

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 050**

51 Int. Cl.:

**C07D 235/18** (2006.01)

**A61K 31/435** (2006.01)

**C07D 401/12** (2006.01)

**C07D 403/12** (2006.01)

**C07D 513/04** (2006.01)

**A61K 31/41** (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 06789433 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 1910385**

54 Título: **Benzotiazoles y tiazolopiridinas como moduladores de la sirtuína**

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:  
**22.11.2013**

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;  
DISCH, JEREMY, S.;  
SALZMANN, THOMAS y  
ARMISTEAD, DAVID**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 431 050 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

Benzotiazoles y tiazolopiridinas como moduladores de la sirtuína

## Antecedentes

5 La familia de genes de regulador de información silenciosa (SIR) representa un grupo de genes altamente conservado presente en los genomas de organismos en intervalos que van desde arqueobacterias hasta una variedad de eucariotas (Frye, 2000). Las proteínas SIR codificadas están involucradas en diversos procesos, desde la regulación de silenciamiento de genes hasta la reparación de ADN. Las proteínas codificadas por miembros de la familia de genes SIR muestran una alta conservación de secuencia en un dominio nuclear de 250 aminoácidos. Un gen de esta familia bien caracterizado es el SIR2 de *S. cerevisiae*, el cual está involucrado en el silenciamiento del locus HM que contiene información que especifica el tipo de apareamiento de la levadura, los efectos de la posición del telómero y el envejecimiento celular (Guarente, 1999; Kaeberlein y col., 1999; Shore, 2000). La proteína Sir2 de la levadura pertenece a una familia de histona desacetilasas (revisadas en Guarente, 2000, Shore, 2000). La homóloga de Sir2, CobB, en *Salmonella typhimurium*, funciona como una dependiente de NAD (nicotinamida adenina dinucleótido)-ADP – ribosil transferasa, (Tsang y Escalante-Semerena, 1998).

15 La proteína Sir2 es una desacetilasa de clase III que usa NAD como un cosustrato (Imai y col., 2000; Moazed, 2001; Smith y col., 2000; Tanner y col., 2000; Tanny y Moazed, 2001). A diferencia de otras desacetilasas, muchas de las cuales están involucradas en el silenciamiento de genes, Sir2 no es sensible a los inhibidores de desacetilasas de clase I y de clase II, como la tricostatina A (TSA) (Imai y col., 2000; Landry y col., 2000a; Smith y col., 2000).

20 La desacetilación de la acetil-lisina por Sir2 está estrechamente acoplada a la hidrólisis de NAD, produciendo nicotinamida y un nuevo compuesto de acetil-ADP ribosa (Tanner y col., 2000; Landry y col., 2000b; Tanny y Moazed, 2001). La actividad desacetilasa dependiente de NAD de Sir2 es esencial por sus funciones, las cuales pueden conectar su papel biológico con el metabolismo celular en la levadura (Guarente, 2000; Imai y col., 2000; Un y col., 2000; Smith y col., 2000). Los homólogos de Sir2 de mamífero tienen actividad histona desacetilasa dependiente de NAD (Imai y col., 2000; Smith y col., 2000). La mayor parte de la información sobre las funciones mediadas por Sir2 proviene de los estudios en levadura (Gartenberg, 2000; Gottschling, 2000).

Estudios bioquímicos han mostrado que Sir2 puede desacetilar rápidamente las colas amino-terminales de las histonas H3 y H4, dando como resultado la formación de 1-O-acetil-ADP-ribosa y nicotinamida. Cepas con copias adicionales de Sir2 despliegan un silenciamiento de ADN aumentado y una vida útil un 30 % más larga. Recientemente se ha mostrado que copias adicionales del homólogo de SIR2 de *C. elegans*, sir-2.1, y el gen dSir2 de *D. melanogaster* prolongan en gran medida la vida útil en esos organismos. Esto implica que la ruta reguladora dependiente de Sir2 para el envejecimiento se inició en forma temprana en la evolución y se ha conservado bien. Hoy en día, se cree que los genes Sir2 han evolucionado para potenciar la salud de un organismo y su resistencia al estrés para aumentar la oportunidad de sobrevivir a las adversidades.

30 SIRT3 es un homólogo de SIRT1 que se conserva en procariotas y eucariotas (P. Onyango y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 99: 13653–13658 (2002)). La proteína SIRT3 tiene como objetivo las crestas mitocondriales por un dominio único localizado en el extremo N-terminal. SIRT3 tiene actividad proteína desacetilasa dependiente de NAD + y se expresa de forma ubicua, en particular en los tejidos metabólicamente activos. Después de la transferencia a la mitocondria, se cree que SIRT3 se escinde para dar una forma activa más pequeña por una peptidasa de procesamiento matricial mitocondrial. (MPP) (B. Schwer y col., J. Cell Biol. 158: 647–657 (2002)).

40 Se ha sabido desde hace más de 70 años que la restricción calórica mejora la salud y prolonga la vida útil de los mamíferos (Masoro, 2000). La vida útil de levaduras, al igual que el de los metazoarios, se ve prolongado también por intervenciones que semejan restricción calórica, tales como baja glucosa. El descubrimiento de que tanto las moscas como las levaduras que carecen del gen SIR2 no viven más tiempo cuando están sometidas a restricción calórica, evidencia que los genes SIR2 son mediadores de los efectos benéficos sobre la salud de esta dieta (Anderson y col., 2003; Helfand y Rogina, 2004). Además, las mutaciones que reducen la actividad de la ruta dependiente de cAMP (adenosina 3',5'-monofosfato) (PKA) sensible a glucosa de levadura prolongan la vida útil de células tipo salvaje, pero no de cepas sir2 mutantes, lo que muestra que es probable que SIR2 sea un componente clave aguas abajo de la ruta de restricción calórica (Lin y col., 2001).

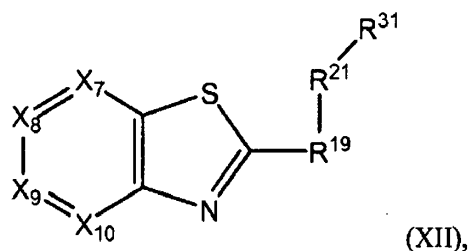
50 Porcu y col., 2005, 2, págs. 94–103, Trends in Pharmacological Sciences, desvela moduladores de la sirtuína conocidos. Los documentos WO2004016600 y WO2006020767 desvelan derivados de benzotiazol que muestran actividad inhibitoria de la quinasa I $\kappa$ B y actividad inhibitoria de la enzima que utiliza ATP, respectivamente.

## Compendio

En la presente memoria se proporcionan compuestos que son moduladores de la sirtuína.

En un aspecto, la invención proporciona un compuesto:

55 A) de la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

cada uno de X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub> y X<sub>10</sub> se selecciona independientemente de N, CR<sup>20</sup>, o CR<sub>1</sub>' , en donde:

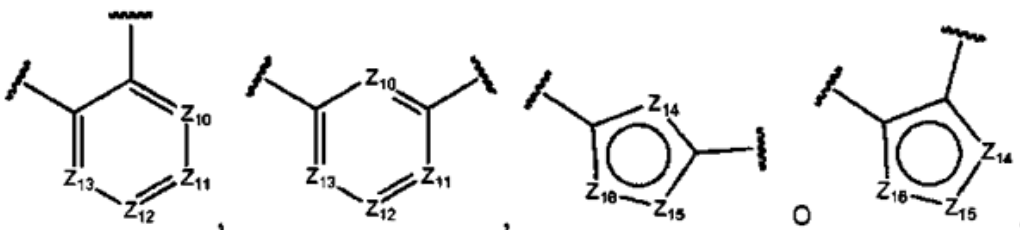
cada R<sup>20</sup> se selecciona independientemente de H o un grupo de solubilización;

5 cada R<sub>1</sub>' se selecciona independientemente de H o alquilo recto o ramificado C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> opcionalmente sustituido;

uno de X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub> y X<sub>10</sub> es N y los otros se seleccionan de CR<sup>20</sup> o CR<sub>1</sub>' ; y

de cero a un R<sup>20</sup> es un grupo de solubilización;

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



10 en donde:

cada Z<sub>10</sub>, Z<sub>11</sub>, Z<sub>12</sub> y Z<sub>13</sub> se selecciona independientemente de 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 de N, NR<sub>1</sub>' , S, O, CR<sup>20</sup>, o CR<sub>1</sub>' , en donde:

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

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

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

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

de cero a un R<sup>20</sup> es un grupo de solubilización;

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

20 R<sup>21</sup> se selecciona de -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>'-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- o -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-;

25 en donde, 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>), -NHC(=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>, en donde:

k es 0, 1 o 2;

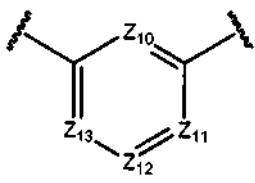
Cada uno de  $R^a-R^d$  es independientemente un grupo alifático, bencilo o aromático; y

$-NR^aR^b$ , tomados juntos, pueden formar también un grupo heterocíclico no aromático;

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

$R^{31}$  se selecciona de un arilo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, o un heteroarilo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, con la condición de que

cuando  $X_7$  es N,  $R^{19}$  es



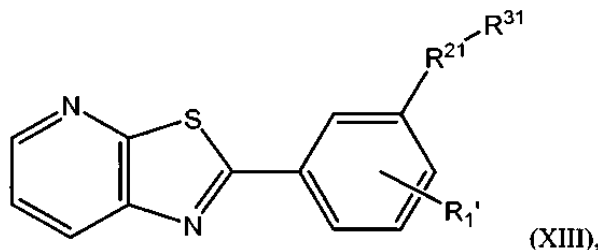
10

y cada uno de  $Z_{10}$ ,  $Z_{11}$ ,  $Z_{12}$  y  $Z_{13}$  se selecciona independientemente de  $CR^{20}$ , o  $CR_1'$ , entonces:

a) por lo menos uno de  $X_8$ ,  $X_9$  o  $X_{10}$  es C-(alquilo recto o ramificado  $C_1-C_3$ ) o C-(grupo de solubilización); o

b) por lo menos uno de  $Z_{10}$ ,  $Z_{11}$ ,  $Z_{12}$  y  $Z_{13}$  es  $CR^{20}$ , en donde  $R^{20}$  es un grupo de solubilización; o

B) de la fórmula:



15

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

$R_1'$  se selecciona de H o alquilo recto o ramificado  $C_1-C_3$  opcionalmente sustituido;

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

25 en donde, cuando  $R_1'$  está sustituido,  $R_1'$  está sustituido con uno o más de  $-OH$ , halógeno,  $-OR^a$ ,  $-OCOR^a$ ,  $-COR^a$ ,  $-C(O)R^a$ ,  $-CN$ ,  $-NO_2$ ,  $-COOH$ ,  $-COOR^a$ ,  $-OCO_2R^a$ ,  $-C(O)NR^aR^b$ ,  $-OC(O)NR^aR^b$ ,  $-SO_3H$ ,  $-NH_2$ ,  $-NHR^a$ ,  $-N(R^aR^b)$ ,  $-COOR^a$ ,  $-CHO$ ,  $-CONH_2$ ,  $-CONHR^a$ ,  $-CON(R^aR^b)$ ,  $-NHCOR^a$ ,  $-NRCOR^a$ ,  $-NHCONH_2$ ,  $-NHCONR^aH$ ,  $-NHCON(R^aR^b)$ ,  $-NR^cCONH_2$ ,  $-NR^cCONR^aH$ ,  $-NR^cCON(R^aR^b)$ ,  $-C(=NH)-NH_2$ ,  $-C(=NH)-NHR^a$ ,  $-C(=NH)-N(R^aR^b)$ ,  $-C(=NR^c)-NH_2$ ,  $-C(=NR^c)-NHR^a$ ,  $-C(=NR^c)-N(R^aR^b)$ ,  $-NH-C(=NH)-NH_2$ ,  $-NH-C(=NH)-NHR^a$ ,  $-NH-C(=NH)-N(R^aR^b)$ ,  $-NH-C(=NR^c)-NH_2$ ,  $-NH-C(=NR^c)-NHR^a$ ,  $-NH-C(=NR^c)-N(R^aR^b)$ ,  $-NR^dH-C(=NH)-NH_2$ ,  $-NR^d-C(=NH)-NHR^a$ ,  $-NR^d-C(=NH)-N(R^aR^b)$ ,  $-NR^d-C(=NR^c)-NH_2$ ,  $-NR^d-C(=NR^c)-NHR^a$ ,  $-NR^d-C(=NR^c)-N(R^aR^b)$ ,  $-NHNH_2$ ,  $-NHNHR^a$ ,  $-NHR^aR^b$ ,  $-SO_2NH_2$ ,  $-SO_2NHR^a$ ,  $-SO_2NR^aR^b$ ,  $-CH=CHR^a$ ,  $-CH=CR^aR^b$ ,  $-CR^c=CR^aR^b$ ,  $-CR^c=CHR^a$ ,  $-CR^c=CR^aR^b$ ,  $-CCR^a$ ,  $-SH$ ,  $-SO_kR^a$ ,  $-S(O)_kOR^a$  y  $-NH-C(=NH)-NH_2$ , en donde

30

k es 0, 1 ó 2;

cada uno de  $R^a-R^d$  es independientemente un grupo alifático, bencilo o aromático; y

35  $-NR^aR^b$ , tomados juntos, pueden formar también un grupo heterocíclico no aromático;

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

de un sustituyente; y

R<sup>31</sup> se selecciona de un arilo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, o un heteroarilo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, con las condiciones de que:

5 cuando R<sup>21</sup> es -NH-C(O)-, R<sup>31</sup> no es furanilo no sustituido, 5-bromofuranilo, fenilo no sustituido, fenilo monosustituido con halo o metilo, 3- o 4-metoxifenilo, 4-butoxifenilo, 4-t-butilfenilo, 3-trifluorometilfenilo, 2-benzoilfenilo, 2- o 4-etoxifenilo, 2,3-, 2,4-, 3,4-, o 3,5-dimetoxifenilo, 3,4,5-trimetoxifenilo, 2,4- o 2,6-difluorofenilo, 3,4-dioximetilen-fenilo, 3,4- o 3,5-dimetilfenilo, 2-cloro-5-bromofenilo, 2-metoxi-5-clorofenilo, quinolinilo no sustituido, tiazolilo sustituido de forma simultánea con metilo y fenilo, o piridinilo sustituido con etoxilo;

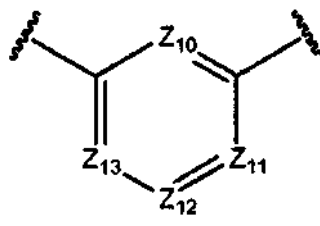
cuando R<sup>21</sup> es -NH-C(O)-CH(CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)-, R<sup>31</sup> no es fenilo no sustituido;

10 cuando R<sup>21</sup> es -NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-, R<sup>31</sup> no es fenilo no sustituido, 3-metilfenilo, 4-clorofenilo, 4-etoxifenilo, 4-fluorofenilo o 4-metoxifenilo;

cuando R<sup>21</sup> es -NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-O-, R<sup>31</sup> no es fenilo no sustituido o 4-clorofenilo; y

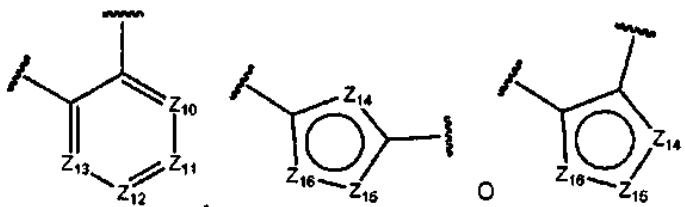
15 cuando R<sup>21</sup> es -NH-S(O)<sub>2</sub>-, R<sup>31</sup> no es 3,4-dioximetilen-fenilo, 2,4,5-trimetilfenilo, 2,4,6-trimetilfenilo, 2,4- o 3,4-dimetilfenilo, 2,5-difluorofenilo, 2,5- o 3,4-dimetoxifenilo, fluorofenilo, 4-clorofenilo, 4-bromofenilo, 4-etilfenilo, 4-metilfenilo, 3-metil-4-metoxifenilo, fenilo no sustituido, piridinilo no sustituido, tienilo no sustituido, tienilo sustituido con cloro o benzotiazolilo sustituido con metilo.

En ciertas realizaciones, en compuestos de la Fórmula Estructural (XII), cuando R<sup>19</sup> es



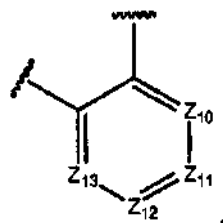
cada uno de Z<sub>10</sub>, Z<sub>11</sub>, Z<sub>12</sub> y Z<sub>13</sub> es CH, y R<sup>21</sup> es -NHC(O)-, R<sup>31</sup> no es un fenilo opcionalmente sustituido.

20 En ciertas realizaciones, R<sup>21</sup> en compuestos de la Fórmula Estructural (XII) es -NH-C(O)- y R<sup>19</sup> se selecciona de:



En ciertas realizaciones, R<sup>19</sup> en compuestos de la Fórmula Estructural (XII) se selecciona de fenilo opcionalmente sustituido, piridilo opcionalmente sustituido, tienilo opcionalmente sustituido o furanilo opcionalmente sustituido.

En ciertas realizaciones, R<sup>19</sup> en compuestos de la Fórmula Estructural (XII) es



25

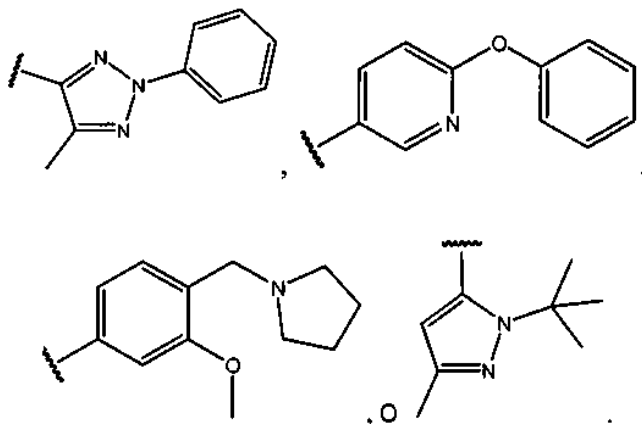
en donde cada uno de Z<sub>10</sub>, Z<sub>11</sub>, Z<sub>12</sub> y Z<sub>13</sub> se selecciona independientemente de CR<sup>20</sup> o CR<sub>1</sub><sup>1</sup>; y

R<sup>21</sup> se selecciona de -NH-C(O)-, -NH-C(O)-CH(CH<sub>3</sub>)-O-, -NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-O- o -NH-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-; y

R<sup>31</sup> se selecciona de un arilo opcionalmente sustituido o un heteroarilo opcionalmente sustituido.

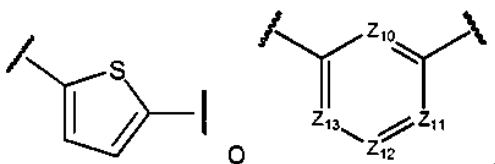
30 En determinadas de tales realizaciones, R<sup>31</sup> en compuestos de la Fórmula Estructural (XII) está opcionalmente sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre -OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>3</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, fenilo, fenoxilo, 3,4-dioximetileno, flúor u otro grupo de solubilización. Ejemplos adecuados de R<sup>31</sup> incluyen quinolinilo no

sustituido, 2,4-dimetoxifenilo, 3,4-dimetoxifenilo, 3,5-dimetoxifenilo, 3,4,5-trimetoxifenilo, 2,3,4-trimetoxifenilo, 2-dimetilaminofenilo, 3-dimetilaminofenilo, 4-dimetilaminofenilo, 3,5-dimetilfenilo, 3,5-difluorofenilo, 3-trifluorometoxifenilo, quinoxalino no sustituido, benzopirimidino no sustituido,



- 5 En determinadas de tales realizaciones,  $R^{31}$  en compuestos de la Fórmula Estructural (XII) no es furanilo sustituido con fenilo.

En ciertas realizaciones,  $R^{19}$  en compuestos de la Fórmula Estructural (XII) se selecciona de

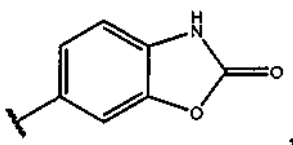


cada uno de  $Z_{10}$ ,  $Z_{11}$ ,  $Z_{12}$  y  $Z_{13}$  se selecciona independientemente de  $CR^{20}$ , o  $CR_1$ ;

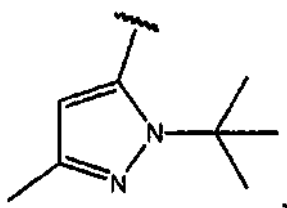
- 10  $R^{21}$  se selecciona de  $-NH-C(O)-$ ,  $-NH-C(O)-CH_2-CH(CH_3)-O-$ ,  $-NH-C(O)-NH-$ ,  $-NH-C(S)-NH-$ ,  $-NH-C(S)-NH-CH_2-$  o  $-NH-S(O)_2-$ ; y

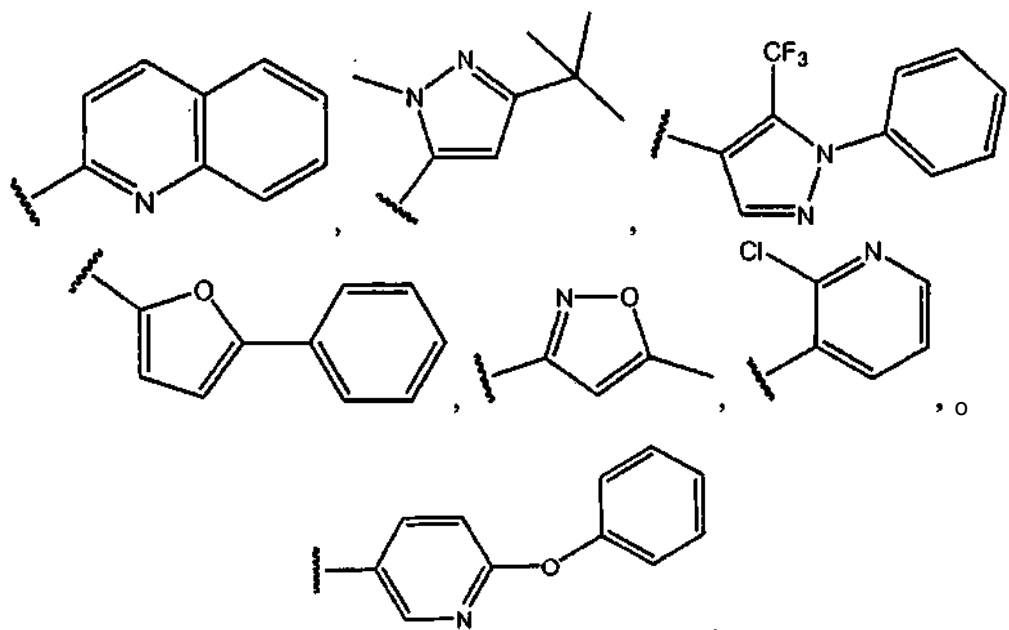
$R^{31}$  se selecciona de un fenilo opcionalmente sustituido, un naftilo opcionalmente sustituido o un heteroarilo opcionalmente sustituido.

- 15 En determinadas de tales realizaciones,  $R^{31}$  en compuestos de la Fórmula Estructural (XII) se selecciona de fenilo, naftilo, pirazolilo, furanilo, tienilo, piridilo, isoxazolilo, benzopirazolilo, benzofuranilo, benzotienilo, quinolinilo, benzisoxazolilo, o



- 20 y  $R^{31}$  está opcionalmente sustituido (por ejemplo, opcionalmente sustituido con hasta tres sustituyentes seleccionados independientemente entre  $-OCH_3$ ,  $-CH_3$ ,  $-N(CH_3)_2$ ,  $-O$ -fenilo u otro grupo de solubilización). Ejemplos adecuados de  $R^{31}$  incluyen fenilo no sustituido, 3-metoxifenilo, 4-metoxifenilo, 2,3 dimetoxifenilo, 2,4-dimetoxifenilo, 2,5-bis(trifluorometil)fenilo, 3,4-dimetoxifenilo, 3,5-dimetoxifenilo, 3,4,5-trimetoxifenilo, 2,3,4-trimetoxifenilo, 2-metoxi-4-metilfenilo, 2-fenoxifenilo, 3-dimetilaminofenilo, 4-dimetilaminofenilo, 2-furanilo no sustituido, 2-tienilo no sustituido,





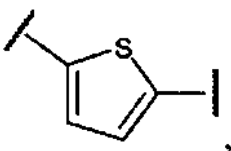
5 En ciertas realizaciones en compuestos de la Fórmula Estructural (XII), se aplica una o más de las siguientes condiciones:

cuando X<sub>8</sub> es N, R<sup>21</sup> es -NH-C(S)-NH-, y R<sup>19</sup> es fenilo, R<sup>31</sup> no es 2-metoxi-5-nitrofenilo, 2-S-metilfenilo o 2-acetilfenilo;

cuando X<sub>8</sub> es N, R<sup>21</sup> es -NH-S(O)<sub>2</sub>-, y R<sup>19</sup> es fenilo, R<sup>31</sup> no es tienilo sustituido con tiadiazolo o 4-metilsulfonilfenilo;

10 cuando X<sub>8</sub> es N, R<sup>21</sup> es -NH-CO-, y R<sup>19</sup> es fenilo, R<sup>31</sup> no es 2,4-difluorofenilo, tienilo sustituido con piridilo, 3,4-diclorofenilo, 4-t-butilfenilo, o 3-benciloxifenilo;

cuando X<sub>9</sub> es N, R<sup>21</sup> es -NH-C(O)- y R<sup>19</sup> es



R<sup>31</sup> no es 2,3,4-trimetoxifenilo o 3,5-dimetoxifenilo; y

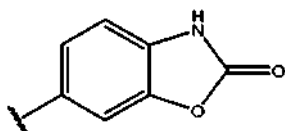
15 cuando X<sub>9</sub> es N, R<sup>21</sup> es -NH-C(O)- y R<sup>19</sup> es fenilo, R<sup>31</sup> no es 3,5-dimetoxifenilo.

En ciertas realizaciones, R<sub>1</sub>' en compuestos de la Fórmula Estructural (XIII) se selecciona de H o alquilo recto o ramificado C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> opcionalmente sustituido;

20 R<sup>21</sup> se selecciona de -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>'-o -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-; y

R<sup>31</sup> se selecciona de un arilo monocíclico o bicíclico o un heteroarilo monocíclico o bicíclico, y comprende un sustituyente de grupo de solubilización.

25 En ciertas realizaciones, R<sup>31</sup> en compuestos de la Fórmula Estructural (XIII) se selecciona de fenilo, naftilo, pirazolilo, furanilo, tienilo, piridilo, isoxazolilo, benzopirazolilo, benzofuranilo, benzotienilo, quinolinilo, benzoisoxazolilo, o

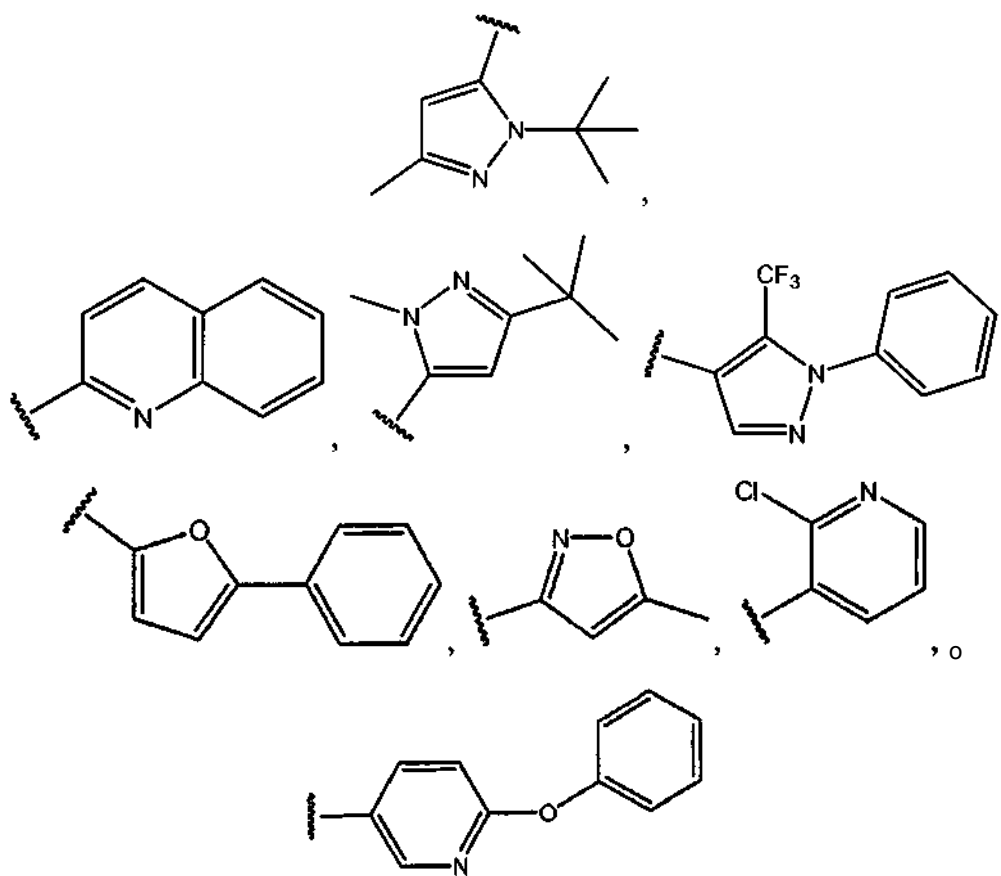


y R<sup>31</sup> está opcionalmente sustituido.

En ciertas realizaciones, R<sup>21</sup> en compuestos de la Fórmula Estructural (XIII) se selecciona de -NH-C(O)-, -NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-O-, -NH-C(O)-NH-, -NH-C(S)-NH-, -NH-C(S)-NH-CH<sub>2</sub>- o -NH-S(O)<sub>2</sub>-; y

5 R<sup>31</sup> se selecciona de un fenilo opcionalmente sustituido, un naftilo opcionalmente sustituido o un heteroarilo opcionalmente sustituido.

En determinadas de tales realizaciones en compuestos de la Fórmula Estructural (XIII), particularmente cuando R<sup>21</sup> es -NH-C(O)-, R<sup>31</sup> se selecciona de R<sup>31</sup> se selecciona de fenilo no sustituido, 3-metoxifenilo, 4-metoxifenilo, 2,3-dimetoxifenilo, 2,4-dimetoxifenilo, 2,5-bis(trifluorometil)fenilo, 3,4-dimetoxifenilo, 3,5-dimetoxifenilo, 3,4,5-trimetoxifenilo, 2,3,4-trimetoxifenilo, 2-metoxi-4-metilfenilo, 2-fenoxifenilo, 3-dimetilaminofenilo, 4-dimetilami-  
10 nofenilo, 2-furanilo no sustituido, 2-tienilo no sustituido,



15 Se proporcionan también composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos de las Fórmulas (XII) - (XIII) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En otro aspecto, la invención proporciona compuestos moduladores de la sirtuina para su uso en terapia, o composiciones que comprenden compuestos moduladores de la sirtuina. En ciertas realizaciones, los compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse en una  
20 variedad de aplicaciones terapéuticas, incluyendo, por ejemplo, aumentar la vida útil de una célula y tratar y/o prevenir una amplia variedad de enfermedades y trastornos, incluyendo, por ejemplo, enfermedades o trastornos relacionados con el envejecimiento o el estrés, la diabetes, la obesidad, enfermedades neurodegenerativas, neuropatías inducidas por quimioterapia, neuropatías asociadas a un acontecimiento isquémico, enfermedades y/o trastornos oculares, enfermedad cardiovascular, trastornos de la coagulación de la sangre, inflamaciones y/o crisis vasomotoras, etc. Los compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse también para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto que pudiera beneficiarse de una actividad mitocondrial aumentada, para potenciar el desempeño muscular, para aumentar los niveles de ATP en los músculos o para el tratamiento o la prevención de daños en el tejido muscular asociados a hipoxia o isquemia. En otras realizaciones, los compuestos moduladores de la sirtuina que disminuyen el nivel y/o la actividad de una  
25 proteína sirtuina pueden usarse para una variedad de aplicaciones terapéuticas incluyendo, por ejemplo, aumentar la sensibilidad celular al estrés, aumentar la apoptosis, tratamiento del cáncer, estimulación del apetito, y/o estimulación de la ganancia de peso, etc. Tal como se describirá más adelante, los métodos comprenden la administración a un sujeto que lo necesite, de una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto modulador  
30



de la sirtuína.

En ciertos aspectos, los compuestos moduladores de la sirtuína pueden administrarse solos o en combinación con otros compuestos, incluyendo otros compuestos moduladores de la sirtuína u otros agentes terapéuticos.

### Breve descripción de las figuras

- 5 La figura 1 muestra una representación esquemática del ensayo de ATP celular que se describe en el ejemplo 5.

La figura 2 muestra una curva dosis–respuesta para los niveles de ATP en las células siguiendo el tratamiento con resveratrol.

### Descripción detallada

#### 1. Definiciones

- 10 Tal como se usan en la presente memoria, las siguientes expresiones y frases deben tener los significados que se exponen más adelante. A menos que se defina de otra forma, todas las expresiones técnicas y científicas que se usan en la presente memoria tienen el mismo significado con el que las entendería comúnmente un experto en la técnica.

- 15 Las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

- 20 La expresión “agente” se usa en la presente memoria para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica (tal como un ácido nucleico, un anticuerpo, una proteína o una porción de la misma, por ejemplo, un péptido) o un extracto hecho de materiales biológicos tales como células o tejidos de bacterias, plantas, hongos o animales (en particular mamíferos). La actividad de tales agentes puede convertirlos en un “agente terapéutico” adecuado, que es una sustancia (o sustancias) biológica, fisiológica o farmacológicamente activa que actúa en forma local o sistémica en un sujeto.

- 25 La expresión “biodisponible” cuando hace referencia a un compuesto se reconoce en la técnica, y hace referencia a una forma de un compuesto que permite que el mismo, o una porción de la cantidad de compuesto administrado, sea absorbida por, incorporada a, o se encuentre de otra forma fisiológicamente disponible para un sujeto o paciente al cual le se administra.

- 30 “Porción biológicamente activa de una sirtuína” hace referencia a una porción de una proteína sirtuína que tiene una actividad biológica, tal como la capacidad de desacetilar. Porciones biológicamente activas de una sirtuína pueden comprender el dominio nuclear de sirtuínas. Porciones biológicamente activas de SIRT1 que tienen el n.º de Acceso de GenBank NP\_036370 que comprenden el NAD + dominio de enlace y el dominio de enlace de sustrato, por ejemplo, pueden incluir, sin limitaciones, aminoácidos 62–293 de n.º de Acceso de GenBank NP\_036370 que se codifican por nucleótidos 237 a 932 de n.º de Acceso de GenBank NM\_012238. Por lo tanto, se hace referencia a veces a esta región como el dominio nuclear. Otras porciones biológicamente activas de SIRT1, a las que también se hace referencia a veces como dominios nucleares, incluyen los aminoácidos alrededor de 261 a 447 de n.º de Acceso de GenBank NP\_036370 que se codifican por los nucleótidos 834 a 1.394 de n.º de Acceso de GenBank NP\_036370 que se codifican por los nucleótidos 777 a 1.532 de n.º de Acceso de GenBank NM\_012238; o alrededor de los aminoácidos 254 a 495 de n.º de Acceso de GenBank NP\_036370 que se codifican por los nucleótidos 813 a 1.538 de n.º de Acceso de GenBank NM\_012238.

- 40 La expresión “animales de compañía” hace referencia a perros y gatos. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “perro(s)” indica cualquier miembro de la especie *Canis familiaris*, de la cual existe un gran número de razas diferentes. La expresión “gato(s)” hace referencia a un animal felino incluyendo gatos domésticos y otros miembros de la familia Felidae, género Felis.

Las expresiones “comprender” y “comprendiendo” se usan en el sentido inclusivo, abierto, lo que significa que pueden incluirse elementos adicionales.

- 45 La expresión “residuo conservado” hace referencia a un aminoácido que es un miembro de un grupo de aminoácidos que tienen ciertas propiedades comunes. La expresión “sustitución de aminoácido conservativa” hace referencia a la sustitución (conceptualmente o de otro modo) de un aminoácido de un grupo de este tipo con un aminoácido diferente del mismo grupo. Una forma funcional de definir propiedades comunes entre aminoácidos individuales es analizar las frecuencias normalizadas de cambios de aminoácido entre proteínas correspondientes de organismos homólogos (Schulz, G. E. y R. H. Schirmer., *Principles of Protein Structure*, Springer–Verlag). De acuerdo con tales análisis, pueden definirse grupos de aminoácidos en los que los aminoácidos dentro de un grupo se intercambian de forma preferente entre sí, y por lo tanto se asemejan uno a otro en la mayor medida en su impacto sobre la estructura proteica global (Schulz, G. E. y R. H. Schirmer, *Principles of Protein Structure*, Springer–Verlag). Un ejemplo de un conjunto de grupos de aminoácidos definidos de la presente forma incluyen: (i) un grupo cargado, que consiste en Glu y Asp, Lys, Arg y His, (ii) un grupo cargado positivamente, que consiste en Lys, Arg y His, (iii) a un

- grupo cargado negativamente, que consiste en Glu y Asp, (iv) un grupo aromático, que consiste en Phe, Tyr y Trp, (v) un grupo de anillo de nitrógeno, que consiste en His y Trp, (vi) un grupo no polar alifático grande, que consiste en Val, Leu y Ile, (vii) un grupo ligeramente polar, que consiste en Met y Cys, (viii) un grupo de residuo pequeño, que consiste en Ser, Thr, Asp, Asn, Gly, Ala, Glu, Gln y Pro, (ix) un grupo alifático que consiste en Val, Leu, Ile, Met y Cys, y (x) un grupo hidroxilo pequeño que consiste en Ser y Thr.
- 5 “Diabetes” hace referencia a una glucosa en sangre elevada o cetoacidosis, así como también a anomalías metabólicas generales, crónicas, resultantes de un estado prolongado de glucosa en sangre elevada o de una disminución a la tolerancia a la glucosa. “Diabetes” comprende tanto el Tipo I como el Tipo II (Diabetes Mellitus no dependiente de la insulina o NIDDM) de las formas de la enfermedad. Los factores de riesgo para la diabetes incluyen los siguientes factores: medidas de cintura de más de 101,6 cm para los hombres u 88,9 cm para las mujeres, presión arterial de 130/85 mmHg o mayor; triglicéridos por encima de 150 mg/dl, glicemia en ayunas mayor de 100 mg/dl o lipoproteínas de alta densidad menores de 40 mg/dl en hombres o de 50 mg/dl en mujeres.
- 10 Un “activador directo” de una sirtuina es una molécula que activa una sirtuina enlazándose a la misma. Un “inhibidor directo” de una sirtuina es una molécula que inhibe una sirtuina enlazándose a la misma.
- 15 La expresión “DE<sub>50</sub>” se reconoce en la técnica. En ciertas realizaciones, “DE<sub>50</sub>” significa la dosis de un fármaco que produce 50 % de su máxima respuesta o efecto, o como alternativa, la dosis que produce una respuesta predeterminada en el 50 % de los sujetos de prueba o preparaciones. La expresión “DL<sub>50</sub>” se reconoce en la técnica. En ciertas realizaciones, DL<sub>50</sub> significa la dosis de un fármaco que es letal en el 50 % de los sujetos de prueba. La expresión “índice terapéutico” es una expresión reconocida en la técnica que hace referencia al índice terapéutico de un fármaco, definido como DL<sub>50</sub>/DE<sub>50</sub>.
- 20 La expresión “hiperinsulinemia” hace referencia a un estado en un individuo en el cual el nivel de insulina en la sangre es mayor que el normal.
- La expresión “incluyendo” se usa para significar “incluyendo pero no limitado a”. “Incluyendo” e “incluyendo pero no limitado a” se usan en forma intercambiable.
- 25 La expresión “resistencia a la insulina” hace referencia a un estado en el cual una cantidad normal de insulina produce una respuesta biológica inferior a la normal en relación con la respuesta biológica en un sujeto que no tiene resistencia a la insulina.
- Un “trastorno insulino-resistente”, tal como se analiza en la presente memoria, hace referencia a cualquier enfermedad o estado que sea causado o al que contribuya la resistencia a la insulina. Los ejemplos incluyen:
- 30 diabetes, obesidad, síndrome metabólico, síndromes resistentes a la insulina, síndrome X, resistencia a la insulina, alta presión sanguínea, hipertensión, alto colesterol en sangre, dislipidemia, hiperlipidemia, dislipidemia, enfermedades ateroscleróticas incluyendo ataque súbito, enfermedad de las arterias coronarias o infarto de miocardio, hiperglicemia, hiperinsulinemia y/o hiperproinsulinemia, tolerancia a la glucosa deteriorada, liberación de insulina retardada, complicaciones diabéticas, incluyendo enfermedad cardíaca coronaria, angina de pecho, insuficiencia cardíaca congestiva, infarto, funciones cognitivas en demencia, retinopatía, neuropatía periférica, nefropatía, glomerulonefritis, glomerulosclerosis, síndrome nefrótico, nefroesclerosis hipertensiva, algunos tipos de cáncer (tales como cáncer de endometrio, senos, próstata y colon), complicaciones del embarazo, pobre salud reproductiva femenina (tales como irregularidades de la menstruación, infertilidad, ovulación irregular, síndrome de ovario poliquístico (PCOS)), lipodistrofia, trastornos relacionados con el colesterol, tales como piedras en la vesícula biliar, colecistitis y colelitiasis, gota, apnea del sueño obstructiva y problemas respiratorios, osteoartritis, y prevención y tratamiento de pérdidas óseas, por ejemplo, osteoporosis.
- 35 40 La expresión “animal de granja” hace referencia a cuadrúpedos domesticados incluyendo aquellos criados por su carne y varios subproductos, por ejemplo, un animal bovino incluyendo reses y otros miembros del género Bos, un animal porcino incluyendo cerdos domésticos y otros miembros del género Sus, un animal ovino incluyendo ovejas y otros miembros del género Ovis, cabras domésticas y otros miembros del género Capra, cuadrúpedos domesticados criados para tareas especializada, tales como para usarse como una bestia de carga, por ejemplo, un animal equino incluyendo caballos domésticos y otros miembros de la familia Equidae, género Equus.
- 45 La expresión “mamífero” se conoce en la técnica, y los mamíferos a modo de ejemplo incluyen humanos, primates, animal de granja (incluyendo bovinos, porcinos, etc.), animales de compañía (por ejemplo, caninos, felinos, etc.) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas).
- 50 La expresión “que se produce de manera natural” cuando hace referencia a un compuesto significa un compuesto que se encuentra en una forma, p. ej., una composición, en donde este puede encontrarse de manera natural. Por ejemplo, debido a que el resveratrol puede encontrarse en el vino tinto, se encuentra presente en el vino tinto en una forma que se produce de manera natural. Un compuesto no se encuentra en una forma que se produce de manera natural si, p. ej., el compuesto se ha purificado y separado de por lo menos alguna de las otras moléculas que se encuentran con el compuesto en la naturaleza.
- 55 Un “compuesto que se produce de manera natural” hace referencia a un compuesto que puede encontrarse en la

naturaleza, es decir, un compuesto que no ha sido diseñado por el hombre. Un compuesto que se produce de manera natural puede haber sido fabricado por el hombre o por la naturaleza. Un “compuesto que se produce de manera natural” hace referencia a un compuesto que puede encontrarse en la naturaleza, es decir, un compuesto que no ha sido diseñado por el hombre. Un compuesto que se produce de manera natural puede haber sido fabricado por el hombre o por la naturaleza. Por ejemplo, el resveratrol es un compuesto que se produce de manera natural. Un “compuesto que se produce de manera no natural” es un compuesto cuya existencia no se conoce en la naturaleza o que no se produce en la naturaleza.

Individuos “obesos” o individuos que sufren de obesidad son, en general, individuos que tienen un índice de masa corporal (IMC) de por lo menos 25 o mayor. La obesidad puede estar o no asociada con la resistencia a la insulina. Las expresiones “administración parenteral” y “administrado parenteralmente” se reconocen en la técnica y hacen referencia a modos de administración diferentes a la administración tópica o entérica, usualmente por inyección, incluyendo, sin limitarse a, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intra-capsular, intra-orbital, intra-cardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, sub-cuticular, intra-articular, subcapsular, sub-aracnoidea, intra-espinal, o inyección intra-esternal e infusión.

Un “paciente”, “sujeto”, “individuo” o “huésped” hace referencia a un animal o bien humano o bien no humano.

La expresión “idéntico en porcentaje” hace referencia a una identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos nucleótido secuencias. Cada identidad puede determinarse comparando una posición en cada secuencia que puede alinearse para fines de comparación. Cuando una posición equivalente en las secuencias comparadas se ocupa por el mismo aminoácido o base, entonces las moléculas son idénticas en esa posición; cuando el sitio equivalente ocupado por el mismo residuo de aminoácido o uno similar (p. ej., similar en cuanto a su naturaleza estérica y/o electrónica), entonces puede hacerse referencia a las moléculas como homólogas (similares) en esa posición. La expresión como un porcentaje de homología, similitud, o identidad hace referencia a una función del número de aminoácidos idénticos o similares en posiciones compartidas por las secuencias comparadas. La expresión como un porcentaje de homología, similitud, o identidad hace referencia a una función del número de aminoácidos idénticos o similares en posiciones compartidas por las secuencias comparadas. Varios algoritmos y/o programas de alineamiento pueden usarse, incluyendo FASTA, BLAST, o ENTREZ. FASTA y BLAST están disponibles como una parte del paquete de análisis de secuencias GCG (Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), y puede usarse con, p. ej., ajustes por defecto. ENTREZ está disponible a través del National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD. En una realización, la identidad en porcentaje de dos secuencias puede determinarse por el programa GCG con un peso de hueco de 1, p. ej., cada hueco de aminoácido se pondera como si fuera una sola no correspondencia de aminoácido o nucleótido entre las dos secuencias.

Otras técnicas de alineamiento se describen en *Methods in Enzymology*, vol. 266: *Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis* (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., una división de Harcourt Brace & Co., San Diego, California, EE. UU. Preferiblemente, un programa de alineamiento que permita huecos en la secuencia se utiliza para alinear las secuencias. El Smith-Waterman es un tipo de algoritmo que permite huecos en los alineamientos de secuencias. Véase *Meth. Mol. Biol.* 70: 173-187 (1997). También puede utilizarse el programa GAP, que usa el método de alineamiento de Needleman y Wunsch para alinear secuencias. Una estrategia de búsqueda alternativa usa software MPSRCH, que se ejecuta en un ordenador MASPARG. MPSRCH usa un algoritmo de Smith-Waterman para puntuar secuencias en un ordenador masivamente paralelo. El presente enfoque mejora la capacidad de escoger correspondencias vagamente relacionadas, y es especialmente tolerante con los huecos pequeños y los errores de secuencia de nucleótidos. Pueden usarse secuencias de aminoácidos codificadas por ácido nucleico para buscarlas en bases de datos tanto de proteínas como de ADN.

La expresión “portador farmacéuticamente aceptable” se reconoce en la técnica y hace referencia a un material farmacéuticamente aceptable, composición o vehículo, tal como un diluyente, excipiente, solvente o material de encapsulado o una carga líquida o sólida, involucrado en llevar o transportar cualquier composición o componente objeto de ésta. Cada portador debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con la composición objeto y sus componentes y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen; (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sucrosa, (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata, (3) celulosa y sus derivados, tales como carboxi-metilcelulosa, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorios; aceites, tales como aceite de maní, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, 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 de tamponamiento tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tampón de fosfato y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas usadas en las formulaciones farmacéuticas.

Las expresiones “polinucleótido”, y “ácido nucleico” se usan de forma intercambiable. Estas hacen referencia a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, o bien desoxirribonucleótidos o bien ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional, y puede realizar

cualquier función, conocida o desconocida. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: regiones codificantes o no codificantes de un gen o fragmento de gen, loci (locus) definidos a partir de análisis de enlace, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico, y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tal como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si se encuentran presentes, las modificaciones a la estructura de nucleótidos pueden impartirse antes o después del montaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente, tal como por conjugación con un componente de marcado. La expresión polinucleótido “recombinante” significa un polinucleótido de origen genómico, ADNc, semisintético, o sintético que o bien no se produce en la naturaleza o bien está unido a otro polinucleótido en una disposición no natural.

La expresión “tratamiento “profiláctico” o “terapéutico” se reconoce en la técnica y hace referencia a la administración de un fármaco a un huésped. Si este se administra antes de la manifestación clínica del estado no deseado (por ejemplo, enfermedad u otro estado no deseado del animal huésped) entonces el tratamiento es profiláctico, es decir, protege al huésped contra el desarrollo de un estado no deseado, mientras que si se administra después de la manifestación del estado no deseado, el tratamiento es terapéutico (es decir, se pretende que este disminuya, aminore o mantenga el estado no deseado existente o los efectos secundarios derivados del mismo).

La expresión “grupo protector” se reconoce en la técnica y hace referencia a sustituyentes temporales que protegen un grupo funcional potencialmente reactivo frente a transformaciones químicas no deseadas. Los ejemplos de tales grupos protectores incluyen ésteres de ácido carboxílicos, silil éteres de alcoholes, y acetales y cetales de aldehídos y cetonas, respectivamente. El campo de la química de los 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”, en referencia a una composición, hace referencia a una composición que no contiene un pirógeno en una cantidad que pueda conducir a un efecto adverso (por ejemplo, irritación, fiebre, inflamación, diarrea, insuficiencia respiratoria, choque endotóxico, etc.) en un sujeto al cual se le ha administrado la solución. Por ejemplo, se pretende que la expresión comprenda composiciones que están libres, o sustancialmente libres de, una endotoxina, tal como, por ejemplo, un lipopolisacárido (LPS).

“Vida útil replicativa” de una célula se refiere al número de células hijas producidas por una “célula madre” individual. “Envejecimiento cronológico” o “vida útil cronológica”, por otra parte, se refiere al tiempo que una población de células que no se dividen permanece viable cuando está desprovista de nutrientes. “Aumentar la vida útil de una célula” o “extender la vida útil de una célula”, tal como se aplica a células u organismos, hace referencia a aumentar el número de células hijas producidas por una célula; aumentar la capacidad de las células o de los organismos para hacer frente al estrés y para combatir daños, p. ej., al ADN, proteínas; y/o aumentar la capacidad de las células u organismos para sobrevivir y existir en estado viviente por más tiempo bajo una condición particular, por ejemplo, estrés (por ejemplo, choque térmico, estrés osmótico, radiación de alta energía, estrés químicamente inducido, daño al ADN, inadecuado nivel salino, inadecuado nivel de nitrógeno, o inadecuado nivel de nutrientes). La vida útil puede ser aumentada en por lo menos alrededor de 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o entre 20 % y 70 %, 30 % y 60 %, 40 % y 60 % o más usando los métodos que se describen en la presente memoria.

“Compuesto activador de la sirtuína” hace referencia a un compuesto que aumenta el nivel de una proteína sirtuína y/o que aumenta por lo menos una actividad de una proteína sirtuína. En una realización a modo de ejemplo, un compuesto activador de la sirtuína puede aumentar por lo menos una actividad biológica de una proteína sirtuína en alrededor del 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 % o más. Las actividades biológicas a modo de ejemplo de las proteínas sirtuína incluyen la desacetilación, por ejemplo, de histonas y p53; extensión de la vida útil; aumento de la actividad genómica, silenciamiento de la transcripción, y control de la segregación de proteínas oxidadas entre las células madre e hija.

“Compuesto inhibidor de la sirtuína” se refiere a un compuesto que disminuye el nivel de una proteína sirtuína y/o disminuye por lo menos una actividad de una proteína sirtuína. En una realización a modo de ejemplo, un compuesto inhibidor de la sirtuína puede disminuir por lo menos una actividad biológica de una proteína sirtuína en por lo menos alrededor de 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 % o más. Las actividades biológicas a modo de ejemplo de las proteínas sirtuína incluyen la desacetilación, por ejemplo, de histonas y p53; extensión de la vida útil; aumento de la actividad genómica, silenciamiento de la transcripción, y control de la segregación de proteínas oxidadas entre las células madre e hija.

“Compuesto modulador de la sirtuína” hace referencia a un compuesto de Fórmulas (I)–(XXVIII) tal como se describen en la presente memoria. En realizaciones a modo de ejemplo, un compuesto modulador de la sirtuína puede o bien regular por incremento arriba (por ejemplo, activar o estimular) o bien regular por disminución (por ejemplo, inhibir o suprimir) o cambiar de cualquier otra forma una propiedad funcional o una actividad biológica de una proteína sirtuína. Los compuestos moduladores de la sirtuína pueden actuar modulando una proteína sirtuína o bien directamente o bien indirectamente. En ciertas realizaciones, un compuesto modulador de la sirtuína puede ser un compuesto activador de la sirtuína o un compuesto inhibidor de la sirtuína.

“Proteína sirtuina” hace referencia a un miembro de la familia proteína desacetilasa, o preferiblemente a la familia Sir2 que incluye Sir2 de levadura (n.º de Acceso de GenBank P53685), Sir-2.1 de *C. elegans* (n.º de Acceso de GenBank NP\_501912) y SIRT1 humana (n.º de Acceso de GenBank NM\_012238 y NP\_036370 (o AF083106)) y SIRT2 (n.º de Acceso de GenBank NM\_012237, NM\_03Q593, NP\_036369, NP\_085096 y AF083107). Otros miembros de la familia incluyen los cuatro genes adicionales de tipo Sir2 de levadura denominados “genes HST” (homólogos de Sir dos) HST1, HST2, HST3 y HST4, y los otros cinco homólogos humanos hSIRT3, hSIRT4, hSIRT5, hSIRT6 y hSIRT7 (Brachmann y col. (1995) *Genes Dev.* 9:2888 y Frye y col. (1999) *BBRC* 260:273). Sirtuinas preferidas son aquellas que comparten más similitudes con SIRT1, es decir, SIRT1, y/o Sir2 que con SIRT2, tales como aquellos miembros que tienen por lo menos parte de la secuencia N-terminal presente en SIRT1 y ausente en SIRT2, tal como la tiene SIRT3.

“Proteína SIRT1” hace referencia a un miembro de la familia Sir2 de las sirtuina desacetilasas. En una realización, una proteína SIRT1 incluye Sir2 de levadura (n.º de Acceso de GenBank P53685), Sir-2.1 de *C. elegans* (n.º de Acceso de GenBank NP\_501912), SIRT1 humana (n.º de Acceso de GenBank NM\_012238 o NP\_036370 (o AF083106)) y proteínas SIRT2 humana (n.º de Acceso de GenBank NM\_012237, NM\_030593, NP\_036369, NP\_085096, o AF083107), y equivalentes o fragmentos de éstos. 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 que se expone en los n.º de Acceso de GenBank NP\_036370, NP\_501912, NP\_085096, NP\_036369, o P53685. Las proteínas SIRT1 incluyen polipéptidos que comprenden toda o una porción de una secuencia de aminoácidos que se expone en los n.º de Acceso de GenBank NP\_036370, NP\_501912, NP\_085096, NP\_036369, o P53685; la secuencia de aminoácidos que se expone en los n.º de Acceso de GenBank NP\_036370, NP\_501912, NP\_085096, NP\_036369, o P53685 con desde 1 hasta alrededor de 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 75 o más sustituciones conservadoras de aminoácidos; una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a los n.º de Acceso de GenBank NP\_036370, NP\_501912, NP\_085096, NP\_036369, o P53685, y fragmentos funcionales de estos. Los polipéptidos de la invención también incluyen homólogos (por ejemplo, ortólogos y parálogos), variantes o fragmentos de n.º de Acceso de GenBank NP\_036370, NP\_501912, NP\_085096, NP\_036369, o P53685.

“Proteína SIRT3” hace referencia a un miembro de la familia de proteínas sirtuina desacetilasas y/o a un homólogo de una proteína SIRT1. En una realización, una proteína SIRT3 incluye proteínas SIRT3 humana (n.º de Acceso de GenBank AAH01042, NP\_036371 o NP\_001017524) y SIRT3 de ratón (n.º de Acceso de GenBank NP\_071878), y equivalentes o fragmentos de estos. En otra realización, una proteína SIRT3 incluye un polipéptido que comprende una secuencia consistente en, o que consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos que se expone en los n.º de Acceso de GenBank AAH01042, NP\_036371, NP\_001017524 o NP\_071878. Las proteínas SIRT3 incluyen polipéptidos que comprenden toda o una porción de la secuencia de aminoácidos que se expone en el n.º de Acceso de GenBank AAH01042, NP\_036371, NP\_001017524 o NP\_071878; la secuencia de aminoácidos que se expone en el n.º de Acceso de GenBank AAH01042, NP\_036371, NP\_001017524 o NP\_071878 con desde 1 hasta alrededor de 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 75 o más sustituciones conservadoras de aminoácidos; una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a los n.º de Acceso de GenBank AAH01042, NP\_036371, NP\_001017524 o NP\_071878, y fragmentos funcionales de estos. Los polipéptidos de la invención también incluyen homólogos (por ejemplo, ortólogos y parálogos), variantes o fragmentos de n.º de Acceso de GenBank AAH01042, NP\_036371, NP\_001017524 o NP\_071878. En una realización, una proteína SIRT3 incluye un fragmento de proteína SIRT3 que es producido por escisión con una peptidasa de procesamiento matricial mitocondrial (MPP) y/o una peptidasa intermedia mitocondrial (MIP).

La expresión “sustancialmente homólogo” cuando se usa en conexión con secuencias de aminoácidos, hace referencia a secuencias que son sustancialmente idénticas o similares en secuencia entre sí, dando lugar a una homología de conformación y, por lo tanto, a retención, en un grado útil, de una o más actividades biológicas (incluyendo inmunológicas). No se pretende que la expresión implique una evolución común de las secuencias.

La expresión “sintético” se reconoce en la técnica y hace referencia a la producción por síntesis química o enzimática *in vitro*.

Las expresiones “administración sistémica”, “administrados de manera sistémica”, “administración periférica” y “administrados de manera periférica” se reconocen en la técnica y hacen referencia a la administración de una composición o terapia objeto u otro material distinto de directamente en el sistema nervioso central, de tal forma que la misma entre al sistema del paciente y, por lo tanto, se someta al metabolismo y a otros procesos similares.

La expresión “agente terapéutico” se reconoce en la técnica y hace referencia a cualquier resto químico que sea una sustancia activa biológica, fisiológica o farmacológicamente que actúa de manera local o sistémica en un sujeto. La expresión también significa cualquier sustancia cuyo uso se pretende en el diagnóstico, curación, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades o en el realce de unas condiciones y/o desarrollo físico o mental deseables en un animal o humano.

La expresión “efecto terapéutico” se reconoce en la técnica y hace referencia a un efecto local o sistémico en animales, en particular en mamíferos, y más en particular en humanos, causado por una sustancia farmacológicamente activa. La frase “cantidad terapéuticamente efectiva” significa la cantidad de tal sustancia que

produce algún efecto deseado local o sistémico a una relación razonable de riesgo/ beneficio aplicable a cualquier tratamiento. La cantidad terapéuticamente efectiva de tal sustancia variará dependiendo del sujeto y del estado de enfermedad que se está tratando, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la enfermedad o estado, la forma de administración y similares, que pueden ser rápidamente determinados por un experto en la técnica. Por ejemplo, ciertas composiciones que se describen en la presente memoria pueden administrarse en una cantidad suficiente para producir un efecto deseado a una relación aceptable de riesgo/ beneficio aplicable a tal tratamiento.

“Secuencia regulatoria de transcripción” es un término genérico que se usa a través de la totalidad de la memoria descriptiva para hacer referencia a secuencias de ADN, tal como señales de iniciación, potenciadores y promotores, que inducen o controlan la transcripción de secuencias de codificación de proteínas con las mismas están operativamente vinculadas. En realizaciones preferidas, la transcripción de uno de los genes recombinantes se encuentra bajo el control de una secuencia de promotor (o de otra secuencia regulatoria de transcripción) que controla la expresión del gen recombinante en un tipo celular cuya expresión se pretende. Se entenderá también que el gen recombinante puede encontrarse bajo el control de secuencias regulatorias de transcripción que son las mismas o que son diferentes de las secuencias que controlan la transcripción de las formas que se producen de manera natural de genes tal como se describe en la presente memoria.

“Tratamiento” de un estado o enfermedad hace referencia a curar, así como también a mejorar, por lo menos un síntoma del estado o enfermedad.

Un “vector” es una molécula de ácido nucleico autorreplicante que transfiere una molécula de ácido nucleico insertada en y/o entre células huésped. La expresión incluye vectores que funcionan principalmente para la inserción de una molécula de ácido nucleico en una célula, la 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 ADN o ARN. También se incluyen vectores que proporcionan más de una de las funciones anteriores. Tal como se usa en la presente memoria, “vectores de expresión” se definen como polinucleótidos que, cuando se introducen en una célula huésped apropiada, pueden transcribirse y traducirse en un polipéptido o polipéptidos. Un “sistema de expresión” usualmente connota una célula huésped adecuada compuesta por un vector de expresión que puede funcionar para producir un producto de expresión deseado.

La expresión “deficiencia de la visión” hace referencia a visión disminuida, que a menudo es irreversible o solo reversible parcialmente con el tratamiento (por ejemplo, cirugía). En particular, la deficiencia severa de la visión se denomina “ceguera” o “pérdida de la visión”, lo que hace referencia a una pérdida completa de la visión, una visión peor que 20/200 que no pueda mejorarse con lentes correctivas, o un campo visual de un diámetro de menos de 20 grados (un radio de 10 grados).

## 2. Moduladores de la sirtuína

En un aspecto, la invención proporciona compuestos moduladores de la sirtuína novedosos para el tratamiento y/o la prevención de una amplia variedad de enfermedades y trastornos, incluyendo, por ejemplo, enfermedades o trastornos relacionados con el envejecimiento o al estrés, diabetes, obesidad, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades y trastornos oculares, enfermedad cardiovascular, trastornos de la coagulación de la sangre, inflamación, cáncer y/o crisis vasomotora, etc. Los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden usarse también para el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto que se beneficiaría de una actividad mitocondrial aumentada, para potenciar el desempeño muscular, para aumentar los niveles de ATP en los músculos o para el tratamiento o la prevención del daño al tejido muscular asociado con la hipoxia o isquemia. Otros compuestos descritos en la presente memoria pueden ser adecuados para usarse en una composición farmacéutica y/o uno o más de los métodos descritos en la presente memoria.

En una realización, los compuestos moduladores de la sirtuína de la invención son tal como se define mediante las reivindicaciones:

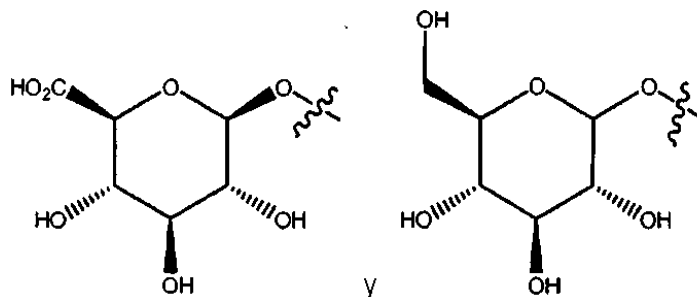
Los compuestos de la invención, incluyendo compuestos novedosos de la invención, pueden usarse también en los métodos que se describen en la presente memoria.

Los compuestos y sales de los mismos que se describen en la presente memoria también incluyen sus hidratos correspondientes (p. ej., hemihidrato, monohidrato, dihidrato, trihidrato, tetrahidrato) y solvatos. En general, un experto pueden seleccionar disolventes adecuados para la preparación de solvatos e hidratos.

Los compuestos y sales de los mismos pueden estar presentes en formas amorfas o cristalinas (incluyendo co-cristalinas y polimórficas).

En los compuestos que se describen anteriormente, los grupos bivalentes descritos como posibles valores para las variables pueden tener cualquier orientación, a condición de que tal orientación dé como resultado una molécula estable. Preferiblemente, no obstante, el lado a la izquierda de un grupo bivalente (p. ej.,  $-NR_1'-C(O)-$ ) está unido a un grupo arileno o heteroarileno bivalente (p. ej.,  $R^{19}$ ) y el lado a la derecha de un grupo bivalente está unido a un grupo arilo monovalente (p. ej.,  $R^{31}$ ).

- 5 Los compuestos moduladores de la sirtuina de la invención que tienen sustituyentes hidroxilo, a menos que se indique otra cosa, pueden formar los metabolitos secundarios relacionados, tal como derivados de fosfato, sulfato, acilo (por ejemplo, acetilo, acilo de ácido graso) y azúcar (por ejemplo, glucuronato, glucosa) (por ejemplo, de grupos hidroxilo), particularmente los derivados de sulfato, acilo y azúcar. Dicho de otra forma, los grupos sustituyentes -OH también incluyen  $-\text{OSO}_3^- \text{M}^+$ , en donde  $\text{M}^+$  es un catión adecuado (preferiblemente  $\text{H}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  o un ión de metal alcalino tal como  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ ) y azúcares tales como



En general, estos grupos pueden escindirse para dar -OH por hidrólisis o por escisión metabólica (por ejemplo, enzimática).

- 10 En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención excluyen una o más de las especies descritas en las tablas 4-6. En determinadas de tales realizaciones, los compuestos de la invención excluyen el compuesto 7.

Los compuestos moduladores de la sirtuina de la invención modulan de forma ventajosa el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina, en particular la actividad desacetilasa de la proteína sirtuina.

- 15 Por separado, o además de las propiedades anteriores, ciertos compuestos moduladores de la sirtuina de la invención no tienen sustancialmente una o más de las siguientes actividades: inhibición de la PI3-quinasa, inhibición de la aldorreductasa, inhibición de la tirosina quinasa, transactivación de la EGFR tirosina quinasa, dilatación coronaria o actividad espasmolítica, a concentraciones del compuesto efectivas para modular la actividad de desacetilación de una proteína sirtuina (por ejemplo, tal como una proteína SIRT1 y/o una proteína SIRT3).

- 20 Un grupo alquilo es un hidrocarburo ramificado o de cadena lineal que está completamente saturado. Típicamente, un grupo alquilo ramificado o de cadena lineal tiene desde 1 hasta alrededor de 20 átomos de carbono, preferiblemente desde 1 hasta alrededor de 10. Los ejemplos de grupos alquilo ramificados y de cadena lineal incluyen metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, pentilo y octilo. También se hace referencia a un grupo alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_4$  ramificado o de cadena lineal como un grupo "alquilo inferior".

- 25 Un grupo alqueno es un hidrocarburo ramificado o de cadena recta que contiene uno o más enlaces dobles. Típicamente, los enlaces dobles no se encuentran en el extremo del grupo alqueno, de tal modo que el enlace doble no es adyacente a otro grupo funcional.

Un grupo alquino es un hidrocarburo ramificado o de cadena recta que contiene uno o más enlaces triples. Típicamente, los enlaces triples no se encuentran en el extremo del grupo alquino, de tal modo que el enlace triple no es adyacente a otro grupo funcional.

- 30 Un anillo (p. ej., anillo de 5 a 7 miembros) o grupo cíclico incluye anillos carbocíclicos y heterocíclicos. Tales anillos pueden ser saturados o insaturados, incluyendo aromáticos. Los anillos heterocíclicos típicamente contienen de 1 a 4 heteroátomos, a pesar de que los átomos de oxígeno y de azufre no pueden ser adyacentes entre sí.

- 35 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, pirroilo, pirazinilo, tiazolilo, oxazolilo y tetrazolilo.

Los grupos aromáticos también incluyen sistemas de anillos aromáticos policíclicos condensados en los cuales un anillo aromático carbocíclico o anillo heteroarilo se condensa con uno o más anillos heteroarilo. Los ejemplos incluyen benzotienilo, benzofurilo, indolilo, quinolinilo, benzotiazol, benzoxazol, bencimidazol, quinolinilo, isoquinolinilo e isoindolilo.

- 40 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 tetrahydrofurilo, tetrahydrotiofenilo, morfolino, tiomorfolino, pirrolidinilo, piperazinilo, piperidinilo y tiazolidinilo, junto a la forma cíclica de los azúcares.

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

- 45 Sustituyentes adecuados en grupo alquilo, alqueno, alquino, arilo heterocíclico no aromático o arilo (carbocíclico y

heteroarilo) son aquellos que no interfieren sustancialmente con la capacidad de los compuestos descritos para tener una o más de las propiedades descritas en la presente memoria. Un sustituyente sustancialmente interfiere con las propiedades de un compuesto cuando la magnitud de las propiedades se ve reducida en más de alrededor de un 50 % en un compuesto con el sustituyente en comparación 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<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>), -NHC(=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>, -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>. Cada uno de R<sup>a</sup>-R<sup>d</sup> es independientemente un grupo alifático, bencilo o aromático, preferiblemente un grupo alquilo, bencílico o arilo. Además, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, tomados juntos, pueden formar también un grupo heterocíclico no aromático. Un grupo heterocíclico no aromático, grupo bencilo o grupo arilo puede tener también un grupo alifático como un sustituyente. Un grupo alifático puede tener también un anillo heterocíclico no aromático, grupo bencilo o arilo como un sustituyente. Un grupo heterocíclico alifático, grupo arilo sustituido o bencilo sustituido puede tener más de un sustituyente.

Combinaciones de sustituyentes y variables contempladas por la presente invención son sólo aquellas que dan como resultado la formación de compuestos estables. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "estable" hace referencia a compuestos que poseen la estabilidad suficiente para permitir la manufactura y que mantienen la integridad del compuesto durante un período de tiempo suficiente para ser útil a los propósitos que se detallan en la presente memoria.

Un grupo donador de enlace de hidrógeno es un grupo funcional que tiene un átomo de hidrógeno de carga parcialmente positiva (p. ej., -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH) o un grupo (p. ej., un éster) que se metaboliza para dar un grupo capaz de donar un enlace de hidrógeno.

Tal como se usa en la presente memoria, un "grupo de solubilización" es un resto que tiene carácter hidrófilo suficiente para mejorar o aumentar la solubilidad en agua del compuesto en el cual está incluido, en comparación con un compuesto análogo que no incluye el grupo. El carácter hidrófilo puede ser logrado por cualquier medio, tal como por la inclusión de grupos funcionales que se ionizan bajo las condiciones de uso para formar restos cargados (por ejemplo, ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, ácidos fosfóricos, aminas, etc.); grupos que incluyen cargas permanentes (por ejemplo, grupos amonio cuaternario); y/o heteroátomos o grupos heteroatómicos (por ejemplo, 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>b</sup>, etc., en donde R<sup>a</sup> se selecciona de hidrógeno, alquilo inferior, cicloalquilo inferior, arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>), fenilnaftilo, bencilo y arilalquilo (C<sub>7</sub>-C<sub>20</sub>), en donde R<sup>a</sup> está opcionalmente sustituido; e y es un entero en el intervalo de 0 a 6), grupos heterocíclicos opcionalmente sustituidos (por ejemplo, -(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>, en donde R<sup>b</sup> se selecciona de un heterociclo monocíclico saturado opcionalmente sustituido, un heterociclo condensado bicíclico saturado opcionalmente sustituido, un espiro-heterociclo bicíclico saturado opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido y un heterociclo no arilo parcialmente sustituido opcionalmente sustituido; y n es un entero en el intervalo de 0 a 2). Debe entenderse que los sustituyentes presentes en R<sup>a</sup> o R<sup>b</sup> no necesitan mejorar o aumentar la solubilidad en agua frente a sus contrapartidas no sustituidas para estar dentro del alcance de la presente definición. Todo lo que se requiere es que dichos sustituyentes no revertan significativamente la mejora en solubilidad en agua proporcionada por el resto no sustituido R<sup>a</sup> o R<sup>b</sup>.

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

En una realización preferida, el grupo de solubilización 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 donde:

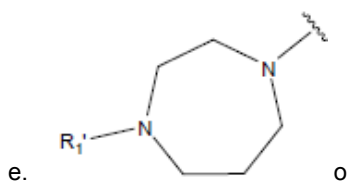
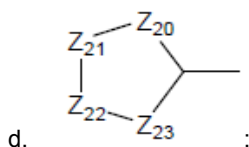
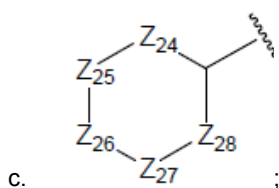
n se selecciona de 0, 1 o 2;

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

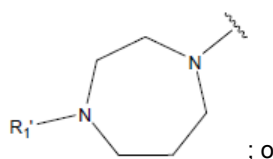
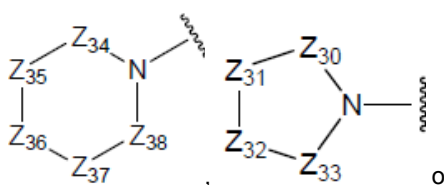
cada R<sup>101</sup> se selecciona independientemente de:

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



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 de 1 a 3 átomos de N adicionales, en donde dicho anillo heteroarilo está sustituido opcionalmente con  $R_1'$ ;

en donde:

cada Z se selecciona independientemente de  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-NR_1'-$ , o  $-C(R^{50})(R^{50})-$ , en donde:

por lo menos tres de  $Z_{20}$ ,  $Z_{21}$ ,  $Z_{22}$ , y  $Z_{23}$  son  $-C(R^{50})(R^{50})-$ ;

por lo menos tres de  $Z_{24}$ ,  $Z_{25}$ ,  $Z_{26}$ ,  $Z_{27}$ , y  $Z_{28}$  son  $-C(R^{50})(R^{50})-$ ;

15 por lo menos cuatro de  $Z_{30}$ ,  $Z_{31}$ ,  $Z_{32}$ , y  $Z_{33}$  son  $-C(R^{50})(R^{50})-$ ; y

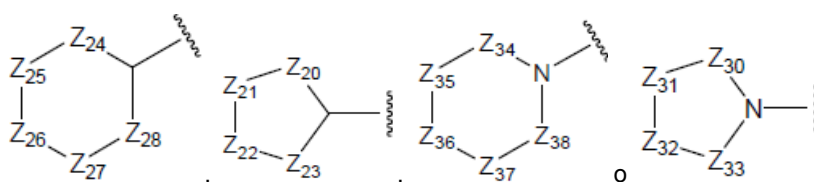
por lo menos cuatro de  $Z_{34}$ ,  $Z_{35}$ ,  $Z_{36}$ ,  $Z_{37}$ , y  $Z_{38}$  son  $-C(R^{50})(R^{50})-$ ;

cada  $R_1'$  se selecciona independientemente de hidrógeno o un alquilo lineal o ramificado  $C_1-C_3$  sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente de halo,  $-CN$ ,  $-OH$ ,  $-OCH_3$ ,  $-NH_2$ ,  $-NH(CH_3)$ ,  $-N(CH_3)_2$ , o  $=O$ ;

20 cada  $R^{50}$  se selecciona independientemente de  $R_1'$ , halo,  $CN$ ,  $OH$ ,  $O-$ (alquilo lineal o ramificado  $C_1-C_4$ ),  $N(R_1')(R_1')$ ,  $=CR_1'$ ,  $SR_1'$ ,  $=NR_1'$ ,  $=NOR_1'$ , o  $=O$ ;

dos cualesquiera  $R^{50}$  no cíclico adecuado se unen opcionalmente entre sí directamente o a través de un puente alquilenos, alquiniлено o alcanodiilideno  $C_1$  a  $C_2$  para producir un anillo espiro o condensado; y

cualquier estructura de anillo,



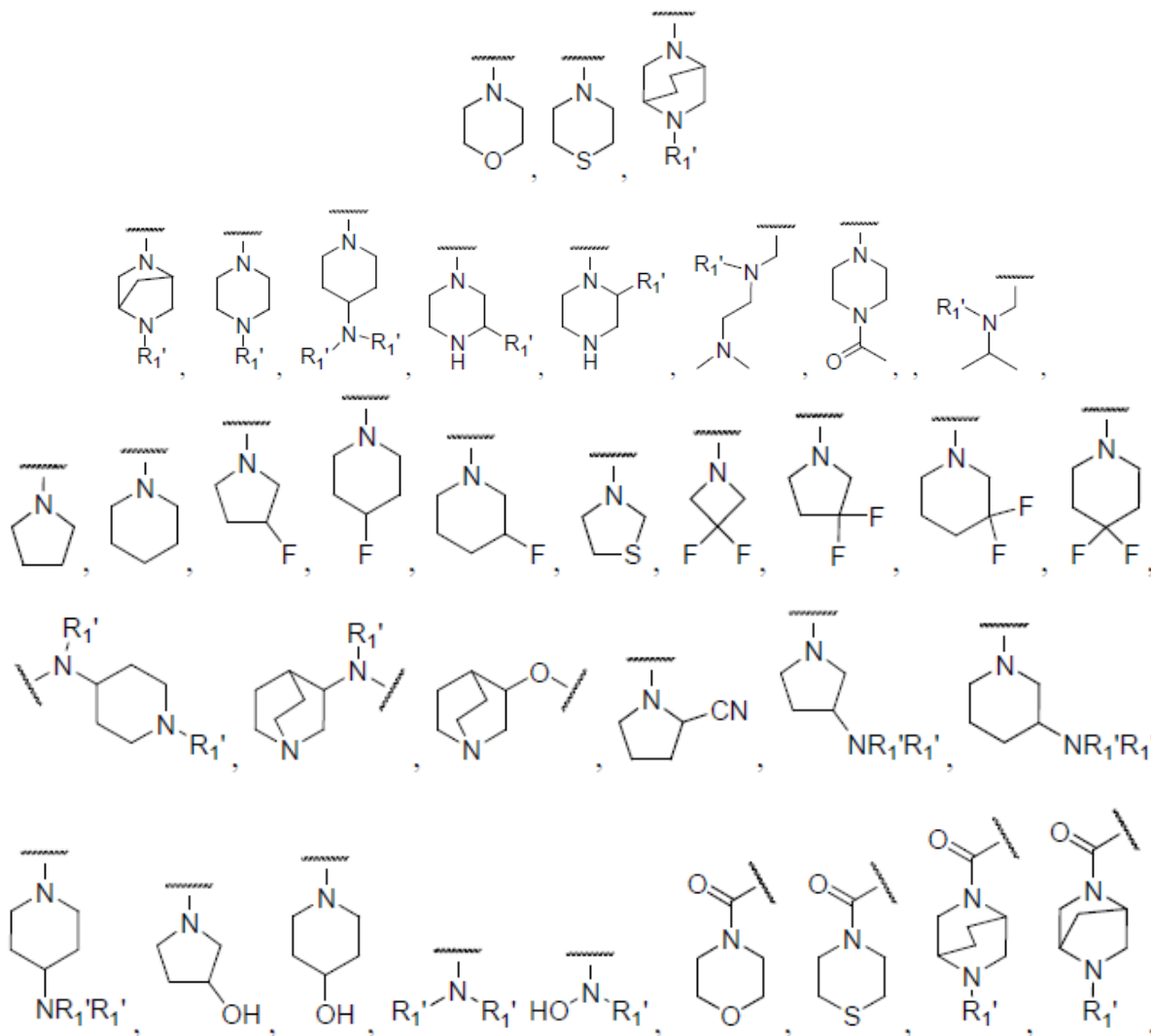
está opcionalmente benzocondensada o condensada con un heteroarilo monocíclico para producir un anillo bicíclico.

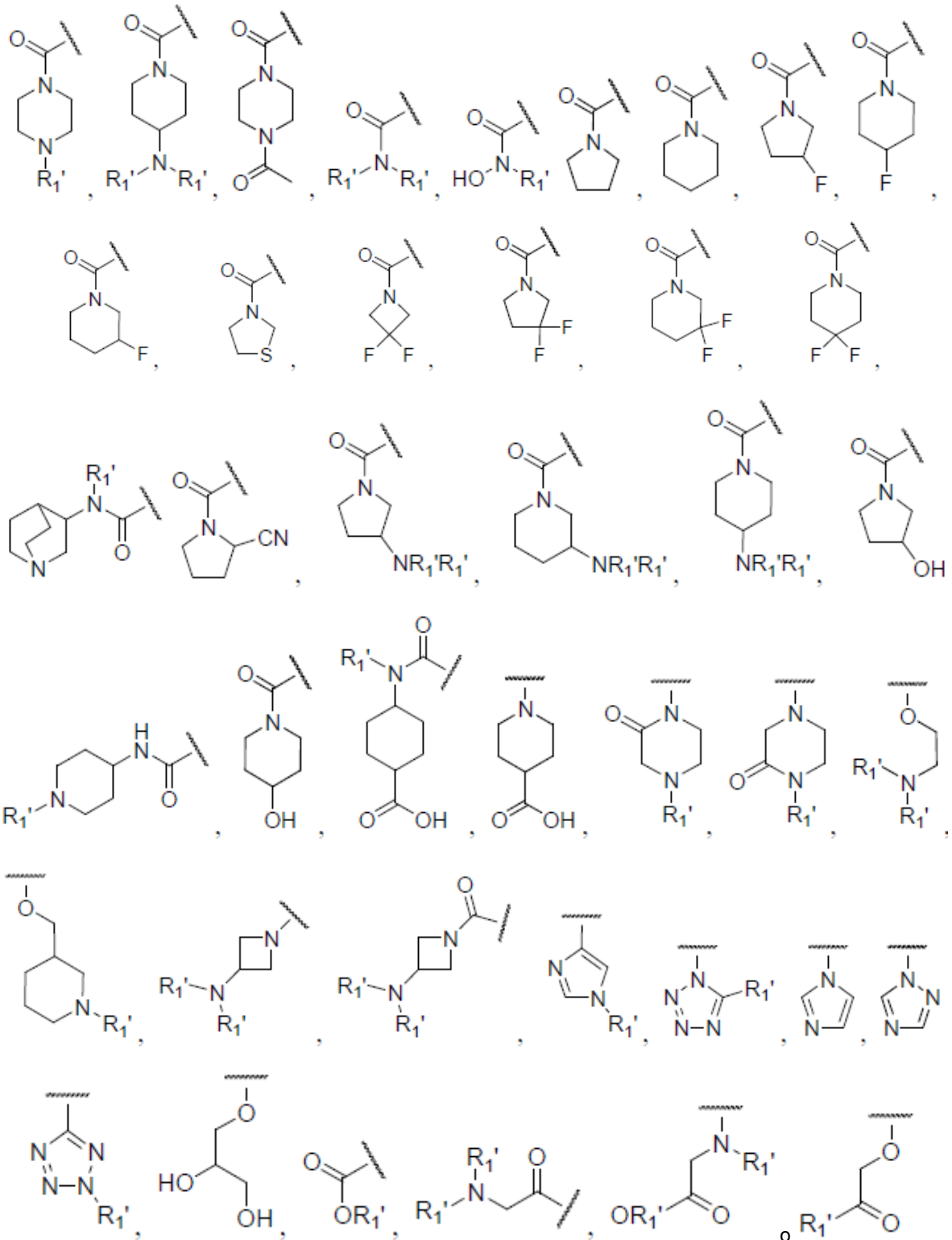
Por claridad, la expresión “puente C<sub>1</sub> a C<sub>2</sub> alquilenos, alquilenos o alcanodilideno” significa las estructuras multivalentes -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH=, =CH-, -CH=CH-, o =CH-CH=. Las dos porciones R<sup>50</sup> que están opcionalmente unidas una a otra pueden estar bien en el mismo carbono o en diferentes átomos de carbono. Lo anterior produce un anillo bicíclico espiro, mientras que lo último produce un anillo bicíclico condensado. Será obvio para los expertos en la técnica que, cuando dos R<sup>50</sup> se unen uno a otro para formar un anillo (bien sea directamente o a través de uno de los puentes descritos), se perderá 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 R<sup>50</sup> no cíclico que comprende por lo menos un átomo de hidrógeno terminal.

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

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

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





5

10

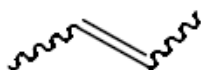
en donde  $R_1'$  son tal como se define anteriormente.

En una realización aún más preferida, un grupo de solubilización se selecciona de 2-dimetilaminoetilcarbamoilo, piperazin-1-ilcarbanoilo, piperazinilmetilo, dimetilaminometilo, 4-metilpiperazin-1-ilmetilo, 4-aminopiperidin-1-ilmetilo, 4-fluoropiperidin-1-ilmetilo, 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, 2H-tetrazol-5-ilmetilo, tiomorfolin-4-ilmetilo, 1-oxotiomorfolin-4-ilmetilo, 1,1-dioxotiomorfolin-4-ilmetilo, 1H-imidazol-1-ilmetilo, 3,5-dimetilpiperazin-1-ilmetilo, 4-hidroxipiperidin-1-ilmetilo, N-

metil(1-acetilpiperidin-4-il)-aminometilo, N-metilquinuclidin-3-ilaminometilo, 1H-1,2,4-triazol-1-ilmetilo, 1-metilpiperidin-3-il-oximetilo, o 4-fluoropiperidin-1-ilo.

En la medida no incluida en ninguna de las definiciones anteriores, la expresión "grupo de solubilización" también incluye restos descritos como unidos en la posición 7 del ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxoquinolina-3-carboxílico (ciprofloxacina) y sus derivados como se describen en las publicaciones PCT WO 2005026165, WO 2005049602 y WO 2005033108, y publicaciones de Patente Europea EP 0343524, EP 0688772, EP 0153163, EP 0159174; así como también "grupos de solubilización en agua" descritos en la publicación de Patente de los Estados Unidos 2006/0035891. La divulgación de cada una de estas publicaciones de patente se incorpora en la presente memoria por referencia.

Se pretende que los enlaces dobles indicados en una estructura como:



incluyan tanto la configuración (E) como la (Z). Preferiblemente, los enlaces dobles se encuentran en la configuración (E).

Un azúcar es un derivado de aldehído o cetona de un alcohol polihidroxiado de cadena recta, 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 las realizaciones de la invención en las que, por ejemplo, se desea la residencia prolongada de un compuesto derivatizado con un azúcar, el azúcar es preferiblemente un azúcar que se produce de manera no natural. Por ejemplo, uno o más grupos hidroxilo están sustituidos con otro grupo, tal como un halógeno (p. ej., cloro). La configuración estereoquímica en uno o más átomos de carbono puede estar también alterada, en comparación con un azúcar que se produce de manera natural. Un ejemplo de un azúcar que se produce de manera no natural adecuado es la sucralosa.

Un ácido graso es un ácido carboxílico que tiene un resto de hidrocarburo 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 estar saturados o insaturados y sustituidos o no sustituidos, pero típicamente son no sustituidos. Los ácidos grasos pueden producirse de manera natural o no natural. En las realizaciones de la invención en las que, por ejemplo, se desea un tiempo de residencia prolongada de un compuesto que tiene un resto de ácido graso, el ácido graso se produce preferiblemente de manera no natural. El grupo acilo de un ácido graso consiste en el resto de hidrocarburo y el resto de carbonilo de la funcionalidad de ácido carboxílico, pero excluye el resto de -OH asociado con la funcionalidad de ácido carboxílico.

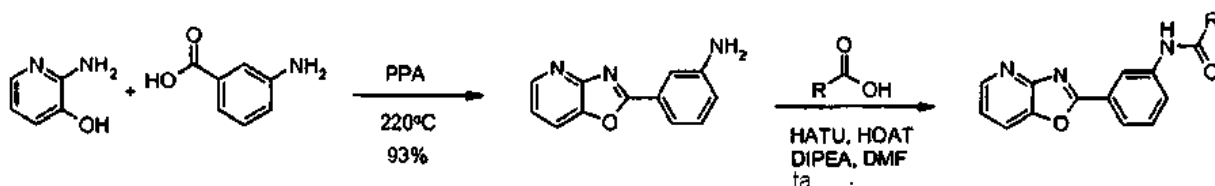
También se incluyen en la presente invención sales, en particular sales farmacéuticamente aceptables, de los compuestos moduladores de la sirtuína que se describen en la presente memoria. Los compuestos de la presente invención que poseen un grupo funcional lo bastante ácido, lo bastante básico, o ambos, pueden reaccionar con cualquier número de bases inorgánicas y ácidos inorgánicos y orgánicos, para formar una sal. Como alternativa, los compuestos que están cargados inherentemente, tales como aquellos con un nitrógeno cuaternario, pueden formar una sal con un apropiado contraión (por ejemplo, un haluro tal como bromuro, cloruro o fluoruro, en particular bromuro).

Los ácidos comúnmente empleados para formar sales de adición ácida son ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares, y 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, formiato, isobutirato, caproato, heptanoato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, butin-1,4-dioato, hexin-1,6-dioato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, ftalato, sulfonato, xilenosulfonato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato, gamma-hidroxibutirato, glicolato, tartrato, metanosulfonato, propanosulfonato, naftaleno-1-sulfonato, naftaleno-2-sulfonato, mandelato y similares.

Sales de adición básica incluyen aquellas derivadas de bases inorgánicas, tales como amonio o álcalis o hidróxidos metálicos de tierras alcalinas, carbonatos, bicarbonatos y similares. Tales bases útiles en la preparación de las sales de la presente invención incluyen hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, carbonato de potasio y similares.

De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona métodos de producción de los compuestos moduladores de la sirtuína que se describen anteriormente. Los compuestos pueden sintetizarse usando técnicas convencionales. Convenientemente, estos compuestos se sintetizan de forma ventajosa a partir de materiales de partida fácilmente disponibles.

Por lo tanto, una realización se refiere a un método de fabricación de un compuesto de la estructura que se describe en la presente memoria usando el siguiente esquema de síntesis:



5 Un experto en la materia reconocería que este esquema de síntesis, o variantes similares, permite de manera útil la incorporación de una diversidad de grupos R en compuestos que caen dentro del alcance de la presente invención, por ejemplo, los compuestos de las tablas en lo sucesivo.

10 Tal como puede ser apreciado por el experto, no se pretende que el esquema de síntesis anterior comprenda una lista exhaustiva de todos los medios mediante los que los compuestos que se describen y se reivindican en la presente solicitud pueden sintetizarse. Métodos adicionales serán evidentes para los expertos en la materia. Además, las diversas etapas de síntesis que se han descrito en lo precedente pueden realizarse en una secuencia u orden alternativo para dar los compuestos deseados. Las transformaciones y las metodologías de la química sintética útiles en la síntesis de los compuestos moduladores de la sirtuina que se describen en la presente memoria se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, las descritas en R. Larock, *Comprehensive Organic*  
 15 *Transformations* (1989); T. W. Greene and 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 a modo de ejemplo, un compuesto modulador de la sirtuina puede atravesar la membrana citoplasmática de la célula. Por ejemplo, un compuesto puede tener una permeabilidad celular de por lo menos alrededor de 20 %, 50 %, 75 %, 80 %, 90 % o 95 %.

20 Los compuestos moduladores de la sirtuina que se describen en la presente memoria pueden tener también una o más de las siguientes características: el compuesto puede ser esencialmente no tóxico para una célula o un sujeto, el compuesto modulador de la sirtuina puede ser una molécula orgánica o una pequeña molécula de 2.000 amu o menos, de 1.000 amu o menos; un compuesto puede tener una vida media bajo condiciones atmosféricas normales de por lo menos alrededor de 30 días, 60 días, 120 días, 6 meses o 1 año; el compuesto puede tener una vida  
 25 media en solución de por lo menos alrededor de 30 días, 60 días, 120 días, 6 meses o 1 año; un compuesto modulador de la sirtuina puede ser más estable en solución que el resveratrol por lo menos en un factor de alrededor de 50 %, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 30 veces, 50 veces o 100 veces; un compuesto modulador de la sirtuina puede promover la desacetilación del factor de reparación ADN Ku70, un compuesto modulador de la sirtuina puede promover la desacetilación de RelA/p65; un compuesto puede aumentar las tasas de rotación general y potenciar la sensibilidad de las células a la apoptosis inducida por TNF.

30 En ciertas realizaciones, un compuesto modulador de la sirtuina no tiene capacidad sustancial alguna para inhibir una histina desacetilasa (HDAC) de clase I, una HDAC de clase II, o HDAC I y II, a concentraciones (por ejemplo, *in vivo*) efectivas para modular la actividad desacetilasa de la sirtuina. Por ejemplo, en realizaciones preferidas, el compuesto modulador de la sirtuina es un compuesto activador de la sirtuina y se escoge para tener una CE<sub>50</sub> para activar la actividad sirtuina – desacetilasa que es por lo menos 5 veces menos que la CE<sub>50</sub> para la inhibición de una HDAC I y/o HDAC II y aún más preferiblemente por lo menos 10 veces, 100 veces, o hasta 1.000 veces menos. Métodos para ensayar la actividad HDAC I y/o HDAC II son bien conocidos en la técnica y kits para realizar dichos ensayos pueden ser adquiridos comercialmente. Véase, por ejemplo, BioVision, Inc. (Mountain View, CA; página electrónica de world wide web en biovision.com) y Thomas Scientific (Swedesboro, NJ; página electrónica de world  
 35 wide web en tomassci.com).

40 En ciertas realizaciones, un compuesto modulador de la sirtuina no tiene capacidad sustancial alguna para modular homólogos de sirtuina. En una realización, un activador de una proteína sirtuina humana puede no tener capacidad sustancial alguna para activar una proteína sirtuina de eucariotas inferiores, en particular levaduras o patógenos humanos, a concentraciones (por ejemplo, *in vivo*) efectivas para activar la actividad desacetilasa de la sirtuina humana. Por ejemplo, un compuesto activador de la sirtuina puede escogerse para tener una CE<sub>50</sub> para activar una sirtuina humana, tal como SIRT1 y/o SIRT3, actividad desacetilasa que es por lo menos 5 veces menor que la CE<sub>50</sub> para activar una sirtuina de levadura tal como una Sir2 (tal como *Candida*, *S. cerevisiae*, etc.), y aún más preferiblemente por lo menos 10 veces, 100 veces o hasta 1.000 veces menos. En otra realización, un inhibidor de una proteína sirtuina de eucariotas inferiores, en particular de levadura o de patógenos humanos, no tiene capacidad  
 45 sustancial alguna para inhibir una proteína sirtuina de humanos en concentraciones (por ejemplo, *in vivo*) efectivas para inhibir la actividad desacetilasa de una proteína sirtuina de una eucariota inferior. Por ejemplo, un compuesto inhibidor de la sirtuina puede escogerse para tener un CI<sub>50</sub> para inhibir una sirtuina humana, tal como SIRT1 y/o SIRT3, actividad desacetilasa que es por lo menos 5 veces menos que la CI<sub>50</sub> para la inhibición de una sirtuina de levadura, tal como Sir2 (tal como *Candida*, *S. cerevisiae*, etc) y aún más preferiblemente por lo menos 10 veces, 100

veces o hasta 1.000 veces menos.

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

En otras realizaciones, un modulador de SIRT1 no tiene capacidad sustancial alguna para modular otros homólogos de proteínas sirtuína, tales como por ejemplo, uno o más de SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, o SIRT7 humana, a concentraciones (por ejemplo, *in vivo*) efectivas para modular la actividad desacetilasa de SIRT1 humana. Por ejemplo, un compuesto modulador de la sirtuína puede ser elegido para que tenga un DE<sub>50</sub> para modular la actividad desacetilasa de SIRT1 humana de por lo menos 5 veces menos que el DE<sub>50</sub> para modular uno o más SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 o SIRT7 humanas, y de forma aún más preferible de por lo menos 10 veces, 100 veces, o incluso 1.000 veces menos. En una realización, un modulador de SIRT1 no tiene capacidad sustancial alguna para modular una proteína SIRT3.

En otras realizaciones, un modulador de SIRT3 no tiene capacidad sustancial alguna para modular otros homólogos de proteína sirtuína, como, por ejemplo, uno o más SIRT1, SIRT2, SIRT4, SIRT5, SIRT6, o SIRT7 humanas a concentraciones (por ejemplo, *in vivo*) efectivas para modular la actividad desacetilasa de SIRT3 humana. Por ejemplo, un compuesto modulador de la sirtuína puede ser elegido para tener un DE<sub>50</sub> para modular una actividad desacetilasa de SIRT3 humana que sea por lo menos 5 veces menos que el DE<sub>50</sub> para modular una o más SIRT1, SIRT2, SIRT4, SIRT5, SIRT6, o SIRT7 humana, y aún más preferible por lo menos 10 veces, 100 veces o incluso 1.000 veces menos. En una realización, un modulador de SIRT3 no tiene capacidad sustancial alguna para modular una proteína SIRT1.

En ciertas realizaciones, un compuesto modulador de la sirtuína puede tener una afinidad de unión a una proteína sirtuína de unos 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 la sirtuína puede reducir (activador) o aumentar (inhibidor) el Km aparente de una proteína sirtuína para su sustrato o NAD<sup>+</sup> (u otro cofactor) por un factor de por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 50 o 100. En ciertas realizaciones, los valores Km se determinan usando el ensayo de espectrometría de masa que se describe en la presente memoria. Los compuestos activadores preferidos reducen el Km de una sirtuína por su sustrato o cofactor en una mayor medida que la causada por el resveratrol a una concentración similar o reducir Km de una sirtuína para su sustrato o cofactor similar al causado por resveratrol en una concentración inferior. Un compuesto modulador de la sirtuína puede aumentar el Vmax de una proteína sirtuína por un factor de por lo menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 50 o 100. Un compuesto modulador de la sirtuína puede tener un DE<sub>50</sub> para modular la actividad 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 a partir de aproximadamente 1–10 nM, a partir de aproximadamente 10–100 nM, a partir de aproximadamente 0,1–1 μM, a partir de aproximadamente 1–10 μM o a partir de aproximadamente 10–100 μM. Un compuesto modulador de la sirtuína puede modular la actividad desacetilasa de una proteína SIRT1 y/o SIRT3 por un factor de por lo menos 5, 10, 20, 30, 50 o 100, como se mide en un ensayo celular o en un ensayo basado en células. Un compuesto activador de la sirtuína puede causar una inducción por lo menos aproximadamente 10 %, 30 %, 50 %, u 80 %, dos veces, cinco veces, 10 veces, 50 veces o 100 veces más grande que la actividad desacetilasa de una proteína sirtuína en relación con la misma concentración de resveratrol. Un compuesto modulador de la sirtuína puede tener un DE<sub>50</sub> para modular SIRT5 que sea por lo menos aproximadamente 10 veces, 20 veces, 30 veces, 50 veces superior a aquel para modular SIRT1 y/o SIRT3.

### 3. Usos a modo de ejemplo

En ciertos aspectos, la invención provee métodos para modular el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína y métodos de uso de los mismos.

En ciertas realizaciones, la invención provee métodos para usar compuestos moduladores de la sirtuína en donde los compuestos moduladores de la sirtuína activan una proteína sirtuína, por ejemplo, aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína. Los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden ser útiles para una variedad de aplicaciones terapéuticas incluyendo, por ejemplo, aumentar la vida útil de una célula, y tratar y/o prevenir una amplia gama de enfermedades o trastornos, incluyendo, por ejemplo, enfermedades o trastornos en relación con el envejecimiento o estrés, diabetes, obesidad, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad cardiovascular, trastornos de coagulación de la sangre, inflamación, cáncer y/o crisis vasomotora etc. Los métodos comprenden la administración a un sujeto que lo necesite, una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto modulador de la sirtuína, por ejemplo, un compuesto activador de la sirtuína.

En otras realizaciones, la invención provee métodos para usar compuestos moduladores de la sirtuína en donde los compuestos moduladores de la sirtuína disminuyen la actividad de la sirtuína, p. ej., disminuyen el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína. Los compuestos moduladores de la sirtuína que disminuyen el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden ser útiles para una variedad de aplicaciones terapéuticas incluyendo, por

ejemplo, aumentar la sensibilidad celular al estrés (incluyendo aumentar la radiosensibilidad y/o la quimiosensibilidad), aumentar la cantidad y/o la tasa de apoptosis, el tratamiento del cáncer (opcionalmente en combinación con otro agente quimioterápico), la estimulación del apetito, y/o la estimulación de la ganancia de peso, etc. Los métodos comprenden la administración a un sujeto que lo necesite, una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto modulador de la sirtuína, por ejemplo, un compuesto inhibidor de la sirtuína.

Aunque los solicitantes de la presente invención no desean estar limitados por la teoría, se cree que los activadores de la presente invención pueden interactuar con una sirtuína en la misma ubicación dentro de la proteína sirtuína (por ejemplo sitio activo o sitio que afecta al Km o Vmax del sitio activo). Se cree que esta es la razón por la que ciertas clases de activadores e inhibidores de la sirtuína pueden tener una similitud estructural sustancial.

En ciertas realizaciones, los compuestos moduladores de la sirtuína que se describen en la presente memoria pueden ser tomados solos o en combinación de otros compuestos. En una realización, una mezcla de dos o más compuestos moduladores de la sirtuína pueden administrarse a un sujeto que necesita de la misma. En otra realización, un compuesto modulador de la sirtuína que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína puede administrarse con uno o más de los siguientes compuestos: resveratrol, buteína, fisetin, piceatanol o quercetina. En una realización a modo de ejemplo, un compuesto modulador de la sirtuína que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína puede administrarse en combinación con ácido nicotínico. En otra realización, un compuesto modulador de la sirtuína que reduce el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína puede administrarse con uno o más de los siguientes compuestos: nicotinamida (NAM), suramina; NF023 (un antagonista de proteína G); NF279 (un antagonista de receptor purinérgico); Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico); (-) epigallocatequina (hidroxilo en los sitios 3,5,7,3',4',5'); (-)-galato de epigalocatequina (sitios hidroxilo 5,7,3',4',5' y éster galato en 3); cloruro de cianurino (cloruro de 3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavilio); cloruro de finidino (cloruro de 3,5,7,3',4',5'-hexahidroxiflavilio); miricetina (cannabiscetina; 3,5,7,3',4',5'-hexahidroxiflavona); 3,7,3',4',5'-pentahidroxiflavona; gopipetina (3,5,7,8,3',4'-hexahidroxiflavona), sirtinol; y esplitomicina. (véase p. ej., Howitz y col. (2003) *Nature* 425:191; Grozinger y col. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:38837; Dedalov y col. (2001) *PNAS* 98:15113; y Hirao y col. (2003) *J. Biol. Chem.* 278:52773). En otra realización más, uno o más compuestos moduladores de la sirtuína pueden administrarse con uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento o la prevención de varias enfermedades, incluyendo, por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad cardiovascular, coagulación sanguínea, inflamación, crisis vasomotora, obesidad, envejecimiento, estrés, etc. En varias realizaciones, las terapias de combinación que comprenden un compuesto modulador de la sirtuína pueden referirse a (1) composiciones farmacéuticas que comprendan uno o más compuestos moduladores de la sirtuína en combinación con uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, uno o más agentes terapéuticos que se describen en la presente memoria); y (2) co-administración de uno o más compuestos moduladores de la sirtuína con uno o más agentes terapéuticos en donde el compuesto modulador de la sirtuína y el agente terapéutico no han sido formulados en las mismas composiciones (pero pueden estar presentes en el mismo kit o paquete, como un paquete con blíster; contenedores sellados conectados de forma separada (p. ej., bolsas de papel metalizado) que puedan ser separadas por el usuario, o un kit en donde el o los compuestos moduladores de la sirtuína y otro u otros agentes terapéuticos estén en recipientes separados. Cuando se usen formulaciones separadas, el compuesto modulador de la sirtuína puede administrarse de forma simultánea, intermitente, en etapas, antes de, posterior a, o en combinación con la administración de otro agente terapéutico.

En ciertas realizaciones, los métodos para reducir, prevenir o tratar las enfermedades o trastornos usando un compuesto modulador de la sirtuína pueden comprender también aumentar el nivel de proteína de una sirtuína, tal como las SIRT1, SIRT2 y/o SIRT3 humanas, u homólogos de los mismos. El aumento de los niveles de proteínas puede ser logrado introduciendo en una célula una o más copias de un ácido nucleico que codifique una sirtuína. Por ejemplo, el nivel de una sirtuína puede ser aumentado en una célula de mamífero introduciendo en la célula de mamífero un ácido nucleico que codifique la sirtuína, por ejemplo, aumentando el nivel de SIRT1 introduciendo un ácido nucleico que codifique la secuencia de aminoácidos mencionada en el n.º de Acceso de GenBank NP\_036370 y/o aumentando el nivel de SIRT3 introduciendo un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos mencionada en el n.º de Acceso de GenBank AAH01042. El ácido nucleico puede encontrarse bajo el control de un promotor que regula la expresión del ácido nucleico de SIRT1 y/o SIRT3. Como alternativa, el ácido nucleico puede introducirse en la célula en una ubicación en el genoma que se encuentra aguas abajo de un promotor. Métodos para aumentar el nivel de una proteína usando estos métodos se conocen bien en la técnica.

Un ácido nucleico que se introduzca en una célula para aumentar el nivel de proteína de una sirtuína puede codificar una proteína que sea por lo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 % idéntica a la secuencia de una sirtuína, por ejemplo, proteína SIRT1 (n.º Acceso de GenBank NP\_036370) y/o SIRT3 (n.º Acceso de GenBank AAH01042). Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica la proteína puede ser por lo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 % idéntico a un ácido nucleico que codifica una proteína SIRT1 (por ejemplo, n.º de Acceso de GenBank NM\_012238) y/o SIRT3 (por ejemplo, n.º de Acceso de GenBank BC001042). El ácido nucleico también puede ser un ácido nucleico que hibridice, preferiblemente, condiciones de hibridación rigurosas, a un ácido nucleico que codifica una sirtuína tipo natural, por ejemplo, proteína SIRT1 (n.º Acceso de GenBank NM\_012238) y/o SIRT3 (p. ej., n.º Acceso de GenBank BC001042). Las condiciones de hibridación rigurosas pueden incluir la hibridación y una limpieza en 0,2 x SSC a 65 °C. Cuando se usa un ácido nucleico que codifique una proteína que sea diferente a una proteína sirtuína tipo natural, tal como una proteína que sea un fragmento de una sirtuína tipo natural, la proteína es, de forma preferible, biológicamente activa, por ejemplo, es capaz de desacetilación. Sólo es necesario

expresar en una célula una porción de la sirtuína que sea biológicamente activa. Por ejemplo, una proteína que difiera del SIRT1 de tipo natural teniendo n.º de Acceso de GenBank NP\_036370, preferiblemente contiene la estructura principal del mismo. La estructura principal a veces hace referencia a los aminoácidos 62–293 de n.º de Acceso de GenBank NP\_036370, los cuales se codifican por los nucleótidos 237 al 932 de n.º de Acceso de GenBank NM\_012238, que comprende la unión NAD así como los dominios de unión de sustratos. El dominio nuclear de SIRT1 puede también hacer referencia a los aminoácidos 261 a 447 de n.º de Acceso de GenBank NP\_036370, los cuales se codifican por los nucleótidos 834 a 1.394 de n.º de Acceso de GenBank NM\_012238; hasta aproximadamente los aminoácidos 242 a 493 de n.º de Acceso de GenBank NP\_036370, que se codifican por los nucleótidos 777 a 1.532 de n.º de Acceso de GenBank NM\_012238; o hasta aproximadamente los aminoácidos 254 a 495 de n.º de Acceso de GenBank NP\_036370, que se codifican por los nucleótidos 813 a 1.538 de n.º de Acceso de GenBank NM\_012238. Si una proteína retiene una función biológica, por ejemplo, capacidades de desacetilación, puede ser determinado de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

En ciertas realizaciones, los métodos para reducir, prevenir, o tratar las enfermedades o trastornos usando un compuesto modulador de la sirtuína pueden comprender también reducir el nivel de proteína de una sirtuína, como la SIRT1, o SIRT2 y/o SIRT3 humana, u homólogos de las mismas. Reducir un nivel de proteína sirtuína puede ser logrado de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ARNip, un ácido nucleico antisentido, o un ribosoma dirigido a la sirtuína puede ser expresado en la célula. Un mutante de sirtuína negativa dominante, por ejemplo, un mutante que no es capaz de desacetilar, puede también ser producida. Por ejemplo, puede usarse el mutante H363Y de SIRT1, descrita, por ejemplo, en Luo y col. (2001) Cell 107:137. De forma alternativa, pueden usarse agentes que inhiban la transcripción.

Los métodos para modular los niveles de proteína sirtuína pueden también incluir métodos para modular la transcripción de genes que codifican sirtuínas, métodos para estabilizar/desestabilizar los ARNm correspondientes, y otros métodos conocidos en la técnica.

#### *Envejecimiento/ Estrés*

En una realización, la invención provee un método para extender el tiempo de vida de una célula, extendiendo la capacidad proliferativa de una célula, haciendo más lento el envejecimiento de una célula, promoviendo la supervivencia de una célula, retardando la senectud de una célula, imitando los efectos de la restricción calórica, aumentando la resistencia de una célula al estrés, o previniendo la apoptosis de una célula, poniendo en contacto la célula con un compuesto modulador de la sirtuína de la invención que aumente el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína. En una realización a modo de ejemplo, los métodos comprenden poner en contacto la célula con un compuesto activador de la sirtuína.

Los métodos que se describen en la presente memoria pueden usarse para aumentar la cantidad de tiempo que las células, de forma particular, las células primarias (es decir, células obtenidas a partir de un organismo, por ejemplo, un humano), puedan ser mantenidas con vida en un cultivo de células. Las células madre embrionarias (ES) y las células pluripotenciales, y las células diferenciadas de las mismas, también pueden ser tratadas con un compuesto modulador de la sirtuína que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína para mantener las células, o la progenie de las mismas, en cultivo por períodos más largos de tiempo. Dichas células también pueden usarse para ser trasplantadas a un sujeto, por ejemplo, después de una modificación *ex vivo*.

En una realización, las células que se pretende preservar por períodos largos de tiempo pueden ser tratadas con un compuesto modulador de la sirtuína que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína. Las células pueden estar en suspensión (por ejemplo, células sanguíneas, suero, medio de crecimiento biológico, etc.) o en tejidos u órganos. Por ejemplo, la sangre recolectada de un individuo para propósitos de transfusión puede ser tratada con un compuesto modulador de la sirtuína que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína para preservar las células sanguíneas por períodos más largos de tiempo. De forma adicional, la sangre a usarse para propósitos forenses también puede ser preservada usando un compuesto modulador de la sirtuína que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína. Otras células que pueden ser tratadas para extender su vida útil o para ser protegidas contra la apoptosis incluyen las células para consumo, por ejemplo, células de mamíferos no humanos (tales como carne) o células de plantas (tales como vegetales).

Los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden también ser aplicados durante el desarrollo y las fases de crecimiento en mamíferos, plantas, insectos o microorganismos, con el fin de, por ejemplo alterar, retardar o acelerar los procesos de desarrollo y/o crecimiento.

En otra realización, los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden usarse para tratar células útiles para el trasplante o la terapia celular, incluyendo, por ejemplo, injertos de tejidos sólidos, trasplantes de órganos, suspensiones de células, células de médula ósea, etc. Las células o tejido pueden ser un auto – injerto, un aloinjerto, un injerto sintético o un xeno–injerto. Las células o tejido pueden ser tratadas con el compuesto modulador de la sirtuína antes de la administración/ implantación de forma concurrente con la administración/ implantación, y/o post–administración/ implantación en un sujeto. Las células o tejido pueden ser tratados antes de la remoción de las células del individuo donante, *ex vivo* después de la remoción de las células o tejidos a partir del individuo donante, o post implantación al receptor. Por ejemplo, el



donante o individuo receptor puede ser tratado de forma sistémica con un compuesto modulador de la sirtuína o puede tener un subconjunto de células/tejidos tratados de forma local con un compuesto modulador de la sirtuína que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína. En ciertas realizaciones, las células o tejido (o individuos donantes/ receptores) pueden, de forma adicional, ser tratados con otro agente terapéutico útil para prolongar la supervivencia del injerto, tal como, por ejemplo, un agente inmunosupresor, una citocina, un factor angiogénico, etc.

En otras realizaciones más, las células pueden ser tratadas con un compuesto modulador de la sirtuína que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína *in vivo*, por ejemplo, para aumentar su vida útil o prevenir la apoptosis. Por ejemplo, la piel puede ser protegida del envejecimiento (por ejemplo, desarrollo de arrugas, pérdida de elasticidad, etc.), tratando la piel o las células epiteliales con un compuesto modulador de la sirtuína que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína. En una realización a modo de ejemplo, la piel se pone en contacto con una composición farmacéutica o cosmética que comprende un compuesto modulador de la sirtuína que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína. Las afecciones de piel o las condiciones de piel a modo de ejemplo que puedan ser tratadas en concordancia con los métodos que se describen en la presente memoria incluyen trastornos o enfermedades asociadas con o causadas por inflamación, daño causado por el sol o envejecimiento natural. Por ejemplo, las composiciones encuentran utilidad en la prevención o tratamiento de la dermatitis por contacto (incluyendo la dermatitis de contacto irritante y la dermatitis de contacto alérgico), la dermatitis atópica (también conocida como eczema alérgico), la queratosis actínica, trastornos de queratinización (incluyendo eczema), enfermedades de epidermolísis bulosa (incluyendo pénfigo), dermatitis exfoliante, dermatitis seborreica, eritemas (incluyendo eritema multiforme y eritema nodoso), daño causado por el sol u otras fuentes de luz, lupus discoide eritematoso, psoriasis, dermatomiositis, cáncer de piel y los efectos del envejecimiento natural. En otra realización, los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden usarse para el tratamiento de heridas y/o quemaduras para promover la sanación, incluyendo, por ejemplo, quemaduras de primer, segundo o tercer grado y/o quemaduras térmicas, químicas o eléctricas. Las formulaciones pueden administrarse de forma tópica, a la piel o tejido mucoso, como una pomada, loción, crema, microemulsión, gel, solución o similares, tal como se describe adicionalmente en la presente memoria, dentro del contexto de un régimen de dosificación efectivo para producir el resultado deseado.

Las formulaciones tópicas que comprenden uno o más compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden usarse también como composiciones preventivas, por ejemplo quimiopreventivas. Cuando se usan en un método quimiopreventivo, la piel sensible es tratada antes para cualquier estado visible en un individuo particular.

Los compuestos moduladores de la sirtuína pueden administrarse de forma local o sistémica a un sujeto. En una realización, un compuesto modulador de la sirtuína se administra de forma local a un tejido u órgano de un sujeto por medio de inyección, formulación tópica, etc.

En otra realización, un compuesto modulador de la sirtuína que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína puede usarse para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o estado inducido o exacerbado por la senilidad celular en un sujeto; los métodos para reducir la tasa de senilidad de un sujeto, por ejemplo, después del comienzo de la senilidad; métodos para extender la vida útil de un sujeto; métodos para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o estado relacionado con el periodo de vida; métodos para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o estado relacionado con la capacidad proliferativa de las células; y métodos para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o estado que resulta de daño o muerte celular. En ciertas realizaciones, el método no actúa reduciendo la tasa de ocurrencia de enfermedades que acortan la vida útil de un sujeto. En ciertas realizaciones, un método no actúa reduciendo la letalidad causada por una enfermedad, tal como el cáncer.

En otra realización más, un compuesto modulador de la sirtuína que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína puede administrarse a un sujeto para aumentar, de forma general, la vida útil de sus células y de proteger sus células contra el estrés y/o contra la apoptosis. Se cree que tratar a un sujeto compuesto que se describe en la presente memoria es similar a exponer al sujeto a hormesis, es decir, un estrés leve que es beneficioso para los organismos y que puede extender su vida útil.

Los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden administrarse a un sujeto para prevenir la senilidad y consecuencias o enfermedades relacionadas con la vejez, tal como infarto, enfermedad cardíaca, insuficiencia cardíaca, artritis, alta presión sanguínea, y la enfermedad de Alzheimer. Otras condiciones que pueden ser tratadas incluyen trastornos oculares, por ejemplo, asociados con el envejecimiento del ojo, tal como las cataratas, glaucoma y degeneración macular. Los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína también pueden administrarse a sujetos para el tratamiento de enfermedades, por ejemplo, enfermedades crónicas, asociadas con la muerte celular, con el fin de proteger a las células de la muerte celular. Enfermedades a modo de ejemplo incluyen aquellas asociadas con la muerte de células neuronales, disfunción neuronal, o muerte o disfunción de células musculares, tal como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica, y la distrofia muscular; SIDA, hepatitis fulminante, enfermedades relacionadas con la degeneración del cerebro, tal como la enfermedad de Creutzfeld–Jakob, retinitis pigmentosa, y degeneración cerebelosa; mielodisplasias tales como la

anemia aplásica, enfermedades isquémicas tales como apoplejía e infarto de miocardio; enfermedades hepáticas tales como la hepatitis alcohólica, hepatitis B y hepatitis C; enfermedades en las articulaciones como la osteoartritis, arterosclerosis, alopecia; daño a la piel debido a la luz UV; liquen plano; atrofia de la piel; cataratas; y rechazos de injertos. La muerte celular también puede estar causada por cirugía, terapia de fármacos, exposición química o exposición a la radiación.

5 Los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína también pueden administrarse a un sujeto que sufre un enfermedad aguda, por ejemplo, daño a un tejido u órgano, por ejemplo, un sujeto que sufre un infarto de miocardio o un sujeto que sufre una lesión a la médula ósea. Los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína también pueden usarse para reparar el hígado de un alcohólico.

#### *Enfermedad cardiovascular*

En otra realización, la invención provee un método para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad cardiovascular administrando a un sujeto que lo necesite un compuesto modulador de la sirtuína que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína.

15 Las enfermedades cardiovasculares que pueden ser tratadas o prevenidas usando los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína incluyen la cardiomiopatía o miocarditis; tal como la cardiomiopatía idiopática, la cardiomiopatía metabólica, la cardiomiopatía alcohólica, la cardiomiopatía inducida por fármacos, la cardiomiopatía isquémica y la cardiomiopatía hipertensiva. También son tratables o prevenibles usando compuestos y métodos que se describen en la presente memoria los trastornos ateromatosos de los principales vasos sanguíneos (enfermedad macrovascular) como la aorta, las arterias coronarias, las arterias carótidas, las arterias cerebrovasculares, las arterias renales, las arterias ilíacas, las arterias femorales y las arterias popliteales. Otras enfermedades vasculares que pueden ser tratadas o prevenidas incluyen aquellas relacionadas con la agregación de plaquetas, las arteriolas retinianas, las arteriolas glomerulares, los vasos nervorum, las arteriolas cardíacas, y los lechos capilares asociados del ojo, el riñón, el corazón y los sistemas nerviosos periférico y central. Los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden usarse también para aumentar los niveles de HDL en el plasma sanguíneo de un individuo.

Otros trastornos más que pueden ser tratados con compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína incluyen la reestenosis, por ejemplo, siguiendo una intervención coronaria y los trastornos en relación con un nivel anormal de colesterol de alta y baja densidad.

30 En una realización, un compuesto modulador de la sirtuína que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína puede administrarse como parte de una terapia de combinación con otro agente cardiovascular incluyendo, por ejemplo, un agente antiarrítmico, un agente antihipertensivo, un bloqueante de los canales de calcio, una solución cardioplégica, un agente cardiotónico, un agente fibrinolítico, una solución esclerosante, un agente vasoconstrictor, un agente 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.

40 En una realización, un compuesto modulador de la sirtuína que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína puede administrarse como parte de una terapia de combinación con un agente anti-arritmia. Los agentes anti-arritmia se organizan a menudo 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 la repolarización; y tipo IV, bloqueo de los canales de calcio. Los agentes antiarrítmicos de tipo I incluyen lidocaína, moricizina, mexiletina, tocainida, procainamida, encainida, flecanida, tocainida, fenitoína, propafenona, quinidina, disopiramida, y flecainida. Los agentes antiarrítmicos de tipo II incluyen propranolol y esmolol. El tipo III incluye agentes que actúan prolongando la duración del potencial de la acción, tal como amiodarona, artilida, bretillo, clofilio, isobutilida, sotalol, azimilida, dofetilida, dronedarona, ersentilida, ibutilida, tedisamilo y trecetilida. Los agentes antiarrítmicos de tipo IV incluyen verapamilo, diltiazem, digitalis, adenosina, cloruro de níquel, e iones de magnesio.

50 En otra realización, un compuesto modulador de la sirtuína que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína puede administrarse como parte de una terapia de combinación con otro agente cardiovascular. Los ejemplos de agentes cardiovasculares incluyen vasodilatadores, por ejemplo, hidralazina; inhibidores de enzima de conversión de angiotensina, por ejemplo, captopril; agentes anti-angina, por ejemplo, nitrato de isosorbida, trinitrato de glicerilo y tetranitrato de pentaeritritol; agentes antiarrítmicos, por ejemplo, quinidina, procainalida y lignocaína; cardioglósidos, por ejemplo, digoxina y digitoxina; antagonistas de calcio, por ejemplo, verapamil y nifedipina; diuréticos, tal como tiazidas y comopuestos relacionados, por ejemplo, bendrofluazida, clorotiazida, clortalidona, hidroclorotiazida y otros diuréticos, por ejemplo, furosemida y triamtereno, y sedantes, por ejemplo, nitrazepam, flurazepam y diazepam.

55 Otros agentes cardiovasculares a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, un inhibidor de la 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 así como ácido etacrínico,

tricinafeno, clortalidona, furosemida, musolimina, bumetanida, triamtereno, amilorida y espirolactona y sales de tales compuestos, inhibidores de enzima de conversión de angiotensina tales como captoprilo, zofenopril, fosinopril, enalapril, ceranopril, cilazopril, delapril, pentopril, quinapril, ramipril, lisinopril, y sales de tales compuestos, antagonistas de angiotensina II tal como losartán, irbesartán o valsartán, agentes trombolíticos tales como activador de plasminógeno de tejido (tPA), tPA recombinante, estreptoquinasa, uroquinasa, prouroquinasa, y complejo activador de estreptoquinasa de plasminógeno anisóilada (APSAC, Eminase, Beecham Laboratories), o activadores de plasminógeno de glándulas salivares de animales, agentes de bloqueo de los canales de calcio tales como verapamilo, nifedipina o diltiazem, antagonistas de receptor de tromboxano tal como ifetrobán, miméticos de prostaciclina, o inhibidores de la fosfodiesterasa. Tales productos de combinación, si se formulan como una dosis fija, emplean los compuestos de la presente invención dentro del intervalo de dosificación que se describe anteriormente y el otro agente farmacéuticamente activo dentro de su intervalo de dosificación aprobado.

Aún otros agentes cardiovasculares a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, vasodilatadores, p. ej., benciclano, cinnarizina, citalcolina, ciclandelato, ciclónico, ebumamonina, fenoxezilo, flunarizina, ibudilast, ifenprodilo, lomerizina, naflol, nikamato, nosergolina, nimodipina, papaverina, pentifilina, nifedolina, vincamina, vinpocetina, vichizilo, pentoxifilina, derivados de prostaciclina (tales como prostaglandina E1 y prostaglandina I2), un fármaco de bloqueo de receptor de endotelina (tal como bosentán), diltiazem, nicorandilo, y nitroglicerina. Los ejemplos del fármaco de protección cerebral incluyen eliminadores de radicales (tales como edaravona, vitamina E, y vitamina C), antagonistas de glutamato, antagonistas de AMPA, antagonistas de kainato, antagonistas de NMDA, agonistas de GABA, factores de crecimiento, antagonistas opioides, precursores de fosfatidilcolina, agonistas de serotonina, fármacos inhibidores de canal de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , y fármacos de apertura de canal de  $\text{K}^+$ . Los ejemplos de los estimulantes metabólicos del cerebro incluyen amantadina, tiaprida, y ácido gamma-aminobutírico. Los ejemplos del anticoagulante incluyen heparinas (tales como heparina de sodio, heparina potásica, dalteparina de sodio, dalteparina cálcica, heparina cálcica, parnaparina de sodio, reviparina de sodio, y danaparoid de sodio), warfarina, enoxaparina, argatrobán, batroxobina, y citrato de sodio. Los ejemplos de los fármacos antiplaquetarios incluyen hidrocloreto de ticlopidina, dipiridamol, cilostazol, icosapentato de etilo, hidrocloreto de sarpogrelato, hidrocloreto de dilazep, trapidilo, un agente anti-inflamatorio no esteroideo (tal como aspirina), beraprostosodio, iloprost, e indobufeno. Los ejemplos del fármaco trombolítico incluyen uroquinasa, activadores de plasminógeno de tipo de tejido (tal como alteplasa, tisoquinasa, nateplasa, pamiteplasa, monteplasa, y rateplasa), y nasaruplase. Los ejemplos del fármaco antihipertensivo incluyen inhibidores de enzima de conversión de angiotensina (tal como captoprilo, alaceprilo, lisinopril, imidapril, quinapril, temocapril, delapril, benazeprilo, cilazapril, trandolapril, enalapril, ceronapril, fosinopril, imadapril, mobertprilo, perindopril, ramipril, espirapril, y randolapril), antagonistas de angiotensina II (tal como losartán, candesartán, valsartán, eprosartán, e irbesartán), fármacos de bloqueo de los canales de calcio (tal como aranidipina, efonidipina, nicardipina, bamidipina, benidipina, manidipina, cilnidipina, nisoldipina, nitrendipina, nifedipina, nilvadipina, felodipina, amlodipina, diltiazem, bepridilo, clentiazem, fendilina, galopamilo, mibefradil, prenilamina, semotiadilo, terodilina, verapamilo, cilnidipina, elgodipina, isradipina, lacidipina, lercanidipina, nimodipina, cinnarizina, flunarizina, lidoflazina, lomerizina, benciclano, etafenona, y perhexilina), fármacos de bloqueo de receptor 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, moprolo, nadoxolol, nevíbolol, oxprenolol, practol, pronetalol, sotalol, sufinalol, talindolol, tertalol, toliprolol, xybenolol, y esmolol), fármacos de bloqueo de receptor  $\alpha$  (tal como amosulalol, prazosina, terazosina, doxazosina, bunazosina, urapidilo, fentolamina, arotinolol, dapiprazol, fenspirida, indoramina, labetalol, naftopidilo, nicergolina, tamsulosina, tolazolina, trimazosina, y yohimbina), inhibidores del nervio impático (tal como clonidina, guanfacina, guanabenz, metildopa, y reserpina), hidralazina, todralazina, budralazina y cadralazina. Los ejemplos del fármaco antiangina incluyen fármacos de nitrato (tal como nitrito de amilo, nitroglicerina e isosorbida), fármacos de bloqueo de receptor de  $\beta$ -adrenalina (tal 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, moprolo, nadoxolol, nevíbolol, oxprenolol, practol, pronetalol, sotalol, sufinalol, talindolol, tertalol, toliprolol, y xybenolol), fármacos de bloqueo de los canales de calcio (tal como aranidipina, efonidipina, nicardipina, bamidipina, benidipina, manidipina, cilnidipina, nisoldipina, nitrendipina, nifedipina, nilvadipina, felodipina, amlodipina, diltiazem, bepridilo, clentiazem, fendilina, galopamilo, mibefradil, prenilamina, semotiadilo, terodilina, verapamilo, cilnidipina, elgodipina, isradipina, lacidipina, lercanidipina, nimodipina, cinnarizina, flunarizina, lidoflazina, lomerizina, benciclano, etafenona, y perhexilina) trimetazidina, dipiridamol, etafenona, dilazep, trapidilo, nicorandilo, enoxaparina, y aspirina. Los ejemplos de los diuréticos incluyen diuréticos de tiazida (tal como hidroclorotiazida, metilclotiazida, triclorometiazida, bencilhidroclorotiazida, y penflutizida), diuréticos de asa (tal como furosemida, ácido etacrínico, bumetanida, piretanida, azosemida y torasemida), diuréticos ahorradores de  $\text{K}^+$  (espirolactona, triamtereno, y canrenoato de potasio), diuréticos osmóticos (tales como isosorbida, manitol D y glicerina), diuréticos no de tiazida (tal como meticrano, tripamida, clortalidona, y mefrusida), y acetazolamida. Los ejemplos del cardiotónico incluyen formulaciones de digitalis (tales como digitoxina, digoxina, metildigoxina, deslanósido, vesnarinona, lanatósido C, y proscillaridina), formulaciones de xantina (tal como aminofilina, colina, teofilina, diprofilina y proxifilina), formulaciones de catecolamina (tal como dopamina, dobutamina y docarpamina), inhibidores de PDE III (tal como amrinona, olprinona y milrinona), denopamina, ubidecarenona, pimobendán, levosimendán,

ácido aminoetilsulfónico, vesnarinona, carperitida, y daropato de colforsina. Los ejemplos del fármaco antiarrítmico incluyen ajmalina, pirmenol, procainamida, cibenzolina, disopiramida, quinidina, aprindina, mexiletina, lidocaína, feniloína, pilsicainida, propafenona, flecainida, atenolol, acebutolol, sotalol, propranolol, metoprolol, pindolol, amiodarona, nifekalant, diltiazem, bepridilo y verapamilo. Los ejemplos del fármaco antihiperlipidémico incluyen atorvastatina, simvastatina, pravastatina de sodio, fluvastatina de sodio, clinofibrato, clofibrato, simfibrato, fenofibrato, bezafibrato, colestimida y colestiramina. Los ejemplos del inmunosupresor incluyen azatioprina, mizoribina, ciclosporina, tacrolímús, gusperimús, y metotrexato.

#### *Muerte celular/ Cáncer*

Los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden administrarse a sujetos que hayan recibido, de forma reciente, o tengan alta probabilidad de recibir 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, por ejemplo, trabajo en una planta de energía nuclear, pilotar una aeronave, una exploración de CAT por rayos X, o la administración de un colorante radioactivo para la obtención de imágenes médicas; en una realización tal, el compuesto se administra como una medida profiláctica. En otra realización, la exposición a la radiación o toxina se recibe de forma no intencionada, p. ej., como resultado de un accidente industrial, por habitar en una ubicación de radiación natural, acto terrorista, o acto de guerra que implique material radioactivo o tóxico. En dicho caso, el compuesto se administra, de forma preferible, tan pronto como sea posible después de la exposición para inhibir la apoptosis y el desarrollo subsecuente del síndrome de radiación aguda.

Los compuestos moduladores de la sirtuína pueden usarse también para el tratamiento y/o la prevención de cáncer. En ciertas realizaciones, los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden usarse para el tratamiento y/o la prevención de cáncer. La restricción de calorías se ha vinculado a una reducción en la incidencia de los trastornos relacionados con la edad incluyendo el cáncer (véase p. ej., Bordone y Guarente, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2005 epub); Guarente y Picard, *Cell* 120: 473–82 (2005); Berrigan, y col., *Carcinogénesis* 23: 817–822 (2002); y Heilbronn y Ravussin, *Am. J. Clin. Nutr.* 78: 361–369 (2003)). Adicionalmente, se ha mostrado que la proteína Sir2 de la levadura se requiere para la prolongación de la vida útil por restricción de glucosa (véase p. ej., Lin y col., *Science* 289: 2126–2128 (2000); Anderson y col., *Nature* 423: 181–185 (2003)), un modelo de levadura para la restricción de calorías. Por consiguiente, un aumento en el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína puede ser útil para el tratamiento y/o la prevención de la incidencia de los trastornos relacionados con la edad, tal como, por ejemplo, cáncer. En otras realizaciones, los compuestos moduladores de la sirtuína que disminuyen el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden usarse para el tratamiento o la prevención del cáncer. Por ejemplo, pueden usarse compuestos de inhibición para estimular la acetilación de sustratos tales como p53 y, de este modo, aumentar la apoptosis, así como para reducir la vida útil de células y organismos, hacerlos más sensibles al estrés, y/o aumentar la radiosensibilidad y/o quimiosensibilidad de una célula u organismo. Por lo tanto, pueden usarse compuestos de inhibición, p. ej., para el tratamiento de cáncer. Cánceres a modo de ejemplo que pueden ser tratados usando un compuesto modulador de la sirtuína son aquellos del cerebro y riñón; cánceres dependientes de hormonas incluyendo el cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer testicular y cáncer ovárico, linfomas y leucemias. En los cánceres asociados con tumores sólidos, un compuesto modulador puede administrarse directamente al tumor. El cáncer de células sanguíneas, por ejemplo la leucemia, puede ser tratado administrando un compuesto modulador al flujo sanguíneo o a la médula ósea. El crecimiento benigno de células, por ejemplo, las verrugas, también puede ser tratado. Otras enfermedades que pueden ser tratadas incluyen las enfermedades autoinmunes, por ejemplo el lupus sistémico eritematoso, la esclerodermia y la artritis, en las cuales las células autoinmunes deben ser eliminadas. Las infecciones virales como el herpes, VIH, los adenovirus, y los trastornos malignos asociados con el HTLV-1 y los trastornos benignos también se pueden tratar por administración de un compuesto modulador de la sirtuína. De forma alternativa, las células pueden ser obtenidas a partir de un sujeto, tratado *ex vivo* para eliminar ciertas células no deseables, por ejemplo, células cancerosas, y administradas de nuevo al mismo sujeto o a uno diferente.

Los agentes quimioterápicos pueden ser co-administrados con los compuestos moduladores que se describen en la presente memoriacom teniendo actividad anti-cancerígena (por ejemplo, compuestos que inducen apoptosis, compuestos que reducen la vida útil o compuestos que hacen a las células sensibles al estrés) incluyen: aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, asparaginasa, bcg, bicalutamida, bleomicina, busrelina, busulfán, campotecina, capecitabina, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, cladribina, clodronato, colquicina, ciclofosfamida, ciproterona, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, dienestrol, dietilstilbestrol, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, estradiol, estramustina, etopósido, exemestano, filgrastim, fludarabina, fludrocortisona, fluorouracilo, fluoximesterona, flutamida, gemcitabina, genisteína, goserelina, hidroxiurea, idarrubicina, ifosfamida, imatinib, interferón, irinotecán, ironotecán, letrozol, leucovorina, 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, suramina, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testosterona, tioguanina, tiotepa, dicloruro de titanoceno, topotecán, trastuzumab, tretinoína, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina.

Estos agentes quimioterápicos pueden categorizarse por su mecanismo de acción para en, por ejemplo, los siguientes grupos: agentes anti-metabolitos/anti-cancerígenos, tal como análogos de la pirimidina (5-fluorouracilo,

floxuridina, capecitabina, gemcitabina y citarabina) y análogos de la purina, antagonistas de folato e inhibidores relacionados (mercaptopurina, tioguanina, pentostatina y 2-clorodeoxiadenosina (cladribina)); agentes antiproliferativos/ antimitóticos incluyendo productos naturales tales como alcaloides de vinca (vinblastina, vincristina, y vinorelbina), perturbadores de microtúbulos tales como taxano (paclitaxel, docetaxel), vincristina, vinblastina, nocodazol, epotilonas y navelbina, epididodofilotoxinas (tenipósido), agentes de daño al ADN (actinomicina, amsacrina, antraciclinas, bleomicina, busulfán, camptotecina, carboplatino, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, cytoxan, dactinomicina, daunorrubicina, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, hexametilmelaminaoxaliplatino, ifosfamida, melfalán, merclaretamina, mitomicina, mitoxantrona, nitrosourea, paclitaxel, plicamicina, procarbazona, tenipósido, trietilen-tiofosforamida 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 de forma sistémica L-asparagina y priva a las células que no tienen la capacidad de sintetizar su propia asparagina); agentes antiplaquetarios; agentes alquilantes antiproliferativos/ antimitóticos tales como mostazas nitrogenadas (hexametilmelamina y tiotepa), sulfonatos de alquilo-busulfán, nitrosoureas (carmustina (BCNU) y análogos, estrepto-zocin), trazenos – dacarbazina (DTIC); antimetabolitos antiproliferativos/ antimitóticos tales como análogos de ácido fólico (metotrexato); complejos de coordinación de platino (cisplatino, carboplatino), procarbazona, hidroxurea, mitotano, aminoglutetimida; hormonas, análogos de hormonas (estrógeno, tamoxifeno, goserelina, bicalutamida, nilutamida) e inhibidores de la aromata-sa (letrozol, anastrozol); anticoagulantes (heparina, sales de heparina sintéticas y otros inhibidores de la trombina); agentes fibrinolíticos (tales como activador de plasminógeno de tejido, estreptoquinasa y uroquinasa), aspirina, inhibidores de COX-2, dipiridamol, ticlopidina, clopidogrel, abciximab; agentes antimigradores; agentes antiseoretos (breveldina); inmunosupresores (ciclosporina, tacrolimús (FK-506), sirolimús (rapamicina), azatioprina, mofetil- micofenolato); compuestos anti-angiogénicos (TNP-470, genisteína) e inhibidores de factor de crecimiento (inhibidores de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), inhibidores de factor de crecimiento fibroblastos (FGF), inhibidores de factor de crecimiento epidérmico (EGF)); bloqueante de receptor 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 (doxorubicina (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 quinasa de transducción de señal de factor de crecimiento; inductores de disfunción mitocondrial y activadores de caspasa; perturbadores de cromatina.

Estos agentes quimioterápicos pueden usarse por sí mismos con un compuesto modulador de la sirtuína que se describe en la presente memoria como inductor de la muerte celular o reductor de la vida útil o capaz de aumentar la sensibilidad al estrés y/o en combinación con otros agentes quimioterápicos. Se han desarrollado muchas terapias de combinación, incluyendo pero sin limitarse a las que se enumeran en la tabla 1.

Tabla 1: Terapias de combinación a modo de ejemplo para el tratamiento del cáncer.

Nombre	Agentes terapéuticos
ABV	Doxorrubicina, Bleomicina, Vinblastina
ABVD	Doxorrubicina, Bleomicina, Vinblastina, Dacarbazina
AC (Mama)	Doxorrubicina, Ciclofosfamida
AC (Sarcoma)	Doxorrubicina, Cisplatino
AC (Neuroblastoma)	Ciclofosfamida, Doxorubicina
ACE	Ciclofosfamida, Doxorubicina, Etopósido
ACe	Ciclofosfamida, Doxorubicina
AD	Doxorrubicina, Dacarbazina
AP	Doxorrubicina, Cisplatino
ARAC-DNR	Citarabina, Daunorrubicina
B-CAVe	Bleomicina, Lomustina, Doxorubicina, Vinblastina
BCVPP	Carmustina, Ciclofosfamida, Vinblastina, Procarbazona, Prednisona
BEACOPP	Bleomicina, Etopósido, Doxorubicina, Ciclofosfamida, Vincristina, Procarbazona, Prednisona, Filgrastim
BEP	Bleomicina, Etopósido, Cisplatino

ES 2 431 050 T3

<b>Nombre</b>	<b>Agentes terapéuticos</b>
BIP	Bleomicina, Cisplatino, Ifosfamida, Mesna
BOMP	Bleomicina, Vincristina, Cisplatino, Mitomicina
CA	Citarabina, Asparaginasa
CABO	Cisplatino, Metotrexato, Bleomicina, Vincristina
CAF	Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Fluorouracilo
CAL-G	Ciclofosfamida, Daunorrubicina, Vincristina, Prednisona, Asparaginasa
CAMP	Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Metotrexato, Procarbazina
CAP	Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Cisplatino
CaT	Carboplatino, Paclitaxel
CAV	Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina
CAVE ADD	CAV y Etopósido
CA-VP16	Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Etopósido
CC	Ciclofosfamida, Carboplatino
CDDP/VP-16	Cisplatino, Etopósido
CEF	Ciclofosfamida, Epirubicina, Fluorouracilo
CEPP(B)	Ciclofosfamida, Etopósido, Prednisona, con o sin Bleomicina
CEV	Ciclofosfamida, Etopósido, Vincristina
CF	Cisplatino, Fluorouracilo o Carboplatino Fluorouracilo
CHAP	Ciclofosfamida o Ciclofosfamida, Altretamina, Doxorrubicina, Cisplatino
ChIVPP	Clorambucilo, Vinblastina, Procarbazina, Prednisona
CHOP	Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina, Prednisona
CHOP-BLEO	Bleomicina añadida a CHOP
CISCA	Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Cisplatino
CLD-BOMP	Bleomicina, Cisplatino, Vincristina, Mitomicina
CMF	Metotrexato, Fluorouracilo, Ciclofosfamida
CMFP	Ciclofosfamida, Metotrexato, Fluorouracilo, Prednisona
CMFVP	Ciclofosfamida, Metotrexato, Fluorouracilo, Vincristina, Prednisona
CMV	Cisplatino, Metotrexato, Vinblastina
CNF	Ciclofosfamida, Mitoxantrona, Fluorouracilo
CNOP	Ciclofosfamida, Mitoxantrona, Vincristina, Prednisona
COB	Cisplatino, Vincristina, Bleomicina
CODE	Cisplatino, Vincristina, Doxorrubicina, Etopósido
COMLA	Ciclofosfamida, Vincristina, Metotrexato, Leucovorina, Citarabina
COMP	Ciclofosfamida, Vincristina, Metotrexato, Prednisona
Régimen de Cooper	Ciclofosfamida, Metotrexato, Fluorouracilo, Vincristina, Prednisona
COP	Ciclofosfamida, Vincristina, Prednisona
COPE	Ciclofosfamida, Vincristina, Cisplatino, Etopósido
COPP	Ciclofosfamida, Vincristina, Procarbazina, Prednisona
CP (Leucemia linfocítica crónica)	Clorambucilo, Prednisona

ES 2 431 050 T3

<b>Nombre</b>	<b>Agentes terapéuticos</b>
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, Fluorouracilo, Cisplatino
ELF	Etopósido, Leucovorina, Fluorouracilo
EMA 86	Mitoxantrona, Etopósido, Citarabina
EP	Etopósido, Cisplatino
EVA	Etopósido, Vinblastina
FAC	Fluorouracilo, Doxorrubicina, Ciclofosfamida
FAM	Fluorouracilo, Doxorrubicina, Mitomicina
FAMTX	Metotrexato, Leucovorina, Doxorrubicina
FAP	Fluorouracilo, Doxorrubicina, Cisplatino
F-CL	Fluorouracilo, Leucovorina
FEC	Fluorouracilo, Ciclofosfamida, Epirubicina
FED	Fluorouracilo, Etopósido, Cisplatino
FL	Flutamida, Leuprolida
FZ	Flutamida, implante de acetato de Goserelina
HDMTX	Metotrexato, Leucovorina
Hexa-CAF	Altretamina, Ciclofosfamida, Metotrexato, Fluorouracilo
ICE-T	Ifosfamida, Carboplatino, Etopósido, Paclitaxel, Mesna
IDMTX/6-MP	Metotrexato, Mercaptopurina, Leucovorina
IE	Ifosfamida, Etopósido, Mesna
IfoVP	Ifosfamida, Etopósido, Mesna
IPA	Ifosfamida, Cisplatino, Doxorrubicina
M-2	Vincristina, Carmustina, Ciclofosfamida, Prednisona, Melfalán

ES 2 431 050 T3

<b>Nombre</b>	<b>Agentes terapéuticos</b>
MAC-III	Metotrexato, Leucovorina, Dactinomicina, Ciclofosfamida
MACC	Metotrexato, Doxorubicina, Ciclofosfamida, Lomustina
MACOP-B	Metotrexato, Leucovorina, Doxorubicina, Ciclofosfamida, Vincristina, Bleomicina, Prednisona
MAID	Mesna, Doxorubicina, Ifosfamida, Dacarbazina
m-BACOD	Bleomicina, Doxorubicina, Vincristina, Ciclofosfamida, Dexametasona, Metotrexato, Leucovorina
MBC	Metotrexato, Bleomicina, Cisplatino
MC	Mitoxantrona, Citarabina
MF	Metotrexato, Fluorouracilo, Leucovorina
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, Doxorubicina, Bleomicina, Vinblastina
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, Leucovorina, 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, Fluorouracilo, Leucovorina
NOVP	Mitoxantrona, Vinblastina, Vincristina
OPA	Vincristina, Prednisona, Doxorubicina
OPPA	Procarbazina añadida 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, Fluorouracilo, Leucovorina
POC	Prednisona, Vincristina, Lomustina



<b>Nombre</b>	<b>Agentes terapéuticos</b>
ProMACE	Prednisona, Metotrexato, Leucovorina, Doxorrubicina, Ciclofosfamida, Etopósido
ProMACE/cytaBOM	Prednisona, Doxorrubicina, Ciclofosfamida, Etopósido, Citarabina, Bleomicina, Vincristina, Metotrexato, Leucovorina, Cotrimoxazol
PRoMACE/MOPP	Prednisona, Doxorrubicina, Ciclofosfamida, Etopósido, Mecloretamina, Vincristina, Procarbazina, Metotrexato, Leucovorina
Pt/VM	Cisplatino, Tenipósido
PVA	Prednisona, Vincristina, Asparaginasa
PVB	Cisplatino, Vinblastina, Bleomicina
PVDA	Prednisona, Vincristina, Daunorrubicina, Asparaginasa
SMF	Estreptozocina, Mitomicina, Fluorouracilo
TAD	Mecloretamina, Doxorrubicina, Vinblastina, Vincristina, Bleomicina, Etopósido, Prednisona
TCF	Paclitaxel, Cisplatino, Fluorouracilo
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	Vinorelbina, Cisplatino
VCAP	Vincristina, Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Prednisona
VD	Vinorelbina, 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 quimioterápicos convencionales, los compuestos moduladores de la sirtuína que se describen en la presente memoria como capaces de inducir la muerte celular o de reducir la vida útil también pueden usarse con ARN antisentido, ARNi u otros polinucleótidos para inhibir la expresión de los componentes celulares que contribuyen con la proliferación celular no deseada que son objetivos de la quimioterapia convencional. Tales objetivos son, meramente a modo de ilustración, factores de crecimiento, receptores de factor de crecimiento, proteínas reguladoras del ciclo celular, factores de transcripción, o quinasas de transducción de señal.

Las terapias de combinación que comprenden compuestos moduladores de la sirtuína y un agente convencional de quimioterapia pueden ser ventajosas sobre las terapias de combinación conocidas en la técnica porque la combinación permite al agente quimioterápico convencional ejercer un mayor efecto a una dosis menor. En una realización preferida, la dosis efectiva ( $DE_{50}$ ) para un agente quimioterápico, o una combinación de agentes quimioterápicos convencionales, cuando se usa en combinación con un compuesto modulador de la sirtuína es por lo menos 2 veces menos que el  $DE_{50}$  para el agente quimioterápico sólo, e incluso más preferiblemente a 5 veces, 10 veces, o incluso 25 veces menos. A la inversa, el índice terapéutico (TI) para dicho agente quimioterápico o combinación de dicho agente quimioterápico cuando se usa en combinación con un compuesto modulador de la sirtuína que se describe en la presente memoria puede ser por lo menos 2 veces mayor que el TI para el régimen quimioterápico convencional sólo, e incluso más preferible a 5 veces, 10 veces o 25 veces más.

#### *Trastornos/ Enfermedades neuronales*

En ciertos aspectos, los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden usarse para tratar pacientes que sufren enfermedades neurodegenerativas, y lesión traumática o mecánica al sistema nervioso central (SNC), a la médula espinal o el sistema nervioso periférico (SNP). La enfermedad neurodegenerativa involucra, de forma típica, reducciones en la masa y volumen del cerebro humano, lo que puede deberse a la atrofia y/o muerte de células cerebrales, que sean mucho más profundas que las que se dan una persona saludable que pueden ser atribuidas al envejecimiento. Las enfermedades neurodegenerativas pueden evolucionar de forma gradual, después de un período largo de función cerebral normal, debido a degeneración progresiva (por ejemplo, disfunción y muerte de las células nerviosas) de regiones específicas del cerebro. De forma alternativa, las enfermedades neurodegenerativas pueden tener un comienzo inmediato, como aquellos atribuibles a los traumatismos y las toxinas. El comienzo de la degeneración cerebral puede preceder a la expresión clínica por muchos años. Los ejemplos de enfermedades neurodegenerativas incluyen, pero no están limitadas a, enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Huntington (EH), esclerosis amiotrófica lateral (ELA), enfermedad de Lou Gehrig, enfermedad de cuerpo de Lewy difusa, corea – acantocitosis, esclerosis primaria lateral, enfermedades oculares (neuritis ocular), neuropatías inducidas por quimioterapia (por ejemplo a partir de vincristina, paclitaxel, bortezomib), las neuropatías inducidas por diabetes y la ataxia de Friedreich. Los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden usarse para tratar estos trastornos y otros, como se describe posteriormente.

El Alzheimer es un trastorno del sistema nervioso central que da como resultado la pérdida de la memoria, comportamiento errático, cambios de personalidad y una reducción de las capacidades cognitivas. Estas pérdidas están relacionadas con la muerte de un tipo específico de células cerebrales y la ruptura de conexiones y su red de soporte (por ejemplo, células gliales) entre las mismas. La EA se ha descrito como el desarrollo de la infancia a la inversa. En la mayor parte de las personas con EA, los síntomas aparecen después de la edad de 60. Los primeros síntomas incluyen la pérdida de la memoria a corto plazo, fallos de juicio y cambios en la personalidad. Más tarde en la enfermedad, los que padecen EA pueden olvidar cómo hacer tareas simples como lavar sus manos. Con el tiempo, las personas con EA pierden toda capacidad de razonamiento y se vuelven dependientes de otras personas para su cuidado diario. Por último, la enfermedad se vuelve tan debilitante que los pacientes acaban postrados en cama y típicamente desarrollan dolencias coexistentes.

La EP es un trastorno crónico, incurable e imparable del sistema nervioso central que da como resultado movimientos del cuerpo descontrolados, rigidez, temblores, y disquinesia, y se asocia con la muerte de células cerebrales en un área del cerebro que produce dopamina, una sustancia química que ayuda a controlar la actividad muscular. En la mayor parte de las personas con EP, los síntomas aparecen después de la edad de 50. Los síntomas iniciales de la EP son un temblor pronunciado que afecta a las extremidades, notablemente en las manos o labios. Son síntomas característicos posteriores de la EP la rigidez o lentitud de movimiento, caminar arrastrando los pies, postura encorvada, y equilibrio deteriorado. Existe una amplia gama de los síntomas secundarios, tales como pérdida de memoria, demencia, depresión, cambios emocionales, dificultades al tragar, habla anormal, disfunción sexual, y problemas de vejiga e intestino. Estos síntomas comenzarán a interferir con actividades rutinarias, tales como sostener un tenedor o leer un periódico. Por último, las personas con EP quedan tan profundamente discapacitadas que acaban postradas en cama.

La ELA (una enfermedad de las neuronas motoras) es un trastorno del sistema nervioso central que ataca las células neuronales motoras, componentes del sistema nervioso central que conectan el cerebro a los músculos esqueléticos. En la ELA, las neuronas motoras se deterioran y, con el tiempo, mueren y, a pesar de que el cerebro de una persona normalmente permanece completamente en funcionamiento y alerta, la orden de moverse nunca alcanza los músculos. La mayor parte de las personas que contraen ELA tienen una edad entre 40 y 70 años. Las primeras neuronas motoras que se debilitan son las que controlan los brazos o las piernas. Los que padecen ELA pueden tener problemas para caminar, pueden dejar caer cosas, caer, presentar un habla balbuceante, y reír o llorar de forma incontrolada. Con el tiempo, los músculos en las extremidades comienzan a atrofiarse debido a la falta de uso. Esta debilidad muscular se volverá debilitante y la persona necesitará una silla de ruedas o será incapaz de desenvolverse fuera de la cama.

Las causas de estas enfermedades neurológicas han permanecido en gran medida desconocidas. Estas se definen convencionalmente como enfermedades diferentes, si bien muestran claramente unas similitudes extraordinarias en

los procesos básicos y comúnmente muestran un solapamiento de los síntomas que excede en gran medida el que se esperaría por la mera casualidad. Las definiciones de enfermedades actuales son incapaces de tratar adecuadamente el problema del solapamiento y se ha demandado una nueva clasificación de los trastornos neurodegenerativos.

- 5 La EH es otra enfermedad neurodegenerativa que resulta de degeneración genéticamente programada de las neuronas en ciertas zonas del cerebro. Esta degeneración causa movimientos no controlados, pérdida de facultades intelectuales y perturbaciones emocionales. La EH es una enfermedad familiar, que pasa de padres a hijos a través de una mutación dominante en el gen de tipo natural. Algunos síntomas tempranos de la EH son cambios de humor, depresión, irritabilidad o problemas al conducir, con el aprendizaje de cosas nuevas, al recordar un hecho, o al tomar  
10 una decisión. A medida que la enfermedad progresa, la concentración en tareas intelectuales se vuelve cada vez más difícil y el paciente puede tener dificultades para alimentarse a sí mismo y para tragar.

15 La enfermedad de Tay–Sachs y la enfermedad de Sandhoff son enfermedades de almacenamiento de glicolípidos producidas por la carencia de  $\beta$ -hexosaminidasa lisosómica (Gravel y col., en *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, eds. Scriver y col., McGraw–Hill, Nueva York, págs 2839–2879, 1995). En ambas enfermedades, el GM2 gangliósido y los glicolipilsustratos para la p-hexosaminidasa se acumulan en el sistema nervioso y desencadenan una neurodegeneración aguda. En las formas más severas, la aparición de los síntomas comienza en la primera infancia. Sobreviene entonces un transcurso neurodegenerativo precipitado, en el que los lactantes afectados que muestran disfunción motora, convulsiones, pérdida visual y sordera. La muerte se produce usualmente antes de los 2–5 años de edad. Se ha mostrado la pérdida neuronal a través de un mecanismo apoptótico (Huang y col., *Hum. Mol. Genet.* 6: 1879–1885, 1997).  
20

Es bien sabido que la apoptosis juega un rol en la patogénesis del SIDA en el sistema inmune. Sin embargo, el VIH–1 también induce la enfermedad neurológica. Shi y col. (*J. Clin. Invest.* 98: 1979–1990, 1996) examinaron la apoptosis inducida por la infección por VIH–1 del SNC en un modelo *in vitro* y en tejido cerebral de pacientes con SIDA, y se encontró que la infección por VIH–1 de cultivos cerebrales primarios indujo apoptosis en las neuronas y astrocitos *in vitro*. También se detectó apoptosis de las neuronas y astrocitos en el tejido cerebral de 10/11 pacientes con SIDA, incluyendo 5/5 pacientes con demencia por VIH–1 y 4/5 pacientes sin demencia.  
25

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

30 El tipo más común de neuropatía asociada con el SIDA es la polineuropatía simétrica distal (DSPN). Este síndrome es un resultado de la degeneración de los nervios y se caracteriza por entumecimiento y una sensación de alfileres y agujas. La DSPN produce pocas anomalías serias y da como resultado, en su mayor parte, entumecimiento u hormigueo de los pies y reflejos ralentizados en los tobillos. Esto se produce, en general, con inmunosupresión más severa y progresa de forma constante. El tratamiento con antidepresivos tricíclicos alivia los síntomas pero no afecta al 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 la AIDP/CIDP existe damage a la membrana grasa que cubre los impulsos nerviosos. Este tipo de neuropatía implica inflamación y se asemeja al deterioro muscular que se identifica a menudo con el uso a largo plazo de AZT. Esta puede ser la primera manifestación de infección por VIH, en donde el paciente puede no quejarse por dolor, pero es incapaz de responder a pruebas de reflejos convencionales. Este tipo de neuropatía puede estar asociada con la seroconversión, caso en el que el mismo puede a veces resolverse de forma espontánea. Esto puede servir como signo de infección por VIH e indicar que podría ser momento de considerar una terapia antiviral. La AIDP/CIDP puede ser de origen auto–inmune.  
40

45 Las neuropatías inducidas por fármacos, o tóxicas, pueden ser muy dolorosas. Los fármacos antivirales comúnmente dan lugar a neuropatía periférica, al igual que otros fármacos p. ej. vincristina, dilantina (una medicación anti–convulsiones), vitaminas en dosis altas, isoniazida, y antagonistas de ácido fólico. La neuropatía periférica se usa a menudo en ensayos clínicos para antivirales como un efecto secundario de limitación de dosis, lo que significa que no deberían administrarse más fármacos. Adicionalmente, el uso de tales fármacos puede exacerbar neuropatías por lo demás menores. Usualmente, estas neuropatías inducidas por fármacos son reversibles con la interrupción del fármaco.

50 El CMV da lugar a varios síndromes neurológicos en el SIDA, incluyendo encefalitis, mielitis, y polirradiculopatía.

La pérdida neuronal también es una característica dominante en las enfermedades de priones, como la enfermedad de Creutzfeldt–Jakob en los seres humanos, la enfermedad de las vacas locas en el ganado, la enfermedad de Scrapie en las cabras y chivos, y la encefalopatía felina esponjiforme (FSE) en gatos. Los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden ser útiles para el tratamiento o la  
55 prevención de la pérdida neuronal debido a estas enfermedades previas.

En otra realización, un compuesto modulador de la sirtuína que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína puede usarse para el tratamiento o la prevención de cualquier enfermedad o trastorno que involucre la axonopatía. La axonopatía distal es un tipo de neuropatía periférica que da como resultado algún trastorno

metabólico o tóxico de las neuronas del sistema nervioso periférico (SNP). Es la respuesta común de los nervios a perturbaciones metabólicas o tóxicas, y en ese sentido puede estar causada por enfermedades metabólicas tales como la diabetes, fallo renal, síndromes de deficiencia como malnutrición y alcoholismo, o los efectos de toxinas o fármacos. La causa más común de axonopatía distal es la diabetes, y la axonopatía distal más común es la neuropatía diabética. Las porciones más distales de los axones son usualmente las primeras en degenerarse, y la atrofia axonal avanza lentamente hacia el cuerpo celular del nervio. Si el estímulo nocivo se elimina, la regeneración es posible, a pesar de que el pronóstico disminuye dependiendo de la duración y gravedad del estímulo. Aquellos con axonopatías distales presentan a menudo perturbaciones de los sensores motores simétricos en forma de guante. Los reflejos en los tendones profundos y las funciones autonómicas del sistema nervioso (SNA) también se pierden o disminuyen en las regiones afectadas.

Las neuropatías diabéticas son trastornos neuropáticos asociados con la diabetes mellitus. Estos estados resultan usualmente de una lesión microvascular diabética que implica vasos sanguíneos pequeños que alimentan a los nervios (vasa nervorum). Condiciones que son comunes, de forma relativa, que pueden estar asociadas con la neuropatía diabética incluyen la parálisis del tercer nervio, mononeuropatía, mononeuritis múltiple, amiotrofia diabética, una polineuropatía dolorosa, neuropatía autonómica, y neuropatía toracoabdominal. Las manifestaciones clínicas de la neuropatía diabética incluyen, por ejemplo, polineuropatía sensoriomotora tal como entumecimiento, pérdida sensorial, disestesia y dolor nocturno; neuropatía autónoma tal como vaciamiento gástrico retardado o gastroparesia; y neuropatía craneal tal como neuropatías oculomotoras (3ª) o Mononeuropatías de los nervios espinales torácicos o lumbares.

La neuropatía periférica es la expresión médica para el daño a los nervios del sistema nervioso periférico, que puede estar causado por enfermedades del nervio o por efectos secundarios de enfermedades sistémicas. Las neuropatías periféricas varían en su presentación y origen, y pueden afectar al nervio o la unión neuromuscular. Las mayores causas de neuropatía periférica incluyen los espasmos, las deficiencias nutricionales, y el VIH, aunque la diabetes es la causa más común. La presión mecánica debida a permanecer en una posición durante demasiado tiempo, un tumor, hemorragia intraneural, la exposición del cuerpo a condiciones extremas tales como radiación, temperaturas frías, o sustancias tóxicas puede dar lugar también a neuropatía periférica.

En una realización a modo de ejemplo, un compuesto modulador de la sirtuína que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína puede usarse para el tratamiento o la prevención de la esclerosis múltiple (EM), incluyendo la esclerosis múltiple regresiva, y la esclerosis múltiple monosintomática, y otras condiciones desmielinisantes, como por ejemplo, la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), o síntomas asociados a la misma.

La EM es una enfermedad crónica a menudo incapacitante del sistema nervioso central. Varias líneas convergentes de evidencia apuntan a la posibilidad de que la enfermedad esté producida por una perturbación en la función inmune, a pesar de que la causa de esta perturbación no se ha establecido. Esta perturbación permite que las células del sistema inmune "ataquen" a la mielina, la envoltura aislante que contiene grasa que rodea el axón de los nervios ubicados en el sistema nervioso central ("SNC"). Cuando la mielina está dañada, los pulsos eléctricos no pueden viajar con rapidez o normalmente a lo largo de las rutas de fibra nerviosa en el cerebro y la médula espinal. Esto da como resultado la perturbación de la conductividad eléctrica normal dentro de los axones, fatiga y perturbaciones de la visión, fuerza, coordinación, equilibrio, sensaciones y función de la vejiga y del intestino.

En ese sentido, la EM es ahora un trastorno neurológico común y bien conocido que se caracteriza por parches episódicos de inflamación y desmielinación que pueden tener lugar en cualquier parte en el SNC. No obstante, casi siempre sin implicación alguna de los nervios periféricos asociados con los mismos. La desmielinación produce una situación análoga a la resultante de grietas o desgarros en un aislante que rodea a un cable eléctrico. Es decir, cuando la envoltura aislante se rompe, el circuito se "cortocircuita" y el aparato eléctrico asociado con el mismo funcionará de forma intermitente, o no lo hará en absoluto. Tal pérdida de mielina que rodea las fibras nerviosas da como resultado cortocircuitos en los nervios que atraviesan el cerebro y la médula espinal, lo que da como resultado, de este modo, síntomas de EM. Se ha hallado además que tal desmielinación se produce en parches, en lugar de a lo largo de la totalidad del SNC. Además, tal desmielinación puede ser intermitente. Por lo tanto, tales placas están diseminadas tanto en el tiempo como en el espacio.

Se cree que la patogenia implica una perturbación local de la barrera hematoencefálica que da lugar a una respuesta inmune e inflamatoria localizada, con daño consiguiente a la mielina y por lo tanto a las neuronas.

Clínicamente, la EM existe en ambos sexos y puede tener lugar a cualquier edad. No obstante, su presentación más común se encuentra en el adulto relativamente joven, a menudo con una única lesión focal tal como un daño del nervio óptico, un área de anestesia (pérdida de sensaciones), o parestesia (pérdida localizada de percepción sensorial), o debilidad muscular. Además, puede producirse vertigo, visión doble, dolor localizado, incontinencia y dolor en los brazos y piernas tras la flexión del cuello, así como una gran variedad de los síntomas menos comunes.

Un ataque inicial de EM es a menudo transitorio, y este puede darse semanas, meses o años antes de que tenga lugar otro ataque. Algunos individuos pueden disfrutar de un estado estable relativamente libre de sucesos durante un gran número de años, mientras que otros, menos afortunados, pueden experimentar un transcurso descendente continuo que termina en la parálisis completa. En la mayor parte de los casos, existe una serie de remisiones y

recaídas, en donde cada recaída deja a un paciente algo pero de lo que estaba. Las recaídas pueden desencadenarse por sucesos estresantes, infecciones virales o toxinas. En las mismas, una temperatura corporal elevada, es decir, una fiebre, empeorará el estado, o como una reducción de la temperatura por, por ejemplo, un baño frío, puede mejorar el estado.

- 5 En otra realización más, un compuesto modulador de la sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede usarse para tratar traumatismos a los nervios, incluyendo traumatismo debido a enfermedad, lesión (incluyendo intervención quirúrgica), o lesión ambiental (por ejemplo, neurotoxinas, alcoholismo, etc.).

Los compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden también ser útiles para prevenir, tratar y aliviar síntomas de varios trastornos del sistema nervioso periférico, tal como los que se describen posteriormente. El SNP se compone de los nervios que conducen a o rama saliente de la médula espinal y el SNC. Los nervios periféricos manejan un conjunto diverso de funciones en el cuerpo, incluyendo funciones sensoriales, motoras y autónomas. Cuando un individuo presenta una neuropatía periférica, los nervios del SNP se han dañado. El daño nervioso puede surgir de un número de causas, tales como enfermedad, lesión física, envenenamiento o malnutrición. Estos agentes pueden afectar a nervios o bien aferentes o bien eferentes. Dependiendo de la causa del daño, el axón de célula nerviosa, su envoltura de mielina protectora, o ambos, pueden ser dañados o destruidos.

La expresión “neuropatía periférica” abarca un amplio intervalo de trastornos en los cuales los nervios fuera del cerebro y la médula espinal – nervios periféricos – han sido dañados. También puede hacerse referencia a la neuropatía periférica como neuritis periférica, o si muchos nervios están involucrados, pueden usarse las expresiones polineuropatía o polineuritis.

Neuropatía periférica es un trastorno ampliamente extendido, y existen muchas causas subyacentes. Algunas de estas causas son comunes, tal como la diabetes, y otras son extremadamente raras, tal como el envenenamiento por acrilamida y ciertos trastornos hereditarios. La causa más común a nivel mundial de neuropatía periférica es la lepra. La lepra está causada por la bacteria *Mycobacterium leprae*, la cual ataca los nervios periféricos de las personas afectadas.

La lepra es extremadamente rara en los Estados Unidos, en donde la diabetes es la causa más comúnmente conocida de neuropatía periférica. Se ha estimado que más de 17 millones de personas en los Estados Unidos y Europa presentan polineuropatía relacionada con la diabetes. Muchas neuropatías son idiopáticas; no puede encontrarse causa conocida alguna. La más común de las neuropatías periféricas hereditarias en los Estados Unidos es la enfermedad de Charcot– Marie–Tooth, la cual afecta a aproximadamente 125.000 personas.

Otra de las neuropatías periféricas mejor conocidas es el síndrome de Guillain–Barré, que surge de complicaciones asociadas con enfermedades virales, tales como citomegalovirus, virus de Epstein–Barr, y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), o infección bacteriana, incluyendo *Campylobacter jejuni* y la enfermedad de Lyme. La tasa de incidencia a nivel mundial es de aproximadamente 1,7 casos por 100.000 de personas al año. Otras causas bien conocidas de neuropatías periféricas incluyen el alcoholismo crónico, infección del virus de la varicela zóster, botulismo y poliomielitis. La neuropatía periférica puede desarrollarse como un síntoma primario, o puede deberse a otra enfermedad. Por ejemplo, la neuropatía periférica es sólo un síntoma de enfermedades tales como la neuropatía amiloide, ciertos cánceres, o trastornos neurológicos hereditarios. Tales enfermedades pueden afectar al SNP y el SNC, así como a otros tejidos corporales.

Otras enfermedades del SNP que pueden tratarse con compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina incluyen: las neuropatías del Plexo braquial (enfermedades de las raíces torácicas cervical y primera, cordones, troncos nerviosos, y componentes del nervio periférico del plexo braquial. Las manifestaciones clínicas incluyen regional dolor, parestesia; debilidad en los músculos y sensaciones disminuidas en la extremidad superior. Estos trastornos pueden estar asociados con traumatismo, incluyendo lesiones de nacimiento; síndrome de salida torácica; neoplasmas, neuritis, radioterapia; y otros estados. Véase Adams y col., Principles of Neurology, 6ª ed, págs. 1351–2); Neuropatías diabéticas (trastornos periféricos, autónomos, y del nervio craneal que están asociados con la diabetes mellitus). Estos estados resultan usualmente de una lesión microvascular diabética que implica a los vasos sanguíneos pequeños que alimentan a los nervios (vasa nervorum). Unas condiciones relativamente comunes que pueden estar asociadas con la neuropatía diabética incluyen la parálisis del tercer nervio; mononeuropatía; mononeuritis múltiple; amiotrofia diabética; una polineuropatía dolorosa; neuropatía autónoma; y neuropatía toracoabdominal (véase Adams y col., Principles of Neurology, 6ª ed, pág. 1325); mononeuropatías (enfermedad o traumatismo que implica un único nervio periférico en aislamiento, o desproporcionado para evidenciar una disfunción periférica nerviosa difusa). La mononeuritis múltiple hace referencia a un estado caracterizado por múltiples lesiones nerviosas aisladas. Las mononeuropatías pueden resultar de una amplia variedad de causas, incluyendo isquemia; lesión traumática; compresión; enfermedades del tejido conectivo; trastornos de traumatismos acumulativos; y otros estados; la Neuralgia (dolor intenso o agudo que se produce a lo largo del curso o la distribución de un nervio periférico o craneal); Neoplasmas del Sistema nervioso periférico (neoplasmas que surgen del tejido nervioso periférico). Esto incluye neurofibromas; Schwannomas; tumores celulares granulares; y tumores de la envoltura de nervio periférico malignos (véase DeVita Jr y col., Cancer: Principles and Practice of Oncology, 5ª ed, págs. 1750–1); y Síndromes de Compresión Nerviosa

(compresión mecánica de nervios o raíces nerviosas por causas internas o externas). Estos pueden dar como resultado un bloque de conducción para impulsos nerviosos, debido a, por ejemplo, disfunción de la envoltura de mielina, o pérdida axonal. Las lesiones de nervio y de envoltura nerviosa pueden estar producidas por isquemia; inflamación; o un efecto mecánico directo; la Neuritis (un término general que indica inflamación de un nervio periférico o craneal). La manifestación clínica puede incluir dolor; parestesias; paresia; o hiperestesia; Polineuropatías (enfermedades de múltiples nervios periféricos). Las varias formas están categorizadas por el tipo de nervio afectado (p. ej., sensorial, motor, o autónomo), por la distribución de lesión nerviosa (p. ej., distal frente a proximal), por el componente nervioso principalmente afectado (p. ej., desmielinante frente a axonal), por la etiología, o por el patrón de herencia.

En otra realización, un compuesto activador de la sirtuina puede usarse para tratar o prevenir la neuropatía inducida por agentes quimioterápicos. Los compuestos moduladores de la sirtuina pueden administrarse antes de la administración del agente quimioterápico, concurrentemente con la administración del fármaco quimioterápico, y/o después de la iniciación de la administración del fármaco quimioterápico. Si el compuesto activador de la sirtuina se administra después de la iniciación de la administración del fármaco quimioterápico, se desea que el compuesto activador de la sirtuina se administre antes, o con los primeros signos, de la neuropatía inducida por agentes quimioterápicos.

Los fármacos de quimioterapia pueden dañar cualquier parte del sistema nervioso. La encefalopatía y la mielopatía son, afortunadamente, muy raras. El daño a los nervios periféricos es mucho más común y puede ser un efecto secundario del tratamiento experimentado por las personas con cánceres, tales como linfoma. La mayor parte de la neuropatía afecta a nervios sensoriales en lugar de motores. Por lo tanto, los síntomas comunes son hormigueo, entumecimiento o una pérdida del equilibrio. Los nervios más largos en el cuerpo parecen ser los más sensibles, de ahí el hecho de que la mayoría de pacientes notifique entumecimiento o alfileres y agujas en sus manos y pies.

Los fármacos de quimioterapia que se asocian más comúnmente con la neuropatía, son los alcaloides de Vinca (fármacos anti-cancerígenos obtenidos originalmente de un miembro de la vincapervinca— el género de la planta de la Vinca) y un fármaco que contiene platino denominado Cisplatino. Los alcaloides de Vinca incluyen los fármacos vinblastina, vincristina y vindesina. Muchos tratamientos de quimioterapia de combinación para linfomas, por ejemplo CHOP y CVP, contienen vincristina, que es el fármaco que se sabe que da lugar a este problema con la mayor frecuencia. De hecho, el riesgo de la neuropatía es que limita la dosis de vincristina que puede administrarse.

Los estudios que se han realizado han mostrado que la mayoría de pacientes perderá parte de sus reflejos en sus piernas como resultado del tratamiento con vincristina y que muchos experimentarán un cierto grado de hormigueo (parestesia) en sus dedos de manos y pies. La neuropatía no se manifiesta usualmente a sí misma directamente al inicio del tratamiento, sino que comienza, en general, a lo largo de un periodo de unas pocas semanas. No es esencial detener el fármaco con la primera aparición de los síntomas, pero si la neuropatía progresa lo anterior puede ser necesario. Es muy importante que los pacientes notifiquen tales síntomas a sus médicos, debido a que el daño nervioso es, en gran medida, reversible si el fármaco se interrumpe. La mayor parte de los médicos reducirá a menudo la dosis de vincristina o cambiará a otra forma de alcaloide de Vinca, tal como la vinblastina o vindesina si los síntomas son leves. Ocasionalmente, los nervios que abastecen al intestino se ven afectados, dando lugar a dolor abdominal y estreñimiento.

En otra realización, un compuesto activador de la sirtuina puede usarse para tratar o prevenir una enfermedad de la poliglutamina. La Enfermedad de Huntington (EH) y la Ataxia espinocerebelosa 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 secuencia de tripletes. En referencia a este mecanismo común, estos trastornos se denominan enfermedades de repetición de trinucleótidos. Se sabe que por lo menos 14 de tales enfermedades afectan a los seres humanos. Nueve de estas, incluyendo la SCA1 y la Enfermedad de Huntington, tienen CAG como la secuencia repetida (véase la tabla 2 a continuación). Debido a que CAG codifica para un aminoácido denominado glutamina, estos nueve trastornos de repetición de trinucleótidos se conocen colectivamente como enfermedades de la poliglutamina.

A pesar de que los genes implicados en las diferentes enfermedades de la poliglutamina tienen poco en común, los trastornos que causan siguen un curso sorprendentemente similar. Cada enfermedad se caracteriza por una degeneración progresiva de un grupo distinto de células nerviosas. Los principales síntomas de estas enfermedades son similares, aunque no idénticos, y usualmente afectan a las personas durante la madurez. Dadas las similitudes en los síntomas, se plantea la hipótesis de que las enfermedades de la poliglutamina progresan a través de mecanismos celulares comunes. En los últimos años, los científicos han realizado grandes avances en desentrañar cuales son los mecanismos.

Por encima de un cierto umbral, cuanto mayor es el número de repeticiones de glutamina en una proteína, más temprana será la aparición de enfermedad y más severos los síntomas. Esto sugiere que trectos de glutamina anómalamente largos vuelven a su proteína huésped tóxica para las células nerviosas.

Para someter a prueba la presente hipótesis, los científicos han generado ratones modificados por ingeniería genética que expresan proteínas con largos trectos de poliglutamina. Con independencia de si los ratones expresan

proteínas de longitud completa o sólo aquellas porciones de las proteínas que contienen los trectos de poliglutamina, estos desarrollan síntomas de enfermedades de la poliglutamina. Esto sugiere que un tracto de poliglutamina largo es, por sí mismo, dañino para las células y no tiene que ser parte de una proteína funcional para dar lugar a su damage.

- 5 Por ejemplo, se cree que los síntomas de SCA1 no están causados directamente por la pérdida de la función de ataxina-1 normal sino más bien por la interacción entre la ataxina-1 y otra proteína denominada LANP. La LANP es necesaria para que las células nerviosas se comuniquen una con otra y, por lo tanto, para su supervivencia. Cuando la proteína ataxina-1 mutante se acumula en el interior de las células nerviosas, esta "atrapa" la proteína LANP, interfiriendo con su función normal. Después de un tiempo, parece que la ausencia de la función LANP da lugar a
- 10 que las células nerviosas funcionen incorrectamente.

Tabla 2. Resumen de Enfermedades de la poliglutamina.

Enfermedad	Nombre del gen	Ubicación cromosómica	Patrón de herencia	Proteína	Longitud de repetición normal	Longitud de repetición con enfermedad
Atrofia muscular espinobulbar (enfermedad de Kennedy)	AR	Xq13-21	recesivo de unión a X	receptora de andrógeno (AR)	9-36	38-62
enfermedad de Huntington	EH	4p16.3	dominante autosómico	huntingtina	6-35	36-121
Atrofia dentatorrubral-palidoluisiana (síndrome de Haw River)	DRPLA	12p13.31	dominante autosómico	atrofina-1	6-35	49-88
Ataxia espinocerebelosa de tipo 1	SCA1	6p23	dominante autosómico	ataxina-1	6-44	39-82
Ataxia espinocerebelosa de tipo 2	SCA2	12q24.1	dominante autosómico	ataxina-2	15-31	36-63
Ataxia espinocerebelosa de tipo 3 (enfermedad de Machado-Joseph)	SCA3	14q32.1	dominante autosómico	ataxina-3	12-40	55-84
Ataxia espinocerebelosa de tipo 6	SCA6	19p13	dominante autosómico	Subunidad de canal de calcio dependiente del voltaje de $\alpha_{1A}$	4-18	21-33
Ataxia espinocerebelosa de tipo 7	SCA7	3p12-13	dominante autosómico	ataxina-7	4-35	37-306
Ataxia espinocerebelosa de tipo 17	SCA17	6q27	dominante autosómico	proteína de unión de TATA	25-42	45-63

Muchos factores de transcripción se han encontrado también en inclusiones neuronales en diferentes enfermedades.

Es posible que estos factores de transcripción interactúen con las proteínas que contienen poliglutamina y entonces queden atrapados en las inclusiones neuronales. Esto podría, a su vez, evitar que los factores de transcripción activaran y desactivaran los genes según necesite la célula. Otra observación es la hipoacetilación de histonas en las células afectadas. Esto ha conducido a la hipótesis de que los inhibidores de la Histona Desacetilasa de Clase I/II (HDAC I/II), de los cuales se sabe que aumentan la acetilación de histona, puede ser una terapia novedosa para enfermedades de la poliglutamina (solicitud de patente de los EE. UU. 10/476.627; "Method of treating neurodegenerative, psychiatric, and other disorders with deacetylase inhibitors").

En aún otra realización, la invención provee un método para el tratamiento o la prevención de neuropatía en relación con lesiones o enfermedades isquémicas, tal como, por ejemplo, cardiopatía coronaria (incluyendo insuficiencia cardíaca congestiva e infartos de miocardio), apoplejía, emfisema, choque hemorrágico, enfermedad vascular periférica (extremidades inferiores y superiores) y lesiones relacionadas con trasplantes.

En ciertas realizaciones, la invención provee un método para tratar una célula del sistema nervioso central para prevenir daño en respuesta a una reducción de flujo sanguíneo a la célula. De forma típica, el grado de gravedad del daño que puede ser prevenido dependerá en gran parte del grado de reducción en flujo sanguíneo a la célula y la duración de la reducción. A modo de ejemplo, la cantidad normal de perfusión a la materia gris del cerebro en humanos es de aproximadamente 60 a 70 ml/100 g de tejido cerebral/min. La muerte de las células del sistema nervioso central típicamente se produce cuando el flujo de sangre cae por debajo de aproximadamente 8–10 ml/100 g de tejido cerebral/min mientras que, a unos niveles ligeramente más altos (es decir 20–35 ml/100 g de tejido cerebral/min), el tejido permanece vivo pero no es capaz de realizar sus funciones. En una realización, la muerte celular por apoptosis o necrosis puede prevenirse. En todavía una realización más, el daño mediado–isquémico, tal como un edema citotóxico o en la anoxemia del tejido del sistema nervioso, puede ser prevenido. En cada realización, la célula del sistema nervioso central puede ser una célula espinal o una célula cerebral.

Otro aspecto involucra la administración de un compuesto activador de la sirtuina a un sujeto para tratar un estado isquémico del sistema nervioso central. Un número de estados isquémicos del sistema nervioso central pueden ser tratados por los compuestos activadores de la sirtuina que se describen en la presente memoria. En una realización, el estado isquémico es una apoplejía que da como resultado cualquier tipo de daño isquémico al sistema nervioso central, tal como muerte celular apoptótica o necrótica, edema citotóxico o anoxia a tejido del sistema nervioso central. La apoplejía puede impactar cualquier área del cerebro o estar causada por cualquier etiología comúnmente conocida por dar como resultado la ocurrencia de una apoplejía. En una alternativa a la presente realización, la apoplejía es una apoplejía del tronco encefálico. Hablando en sentido general, las apoplejías del tronco encefálico atacan al tronco encefálico, que controla funciones de soporte vital involuntarias tales como la respiración, presión sanguínea y latido del corazón. En otra alternativa a la presente realización, la apoplejía es una apoplejía cerebelosa. Típicamente, las apoplejías cerebelosas afectan al área del cerebelo del cerebro, que controla el equilibrio y coordinación. En otra realización más, la apoplejía es una apoplejía embólica. En términos generales, las apoplejías embólicas pueden afectar a cualquier región del cerebro y típicamente resultan del bloqueo de una arteria por una oclusión de vasos. En otra alternativa más, la apoplejía puede ser una apoplejía hemorrágica. Al igual que las apoplejías isquémicas, la apoplejía hemorrágica puede afectar a cualquier región del cerebro, y típicamente resulta de la rotura de un vaso sanguíneo caracterizada por una hemorragia (sangrado) en el interior o alrededor del cerebro. En una realización más, la apoplejía es una apoplejía trombótica. Típicamente, las apoplejías trombóticas resultan del bloqueo de un vaso sanguíneo por depósitos acumulados.

En otra realización, el estado isquémico puede resultar de un trastorno que se produce en una parte del cuerpo del sujeto fuera del sistema nervioso central, pero que sigue causando aún una reducción en el flujo de sangre al sistema nervioso central. Estos trastornos pueden incluir, pero no se limitan a, un trastorno vascular periférico, una trombosis venosa, un émbolo pulmonar, arritmia (p. ej. fibrilación atrial), un infarto de miocardio, un ataque isquémico transitorio, angina inestable, o anemia drepanocítica. Además, el estado isquémico del sistema nervioso central puede tener lugar como resultado de que el sujeto experimente un procedimiento quirúrgico. A modo de ejemplo, el sujeto puede estar experimentando cirugía de corazón, cirugía de pulmón, cirugía espinal, cirugía cerebral, cirugía vascular, cirugía abdominal, o cirugía de trasplante de órganos. La cirugía de trasplante de órganos puede incluir cirugía de trasplante corazón, pulmón, páncreas, riñón o hígado. Además, el estado isquémico del sistema nervioso central puede tener lugar como resultado de un traumatismo o lesión a una parte del cuerpo del sujeto fuera del sistema nervioso central. A modo de ejemplo, el traumatismo o lesión puede dar lugar a un grado de sangrado que reduce de forma significativa el volumen total de sangre en el cuerpo del sujeto. Debido a este volumen total reducido, la cantidad de flujo de sangre al sistema nervioso central se ve reducida concomitantemente. A modo de ejemplo adicional, el traumatismo o lesión puede dar como resultado también la formación de una oclusión de vasos que restrinja el flujo de sangre al sistema nervioso central.

Por supuesto, se contempla que los compuestos activadores de la sirtuina puedan emplearse para tratar el estado isquémico del sistema nervioso central con independencia de la causa del estado. En una realización, el estado isquémico resulta de una oclusión de vasos. La oclusión de vasos puede ser cualquier tipo de oclusión, pero típicamente es una trombosis cerebral o una embolia. En una realización más, el estado isquémico puede resultar de una hemorragia. La hemorragia puede ser cualquier tipo de hemorragia, pero en general es una hemorragia cerebral o una hemorragia subaracnoidea. En todavía otra realización, el estado isquémico puede resultar del estrechamiento de un vaso. Hablando en sentido general, el vaso puede estrecharse como resultado de una vasoconstricción tal



como se produce durante vasoespasmos, o debido a la arteriosclerosis. En aún otra realización, el estado isquémico resulta de una lesión al cerebro o a la médula espinal.

En otro aspecto más, un compuesto activador de la sirtuína puede administrarse para reducir el tamaño de infarto del núcleo isquémico siguiendo un estado isquémico del sistema nervioso central. Aún más, un compuesto activador de la sirtuína puede también resultar beneficioso al administrarse con la intención de reducir el tamaño de la penumbra isquémica o la zona transicional siguiendo un estado isquémico del sistema nervioso central. En una realización, un régimen de combinación de fármacos puede incluir fármacos o compuestos para el tratamiento o la prevención de trastornos neurodegenerativos o condiciones secundarias asociadas a estos estados. Por lo tanto, un régimen de combinación de fármaco puede incluir uno o más activadores de la sirtuína y uno o más agentes anti-neurodegeneración. Por ejemplo, uno o más compuestos activadores de la sirtuína puede combinarse con una cantidad efectiva de uno o más de: L-DOPA; un agonista de la dopamina; un antagonista del receptor de la adenosina A<sub>2A</sub>; un inhibidor de COMT; un inhibidor de MAO; un inhibidor de N-NOS; un antagonista de los canales de sodio; un antagonista del receptor de D-aspartato de N-metilo (NMDA) selectivo; un antagonista del receptor de AMPA/kainato; un antagonista de los canales de calcio; un agonista del receptor de GABA-A; un inhibidor de la acetil-colinesterasa; un inhibidor de metaloproteasas de matriz; un inhibidor de PARP; un inhibidor de p38 MAP quinasa o quinasas c-Jun N-terminales; TPA; antagonistas de NDA; beta-interferones; factores de crecimiento; inhibidores del glutamato; y/o como parte de una terapia celular.

Los inhibidores de N-NOS a modo de ejemplo 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-pirrolidiniletoxi)-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-piper-azin-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-(4-dimetilamino-o-piperidin-1-il)-etoxi]-3-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(2-dimetilamino-etoxi)-3-etoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(2-pirrolidiniletoxi)-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 del ácido 3-[3-(6-aminopiridin-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-dimetilaminoetoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-ciclobutil-4-(2-pirrolid-en-1-il-etoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-ciclobutil-4-(1-metil-pir-rolidin-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]-pirid-en-2-il-amina, 6-[2-ciclopentil-4-(2-pirrolidin-1-il-etoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, éster terc-butílico del ácido 3-[4-(6-aminopiridin-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 del ácido 4-[4-(6-amino-piridin-2-il)-3-metoxi-fenoxi]-piperidina-1-carboxílico, 6-[2-metoxi-4-(1-metil-p-iperidin-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, 4-(6-amino-piridin-2-il)-3-metoxi-2-alil-fenol 13 4-(6-aminopiridin-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-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]-p-iridin-2-il-amina, 6-[4-(2-dimetilaminoetoxi)-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-iletexi)-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]-pirid-en-2-il-amina, 2-[4-(6-aminopiridin-2-il)-3-metoxi-fenoxi]-etanol 6-[2-metoxi-4-[2-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-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-dimetilpirrolidin-1-il)-etoxi]-2-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 2-[4-(6-aminopiridin-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-(bencilmetil-amino)-etoxi]-2-propoxi-fenil]-piridin-2-il-amina 6-[4-(2-etoxietoxi)-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-(bencilmetil-amino)-etoxi]-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-azabicyclo[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-fen-il]-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]-p-iridin-2-il-amina, 6-[2-metoxi-4-(1-metil-pirrolidin-3-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-etoxi-4-(pirrolidin-3-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-isopropoxi-4-(pirrolidin-3-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-metoxi-4-(piperidin-4-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-metoxi-4-(2,2,6,6-tetrametil-piperidin-4-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-isopropoxi-4-(pirrolidin-3-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, éster terci-  
5 butílico del ácido 3-[4-(6-amino-piridin-2-il)-3-metoxi-fenoxi]-azetidina-1-carboxílico, 6-[4-(azetidín-3-il-oxi)-2-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-metoxi-4-(1-metil-azetidín-3-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-isopropoxi-4-(pirrolidin-3-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-isopropoxi-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-(2-metil-2-aza-biciclo[2.2.1]hept-5-il-oxi)-fenil]-pirid-en-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-metilpirrolidin-3-il-oxi)-fenil]-pir-idin-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-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]-pirid-en-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-dimetilpiperidin-1-il)-etoxi]-2-isopr-opil-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)-fen-il]-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]-pir-idin-2-il-amina, 6-[4-(2-dimetilamino-etoxi)-2,5-dimetil-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(2-(4-fenetilpiperazin-1-il)-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]-piridi-n-2-ilamina, 2-alil-4-(6-amino-piridin-2-il)-3-ciclobutil-fenol y 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]-piri-din-2-il-amina, 6-[2-ciclobutil-4-(2-dimetilamino-1-metil-etoxi)-3-propil-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)-p-iridina 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]-pir-idin-2-il-amina, 6-[5-etil-2-metoxi-4-(piperidin-4-il-oxi)-fenil]-piridi-n-2-il-amina, 6-[2,5-dimetoxi-4-(1-metil-pirrolidin-3-il-oxi)-fenil]-pir-idin-2-il-amina, 6-[4-(2-dimetilamino-etoxi)-5-etil-2-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina.
- 35 Los antagonistas del receptor de NMDA a modo de ejemplo incluyen (+)-(1S, 2S)-1-(4-hidroxifenil)-2-(4-hidroxi-4-fenilpiperidino)-1-pro-panol, (1S, 2S)-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-(4-hidroxi-4-fenilpiperi-dino)-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-olmesilato o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 40 Los agonistas de la dopamina a modo de ejemplo incluyen ropinolol; inhibidores de la L-dopa descarboxilasa tales como carbidopa o benserazida, bromocriptina, dihidroergocriptina, etisulergina, AF-14, alaptida, pergolida, piribedil; agonistas del receptor de la dopamina D1 tales como A-68939, A-77636, dihidrexina y SKF-38393; agonistas del receptor de la dopamina D2 tales como carbergolina, lisurida, N-0434, naxagolida, PD-118440, pramipexol, quinpirol y ropinirol; agonistas del receptor dopamina/ $\beta$ -adrenérgico tales como DPDMS y dopexamina; inhibidor de la captación de 5-HT/ agonistas de 5-HT-1A/ dopamina tales como roxindol; agonistas del receptor opiáceo/de la dopamina tales como NIH-10494; antagonista  $\alpha$ 2-adrenérgico / agonistas de la dopamina tales como tergurida; antagonista  $\alpha$ 2-adrenérgico/ agonistas de la dopamina D2 tales como ergolinas y talipexol; inhibidores de la captación de dopamina tales como GBR-12909, GBR-13069, GYKI-52895, y NS-2141; inhibidores de la monoamina oxidasa-B tales como selegilina, N-(2-butil)-N-metilpropargilamina, N-metil-N-(2-pentil)propargilamina, AGN-1133, derivados del cornezuelo, lazabemida, LU-53439, MD-280040 y mofegilina; e inhibidores de COMT tales como CGP-28014.
- 45 Los inhibidores de la acetil colinesterasa a modo de ejemplo incluyen donepizilo, 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-pr-opanona; 1-(1-etil-2-metil-1H-bencimidazol-5-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-p-iperidinil]-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]tie-n-2-il)-3-[1-(fenilmetil)4-piperidinil]-1-propanona; 1-(6-metil-benzo[b]tien-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-prop-anona; 1-(3,5-dimetil-benzo[b]tien-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidin-il]-1-propanona; 1-(benzo[b]tien-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(1-fenilsulfonil-6-piperidinil)-1-propanona; 1-(benzofuran-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(1-fenilsulfonil-6-metil-indol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-pip-eridinil]-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-(fenilm-etil)-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-benzotienil)-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-metilbencimidazol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(6-metil-bencimidazol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(5-clorobenzo[b]tien-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(5-azaindol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(6-azabenzo[b]tien-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(1H-2-oxopirrolol[2',3',5,6]benzo[b]tieno-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-metoxibenzo[b]tien-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(6-acetilamino-benzo[b]tien-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(5-acetilamino-benzo[b]tien-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-pirrolol[4,5-f]-1,2-bencisoxazol-6-ona; 3-[2-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]etil]-1,2-bencisotiazol; 3-[2-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]etil]-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-pirrolol[4,5-f]-1,2-bencisoxazol-6-ona; 6,8-dihidro-3-[2-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]etil]-7H-pirrolol[5,4-g]-1,2-bencisoxazol-7-ona; 3-[2-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]etil]-5,6,8-trihidro-7H-isoxazolol[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)metilpiperidina, 1-bencil-4-((5,6-dietoxi-1-indanon)-2-il)metilpiperidina, 1-bencil-4-((5,6-metilen-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.

Antagonistas de los canales de calcio a modo de ejemplo incluyen diltiazem, omega-conotoxina GVIA, metoxiverapamilo, amlodipina, felodipina, lacidipina y mibefradil.

Los moduladores del receptor de GABA-A a modo de ejemplo incluyen clometiazol; IDDB; gaboxadol (4,5,6,7-tetrahidroisoxazolol[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-pirazolol[4,3-c]cinolin-3-ona; 7-ciclobutil-6-(2-metil-2H-1,2,4-triazol-3-ilmetoxi)-3-fenil-1,2,4-triazolol[4,3-b]piridazina; (3-fluoro-4-metilfenil)-N-({-1-[(2-metilfenil)metil]-bencimidazol-2-il}metil)-N-pentilcarboxamida; y ácido 3-(aminometil)-5-metilhexanoico.

Los agentes de apertura de los canales de potasio a modo de ejemplo incluyen diazóxido, flupirtina, pinacidilo, levromacalim, rilmacalim, cromacalim, PCO-400 y SKP-450 (2-[2<sup>n</sup>(1<sup>n</sup>,3<sup>n</sup>-dioxolona)-2-metil]-4-(2'-oxo-1'-pirrolidinil)-6-nitro-2H-1-benzopira-n).

Los antagonistas del receptor AMPA/kainato a modo de ejemplo incluyen 6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-di-ona (CNQX); 6-nitro-7-sulfamoilbenzo[f]quinoxalina-2,3-diona (NBQX); 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona (DNQX); hidrocloreuro de 1-(4-aminofenil)-4-metil-7,8-m-etilen-dioxi-5H-2,3-benzodiazepina; y 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoilbenzo-[f]quinoxalina.

Antagonistas de los canales de sodio a modo de ejemplo incluyen ajmalina, procainamida, flecainida y riluzol.

Los inhibidores de metaloproteasas de matriz a modo de ejemplo incluyen hidroxiamida del ácido 4-[4-(4-fluorofenoxi)benzenosulfon-ilamino]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.

La poli(ADP ribosa) polimerasa (PARP) es una enzima nuclear abundante que se activa por roturas únicas de cadena de ADN para sintetizar poli(ADP ribosa) a partir de NAD. En condiciones normales, PARP se implica en la reparación de excisión de bases causada por estrés oxidativo a través de la activación y el reclutamiento de enzimas de reparación de ADN en el núcleo. Por lo tanto, PARP desempeña un papel en la necrosis celular y la reparación del ADN. PARP también participa en la regulación de la expresión de citocinas que media en la inflamación. En condiciones en las que el daño al ADN es excesivo (tal como por exposición excesiva aguda a una lesión patológica), PARP está sobre-activado, dando como resultado un fallo energético basado en célula caracterizado por el agotamiento de NAD y por conducir al consumo de ATP, necrosis celular, lesión de tejido y daño/ insuficiencia del órgano. Se piensa que PARP contribuye a la neurodegeneración agotando la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD+), lo que reduce entonces la adenosina trifosfato (ATP; Così y Marien, Ann. N.Y. Acad. Sci., 890:227, 1999) contribuyendo a la muerte celular que puede evitarse por inhibidores de PARP. Pueden encontrarse inhibidores de PARP a modo de ejemplo en Southan y Szabo, Current Medicinal Chemistry, 10:321, 2003.

Los inhibidores a modo de ejemplo de la p38 MAP quinasa y quinasas c-Jun N-terminales incluyen piridil

imidazoles, tal como PD 169316, PD 169316 isomérico, SB 203580, SB 202190, SB 220026 y RWJ 67657. Otros se describen en la patente de los EE. UU. 6.288.089, y se incorporan por referencia en la presente memoria.

5 En una realización a modo de ejemplo, una terapia de combinación para el tratamiento o la prevención de la EM comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina y uno o más de Avonex® (interferón beta-1a), Tysabri® (natalizumab), o Fumaderm® (BG-12/ Fumarato Oral).

10 En otra realización, una terapia de combinación para el tratamiento o la prevención de la neuropatía diabética o condiciones asociadas con la misma comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina y uno o más de antidepresivos tricíclicos (TCA) (incluyendo, por ejemplo, imipramina, amitriptilina, desipramina y nortriptilina), inhibidores de reabsorción de serotonina (SSRI) (incluyendo, por ejemplo, fluoxetina, paroxetina, sertralina, y citalopram) y fármacos antiepilépticos (AED) (incluyendo, por ejemplo, gabapentina, carbamazepina, y topiramato).

15 En otra realización, la invención provee un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad de la poliglutamina usando una combinación que comprende por lo menos un compuesto activador de la sirtuina y por lo menos un inhibidor de HDAC I/II. Los ejemplos de los inhibidores de HDAC I/II incluyen ácidos hidroxámicos, péptidos cíclicos, benzamidas, ácidos grasos de cadena corta, y depudecina.

20 Los ejemplos de ácidos hidroxámicos y de derivados de ácido hidroxámico incluyen, pero sin limitarse a, trichostatina A (TSA), ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA), oxamflatina, ácido bishidroxámico subérico (SBHA), ácido m-carboxi-cinnámico ácido bishidroxámico (CBHA), ácido valproico y piroxamida. La TSA se aisló como un antibiótico antihongos (Tsuji y col. (1976) J. Antibiot (Tokio) 29:1-6) y se descubrió que era un potente inhibidor de la HDAC de mamífero (Yoshida y col. (1990) J. Biol. Chem. 265:17174-17179). El hallazgo de que las líneas celulares resistentes a TSA tienen HDAC alterada pone de manifiesto que esta enzima es una diana importante para TSA. Otros inhibidores de HDAC basados en el ácido hidroxámico, SAHA, SBHA, y CBHA son compuestos sintéticos que son capaces de inhibir HDAC a una concentración micromolar o inferior *in vitro* o *in vivo*. Glick y col. (1999) Cancer Res. 59:4392-4399. Todos estos inhibidores de HDAC basados en el ácido hidroxámico poseen una característica estructural esencial: un terminal hidroxámico polar unido a través de un separador de metileno hidrófobo (p. ej. 6 carbonos de longitud) a otro sitio polar que está unido a un resto hidrófobo terminal (p. ej., anillo de benceno). Los compuestos desarrollados con tales características esenciales también están dentro del alcance de los ácidos hidroxámicos que pueden usarse como inhibidores de HDAC.

30 Los péptidos cíclicos usados como inhibidores de HDAC son principalmente tetrapéptidos cíclicos. Los ejemplos de péptidos cíclicos incluyen, pero sin limitarse a, trapoxina A, apicidina y depsipéptido. La trapoxina A es un tetrapéptido cíclico que contiene un resto 2-amino-8-oxo-9,10-epoxi-decanoil (AOE). Kijima y col. (1993) J. Biol. Chem. 268:22429-22435. La apicidina es un metabolito micótico que exhibe una actividad antiprotozoaria potente y de amplio espectro e inhibe la actividad de HDAC a concentraciones nanomolares. Darkin-Ratray y col. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 93:13143-13147. El depsipéptido se aísla de *Chromobacterium violaceum*, y se ha mostrado que inhibe la actividad de HDAC a concentraciones micromolares.

35 Los ejemplos de benzamidas incluyen, pero no se limitan a, MS-27-275. Saito y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 96:4592-4597. Los ejemplos de ácidos grasos de cadena corta incluyen, pero no se limitan a, butiratos (p. ej., ácido butírico, butirato de arginina y fenilbutirato (PB)). Newmark y col. (1994) Cancer Lett. 78:1-5; y Carducci y col. (1997) Anticancer Res. 17:3972-3973. Además, la depudecina, de la cual se ha mostrado que inhibe HDAC a concentraciones micromolares (Kwon y col. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 95:3356-3361), también está dentro del alcance de los inhibidores de la histona desacetilasa tal como se describe en la presente memoria.

#### Trastornos de Coagulación Sanguínea

45 En otros aspectos, los compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse para el tratamiento o la prevención de trastornos de coagulación sanguínea (o trastornos hemostáticos). Como se usan de forma intercambiable en la presente memoria, las expresiones "hemostasia", "coagulación sanguínea", y "coagulación de la sangre" se refieren al control del sangrado, incluyendo las propiedades fisiológicas de la vasoconstricción y coagulación. La coagulación sanguínea ayuda a mantener la integridad de la circulación de los mamíferos después de ser lastimados, sufrir inflamación, enfermedad, defectos congénitos, disfunción u otros problemas. Después de la iniciación de la coagulación, la coagulación sanguínea prosigue a través de la activación secuencial de ciertos proenzimas de plasma a sus formas de enzima (véase, por ejemplo, Coleman, R. W. y col. (eds.) Hemostasis and Thrombosis, segunda edición, (1987)). Estas glicoproteínas de plasma, incluyendo el Factor XII, el Factor XI, el Factor IX, el Factor X, el Factor VII y la protrombina, son zimógenos de las serina proteasas. La mayor parte de estas enzimas de coagulación de la sangre son efectivas a escala fisiológica sólo 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 los coágulos sanguíneos. La proteína C activada es una enzima específica que inactiva los componentes procoagulantes. Los iones de calcio están implicados en muchas de las reacciones de los componentes. La coagulación sanguínea sigue o bien la ruta intrínseca, en donde la totalidad de los componentes

protéicos se encuentran presentes en la sangre, o la ruta extrínseca, en donde el factor de tejido de proteína de membrana celular desempeña un papel crítico. La formación de coágulos se produce cuando el fibrinógeno se escinde mediante la trombina para formar fibrina. Los coágulos sanguíneos se componen de plaquetas activadas y fibrina.

- 5 Además, la formación de coágulos sanguíneos no sólo limita el sangrado en el caso de una lesión (hemostasia), sino que también puede conducir a daño serio de los órganos y muerte en el contexto de las enfermedades ateroscleróticas por oclusión de una vena o arteria importante. La trombosis es pues la formación de coágulos sanguíneos en el momento y lugar equivocado. Esto implica una cascada de reacciones bioquímicas complicadas y reguladas entre las proteínas de la sangre en circulación (factores de coagulación), las células sanguíneas (en particular plaquetas), y los elementos de una pared de vaso dañada.

En consecuencia, la presente invención provee tratamientos anticoagulación y antitrombóticos dirigidos a inhibir la formación de coágulos sanguíneos para prevenir o tratar los trastornos de coagulación sanguínea, como el infarto de miocardio, apoplejía, pérdida de una extremidad por enfermedad arterial periférica o embolia pulmonar.

- 15 Tal como se usa en la presente memoria, de forma intercambiable, “modular, o modulación de, la hemostasia” y “regular, o regulación de, la hemostasia” incluyen la inducción (por ejemplo, estimulación o aumento) de hemostasia, así como la inhibición (por ejemplo, reducción o disminución) de la hemostasia.

- En un aspecto, la invención provee un método para reducir o inhibir la hemostasia en un sujeto administrando un compuesto modulador de la sirtuína que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína. Las composiciones y métodos que se analizan en la presente memoria son útiles para el tratamiento o la prevención de los trastornos trombóticos. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “trastorno trombótico” incluye cualquier trastorno o estado caracterizado por un estado hipercoagulable o actividad hemostática o coagulación excesiva o no deseada. Los trastornos trombóticos incluyen enfermedades o trastornos que involucren la adhesión de plaquetas y formación de trombos, y pueden manifestarse como un propensión aumentada a formar trombosis, por ejemplo, un número aumentado de trombosis, trombosis a una edad temprana, tendencia familiar a la trombosis, y trombosis en ubicaciones inusuales. Los ejemplos de trastornos trombóticos incluyen, pero sin limitarse a, tromboembolia, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, apoplejía, infarto de miocardio, aborto no inducido, trombofilia asociada con la deficiencia de la anti-trombina III, deficiencia de la proteína C, deficiencia de la proteína S, resistencia a la proteína C activada, disfibrinogenemia, trastornos fibrinolíticos, homocistinuria, embarazo, trastornos inflamatorios, trastornos mieloproliferativos, arteriosclerosis, angina, p. ej., angina inestable, coagulación intravascular diseminada, púrpura trombótica trombocitopénica, metástasis de cáncer, enfermedad drepanocítica, nefritis glomerular, y trombocitopenia inducida por fármacos (incluyendo, por ejemplo, trombocitopenia inducida por heparina). Además, los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden administrarse para evitar sucesos trombóticos o para evitar la reoclusión durante o después de la lisis de coágulo terapéutica o procedimientos tales como angioplastia o cirugía.

- 35 En otra realización, un régimen de combinación de fármacos puede incluir fármacos o compuestos para el tratamiento o la prevención de trastornos de coagulación sanguínea o condiciones secundarias asociadas con estos estados. Por lo tanto, un régimen de combinación de fármacos puede incluir uno o más compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína y uno o más agentes anti-coagulación o anti-trombosis. Por ejemplo, uno o más compuestos moduladores de la sirtuína pueden combinarse con una cantidad efectiva de una o más de: aspirina, heparina, y Warfarina oral que inhibe factores dependientes de la Vit K, heparinas de bajo peso molecular que inhiben los factores X y II, inhibidores de la trombina, inhibidores de los receptores de GP IIb-IIIa plaquetaria, inhibidores de factor de tejido (TF), inhibidores del factor de von Willebrand humano, inhibidores de uno o más factores implicados en la hemostasia (en particular en la cascada de coagulación). Además, los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden combinarse con agentes trombolíticos, tal como t-PA, estreptoquinasa, reptilasa, TNK-t-PA, y estafiloquinasa.

#### *Control de peso*

- En otro aspecto, los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden usarse para el tratamiento o la prevención del aumento de peso o la obesidad en un sujeto. Por ejemplo, los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden usarse, por ejemplo, para el tratamiento o la prevención de la obesidad hereditaria, la obesidad producto de la dieta, la obesidad relacionada con hormonas, la obesidad relacionada con la administración de medicación, para reducir el peso de un sujeto, o para reducir o prevenir el aumento de peso en un sujeto. Un sujeto que necesita de dicho tratamiento puede ser un sujeto que se encuentre obeso, que tenga probabilidad de volverse obeso, con sobrepeso, o con probabilidad de tener sobrepeso. Los sujetos que tienen posibilidad de volverse obesos o de tener sobrepeso pueden ser identificados, por ejemplo, basándose en historia familiar, genética, dieta, nivel de actividad, toma de medicamentos o varias combinaciones de estos factores.

En otras realizaciones más, los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden administrarse a sujetos que sufren de una variedad de otras enfermedades y condiciones

que pueden ser tratadas o prevenidas promoviendo la pérdida de peso en el sujeto. Dichas enfermedades incluyen, por ejemplo, alta presión sanguínea, hipertensión, nivel alto de colesterol en la sangre, dislipidemia, diabetes de tipo 2, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, enfermedad coronaria del corazón, angina de pecho, deficiencia congestiva del corazón, apoplejía, piedras en los riñones, colescistitis y colelitiiasis, gota, osteoartritis, apnea obstructiva del sueño y problemas respiratorios, algunos tipos de cáncer (como el endometrial, de mama, próstata y colon), complicaciones de embarazo, pobre salud reproductiva femenina (tal como irregularidad menstrual, infertilidad, ovulación irregular), problemas de control de la vejiga (como incontinencia por estrés); nefrolitiasis de ácido úrico; trastornos psicológicos (como depresión, trastornos de alimentación, imagen corporal distorsionada, y baja autoestima). Stunkard AJ, Wadden TA. (Editores) *Obesidad: theory and terapia*, Segunda edición. Nueva York: Raven Press, 1993. Finalmente, los pacientes con SIDA pueden desarrollar lipodistrofia o resistencia a la insulina en respuesta a las terapias de combinación para el SIDA.

En otra realización, los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden usarse para inhibir la adipogénesis o diferenciación de células grasas, sea *in vitro* o *in vivo*. En particular, se evitará que unos altos niveles en circulación de insulina y/o de factor de crecimiento de tipo insulina (IGF) 1 recluten preadipocitos para su diferenciación en adipocitos. Dichos métodos pueden usarse para el tratamiento o la prevención de la obesidad.

En otras realizaciones, los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden usarse para reducir el apetito y/o aumentar la saciedad, causando de ese modo una pérdida de peso o que se evite una ganancia de peso. Un sujeto que necesita de dicho tratamiento puede ser un sujeto que sufre de sobrepeso, es obeso o es un sujeto con alta probabilidad de volverse obeso o de presentar sobrepeso. El método puede comprender la administración diaria o en días alternos, una vez a la semana, de una dosis, por ejemplo, en forma de una pastilla, a un sujeto. La dosis puede ser una "dosis reductora del apetito".

En otras realizaciones, un compuesto modulador de la sirtuína que disminuye el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína puede usarse para estimular el apetito y/o ganancia de peso. Un método puede comprender la administración a un sujeto, tal como un sujeto que lo necesite, de una cantidad farmacéuticamente efectiva de un agente modulador de la sirtuína que disminuye el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína, tal como SIRT1 y/o SIRT3. Un sujeto que necesita de un tratamiento de este tipo puede ser un sujeto que tiene caquexia o que es probable que desarrolle caquexia. También puede administrarse una combinación de agentes. Un método puede comprender además supervisar en el sujeto el estado de la enfermedad o de la activación de sirtuínas, por ejemplo, en el tejido adiposo.

Los métodos para estimular la acumulación de grasa en las células pueden usarse *in vitro*, para establecer modelos celulares de ganancia de peso, que pueden usarse, p. ej., para identificar otros fármacos que eviten la ganancia de peso.

También se proporcionan métodos para modular la adipogénesis o diferenciación de adipocitos, ya sea *in vitro* o *in vivo*. En particular, se evitará que unos altos niveles en circulación de insulina y/o de factor de crecimiento de tipo insulina (IGF) 1 recluten preadipocitos para su diferenciación en adipocitos. Tales métodos pueden usarse para modular la obesidad. Un método para estimular la adipogénesis puede comprender poner en contacto una célula con un agente modulador de la sirtuína que disminuye el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína.

En otra realización, la invención provee métodos de disminución del metabolismo de grasas o lípidos en un sujeto administrando un compuesto modulador de la sirtuína que disminuye el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína. El método incluye la administración a un sujeto de una cantidad de un compuesto modulador de la sirtuína, p. ej., en una cantidad efectiva para disminuir la movilización de la grasa a la sangre a partir de las células WAT y/o para disminuir la quema de grasa por las células BAT.

Los métodos para promover el apetito y/o la ganancia de peso pueden incluir, por ejemplo, la identificación previa de un sujeto como necesitado de un metabolismo de grasas o lípidos disminuido, p. ej., pesando el sujeto, determinando el IMC del sujeto, o evaluando el contenido en grasa del sujeto o la actividad de la sirtuína en las células del sujeto. El método puede incluir también supervisar el sujeto, p. ej., durante y/o después de la administración de un compuesto modulador de la sirtuína. La administración puede incluir una o más dosis, p. ej., suministradas en emboladas o de forma continua. La supervisión puede incluir evaluar una hormona o un metabolito. Las hormonas a modo de ejemplo incluyen leptina, adiponectina, resistina e insulina. Los metabolitos a modo de ejemplo incluyen triglicéridos, colesterol y ácidos grasos.

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

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

En una realización a modo de ejemplo, los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden administrarse como una terapia de combinación para el tratamiento o la prevención de ganancia de peso o la obesidad. Por ejemplo, uno o más compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden administrarse en combinación con uno o más agentes anti-obesidad. Los agentes anti-obesidad a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, fenilpropanolamina, efedrina, pseudoefedrina, fentermina, un agonista de la colecistoquinina-A, un inhibidor de la recaptación de la monoamina (tal como sibutramina), un agente simpatomimético, un agente serotoninérgico (tal como dexfenfluramina o fenfluramina), un agonista de la dopamina (tal como bromocriptina), un agonista o mimético del receptor de la hormona estimuladora de melanocito, un análogo de la hormona estimuladora de melanocito, un antagonista del receptor cannabinoide, un antagonista de la hormona de concentración de melanina, la proteína OB (leptina), un análogo de la leptina, un agonista del receptor de la leptina, un antagonista de la galanina o un inhibidor o agente de disminución de la lipasa GI (tal como orlistat). Otros agentes anoréxicos incluyen agonistas de la bombesina, dehidroepiandrosterona o análogos de la misma, agonistas y antagonistas del receptor de glucocorticoides, antagonistas del receptor de la orexina, antagonistas de la proteína de unión a la urocortina, agonistas del receptor del péptido-1 de tipo glucagón tal como Exendina y factores neurotróficos ciliares tales como Axaquina.

En otra realización, los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden administrarse para reducir una ganancia de peso inducida por fármacos. Por ejemplo, un compuesto modulador de la sirtuína que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína puede administrarse como una terapia de combinación con medicaciones que puedan estimular el apetito o causar ganancia de peso, en particular, ganancia de peso debido a factores distintos a la retención de agua. Los ejemplos de medicaciones que pueden dar lugar a ganancia de peso incluyen, por ejemplo, tratamientos para la diabetes, incluyendo, por ejemplo, sulfonilureas (tales como glipizida y gliburida), tiazolidinadionas (tales como pioglitazona y rosiglitazona), meglitinidas, nateglinida, repaglinida, medicinas de sulfonilurea, e insulina; anti-depresivos, incluyendo, por ejemplo, antidepresivos tricíclicos (tales como amitriptilina e imipramina), inhibidores de monoamina oxidasa irreversibles (MAOI), inhibidores de reabsorción de serotonina selectivos (SSRI), bupropión, paroxetina, y mirtazapina; esteroides, tales como, por ejemplo, prednisona; terapia hormonal; carbonato de litio; ácido valproico; carbamazepina; clorpromazina; tiotixeno; beta bloqueantes (tales como propranolol); alfa bloqueantes (tales como clonidina, prazosina y terazosina); y contraceptivos incluyendo contraceptivos orales (píldoras de control de la natalidad) u otros contraceptivos que contienen estrógenos y/o progesterona (Depo-Provera, Norplant, Ortho), testosterona o Megestrol. En otra realización a modo de ejemplo, los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden administrarse como parte de un programa para dejar de fumar, para evitar la ganancia de peso o reducir el peso ya ganado.

### Trastornos Metabólicos/ Diabetes

En otro aspecto, los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden usarse para el tratamiento o la prevención de un trastorno metabólico, como la resistencia a la insulina, un estado pre-diabético, la diabetes de tipo II, y/o complicaciones de los mismos. La administración de un compuesto modulador de la sirtuína que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína puede aumentar la sensibilidad a la insulina y/o reducir los niveles de insulina en un sujeto. Un sujeto que necesita de un tratamiento de este tipo puede ser un sujeto que tenga resistencia a la insulina u otro síntoma precursor de la diabetes de tipo II, que tenga diabetes de tipo II, o que presente probabilidad de desarrollar cualquiera de estas condiciones. Por ejemplo, el sujeto puede ser un sujeto que tenga resistencia a la insulina, por ejemplo, que tenga altos niveles de insulina circulante y/o condiciones asociadas, tales como hiperlipidemia, dislipogénesis, hipercolesterolemia, tolerancia a la glucosa disminuida, altos niveles de azúcar de glucosa en sangre, otras manifestaciones del síndrome X, hipertensión, aterosclerosis y lipodistrofia.

En una realización a modo de ejemplo, los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden administrarse como una terapia de combinación para el tratamiento o la prevención de un trastorno metabólico. Por ejemplo, uno o más compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína insulina pueden administrarse en combinación con uno o más agentes anti-diabéticos. Los agentes anti-diabéticos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, un inhibidor de la aldosa reductasa, un inhibidor de la glicógeno fosforilasa, un inhibidor de la sorbitol deshidrogenasa, un inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa 1B, un inhibidor de la dipeptidil proteasa, insulina (incluyendo preparaciones de insulina biodisponibles por vía oral), un mimético de insulina, metformina, acarbosa, un ligando de receptor-y activado por proliferador de peroxisoma (PPAR-γ) tal como troglitazona, rosiglitazona, pioglitazona o GW-1929, una sulfonilurea, glipazida, gliburida o clorpropamida en donde las cantidades de los compuestos primero y segundo dan como resultado un efecto terapéutico. Otros agentes anti-diabéticos incluyen un inhibidor de la glucosidasa, un péptido-1 de tipo glucagón (GLP-1), insulina, un agonista dual de PPAR α/γ, una meglitimida y un inhibidor de αP2. En una realización a modo de ejemplo, un agente anti-diabético puede ser un inhibidor de la 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 y col., Biochemistry 38: 11597-603 (1999)).

*Enfermedades inflamatorias*

En otros aspectos, los compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno asociado con la inflamación. Los compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden administrarse antes de la ocurrencia, al momento, o después de la iniciación de la inflamación. Cuando se usan de forma profiláctica, los compuestos se proporcionan, de forma preferible, antes de cualquier respuesta o síntoma inflamatorio. La administración de los compuestos puede prevenir o atenuar las respuestas inflamatorias o sus síntomas.

Las condiciones inflamatorias a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis psoriásica, enfermedad articular degenerativa, espondiloartropatías, artritis gotosa, lupus sistémico eritematoso, artritis juvenil, artritis reumatoide, osteoartritis, osteoporosis, diabetes (p. ej., diabetes de aparición juvenil o diabetes mellitus dependiente de la insulina), calambres menstrual, fibrosis quística, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn, colitis mucosa, colitis ulcerosa, gastritis, esofagitis, pancreatitis, peritonitis, enfermedad de Alzheimer, choque, espondilitis anquilosante, gastritis, conjuntivitis, pancreatitis (aguda o crónica), síndrome de lesión multiorgánica (p. ej., subsiguiente a septicemia o traumatismo), infarto de miocardio, aterosclerosis, apoplejía, lesión por reperfusión (p. ej., debido a derivación cardiopulmonar o diálisis de riñón), glomerulonefritis aguda, vasculitis, lesión térmica (es decir, quemadura solar), enterocolitis necrotizante, síndrome asociado con la transfusión de granulocitos, y/o síndrome de Sjögren. Las condiciones inflamatorias a modo de ejemplo de la piel incluyen, por ejemplo, eczema, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, urticaria, escleroderma, psoriasis, y dermatosis con componentes inflamatorios agudos.

En otra realización, los compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse para prevenir o tratar alergias y condiciones respiratorias, incluyendo asma, bronquitis, fibrosis pulmonar, rinitis alérgica, toxicidad al oxígeno, enfisema, bronquitis crónica, síndrome de estrés respiratorio agudo, y cualquier enfermedad pulmonar crónica obstructiva (COPD). Los compuestos pueden usarse para tratar la infección crónica por hepatitis, incluyendo la hepatitis B y la hepatitis C.

De forma adicional, los compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse para tratar enfermedades auto-inmunes y/o inflamación asociada con enfermedades auto-inmunes tales como las enfermedades auto-inmunes de tejido-órgano (por ejemplo síndrome de Raynaud), escleroderma, miastenia grave, rechazo de trasplantes, choque endotóxico, sepsis, psoriasis, eczema, dermatitis, esclerosis múltiple, tiroiditis autoinmune, uveítis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Addison, enfermedad poli-glandular auto-inmune (también conocida como síndrome auto-inmune poli-glandular), y la enfermedad de Grave.

En ciertas realizaciones, uno o más compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden tomarse solos o en combinación con otros compuestos útiles para el tratamiento o la prevención de la inflamación. Los agentes anti-inflamatorios a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, esteroides (p. ej., cortisol, cortisona, fludrocortisona, prednisona, 6 $\alpha$ -metilprednisona, triamcinolona, betametasona o dexametasona), fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDs (p. ej., aspirina, acetaminofeno, tolmetina, ibuprofeno, ácido mefenámico, piroxicam, nabumetona, rofecoxib, celecoxib, etodolaco 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 anti-palúdico (p. ej., artemisinina, arteméter, artsunato, fosfato de cloroquina, hidrocloreuro de mefloquina, hclato de doxiciclina, hidrocloreuro de proguanil, atovacuona o halofantrina). En una realización, el otro agente terapéutico es drotrecogina alfa.

Ejemplos adicionales de agentes anti-inflamatorios incluyen, por ejemplo, aceclofenaco, acetaminofeno, ácido e-acetamidocaproico, acetaminofeno, acetaminosalol, acetanilida, ácido acetilsalicílico, S-adenosilmetionina, alclofenaco, alclometasona, alfentanilo, algestona, alilprodina, alminoprofeno, aloxiprina, alfaprodina, bis(acetilsalicilato) de aluminio, amcinonida, amfenaco, aminoclorfenoxazina, ácido 3-amino-4-hidroxi-butírico, 2-amino-4-picolina, aminopropilona, aminopirina, amixetrina, salicilato de amonio, ampiroxam, amtolmetina guacilo, anileridina, antipirina, antrafenina, apazona, beclometasona, bendazaco, benorilato, benoxaprofeno, benzpiperilona, bencidamina, bencilmorfina, bermoprofeno, betametasona, betametasona-17-valerato, bezitramida,  $\alpha$ -bisabolol, bromfenaco, p-bromoacetanilida, acetato del ácido 5-bromosalicílico, bromosaligenina, bucetina, ácido buclórico, bucolome, budesonida, bufexamaco, bumadizona, buprenorfina, butacetina, butibufeno, butorfanol, carbamazepina, carbifeno, carprofeno, carsalam, clorobutanol, cloroprednisona, clortenoxazina, salicilato de colina, cincofeno, cinmetacina, ciramadol, clidanaco, clobetasol, clocortolona, clometacina, clonitazeno, clonixina, clopiraco, cloprednol, clavo, codeína, metil bromuro de codeína, fosfato de codeína, sulfato de codeína, cortisona, cortivazol, cropropamida, crotetamida, ciclazocina, deflazacort, dehidrotestosterona, desomorfina, desonida, desoximetasona, dexametasona, 21-isonicotinato de dexametasona, dexoadrol, dextromoramida, dextropropoxifeno, deoxicorticosterona, dezocina, diampromida, diamorfona, diclofenaco, difenamizol, difenpiramida, diflorasona, diflucortolona, diflunisal, difluprednato, dihidrocodeína, enol acetato de dihidrocodeinona, dihidromorfina,



acetilsalicilato de dihidroxialuminio, dimenoxadol, dimefeptanol, dimetiltiambuteno, butirato de dioxafetilo, dipipanona, diprocelilo, dipirona, ditazol, droxicam, emorfazona, ácido enfenámico, enoxolona, epirizol, eptazocina, etersalato, etenzamida, etoheptazina, etoxazeno, etilmetiltiambuteno, etilmorfina, etodolaco, etofenamato, etonitazeno, eugenol, felbinaco, fenbufeno, ácido fenclórico, fendosal, fenoprofeno, fentanilo, fentiazaco, fepradinol, feprazona, floctafenina, fluazacort, flucloronida, ácido flufenámico, flumetazona, flunisolidina, flunixinina, flunoxaprofeno, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, acetónido de fluocinolona, fluocortina butilo, fluocortolona, fluoresona, fluorometolona, fluperolona, flupirtina, fluprednido, fluprednisolona, fluproquazona, flurandrenolida, flurbiprofeno, fluticasona, formocortal, fosfosal, ácido gentísico, glafenina, glucametacina, salicilato de glicol, guaiazuleno, halcinonida, halobetasol, halometazona, haloprednona, heroína, hidrocodona, hidrocortamato, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, succinato de hidrocortisona, hemisuccinato de hidrocortisona, 21-lisinato de hidrocortisona, cipionato de hidrocortisona, hidromorfona, hidroxiptidina, ibufenaco, ibuprofeno, ibuproxam, salicilato de imidazol, indometacina, indoprofeno, isofezolaco, isoflupredona, acetato de isoflupredona, isoladol, isometazona, isonixina, isoxepaco, isoxicam, cetobemidona, cetoprofeno, cetorolaco, p-lactofenetida, lefetamina, levorfanol, levorfanol, levofenacil-morfano, lofentanilo, lonazolaco, lornoxicam, loxoprofeno, acetilsalicilato de lisina, mazipredona, ácido meclofenámico, medrisona, ácido mafenámico, meloxicam, meperidina, meprednisona, meptazinol, mesalamina, metazocina, metadona, metotrimoprazina, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, metilprednisolona succinato de sodio, suleptnato de metilprednisolona, ácido metiazínico, metofolina, metopón, mofebutazona, mofezolaco, mometazona, morazona, morfina, hidrocloruro de morfina, sulfato de morfina, salicilato de morfina, mirofina, nabumetona, nalbufina, nalorfina, salicilato de 1-naftilo, naproxeno, narceína, nefopam, nicomorfina, nifenazona, ácido niflúmico, nimesulida, 5'-nitro-2'-propoxiacetanilida, norlevorfanol, normetadona, normorfina, norpipanona, olsalazina, opio, oxaceprol, oxametacina, oxaprozina, oxidodona, oximorfona, oxifenbutazona, papaveretum, parametazona, parnilina, parsalmida, pentazocina, perisoxal, fenacetina, fenadoxona, fenazocina, hidrocloruro de fenazopiridina, fenocol, fenoperidina, fenopirazona, fenomorfanol, acetilsalicilato de fenilo, fenilbutazona, salicilato de fenilo, feniramidol, picetoprofeno, piminodina, pipebuzona, piperilona, pirazolaco, piritramida, piroxicam, pirprofeno, pranoprofeno, prednicarbato, prednisolona, prednisona, prednival, prednilideno, proglumetacina, proheptazina, promedol, propacetamol, properidina, propiram, propoxifeno, propifenazona, proquazona, ácido protizínico, proxazol, ramifenazona, remifentanilo, metilsulfato de rimazolio, salacetamida, salicina, salicilamida, ácido salicilamida o-acético, ácido salicílico, ácido salicilsulfúrico, salsalato, salverina, simetrida, sufentanilo, sulfasalazina, sulindaco, superóxido dismutasa, suprofenol, suxibuzona, talniflumato, tenidap, tenoxicam, terofenamato, tetrandrina, tiazolinobutazona, ácido tiaprofénico, tiaramida, tilidina, tinoridina, tixocortol, ácido tolfenámico, tolmetina, tramadol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, tropesina, viminol, xenbucina, ximoprofeno, zaltoprofeno y zomepiraco.

En una realización a modo de ejemplo, un compuesto modulador de la sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede administrarse con un inhibidor de COX-2 selectivo para el tratamiento o la prevención de la inflamación. Los inhibidores de COX-2 selectivos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, deracoxib, parecoxib, celecoxib, valdecoxib, rofecoxib, etoricoxib, lumiracoxib, 2-(3,5-difluorofenil)-3-[4-(metilsulfonil)fenil]-2-ciclopenteno-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, 1 bencil-4-[(4-oxopiperidin-1-il)sulfonil]piperidina-4-carboxilato de terc-butilo, 4-[5-(fenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]bencenosulfonamida, sales y profármacos de los mismos.

#### *Crisis vasomotora*

En otro aspecto, compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse para reducir la incidencia o la gravedad de la crisis vasomotora y/o sofocos que son síntomas de un trastorno. Por ejemplo, el método sujeto incluye el uso de compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina, solos o en combinación con otros agentes, para reducir la incidencia o la gravedad de la crisis vasomotora y/o sofocos en pacientes de cáncer. En otras realizaciones, el método provee el uso de compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para reducir la incidencia o la gravedad de la crisis vasomotora y/o sofocos en mujeres menopáusicas y post-menopáusicas.

En otro aspecto, los compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse como una terapia para reducir la incidencia o gravedad de la crisis vasomotora y/o los sofocos que son efectos secundarios de otra terapia de fármacos, por ejemplo crisis vasomotora inducida por fármacos. En ciertas realizaciones, un método para el tratamiento y/o la prevención de crisis vasomotora inducida por fármacos comprende la administración a un paciente que la necesite, de una formulación que comprende por lo menos un compuesto que induzca la crisis vasomotora y por lo menos un compuesto modulador de la sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina. En otras realizaciones, un método para tratar la crisis vasomotora inducida por fármacos comprende la administración separada de uno o más compuestos que induzcan la crisis vasomotora y uno o más compuestos de modulación de la crisis vasomotora, por ejemplo, en donde el compuesto de modulación de sirtuina y el agente inducción de crisis vasomotora no han sido formulados en las mismas composiciones. Cuando se usan formulaciones separadas, el compuesto modulador de la sirtuina puede administrarse (1) en el mismo momento de la administración del agente que induce la crisis vasomotora, (2) de forma intermitente con el agente de inducción de crisis vasomotora, (3) de forma escalonada en relación con la

administración del agente de inducción de crisis vasomotora, (4) antes de la administración del agente de inducción de crisis vasomotora, (5) posterior a la administración del agente de inducción de crisis vasomotora, y (6) varias combinaciones de lo anterior. Los agentes de inductores de crisis vasomotora a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, la niacina, faloxifeno, antidepresivos, anti-psicóticos, quimioterapéuticos, bloqueantes de canales de calcio, y antibióticos.

En una realización, los compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse para reducir los efectos secundarios de crisis vasomotora de un vasodilatador o un agente antilipémico (incluyendo agentes anticolesterémicos y agentes lipotrópicos). En una realización a modo de ejemplo, un compuesto modulador de la sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede usarse para reducir la crisis vasomotora asociada con la administración de niacina.

El ácido nicotínico, ácido 3-piridinacarboxílico o niacina, es un agente antilipídico que se comercializa con, por ejemplo, los nombres comerciales Nicolac®, SloNiacin®, Nicobid® y Time Release Niacin®. El ácido nicotínico se ha usado durante muchos años en el tratamiento de trastornos lipídicos tales como la hiperlipidemia, hipercolesterolemia y aterosclerosis. Se conoce desde hace largo tiempo que este compuesto exhibe los efectos beneficiosos de reducir el colesterol total, lipoproteínas de densidad o "colesterol LDL," triglicéridos y apolipoproteína a (Lp(a)) en el cuerpo humano, a la vez que aumenta las lipoproteínas de alta densidad deseables o "colesterol HDL".

Las dosis típicas se encuentran en el intervalo de aproximadamente 1 gramo a aproximadamente 3 gramos al día. El ácido nicotínico se administra normalmente de dos a cuatro veces por día después de las comidas, dependiendo de la forma farmacéutica seleccionada. El ácido nicotínico se encuentra en la actualidad comercialmente disponible en dos formas farmacéuticas. Una forma farmacéutica es un comprimido de liberación rápida o inmediata que debería administrarse tres o cuatro veces por día. Las formulaciones de ácido nicotínico de liberación inmediata ("IR") en general liberan casi la totalidad de su ácido nicotínico dentro de aproximadamente 30 a 60 minutos tras la ingestión. La otra forma farmacéutica es una forma de liberación sostenida que es adecuada para la administración de dos a cuatro veces por día. Al contrario que las formulaciones IR, las formulaciones de ácido nicotínico de liberación sostenida ("SR") están diseñadas para liberar unas cantidades significativas de fármaco para su absorción en el torrente sanguíneo a lo largo de unos intervalos de tiempo específicos con el fin de mantener niveles terapéuticos de ácido nicotínico a lo largo de un periodo prolongado tal como de 12 o 24 horas después de la ingestión.

Tal como se usa en la presente memoria, se pretende que la expresión "ácido nicotínico" abarque ácido nicotínico o un compuesto diferente del propio ácido nicotínico que el cuerpo metaboliza para dar ácido nicotínico, produciendo de este modo esencialmente el mismo efecto que el ácido nicotínico. Los compuestos a modo de ejemplo que producen un efecto similar al del ácido nicotínico incluyen, por ejemplo, tartrato de alcohol nicotínico, hexanicotinato de d-glucitol, nicotinato de aluminio, nicotinato de niceritrol y d,1-alfa-tocoferil. En la presente memoria, se hará referencia de forma colectiva a cada compuesto de este tipo como "ácido nicotínico".

En otra realización, la invención provee un método para el tratamiento y/o la prevención de la hiperlipidemia con efectos de crisis vasomotora reducidos. El método comprende las etapas de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de ácido nicotínico y un compuesto modulador de la sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina en una cantidad suficiente para reducir la crisis vasomotora. En una realización a modo de ejemplo, el ácido nicotínico y/o compuesto modulador de la sirtuina puede administrarse durante la noche.

En otra realización representativa, el método involucra el uso de compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para reducir los efectos secundarios de crisis vasomotora del raloxifeno. El raloxifeno actúa como un estrógeno en ciertos lugares en el cuerpo, pero no es una hormona. Este ayuda a prevenir la osteoporosis en mujeres que han alcanzado la menopausia. La osteoporosis da lugar a que los huesos adelgacen, se vuelvan frágiles, y tengan más probabilidad de romperse de forma gradual. Evista ralentiza la pérdida de masa ósea que se produce con la menopausia, reduciendo el riesgo de fracturas de columna debido a la osteoporosis. Un efecto secundario común del raloxifeno son los sofocos (sudoración y crisis vasomotora). Esto puede ser incómodo para las mujeres que ya tenían sofocos debido a la menopausia.

En otra realización representativa, el método involucra el uso de compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para reducir los efectos secundarios de crisis vasomotora de los antidepresivos o un agente antipsicótico. Por ejemplo, los compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse en conjunción (administrados de forma separada o conjunta) con un inhibidor de reabsorción de serotonina, o un antagonista de receptor 5HT<sub>2</sub>, un anticonvulsivo, un inhibidor de la recaptación de la 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 del Neuropeptido 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 la monoamina oxidasa, o un fármaco sedante-hipótico.

En ciertas realizaciones, los compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse como parte de un tratamiento con un inhibidor de reabsorción de serotonina (SRI)

para reducir la crisis vasomotora. En ciertas realizaciones preferidas, el SRI es un inhibidor de reabsorción de serotonina selectivo (SSRI), tal como un fluoxetinoide (fluoxetina, norfluoxetina) o un nefazodonoide (nefazodona, hidroxinefazodona, oxonafazodona). Otros SSRI a modo de ejemplo incluyen duloxetina, venlafaxina, milnaciprán, citalopram, fluvoxamina, paroxetina y sertralina. El compuesto modulador de la sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede usarse también como parte de un tratamiento con un fármaco sedante-hipótico, tal como seleccionado del grupo que consiste en una benzodiazepina (tal como alprazolam, clordiazepóxido, clonazepam, clorazepato, clobazam, diazepam, halazepam, lorazepam, oxazepam y prazepam), zolpidem, y barbituratos. En todavía otras realizaciones, un compuesto modulador de la 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 seleccionado del grupo que consiste en buspirona, flesinoxán, gepirona e ipsapirona. Los compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse también como parte de un tratamiento con un inhibidor de la recaptación de la norepinefrina, tal como seleccionado de tricíclicos de amina terciarios y tricíclicos de amina secundarios. Los tricíclicos de amina terciarios a modo de ejemplo incluyen amitriptilina, clomipramina, doxepina, imipramina y trimipramina. Los tricíclicos de amina secundarios a modo de ejemplo incluyen amoxapina, desipramina, maprotilina, nortriptilina y protriptilina. En ciertas realizaciones, los compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse como parte de un tratamiento con un inhibidor de la monoamina oxidasa, tal como seleccionado del grupo que consiste en isocarboxazid, fenelzina, tranilcipromina, selegilina y moclobemida.

En otra realización representativa más, los compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse para reducir los efectos de crisis vasomotora secundarios de los agentes quimioterápicos, como la ciclofosfamida y el tamoxifeno.

En otra realización, los compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse para reducir los efectos secundarios de crisis vasomotora de bloqueantes de canales de calcio, como la amlodipina.

En otra realización, los compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse para reducir los efectos secundarios de crisis vasomotora de los antibióticos. Por ejemplo, los compuestos moduladores de la sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse en combinación con la levofloxacina. La levofloxacina se usa para tratar infecciones de los senos nasales, la piel, los pulmones, los oídos, las vías respiratorias, los huesos y las articulaciones, producidas por bacterias sensibles. La levofloxacina también se usa con frecuencia para tratar infecciones urinarias, incluyendo las resistentes a otros antibióticos, así como prostatitis. La levofloxacina es efectiva en el tratamiento de diarreas infecciosas causadas por bacterias *E. coli*, *Campylobacter jejuni* y *Shigella*. La levofloxacina también puede usarse para tratar varias infecciones obstétricas, incluyendo la mastitis.

#### *Trastornos oculares*

Un aspecto de la presente invención es un método para inhibir, reducir o tratar de otro modo la deficiencia de la visión administrando a un paciente una dosis terapéutica de un modulador de la sirtuina seleccionado a partir de un compuesto descrito en la presente memoria, o un profármaco, sal farmacéuticamente aceptable o un derivado metabólico del mismo.

En ciertos aspectos de la invención, la deficiencia de la visión es causada por daño al nervio óptico o al sistema nervioso central. En realizaciones particulares, el daño al nervio óptico es causado por una presión intraocular alta, tal como la creada por glaucoma. En otras realizaciones particulares, el daño al nervio óptico es causado por la inflamación del nervio, que se asocia a menudo con una infección o una respuesta (por ejemplo, auto-inmune) tal como la neuritis óptica.

El glaucoma describe un grupo de trastornos que están asociados con un defecto del campo visual, ahuecamiento del disco óptico y daño al nervio óptico. Comúnmente, se hace referencia a estas como neuropatías ópticas glaucomatosas. La mayoría de los glaucomas están usualmente, pero no siempre, asociados con una subida en la presión intraocular. Formas a modo de ejemplo de glaucoma incluyen el Glaucoma y Queratoplastia Penetrante, Ángulo Cerrado Agudo, Ángulo Cerrado Crónico, Ángulo Abierto Crónico, por Recesión Angular, Afáquico y Pseudofáquico, Inducido por Fármacos, Hifema, Tumores Intraoculares, Juvenil, Por Exfoliación del Cristalino, Baja Tensión, Maligno, Neovascular, Facolítico, Facomórfico, Pigmentario, Iris Plano, Congénito Primario, Ángulo Abierto Primario, Pseudoexfoliación, Congénico Secundario, Sospechoso en Adulto, Unilateral, Uveítico, Hipertensión Ocular, Hipotonía Ocular, Síndrome de Posner-Schlossman y Procedimiento de Expansion Escleral en Hipertensión Ocular y Glaucoma de Ángulo Abierto Primario.

La presión intraocular puede también aumentarse mediante varios procedimientos quirúrgicos, tales como facoemulsión (es decir, cirugía de cataratas) e implantación de estructuras tales como una lente artificial. Además, las cirugías de columna en particular, o cualquier cirugía en donde el paciente se encuentre boca abajo durante un periodo de tiempo prolongado pueden conducir a una presión interocular aumentada.

La neuritis óptica (ON) es la inflamación del nervio óptico y da lugar a una pérdida de visión aguda. Esta está

sumamente asociada con la esclerosis múltiple (EM), ya que 15–25 % de los pacientes de EM presentan inicialmente ON, y al 50–75 % de los pacientes de ON se les diagnostica EM. La ON se asocia también con infección (p. ej., infección viral, meningitis, sífilis), inflamación (p. ej., a partir de una vacuna), infiltración e isquemia.

5 Otro estado que conduce a daño al nervio óptico es la neuropatía óptica isquémica anterior (AION). Existen dos tipos de AION. La AION arterítica se debe a la arteritis de células gigantes (vasculitis) y conduce a pérdida de visión aguda. La AION no arterítica abarca todos los casos de neuropatía óptica isquémica diferentes de los debidos a la arteritis de células gigantes. La patofisiología de AION no está clara a pesar de que parece que esta incorpora mecanismos tanto inflamatorios como isquémicos.

10 Otro daño al nervio óptico se asocia típicamente con las desmielinación, inflamación, isquemia, toxinas, o traumatismo al nervio óptico. Las condiciones a modo de ejemplo en las que el nervio óptico está dañado incluyen Neuropatía Óptica Desmielinante (Neuritis óptica, Neuritis óptica Retrobulbar), Meningioma de la Envoltura del Nervio Óptico, Neuritis Óptica Adulta, Neuritis Óptica Infantil, Neuropatía Óptica Isquémica Anterior, Neuropatía Óptica Isquémica Posterior, Neuropatía Óptica Compresiva, Papiloedema, Pseudopapiloedema y Neuropatía Óptica Tóxica/Nutricional.

15 Otras condiciones neurológicas asociadas con la pérdida de visión, aunque no directamente asociadas con el daño al nervio óptico, incluyen Ambliopía, Parálisis de Bell, Oftalmoplegia Externa Progresiva Crónica, Esclerosis múltiple, Pseudotumor Cerebri y Neuralgia de Trigémino.

20 En ciertos aspectos de la invención, la deficiencia de la visión es causada por daño retiniano. En realizaciones particulares, el daño retiniano es causado por perturbaciones en el flujo sanguíneo al ojo (por ejemplo, arteriosclerosis, vasculitis). En realizaciones particulares, el daño retiniano es causado por perturbación de la mácula (por ejemplo, degeneración macular exudativa o no exudativa).

25 Enfermedades retinales a modo de ejemplo incluyen la Degeneración Macular Relacionada con la Edad Exudativa, Degeneración Macular Relacionada con la Edad No Exudativa, Prótesis Retiniana Electrónica y Degeneración Macular Relacionada con Edad de Transplante RPE, Epiteliopatía Aguda Multifocal de Pigmento Placoide, Necrosis Retiniana Aguda, Enfermedad de Best, Oclusión de la Rama de la Arteria Retiniana, Oclusión de la Rama de la Vena Retiniana, Retinopatías Auto–inmunes Asociadas al Cáncer y Relacionadas, Oclusión de la Arteria Retiniana Central, Oclusión de la Vena Retiniana Central, Coriorretinopatía Serosa Central, Enfermedad de Eales, Membrana Epimacular, Degeneración de Reticular, Macroaneurisma, Edema Macular Diabético, Edema Macular Irving–Gass, Hueco Macular, Membranas Neovasculares Subretinianas, Neurorretinitis Difusa Unilateral Subaguda, Edema Macular Cistoide no pseudofáquico, Síndrome de Histoplasmosis Ocular Supuesta, Desprendimiento Retiniano Exudativo, Desprendimiento Retiniano Post–operatorio, Desprendimiento Retiniano Proliferativo, Desprendimiento Retiniano Regmatógeno, Desprendimiento Retiniano Traccional, Retinitis Pigmentosa, Retinitis CMV, Retinoblastoma, Retinopatía de Prematuro, Retinopatía en Perdigonada, Retinopatía causada por Antecedentes Diabéticos, Retinopatía Diabética Proliferativa, Retinopatía Hemoglobínopática, Retinopatía de Purtscher, Retinopatía de Valsalva, Retinosquiasis Juvenil, Retinosquiasis Senil, Síndrome de Terson y Síndromes de Punto Blanco.

35 Otras enfermedades a modo de ejemplo incluyen las infecciones de bacterias oculares (por ejemplo, conjuntivitis, queratitis, tuberculosis, sífilis, gonorrea), infecciones virales (por ejemplo Virus del Herpes Simplex Ocular, Virus Varicela Zóster, Retinitis Citomegalovirus, Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)) así como necrosis retiniana externa progresiva secundaria al VIH u otras enfermedades oculares asociadas al VIH u otras asociadas a la inmunodeficiencia. De forma adicional, las enfermedades oculares incluyen las infecciones fúngicas (por ejemplo Candida coroiditis, histoplasmosis), infecciones protozoarias (por ejemplo toxoplasmosis) y otras tales como la toxocariasis y la sarcoidosis.

40 Un aspecto de la invención es un método para inhibir, reducir o tratar una deficiencia de la visión en un sujeto que está siendo sometido a un tratamiento con un fármaco quimioterápico (por ejemplo, un fármaco neurotóxico, un fármaco que eleva la presión intraocular tal como un esteroide), mediante la administración al sujeto que necesita tal tratamiento de una dosificación terapéutica de un modulador de la sirtuina desvelado en la presente memoria.

45 Otro aspecto de la invención es un método para inhibir, reducir o tratar la deficiencia de la visión en un sujeto que esté siendo sometido a cirugía, incluyendo cirugía ocular u otras relacionadas en la posición recostada con la cabeza hacia abajo como la cirugía de médula espinal, administrando al sujeto que necesita de dicho tratamiento una dosis terapéutica de un modulador de la sirtuina descrito en la presente memoria. Las cirugías oculares incluyen la catarata, la iridotomía y el reemplazo de lentes. Otro aspecto de la invención es el tratamiento, incluyendo la inhibición y el tratamiento profiláctico, de enfermedades oculares que incluyen cataratas, sequedad de ojos, daño retiniano y similares, administrando al sujeto que necesita de dicho tratamiento, una dosis terapéutica de un modulador de la sirtuina descrito en la presente memoria.

50 La formación de cataratas se asocia con varios cambios bioquímicos en el cristalino del ojo, tal como niveles disminuidos de antioxidantes ácido ascórbico y glutatión, lípidos aumentados, oxidación de aminoácido y proteína, sodio y calcio aumentados, pérdida de aminoácidos y metabolismo del cristalino disminuido. El cristalino, que carece

de vasos sanguíneos, está suspendido en fluidos extracelulares en la parte anterior del ojo. Se requieren nutrientes, tal como ácido ascórbico, glutatión, vitamina E, selenio, bioflavonoides y carotenoides, para mantener la transparencia del cristalino. Niveles bajos de selenio dan como resultado un aumento de peróxido de hidrógeno inductor de radicales libres, que se neutraliza por la enzima glutatión peroxidasa antioxidante dependiente del selenio. La glutatión peroxidasa protectora del cristalino depende también de los aminoácidos metionina, cisteína, glicina y ácido glutámico.

También pueden desarrollarse cataratas debido a una incapacidad de metabolizar adecuadamente la galactosa que se encuentra en productos lácteos que contienen lactosa, un disacárido compuesto por el monosacárido galactosa y glucosa. Las cataratas pueden evitarse, retardarse, ralentizarse y posiblemente incluso revertirse si se detectan temprano y se corrigen metabólicamente.

El daño a la retina se atribuye, entre otros, a reacciones iniciadas por radicales libres en el glaucoma, retinopatía diabética y la degeneración macular relacionada con la edad (AMD). El ojo es una parte del sistema nervioso central y tiene una capacidad de regeneración limitada. La retina se compone de numerosas células nerviosas que contienen la más alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PFA) y está sujeta a oxidación. Los radicales libres se generan por la luz UV al entrar en el ojo y mitocondria en los bastones y conos, que generan la energía necesaria para transformar la luz en impulsos visuales. Los radicales libres dan lugar a peroxidación de los PFA por radicales de hidroxilo o superóxido que, a su vez, propagan radicales libres adicionales. Los radicales libres dan lugar a un daño temporal o permanente al tejido de la retina.

El glaucoma se contempla usualmente como un trastorno que da lugar a una presión intraocular elevada (IOP) que da como resultado un daño permanente a las fibras nerviosas de la retina, pero una sexta parte de todos los casos de glaucoma no desarrollan una IOP elevada. Este trastorno se percibe en la actualidad como uno de perfusión vascular reducida y un aumento en los factores neurotóxicos. Estudios recientes han asociado 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 a partir de óxido nítrico y superóxido. En un estudio reciente, animales tratados con aminoguanidina, un inhibidor de la óxido nítrico sintasa, presentaron una reducción en la pérdida de las células ganglionares de la retina. Se concluyó que el óxido nítrico en el ojo dio lugar a citotoxicidad en muchos tejidos y a neurotoxicidad en el sistema nervioso central.

La retinopatía diabética se produce cuando los vasos sanguíneos subyacentes desarrollan anomalías microvasculares que consisten principalmente en microaneurismas y hemorragias intrarretinales. Los metabolitos oxidativos están directamente implicados en la patogenia de la retinopatía diabética y los radicales libres magnifican la generación de los factores de crecimiento que conducen una actividad proliferativa potenciada. El óxido nítrico producido por las células del endotelio de los vasos puede dar lugar también a que las células de músculo liso se relajen y den como resultado la vasodilatación de segmentos del vaso. La isquemia e hipoxia de la retina tienen lugar después del engrosamiento de la membrana basal arterial, la proliferación endotelial y la pérdida de pericitos. La oxigenación inadecuada da lugar a destrucción capilar o no perfusión, derivaciones arteriolar-venular, flujo de sangre lento y una capacidad deteriorada de RBC para liberar oxígeno. La peroxidación de lípidos de los tejidos de la retina también se produce como resultado del daño por radicales libres.

La mácula es responsable de la visión central aguda en el ser humano y está compuesta de células fotorreceptoras (conos), mientras que el epitelio de pigmento de la retina (RPE) subyacente y la coroide 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 exteriores desprendidas de los. El RPE está expuesto a altos niveles de radiación UV, y secreta factores que inhiben la angiogénesis. La coroide contiene una densa red vascular que proporciona nutrientes y elimina los materiales de desecho.

En la AMD, las puntas desprendidas de los conos se vuelven indigeribles por el RPE, en donde las células se hinchan y mueren después de recoger demasiado material sin digerir. Las acumulaciones de material de desecho sin digerir, denominadas drusas, se forman por debajo del RPE. El daño fototóxico da lugar también a la acumulación de lipofuscina en las células del RPE. La lipofuscina intracelular y la acumulación de drusas en la membrana de Bruch interfieren con el transporte de oxígeno y los nutrientes a los tejidos de la retina y, por último, conduce a disfunción de RPE y de fotorreceptores. En la AMD exudativa, los vasos sanguíneos crecen a partir del coriocapilar a través de defectos en la membrana de Bruch y pueden crecer por debajo del RPE, desprendiendo este de la coroide, y filtrando fluido o sangrando.

El pigmento macular, uno de los factores protectores que evitan que la luz solar dañe la retina, está formado por la acumulación de carotenoides obtenidos nutricionalmente, tal como luteína, el pigmento amarillo graso que sirve como un vehículo de suministro para otros nutrientes importantes y la zeaxantina. Antioxidantes tales como vitaminas C y E, betacaroteno y luteína, así como zinc, selenio y cobre, se encuentran todos en la mácula sana. Además de proporcionar nutrición, estos antioxidantes protegen frente al daño por radicales libres que inicia la degeneración macular.

Otro aspecto de la invención es la prevención o tratamiento de daño al ojo causado por estrés, ataque químico o

radiación, administrando al sujeto que necesita de dicho tratamiento una dosis terapéutica de un modulador de la sirtuina que se describe en la presente memoria. La radiación o el daño electromagnético al ojo pueden incluir aquel causado por CRT o por la exposición a la luz del sol o a luz ultravioleta.

5 En una realización, un régimen de combinación de fármacos puede incluir fármacos o compuestos para el tratamiento o la prevención de trastornos oculares o estados secundarios asociados con estos estados. Por lo tanto, un régimen de combinación de fármacos puede incluir uno o más activadores de la sirtuina y uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento de un trastorno ocular. Por ejemplo, uno o más compuestos activadores de la sirtuina pueden combinarse con una cantidad efectiva de uno o más de: un agente que reduce la presión intraocular, un agente para el tratamiento del glaucoma, un agente para el tratamiento de la neuritis óptica, un agente para el  
10 tratamiento de la Retinopatía por CMV, un agente para el tratamiento de esclerosis múltiple, y/o un antibiótico, etc.

En una realización, un modulador de la sirtuina puede administrarse en conjunción con una terapia para reducir la presión intraocular. Un grupo de terapias implica el bloqueo de la producción acuosa. Por ejemplo, los antagonistas de beta-adrenérgicostópicos (timolol y betaxolol) disminuyen la producción acuosa. El timolol tópico da lugar a que la IOP caiga en 30 minutos con efectos pico en 1–2 horas. Un régimen razonable es Timoptic al 0,5 %, una gota  
15 cada 30 minutos durante 2 dosis. El inhibidor de la anhidrasa carbónica, acetazolamida, también disminuye la producción acuosa y debería darse en conjunción con beta-antagonistas tópicos. Se administra una dosis inicial de 500 mg, seguida por 250 mg cada 6 horas. Esta medicación puede darse por vía oral, por vía intramuscular, o por vía intravenosa. Además, los alfa 2-agonistas (p. ej., Apraclonidina) actúan disminuyendo la producción acuosa. Sus efectos son aditivo para los beta-bloqueantes administrados por vía tópica. Éstos han sido aprobados para su uso  
20 en el control de una subida aguda en la presión a continuación de los procedimientos con láser de la cámara anterior, pero se ha notificado su efectividad en el tratamiento del glaucoma de ángulo cerrado agudo. Un régimen razonable es 1 gota cada 30 minutos durante 2 dosis.

Un segundo grupo de terapias para reducir la presión intraocular implica la reducción del volumen vítreo. Pueden usarse agentes hiperosmóticos para tratar un ataque agudo. Estos agentes extraen agua del globo haciendo la  
25 sangre hiperosmolar. El glicerol oral en una dosis de 1 ml/kg en una solución fría al 50 % (mezclado con zumo de limón para hacerlo más sabroso) se usa a menudo. El glicerol se convierte en glucosa en el hígado; las personas con diabetes pueden necesitar insulina adicional si se vuelven hiperglicémicas después de recibir el glicerol. La isosorbida oral es un alcohol metabólicamente inerte que también puede usarse como un agente osmótico para pacientes con glaucoma de ángulo cerrado agudo. La dosis usual es de 100 g, tomada por vía oral (220 cc de una  
30 solución al 45 %). Este alcohol inerte no debería confundirse con el dinitrato de isosorbida, una medicación cardíaca a base de nitrato que se usa para la angina y para la insuficiencia cardíaca congestiva. El manitol intravenoso, en una dosis de 1.0–1.5 mg/kg, también es efectivo y se tolera bien en los pacientes con náuseas y vómitos. Estos agentes hiperosmóticos deberían usarse con precaución en cualquier paciente con una historia de insuficiencia cardíaca congestiva.

35 Un tercer grupo de terapias implica facilitar la salida acuosa del ojo. Los agentes mióticos tiran del iris desde el ángulo iridocorneal y pueden ayudar a aliviar la obstrucción de la malla trabecular junto al iris periférico. La pilocarpina al 2 % (ojos azules)–4 % (ojos marrones) puede administrarse cada 15 minutos durante las primeras 1–2 horas. Una administración más frecuente o dosis más elevadas pueden precipitar una crisis colinérgica sistémica. Los NSAIDS se usan a veces para reducir la inflamación.

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

50 En una realización, un modulador de la sirtuina puede administrarse en conjunción con una terapia para el tratamiento y/o la prevención del glaucoma. Un ejemplo de un fármaco para el glaucoma es DARANIDE® Comprimidos (Merck) (Diclorfenamida).

En una realización, un modulador de la sirtuina puede administrarse en conjunción con una terapia para el  
55 tratamiento y/o la prevención de la neuritis óptica. Los ejemplos de fármacos para la neuritis óptica incluyen DECADRON® Fosfato Inyectable (Merck) (Fosfato Sódico de Dexametasona), DEPO-MEDROL® (Pharmacia & Upjohn) (acetato de metilprednisolona), HIDROCORTONE® Comprimidos (Merck) (Hidrocortisona), ORAPRED® (Biomarin) (solución oral de fosfato sódico de prednisolona) y PEDIAPRED® (Celltech) (fosfato sódico de prednisolona, USP).

En una realización, un modulador de la sirtuina puede administrarse en conjunción con una terapia para el

tratamiento y/o la prevención de la retinopatía por CMV. Los tratamientos para la retinopatía por CMV incluyen CITOVENE® (cápsulas de ganciclovir) y VALCYTE® (Roche Laboratories) (comprimidos de hidrocloreuro de valganciclovir).

5 En otra realización más, un modulador de la sirtuina puede administrarse en conjunción con una terapia para el tratamiento y/o la prevención de la esclerosis múltiple. Los ejemplos de tales 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 de glatiramer) y REBIF® (Pfizer) (interferón beta-1a).

10 Además, la macrolida y/o el ácido micofenólico, que tiene múltiples actividades, pueden administrarse conjuntamente con un modulador de la sirtuina. Los antibióticos de macrolida incluyen tacrolímús, ciclosporina, sirolímús, everolímús, ascomicina, eritromicina, azitromicina, claritromicina, clindamicina, lincomicina, diritromicina, josamicina, espiramicina, diacetil-midecamicina, tilosina, roxitromicina, ABT-773, telitromicina, leucomicinas, y lincosamida.

#### *Enfermedades y trastornos asociados a las mitocondrias*

15 En ciertas realizaciones, la invención provee métodos para tratar enfermedades o trastornos que se beneficiarían de una actividad mitocondrial aumentada. Los métodos implican la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad terapéuticamente efectiva, de un compuesto activador de la sirtuina. Una actividad mitocondrial aumentada hace referencia a una actividad aumentada de la mitocondria mientras se mantienen los números globales de mitocondria (p. ej., masa mitocondrial), aumentando el número de mitocondrias por tanto aumentando la actividad mitocondrial (p. ej. estimulando la biogénesis mitocondrial), o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, las enfermedades y trastornos que se beneficiarían de una actividad mitocondrial aumentada incluyen las enfermedades o trastornos asociados con la disfunción mitocondrial.

25 En ciertas realizaciones, los métodos para tratar enfermedades o trastornos que se beneficiarían de una actividad mitocondrial aumentada pueden comprender la identificación de un sujeto que sufre de disfunción mitocondrial. Métodos para diagnosticar una disfunción mitocondrial pueden implicar análisis genéticos, patológicos y/o bioquímicos se resumen en Cohen y Gold, Cleveland Clinic Journal of Medicine, 68: 625-642 (2001). Un método para diagnosticar una disfunción mitocondrial es la escala de Thor-Byrne-ier (véase p. ej., Cohen y Gold, citado anteriormente; Collin S. y col., Eur Neurol. 36: 260-267 (1996)). Otros métodos para determinar el número y la función de las mitocondrias 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 del ciclo de Krebs), determinación o masa mitocondrial, volumen mitocondrial, y/o número de mitocondrias, cuantificación de ADN mitocondrial, monitorización de la homeostasis del calcio intracelular y/o respuestas celulares a perturbaciones de esta homeostasis, evaluación de la respuesta frente a un estímulo apoptogénico, determinación de la producción de radicales libres. Tales métodos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en publicación de patente de EE.UU. n.º 30 2002/0049176 y referencias citadas en ese documento. Las mitocondrias son críticas para la supervivencia y la función apropiada de casi todos los tipos de células eucariotas.

35 La mitocondria en prácticamente cualquier tipo celular puede tener defectos congénitos o adquiridos que afectan a su función. Por lo tanto, los síntomas y signos clínicamente significativos de defectos mitocondriales que afectan a la función de la cadena respiratoria son heterogéneos y variables dependiendo de la distribución de mitocondrias defectuosas entre las células y la gravedad de sus déficits, y con demandas fisiológicas sobre las células afectadas. Tejidos de no división con altos requisitos de energía, p. ej. tejido nervioso, músculo esquelético y músculo cardiaco son en particular sensibles a disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial, pero puede verse afectado cualquier sistema de órgano.

45 Las enfermedades y trastornos asociados con la disfunción mitocondrial incluyen enfermedades y trastornos en los que déficits en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial contribuyen al desarrollo de la fisiopatología de tales enfermedades o trastornos en un mamífero. Esto incluye 1) deficiencias genéticas congénitas en la 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, en donde tales deficiencias están provocadas por a) daño oxidativo durante el envejecimiento; b) calcio intracelular elevado; c) exposición de células afectadas a óxido nítrico; d) hipoxia o isquemia; e) déficits asociados a microtúbulos en transporte axonal de mitocondrias, o f) la expresión de proteínas de desacoplamiento mitocondrial.

55 Enfermedades o trastornos que se beneficiarían de una actividad mitocondrial aumentada incluyen en general por ejemplo, enfermedades en las que la lesión oxidativa mediada por radicales libres lleva a degeneración tisular, enfermedades en las que células experimentan de manera inapropiada apoptosis, y enfermedades en las que las células no experimentan apoptosis. Enfermedades o trastornos a modo de ejemplo que se beneficiarían de una actividad mitocondrial aumentada incluyen, por ejemplo, EA (enfermedad de Alzheimer), EAEP (enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson), AMDF (ataxia, mioclonos y sordera), enfermedad autoinmunitaria, cáncer, POIC (pseudoobstrucción intestinal crónica con miopatía y oftalmoplejía), distrofia muscular congénita, OPEC (oftalmoplejía externa progresiva crónica), DEAF (sordera de herencia materna o sordera inducida por

5 aminoglicósidos), DEMCHO (demencia y corea), diabetes mellitus (tipo I o tipo II), DIDMOAD (diabetes insipidus, diabetes mellitus, atrofia óptica, sordera), DDMF (diabetes mellitus y sordera), distonía, intolerancia al ejercicio, ESOC (epilepsia, apoplejías, atrofia óptica, y deterioro cognitivo), NEBF (necrosis estriatal bilateral familiar), FICP (cardiomiopatía infantil mortal más, una cardiomiopatía asociada a MELAS), GER (reflujo gastrointestinal), EH (enfermedad de Huntington), SKS (síndrome de Kearns–Sayre), miopatía de “aparición tardía”, LDYT (neuropatía óptica hereditaria de Leber y distonía), síndrome de Leigh, LHON (neuropatía óptica hereditaria del hígado), L IMM (miopatía mitocondrial infantil mortal), MDM (miopatía y diabetes mellitus), MELAS (encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica, y episodios de tipo apoplejía), MEPR (epilepsia mioclónica y regresión psicomotora), MERME (enfermedad de solapamiento MERRF/MELAS), MERRF (epilepsia mioclónica y fibras musculares rojas desordenadas), MHCM (cardiomiopatía hipertrófica de herencia materna), MICM (cardiomiopatía de herencia materna), MILS (síndrome de Leigh de herencia materna), encefalocardiomiopatía mitocondrial, encefalomiopatía mitocondrial, MM (miopatía mitocondrial), MMC (miopatía mitocondrial y cardiomiopatía), MNGIE (miopatía y oftalmoplejía externa, neuropatía, gastrointestinal, encefalopatía), trastorno mitocondrial multisistema (miopatía, encefalopatía, ceguera, pérdida de audición, neuropatía periférica), NARP (debilidad muscular neurogénica, ataxia, y retinitis pigmentosa; fenotipo alternante en este locus se notifica como enfermedad de Leigh), EP (enfermedad de Parkinson), síndrome de Pearson, PEM (encefalopatía progresiva), PEO (oftalmoplejía externa progresiva), PME (epilepsia de mioclono progresiva), PMPS (síndrome de médula–páncreas de Pearson), psoriasis, RTT (síndrome de Rett), esquizofrenia, SIDS (síndrome de muerte súbita infantil), SNHL (pérdida auditiva neurosensorial), presentación familiar variada (manifestaciones clínicas oscilan desde paraparesia espástica en trastorno progresivo multisistema y cardiomiopatía fatal a ataxia truncal, disartría, pérdida auditiva grave, regresión mental, ptosis, oftalmoparesia, ciclones distales, y diabetes mellitus), o síndrome de Wolfram.

25 Otras enfermedades y trastornos que se beneficiarían de una actividad mitocondrial aumentada incluyen, por ejemplo, ataxia de Friedreich y otras ataxias, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y otras enfermedades neuronales motoras, degeneración macular, epilepsia, síndrome de Alpers, síndrome de delección de ADN mitocondrial múltiple,
 30 síndrome de agotamiento de ADNmit, deficiencia en complejo I, deficiencia en complejo II (SDH), deficiencia en complejo III, deficiencia en citocromo c oxidasa (COX, complejo IV), deficiencia en complejo V, deficiencia en translocador de adenina nucleótido (ANT), deficiencia en piruvato deshidrogenasa (PDH), aciduria etilmalónica con academia láctica, aciduria 3–metilglutacónica con academia láctica, epilepsia refractaria con deterioros durante la infección, síndrome de Asperger con deterioros durante la infección, autismo con deterioros durante infección,
 35 trastorno de hiperactividad por déficit de atención (ADHD), parálisis cerebral con deterioros durante la infección, dislexia con deterioros durante infección, trombocitopenia de herencia materna y síndrome de leucemia, síndrome de MARIAHS (ataxia mitocondrial, infecciones recurrentes, afasia, hipouricemia/hipomielinación, convulsiones y aciduria dicarboxílica), distonía de ND6, síndrome de vómitos cíclicos con deterioros durante la infección, aciduria 3–hidroxí–isobutírica con academia láctica, diabetes mellitus con academia láctica, síndrome neurológico que responde a uridina (URNS), cardiomiopatía dilatada, linfoma esplénico, y síndrome de acidosis tubular renal/diabetes/ataxia.

40 En otras realizaciones, la invención provee métodos para el tratamiento de un sujeto que padece de trastornos mitocondriales que surgen de, pero no se limitan a, lesión de cabeza postraumática y edema cerebral, apoplejía (métodos de la invención útiles para la prevención de o la prevención de la lesión por reperusión), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome hepatorenal, insuficiencia hepática aguda, NASH (esteatohepatitis no alcohólica),
 45 terapia de cáncer anti–metástasis/prodiferenciación, insuficiencia cardíaca congestiva idiopática, fibrilación auricular (no valvular), síndrome de Wolff–Parkinson–White, bloqueo cardíaco idiopático, prevención de lesión por reperusión en infartos de miocardio agudos, migrañas familiares, síndrome del intestino irritable, prevención secundaria de infartos de miocardio de ondas no Q, síndrome premenstrual, prevención de insuficiencia renal en el síndrome hepatorenal, síndrome de anticuerpos anti–fosfolípidos, eclampsia/pre–eclampsia, infertilidad por ovopausia,
 cardiopatía isquémica/angina, y síndromes de Shy–Drager y de disautonomía no clasificada.

50 En todavía otra realización, se proveen métodos para el tratamiento de trastornos mitocondriales asociados con efectos secundarios relacionados con fármacos farmacológicos. Tipos de agentes farmacéuticos que están 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), fluoroyodoarauracilo (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 dihidroorotato deshidrogenasa (DHOD) incluyen, por ejemplo, leflunomida, brequinar y similares.

55 Inhibidores de transcriptasa inversa no sólo inhiben la transcriptasa inversa sino también la polimerasa gamma que se requiere para la función mitocondrial. La inhibición de la actividad polimerasa gamma (p. ej., con un inhibidor de transcriptasa inversa) lleva por lo tanto a disfunción mitocondrial y/o a una masa mitocondrial reducida que se manifiesta en sí en los pacientes como hiperlactatemia. Este tipo de condición puede beneficiarse de un aumento en el número de mitocondrias y/o una mejora en la función mitocondrial, p. ej., mediante la administración de un compuesto activador de la sirtuína.

60 Los síntomas comunes de enfermedades mitocondriales incluyen cardiomiopatía, debilidad muscular y atrofia, retrasos del desarrollo (que implican función motora, del lenguaje, cognitiva o de ejecución), ataxia, epilepsia, acidosis tubular renal, neuropatía periférica, neuropatía óptica, neuropatía autonómica, disfunción del intestino



neurogénica, sordera neurosensorial, disfunción de vejiga neurogénica, cardiomiopatía dilatada, migraña, insuficiencia hepática, acidemia láctica y diabetes mellitus.

En ciertas realizaciones, la invención provee métodos para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno que se beneficiaría de una actividad mitocondrial aumentada que implica administrar a un sujeto que lo necesite uno o más compuestos activadores de la sirtuína en combinación con otro agente terapéutico tal como, por ejemplo, un agente útil para el tratamiento de disfunción mitocondrial (tal como antioxidantes, vitaminas, o cofactores de la cadena respiratoria), un agente útil para reducir un síntoma asociado con una enfermedad o un trastorno que implica disfunción mitocondrial (tal como, un agente anti-convulsiones, un agente útil para aliviar dolor neuropático, un agente para el tratamiento de disfunción cardíaca), un agente cardiovascular (tal como se describe adicionalmente a continuación), un agente quimioterápico (tal como se describe adicionalmente a continuación), o un agente anti-neurodegeneración (tal como se describe adicionalmente a continuación). En una realización a modo de ejemplo, la invención proporciona métodos para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno que se beneficiaría de una actividad mitocondrial aumentada que implica administrar a un sujeto que lo necesite uno o más compuestos activadores de la sirtuína en combinación con una o más de lo siguiente: coenzima Q10, L-carnitina, tiamina, riboflavina, niacinamida, folato, vitamina E, selenio, ácido lipoico, o prednisona. Composiciones que comprenden tales combinaciones se proporcionan también en la presente memoria.

En realizaciones a modo de ejemplo, la invención provee métodos para el tratamiento de enfermedades o trastornos que se beneficiarían de una actividad mitocondrial aumentada administrando a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto activador de la sirtuína. Enfermedades o trastornos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, trastornos neuromusculares (p. ej., ataxia de Friedreich, distrofia muscular, esclerosis múltiple, etc.), trastornos de inestabilidad neuronal (p. ej., trastornos de convulsiones, migrañas, etc.), retrasos del desarrollo, trastornos neurodegenerativos (p. ej., enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, etc.), isquemia, acidosis tubular renal, neurodegeneración relacionada con la edad y deterioro cognitivo, fatiga producto de la quimioterapia, menopausia causada por la edad o inducida por la quimioterapia o irregularidades de ciclo menstrual u ovulación, miopatías mitocondriales, daño mitocondrial (p. ej., acumulación de calcio, excitotoxicidad, exposición al óxido nítrico, hipoxia, etc.), y desregulación mitocondrial.

Un defecto génico subyacente a la ataxia de Friedreich (AF), la ataxia hereditaria más común, se identificó recientemente y se designa "frataxina". En la AF, tras un periodo de desarrollo normal, se desarrollan déficits en la coordinación que avanzan a parálisis y muerte, típicamente entre las edades de 30 y 40 años. Los tejidos afectados de mayor gravedad son médula espinal, nervios periféricos, miocardio, y páncreas. Los pacientes pierden típicamente el control motor y quedan confinados a sillas de ruedas, y se ven afectados comúnmente con insuficiencia cardíaca y diabetes. La base genética para la AF implica repeticiones de trinucleótidos de GAA en una región de intrón del gen que codifica para frataxina. La presencia de estas repeticiones da como resultado la reducción de la transcripción y expresión del gen. La frataxina está implicada en la regulación del contenido en hierro mitocondrial. Cuando el contenido en frataxina celular es inferior al normal, el hierro en exceso se acumula en la mitocondria, promoviendo el daño oxidativo y la consiguiente degeneración y disfunción mitocondrial. Cuando números intermedios de repeticiones de GAA están presentes en el intrón de gen de frataxina, puede no desarrollarse el fenotipo clínico grave de la ataxia. Sin embargo, estas extensiones de trinucleótidos de longitud intermedia se encuentran en un 25 a un 30 % de los pacientes con diabetes mellitus no dependiente de insulina, en comparación con aproximadamente un 5 % de la población no diabética. En ciertas realizaciones, los compuestos activadores de la sirtuína pueden usarse para el tratamiento de pacientes con trastornos relacionados con deficiencias o defectos en frataxina, incluyendo ataxia de Friedreich, disfunción de miocardio, diabetes mellitus y complicaciones de diabetes como neuropatía periférica.

La distrofia muscular hace referencia a una familia de enfermedades que implican el deterioro de la estructura neuromuscular y la función de la misma, a menudo dando como resultado la atrofia del músculo esquelético y disfunción de miocardio. En el caso de la distrofia muscular de Duchenne, mutaciones o déficits en una proteína específica, distrofina, están implicados en su etiología. Ratones con sus genes de distrofina inactivados presentan algunas características de distrofia muscular, y tienen un déficit de aproximadamente un 50 % en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial. Una ruta común final para la degeneración neuromuscular en la mayoría de los casos es la deficiencia mediada por calcio de la función mitocondrial. En ciertas realizaciones, los compuestos activadores de la sirtuína pueden usarse para reducir la tasa de deterioro de capacidades funcionales musculares y para mejorar el estado funcional muscular en pacientes con distrofia muscular.

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neuromuscular caracterizada por degeneración autoinmunitaria e inflamatoria focal de materia blanca cerebral. Exacerbaciones o ataques periódicos están relacionados significativamente con infecciones de las vías respiratorias altas y otras infecciones, tanto bacterianas como virales, lo que indica que la disfunción mitocondrial desempeña un papel en la EM. Una depresión de la actividad neuronal de la cadena respiratoria mitocondrial provocada por óxido nítrico (producido por astrositos y otras células implicadas en la inflamación) está implicada como mecanismo molecular que contribuye a la EM. En ciertas realizaciones, compuestos activadores de la sirtuína pueden usarse para el tratamiento de pacientes con esclerosis múltiple, tanto de manera profiláctica como durante episodios de exacerbación de la enfermedad.

La epilepsia está con frecuencia con frecuencia presente en pacientes con citopatías mitocondriales, que implican

una gama de gravedad y frecuencia de las convulsiones, p. ej. ausencia, tónica, atónica, mioclónica, y *status epilepticus*, que se producen en episodios aislados o muchas veces al día. En ciertas realizaciones, los compuestos activadores de la sirtuina pueden usarse para el tratamiento de pacientes con convulsiones secundarias a la disfunción mitocondrial, incluyendo reducir la frecuencia y gravedad de la actividad de las convulsiones.

- 5 Estudios metabólicos en pacientes con dolores de cabeza por migraña recurrentes indican que los déficits en la actividad mitocondrial están comúnmente asociados con este trastorno, manifestándose como fosforilación oxidativa perjudicada y producción de lactato en exceso. Tales déficits no se deben necesariamente a defectos genéticos en el ADN mitocondrial. Las personas con migrañas son hipersensibles al óxido nítrico, un inhibidor endógeno de la citocromo c oxidasa. Además, pacientes con citopatías mitocondriales, p. ej. MELAS, con frecuencia tienen migrañas recurrentes. En ciertas realizaciones, los compuestos activadores de la sirtuina pueden usarse para el tratamiento de pacientes con dolores de cabeza por migraña recurrentes, incluyendo dolores de cabeza resistentes a compuestos de cornezuelo o antagonistas de receptores de serotonina.

Retrasos en el desarrollo neurológico o neuropsicológico se encuentran con frecuencia en niños con enfermedades mitocondriales. El desarrollo y la remodelación de conexiones neuronales requieren una intensa actividad biosintética, en particular que implica la síntesis de membranas neuronales y mielina, requiriendo ambos nucleótidos de pirimidina como cofactores. Los nucleótidos de uridina están implicados en la activación y transferencia de azúcares a glicolípidos y glicoproteínas. Los nucleótidos de citidina se derivan de nucleótidos de uridina, y son cruciales para la síntesis de constituyentes principales de fosfolípidos de membrana como fosfatidilcolina, que recibe su resto de colina de citidina–difosfolina. En el caso de disfunción mitocondrial (debido o bien a defectos de ADN mitocondrial o cualquiera de los déficits adquiridos o condicionados como disfunción mitocondrial excitotóxica o mediada por óxido nítrico) u otros estados que resultan en síntesis de pirimidina perjudicada, proliferación celular y extensión axonal se ve perjudicada en fases cruciales en el desarrollo de interconexiones neuronales y circuitos, dando como resultado un desarrollo retardado o detenido de funciones neuropsicológicas como el lenguaje, función motora, social, de ejecución, y habilidades cognitivas. En el autismo por ejemplo, mediciones de espectroscopía de resonancia magnética de compuestos de fosfato cerebral indica que existe una subsíntesis global de membranas y precursores de membrana que se indican mediante niveles reducidos de difosfo–azúcares de uridina, y derivados de nucleótidos de citidina implicados en la síntesis de membrana. Los trastornos caracterizados por un retraso del desarrollo incluyen el síndrome de Rett, retraso generalizado del desarrollo (o PDD–NOS “retraso generalizado del desarrollo no especificado de otro modo” para distinguirlo de subcategorías específicas como el autismo), autismo, síndrome de Asperger, y trastorno de hiperactividad con déficit de atención (ADHD), que se reconoce como un retraso o retardo en el desarrollo de circuito neuronal subyacente a funciones de ejecución. En ciertas realizaciones, los compuestos activadores de la sirtuina pueden ser útiles para el tratamiento de pacientes con neurorretardos del desarrollo (p. ej., implicando función motora, del lenguaje, de ejecución, y habilidades cognitivas), u otros retrasos o detenciones de desarrollo neurológico y neuropsicológico en el sistema nervioso y desarrollo somático en tejidos no neuronales como el músculo y glándulas endocrinas.

Las dos enfermedades neurodegenerativas graves más significativas asociadas con el envejecimiento, enfermedad de Alzheimer (EA) y enfermedad de Parkinson (EP), implican ambas disfunción mitocondrial en su patogenia. Deficiencias en complejo I se encuentran frecuentemente en particular no sólo en las neuronas nigroestriales que degeneran en la enfermedad de Parkinson, sino también en tejidos periféricos y células como músculo y plaquetas de pacientes con enfermedad de Parkinson. En la enfermedad de Alzheimer, la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial está con frecuencia reducida, especialmente el complejo IV (citocromo c oxidasa). Además, la función respiratoria mitocondrial en conjunto se ve disminuida como consecuencia del envejecimiento, amplificando adicionalmente las secuelas perjudiciales de lesiones moleculares adicionales que afectan a la función de la cadena respiratoria. Otros factores además de la disfunción mitocondrial primaria subyacen a la neurodegeneración en la EA, la EP, y trastornos relacionados. La estimulación excitotóxica y el óxido nítrico están implicados en ambas enfermedades, dos factores que exacerban los déficits de la cadena respiratoria mitocondrial y cuyas acciones perjudiciales están exageradas sobre una base de disfunción de la cadena respiratoria. La enfermedad de Huntington también implica disfunción mitocondrial en regiones del cerebro afectadas, con interacciones cooperativas de estimulación excitotóxica y disfunción mitocondrial que contribuyen a la degeneración neuronal. En ciertas realizaciones, los compuestos activadores de la sirtuina pueden ser útiles para el tratamiento y la atenuación de la progresión de enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad incluyendo la EA y la EP.

Uno de los defectos genéticos principales en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA o enfermedad de Lou Gehrig) es la mutación o deficiencia en superóxido dismutasa de cobre–zinc (SOD 1), una enzima antioxidante. Las mitocondrias tanto producen como son dianas principales para especies de oxígeno reactivo. La transferencia inefectiva de electrones al oxígeno en las mitocondrias es la fuente fisiológica más significativa de radicales libres en sistemas de mamífero. Las deficiencias en antioxidantes o enzimas antioxidantes pueden dar como resultado o exacerbar la degeneración mitocondrial. Ratones transgénicos para SOD1 mutada desarrollan síntomas y patología similar a los que se dan en la ELA humana. Se ha mostrado que el desarrollo de la enfermedad en estos animales implica la destrucción oxidativa de las mitocondrias seguido de deterioro funcional de neuronas motoras y la aparición de síntomas clínicos. El músculo esquelético de pacientes con ELA tiene baja actividad del complejo I mitocondrial. En ciertas realizaciones, los compuestos activadores de la sirtuina pueden ser útiles para el tratamiento de ELA, para revertir o ralentizar la progresión de los síntomas clínicos.

La deficiencia de oxígeno da como resultado tanto la inhibición directa de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial privando las células de un aceptor de electrones terminal para la reoxidación del citocromo c en el complejo IV, e indirectamente, especialmente en el sistema nervioso, a través de excitotoxicidad post-anóxica secundaria y formación de óxido nítrico. En estados como anoxia cerebral, angina o crisis de anemia falciforme, los tejidos son relativamente hipóxicos. En tales casos, compuestos que aumentan la actividad mitocondrial proporcionan protección de los tejidos afectados frente a efectos perjudiciales de hipoxia, muerte celular retardada secundaria atenuada, y recuperación acelerada de lesión y estrés tisular hipóxico. En ciertas realizaciones, los compuestos activadores de la sirtuina pueden ser útiles para la prevención de la muerte celular retardada (apoptosis en regiones como el hipocampo o córtex que se produce aproximadamente de 2 a 5 días después de un episodio de isquemia cerebral) después de un ataque isquémico o hipóxico al cerebro.

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

Durante el envejecimiento normal, existe una disminución progresiva en la función de la cadena respiratoria mitocondrial. Comenzando aproximadamente a la edad de 40 años, existe un aumento exponencial en la acumulación de defectos de ADN mitocondrial en seres humanos, y una disminución simultánea en los elementos regulados por el núcleo de actividad respiratoria mitocondrial. Muchas lesiones mitocondriales de ADN tienen una ventaja de selección durante el cambio 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 principal de radicales libres en el organismo). Por lo tanto, las mitocondrias que funcionan normalmente acumulan daño oxidativo en los lípidos de membrana que las mitocondrias defectuosas, y están por lo tanto "marcadas" para la degradación por lisosomas. Puesto que las mitocondrias dentro de las células tienen una vida media de aproximadamente 10 días, una ventaja de selección puede dar como resultado una sustitución rápida de mitocondrias funcionales con aquéllas con actividad respiratoria disminuida, especialmente células de división lenta. El resultado neto es que una vez que se produce una mutación en un gen para una proteína mitocondrial que reduce el daño oxidativo en las mitocondrias, tales mitocondrias defectuosas poblarán rápidamente la célula, disminuyendo o eliminando sus capacidades respiratorias. La acumulación de tales células da como resultado el envejecimiento o enfermedad degenerativa a nivel del organismo. Esto concuerda con la aparición en mosaico progresiva de células con actividad de transporte de electrones defectuosa en el músculo, con células casi privadas de actividad citocromo c oxidasa (COX) intercaladas al azar entre células con actividad normal, y una mayor incidencia de células negativas para COX en biopsias de sujetos mayores. El organismo, durante el envejecimiento, o en una variedad de enfermedades mitocondriales, se enfrenta por tanto a una situación en la que deben conservarse células postmitóticas irremplazables (p. ej. neuronas, músculo esquelético y cardíaco) y mantenerse su función en un grado significativo, frente a una disminución progresiva inexorable en la función de la cadena respiratoria mitocondrial. Las neuronas con mitocondrias disfuncionales se vuelven progresivamente más sensibles a ataques como lesión excitotóxica. El fallo mitocondrial contribuye a la mayor parte de las enfermedades degenerativas (especialmente neurodegeneración) que acompañan al envejecimiento. Las enfermedades mitocondriales congénitas implican con frecuencia neurodegeneración de aparición temprana similar en el mecanismo fundamental a trastornos que se producen durante el envejecimiento de personas nacidas con mitocondrias normales. En ciertas realizaciones, los compuestos activadores de la sirtuina pueden ser útiles para el tratamiento o la atenuación del deterioro cognitivo y otras consecuencias degenerativas del envejecimiento.

El daño en el ADN mitocondrial es más extenso y persiste durante más tiempo que el daño en el ADN nuclear en las células sometidas a estrés oxidativo o agentes de quimioterapia contra el cáncer como cisplatino debido tanto a una mayor vulnerabilidad como a una reparación menos eficiente del ADN mitocondrial. A pesar de que el ADN mitocondrial puede ser más sensible al daño que el ADN nuclear, es relativamente resistente, en algunas situaciones, a mutagénesis mediante carcinógenos químicos. Esto se debe a que las mitocondrias responden a algunos tipos de daño en el ADN mitocondrial destruyendo sus genomas defectuosos en lugar de intentar repararlos. Esto da como resultado una disfunción mitocondrial global durante un periodo después de la quimioterapia citotóxica. El uso clínico de agentes quimioterápicos como cisplatino, mitomicina, y cytoxan va con frecuencia acompañado de "fatiga de quimioterapia" debilitante, periodos prolongados de debilidad e intolerancia al ejercicio que puede persistir incluso tras la recuperación de las toxicidades hematológicas y gastrointestinales de tales agentes. En ciertas realizaciones, los compuestos activadores de la sirtuina pueden ser útiles para el tratamiento y la prevención de efectos secundarios de la quimioterapia contra el cáncer relacionados con la disfunción mitocondrial.

Una función crucial del ovario es mantener la integridad del genoma mitocondrial en ovocitos, puesto que las mitocondrias que han pasado a un feto se derivan todas de las presentes en ovocitos en el momento de la concepción. Las deleciones en el ADN mitocondrial se vuelven detectables alrededor de la edad de la menopausia, y están también asociadas con ciclos menstruales anómalos. Puesto que las células no pueden detectar directamente y responder a defectos en el ADN mitocondrial, pero puede sólo detectar efectos secundarios que afectan al citoplasma, como respiración perjudicada, estado redox, o déficits en la síntesis de pirimidina, tales productos de

función mitocondrial participan como una señal para la selección de ovocitos y atresia folicular, desencadenando finalmente la menopausia cuando ya no puede garantizarse el mantenimiento de la fidelidad genómica mitocondrial y la actividad funcional. Esto es análogo a la apoptosis en las células con daño en el ADN, que experimentan un proceso activo de suicidio celular cuando ya no puede conseguirse la fidelidad genómica mediante procesos de reparación. Las mujeres con citopatías mitocondriales que afectan a las gónadas experimentan con frecuencia menopausia prematura o anomalías de ciclos primarios de presentación. La quimioterapia citotóxica contra el cáncer con frecuencia induce menopausia prematura, con un consiguiente riesgo aumentado de osteoporosis. La amenorrea inducida por quimioterapia se debe en general a un fallo de ovarios principal. La incidencia de amenorrea inducida por quimioterapia aumenta en función de la edad en mujeres premenopáusicas que reciben quimioterapia, lo que apunta a la implicación mitocondrial. Los inhibidores de la respiración mitocondrial o síntesis de proteínas inhiben la ovulación inducida por hormonas, e inhiben además la producción de hormonas esteroideas de ovario en respuesta a gonadotropinas pituitarias. Las mujeres con síndrome de Down experimentan típicamente la menopausia de forma prematura, y también están sometidas a la aparición temprana de demencia de tipo Alzheimer. Una baja actividad de citocromo oxidasa se encuentra constantemente en tejidos de pacientes con síndrome de Down y en la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía. Un soporte apropiado de la función mitocondrial o compensación de la disfunción mitocondrial por lo tanto es útil para proteger frente a la menopausia relacionada con la edad o inducida por la quimioterapia o irregularidades de la ovulación o ciclo menstrual. En ciertas realizaciones, los compuestos activadores de la sirtuína pueden ser útiles para el tratamiento y la prevención de la amenorrea, ovulación irregular, menopausia, o consecuencias secundarias de la menopausia.

En ciertas realizaciones, los compuestos moduladores de la sirtuína pueden ser útiles para el tratamiento de miopatías mitocondriales. Las miopatías mitocondriales pueden estar en el intervalo de debilidad moderada, lentamente progresiva de los músculos extraoculares a miopatías graves, o mortales infantiles y encefalomiopatías multisistema. Algunos síndromes se han definido, con algo de solapamiento entre los mismos. Los síndromes que se exponen que afectan al músculo incluyen la oftalmoplejía externa progresiva, el síndrome Kearns–Sayre (con oftalmoplejía, retinopatía pigmentaria, defectos de conducción cardíaca, ataxia cerebelar, y sordera neurosensorial), el síndrome MELAS (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica, y episodios similares a apoplejía), el síndrome MERFF (epilepsia mioclónica y fibras rojas desgastadas), debilidad de distribución limbo–cintura, y miopatía infantil (benigna o grave o mortal). Muestras de biopsia muscular teñidas con tinción tricromo de Gomori muestran fibras rojas desordenadas debido a una acumulación excesiva de mitocondrias. Defectos bioquímicos en el transporte y la utilización de sustratos, el ciclo de Krebs, fosforilación oxidativa, o la cadena respiratoria son detectables. Numerosas mutaciones puntuales de ADN mitocondrial y deleciones se han descrito, transmitidas en un patrón de herencia no mendeliano, materno. Pueden producirse mutaciones en enzimas mitocondriales codificadas por el núcleo.

En ciertas realizaciones, los compuestos activadores de la sirtuína pueden ser útiles para el tratamiento de pacientes que padecen daño tóxico en las mitocondrias, tal como, daño tóxico debido a la acumulación de calcio, excitotoxicidad, exposición a óxido nítrico, daño tóxico inducido por fármacos, o hipoxia.

Un mecanismo fundamental de lesión celular, especialmente en tejidos excitables, implica una entrada de calcio excesiva en las células, como resultado de o bien la fuga a través de la membrana plasmática o bien defectos en los mecanismos de manejo del calcio intracelular. Las mitocondrias con sitios principales de secuestro del calcio, y de forma preferente utilizan energía de la cadena respiratoria para captar el calcio en lugar de para la síntesis de ATP, lo que da como resultado una espiral descendente de fallo mitocondrial, puesto que la captación de calcio en las mitocondrias da como resultado capacidades disminuidas de transducción de energía.

La estimulación excesiva de neuronas con aminoácidos excitadores es un mecanismo común de muerte o lesión celular en el sistema nervioso central. La activación de receptores de glutamato, especialmente del subtipo denominado receptores NMDA, da como resultado disfunción mitocondrial, en parte a través del aumento del calcio intracelular durante la estimulación excitotóxica. A la inversa, déficits en respiración mitocondrial y fosforilación oxidativa sensibiliza a las células frente a estímulos excitotóxicos, dando como resultado la muerte o lesión celular durante la exposición a niveles de neurotransmisores excitotóxicos o toxinas que serían inocuas para células normales.

El óxido nítrico (aproximadamente 1 micromolar) inhibe la citocromo oxidasa (complejo IV) y de ese modo inhibe la respiración mitocondrial; además, una exposición prolongada a óxido nítrico (NO) reduce de manera irreversible la actividad del complejo I. Concentraciones fisiológicas o fisiopatológicas de NO inhiben de ese modo la biosíntesis de pirimidina. El óxido nítrico está implicado en una variedad de trastornos neurodegenerativos incluyendo enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias del sistema nervioso central, y está implicado en la mediación del daño excitotóxico y daño post–hipóxico a neuronas.

El oxígeno es el aceptor de electrones terminal en la cadena respiratoria. La deficiencia de oxígeno perjudica la actividad de la cadena de transporte de electrones, dando como resultado una síntesis de pirimidina disminuida así como una síntesis de ATP disminuida a través de fosforilación oxidativa. Las células humanas proliferan y conservan su viabilidad en condiciones prácticamente anaerobias si están provistas de uridina y piruvato (o un agente efectivo de manera similar para oxidar NADH para optimizar la producción de ATP glicolítico).

En ciertas realizaciones, los compuestos activadores de la sirtuina pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con la desregulación mitocondrial.

5 Las transcripción de ADN mitocondrial que codifica para componentes de la cadena respiratoria requiere factores nucleares. En los axones neuronales, las mitocondrias deben lanzar adelante y atrás hasta el núcleo con el fin de mantener la actividad de la cadena respiratoria. Si el transporte axonal se ve afectado por hipoxia o por fármacos como taxol que afectan a la estabilidad de los microtúbulos, las mitocondrias distantes del núcleo experimentan pérdida de actividad citocromo oxidasa. Por consiguiente, el tratamiento con un compuesto activador de la sirtuina puede ser útil para promover interacciones del núcleo-mitocondrias.

10 Las mitocondrias son la fuente principal de radicales libres y especies de oxígeno reactivo, debido a excedente de la cadena respiratoria mitocondrial, especialmente cuando defectos en uno o más componentes de la cadena respiratoria perjudica la transferencia ordenada de electrones desde productos intermedios metabólicos hasta el oxígeno hasta el oxígeno molecular. Para reducir el daño oxidativo, las células pueden compensarse expresando proteína de desacoplamiento mitocondrial (UCP), de las que se han identificado varias. UCP-2 se transcribe en respuesta al daño oxidativo, citoquinas inflamatorias, o cargas lipídicas excesivas, p. ej. hígado graso y esteatohepatitis. Las UCP recuden el excedente de especies de oxígeno reactivo de las mitocondrias descargando gradientes de protones a través de la membrana interna mitocondrial, en efecto desperdiciando energía producida por el metabolismo y haciendo que las células sean vulnerables a estrés energético como una compensación para la lesión oxidativa reducida.

#### *Rendimiento muscular*

20 En otras realizaciones, la invención proporciona métodos para mejorar el rendimiento muscular administrando una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto activador de la sirtuina. Por ejemplo, los compuestos activadores de la sirtuina pueden ser útiles para mejorar resistencia física (p. ej., la capacidad para realizar una tarea física tal como ejercicio, trabajo físico, actividades deportivas, etc.), inhibir o retardar fatigas físicas, potenciar los niveles de oxígeno en sangre, potenciar la energía en individuos sanos, potenciar la capacidad y resistencia de trabajo, reducir la fatiga muscular, reducir el estrés, potenciar la función cardíaca y cardiovascular, mejorar la capacidad sexual, aumentar los niveles de ATP en los músculos, y/o reducir el ácido láctico en la sangre. En ciertas realizaciones, los métodos implican administrar una cantidad de un compuesto activador de la sirtuina que aumentan la actividad mitocondrial, aumentan la biogénesis mitocondrial, y/o aumentan la masa mitocondrial.

30 El rendimiento deportivo hace referencia a la capacidad de los músculos del atleta para rendir cuando participe en actividades deportivas. Una mejora en el rendimiento deportivo, fuerza, velocidad y resistencia se miden mediante un aumento en la fuerza de contracción muscular, un aumento en la amplitud de contracción muscular, una disminución del tiempo de reacción muscular entre la estimulación y la contracción. Atleta hace referencia a un individuo que participa en deportes a cualquier nivel y que busca lograr un nivel mejorado de fuerza, velocidad y resistencia en su rendimiento, como por ejemplo, culturistas, ciclistas, corredores de larga distancia, corredores de corta distancia, etc. Un atleta puede ser de entrenamiento duro, es decir, realiza actividades deportivas de manera intensiva más de tres días a la semana o para competición. Un atleta puede también ser un entusiasta del ejercicio que busca mejorar la salud general y el bienestar, mejorar los niveles de energía, que trabaja durante aproximadamente 1-2 horas aproximadamente 3 veces a la semana. El desempeño mejorado en los deportes es manifestado por la capacidad de superar la fatiga muscular, la capacidad de mantener la actividad durante períodos prolongados de tiempo y tener un entrenamiento más efectivo.

45 En el campo del rendimiento muscular del atleta, es deseable crear condiciones que permiten la competición o el entrenamiento a niveles más altos de resistencia durante un periodo prolongado de tiempo. Sin embargo, un uso anaeróbico agudo e intenso de los músculos esqueléticos con frecuencia da como resultado un rendimiento atlético perjudicado, con pérdidas en la fuerza y el rendimiento de trabajo, y un aumento en la aparición de fatiga, dolor y disfunción musculares. Está ahora reconocido que incluso una única sesión de ejercicio intensivo, o en ese sentido cualquier trauma agudo para en el organismo tal como lesión muscular, resistencia o ejercicio muscular exhaustivo, o cirugía selectiva, se caracteriza por un metabolismo perturbado que afecta al rendimiento muscular en las fases tanto a corto plazo como a largo plazo. Se ven afectadas tanto la actividad metabólica/enzimática muscular como la expresión génica. Por ejemplo, la perturbación del metabolismo del nitrógeno en el músculo esquelético así como el agotamiento de fuentes de energía metabólica se produce durante una actividad muscular extensiva. Aminoácidos, incluyendo aminoácidos de cadena ramificada, se liberan de los músculos seguido por su desaminación para elevar el amoniaco en suero y la oxidación localizada como fuentes de combustible muscular, lo que aumenta la acidosis metabólica. Además, existe un deterioro en la eficiencia catalítica de acontecimientos de contracción muscular, así como una alteración de actividades enzimáticas de nitrógeno y metabolismo energético. Además, se inicia el catabolismo de proteínas cuando la tasa de síntesis de proteína se disminuye acoplado con un aumento en la degradación de proteína no contráctil. Estos procesos metabólicos van acompañados también de generación de radicales libres lo que daña además células musculares.

60 La recuperación de la fatiga durante ejercicio agudo y prolongado requiere la inversión de factores de fatiga metabólicos y no metabólicos. Factores conocidos que participan en la fatiga muscular humana, tales como lactato, amoniaco, ion hidrógeno, etc., proporcionan una explicación incompleta e insatisfactoria del proceso de

fatiga/recuperación, y es probable que participen agentes desconocidos adicionales (Baker y col., *J. Appl. Physiol.* 74:2294–2300, 1993; Bazzarre y col., *J. Am. Coll. Nutr.* 11:505–511, 1992; Dohm y col., *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 y col., *Acta Physiol. Scand.* 146:403–404, 1992; Walser y col., *Kidney Int.* 32:123–128, 1987). Varios estudios han analizado también los efectos de suplementos nutricionales y suplementos de hierbas en la potenciación del rendimiento muscular.

A parte del rendimiento muscular durante el ejercicio de resistencia, los parámetros de radicales libres y estrés oxidativo se ven afectados en los estados fisiopatológicos. Un cuerpo sustancial de datos sugiere ahora que el estrés oxidativo contribuye a desgaste o atrofia muscular en estados fisiopatológicos (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 el rendimiento como la función musculares están compensados, el papel del óxido nítrico (NO), ha estado implicado. En distrofias musculares, especialmente aquéllas que se deben a defectos en proteínas que constituyen el complejo de distrofina–glicoproteína (DGC), la enzima que sintetiza NO, óxido nítrico sintasa (NOS), se ha asociado. Estudios recientes de distrofias relacionadas con defectos de DGC sugieren que un mecanismo de lesión celular es la isquemia funcional relacionada con alteraciones en la NOS celular y la perturbación de una acción protectora normal de NO. Esta acción protectora es la prevención de isquemia local durante aumentos inducidos por contracción en vasoconstricción simpática. Rando (*Microsc Res Tech* 55(4):223–35, 2001), ha mostrado que la lesión oxidativa precede a cambios patológicos y que células musculares con defectos en la DGC tienen una sensibilidad aumentada frente a exposiciones a oxidantes. Se ha mostrado también que la peroxidación lipídica excesiva debida a radicales libres es un factor en enfermedades miopáticas tales como la enfermedad de McArdle (Russo y col., *Med Hypotheses.* 39(2):147–51, 1992). Además, la disfunción mitocondrial es una correlación bien conocida de desgaste muscular relacionado con la edad (sarcopenia) y el daño por radicales libres se ha sugerido, aunque se ha investigado escasamente, como un factor de contribución (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 miembros, o cirugía mayor torácica, abdominal y/u ortopédica. Se contempla que los métodos de la presente invención serán efectivos en el tratamiento de estados patológicos relacionados con los músculos.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona composiciones dietéticas novedosas que comprenden moduladores de la sirtuína, un método para su preparación y un método de uso de las composiciones para mejorar el rendimiento deportivo. Por consiguiente, se proporcionan composiciones terapéuticas, alimentos y bebidas que tienen acciones de mejora del rendimiento físico y/o de inhibición de las fatigas físicas para aquellas personas implicadas en ejercicios ampliamente definidos incluyendo deportes que requieren resistencia y labores que requieren una actividad muscular repetida. Tales composiciones dietéticas pueden comprender además electrolitos, cafeína, vitaminas, carbohidratos, etc.

#### *Otros usos*

Los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden usarse para el tratamiento o la prevención de infecciones virales (tales como infecciones por influenza, herpes o virus del papiloma) o como agentes antifúngicos. En ciertas realizaciones, los compuestos moduladores de la sirtuína que aumenten el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden administrarse como parte de una terapia farmacológica de combinación con otro agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades virales incluyendo, por ejemplo, aciclovir, ganciclovir y zidovudina. En otra realización, los compuestos moduladores de la sirtuína que aumenten el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden administrarse como parte de una terapia farmacológica de combinación con otro agente antimicótico, incluyendo, por ejemplo, antimicóticos tópicos tales como ciclopirox, clotrimazol, econazol, miconazol, nistatina, oxiconazol, terconazol, y tolnaftato, o antimicótico sistémico tal como fluconazol (Diflucan), itraconazol (Sporanox), ketoconazol (Nizoral), y miconazol (Monistat I.V.).

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

Los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína también pueden usarse para aumentar la vida útil, resistencia al estrés, y 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 una realización, las plantas se modifican genéticamente para producir un compuesto. En otra realización, las plantas y frutas se tratan con un compuesto antes de la cosecha y el transporte para aumentar la resistencia a daño durante el transporte. Las semillas de plantas también pueden ponerse en contacto con los compuestos que se describen en la presente memoria, p. ej., para preservarlas.

En otras realizaciones, los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden usarse para modular la vida útil en las células de levadura. Situaciones en las cuales puede ser deseable prolongar la vida útil de las células de levadura incluyen cualquier proceso en el que se use la levadura, p. ej., la preparación de cerveza, yogurt e artículos de panadería, p. ej., pan. El uso de levadura que presenta una vida útil prolongada puede dar como resultado un uso menor de levadura o haciendo que la levadura sea activa durante periodos de tiempo más largos. La levadura u otras células de mamífero que se usan para producir proteínas de manera recombinante pueden tratarse también tal como se describe en la presente memoria.

Los compuestos moduladores de la sirtuína que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden usarse también para aumentar la vida útil, la resistencia al estrés y la resistencia a la apoptosis en insectos. En la presente realización, los compuestos podrían aplicarse a insectos útiles, p. ej., abejas y otros insectos que estén implicados en la polinización de plantas. En una realización específica, un compuesto podría aplicarse a abejas implicadas en la producción de miel. De forma general, los métodos que se describen en la presente memoria pueden aplicarse a cualquier organismo, p. ej., eucariota, que pueda tener importancia comercial. Por ejemplo, pueden aplicarse a peces (acuicultura) y aves (por ejemplo, pollos y aves de corral).

Dosis más altas de compuestos moduladores de la sirtuína que aumenten el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden usarse también como un pesticida interfiriendo con la regulación de genes silenciados y la regulación de la apoptosis durante el desarrollo. En la presente realización, un compuesto puede aplicarse a las plantas usando un método conocido en la técnica que garantiza que el compuesto tenga biodisponibilidad para las larvas de insectos, y no para las plantas.

Por lo menos, en vista de la conexión entre la reducción y la longevidad (Longo y Finch, Science, 2002), los compuestos moduladores de la sirtuína que aumenten el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína pueden ser aplicados para afectar a la reproducción de organismos como insectos, animales y microorganismos.

#### 4. Ensayos

Aún otros métodos que se contemplan en la presente memoria incluyen métodos de selección para identificar compuestos o agentes que modulan sirtuínas. 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 poner en contacto) una sirtuína con un agente de prueba en condiciones en las que una sirtuína puede modularse por un agente conocido para modular la sirtuína, y monitorizar o determinar el nivel de modulación de la sirtuína en presencia del agente de prueba con respecto a la ausencia del agente de prueba. El nivel de modulación de una sirtuína puede determinarse determinando su capacidad para desacetilar un sustrato. Sustratos a modo de ejemplo son péptidos acetilados que pueden obtenerse de BIOMOL (Plymouth Meeting, PA). Los sustratos preferidos incluyen péptidos de p53, tal como aquéllos que comprenden un K382 acetilado. Un sustrato preferido en particular es el 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 sirtuína puede ser SIRT1, Sir2, SIRT3, o a una parte de las mismas. Por ejemplo, SIRT1 recombinante puede obtenerse de BIOMOL. La reacción puede realizarse durante aproximadamente 30 minutos y detenerse, p. ej., con nicotinamida. El ensayo de actividad fluorescente de HDAC/ kit de descubrimiento de fármacos (AK-500, BIOMOL Research Laboratories) puede usarse para determinar el nivel de acetilación. Ensayos similares se describen en Bitterman y col. (2002) J. Biol. Chem. 277:45099. El nivel de modulación de la sirtuína en un ensayo puede compararse con el nivel de modulación de la sirtuína en presencia de uno o más (por separado o simultáneamente) compuestos que se describen en la presente memoria, lo que puede servir como controles positivos o negativos. Las sirtuínas para su uso en los ensayos pueden ser proteínas de longitud completa o partes de las mismas. Puesto que se ha mostrado en la presente memoria que activar compuestos parece interactuar con el extremo N-terminal de SIRT1, proteínas para su uso en los ensayos incluyen partes N-terminales de sirtuínas, p. ej., aproximadamente aminoácidos 1-176 o 1-255 de SIRT1; aproximadamente aminoácidos 1-174 o 1-252 de Sir2.

En una realización, un ensayo de selección comprende (i) poner en contacto una sirtuína con un agente de prueba y un sustrato acetilado en condiciones apropiadas para que la sirtuína desacetile el sustrato en ausencia del agente de prueba; y (ii) determinar el nivel de acetilación del sustrato, en donde un nivel inferior de acetilación del sustrato en presencia del agente de prueba con respecto a la ausencia del agente de prueba indica que el agente de prueba estimula la desacetilación por la sirtuína, mientras que un nivel mayor acetilación del sustrato en presencia del agente de prueba con respecto a la ausencia del agente de prueba indica que el agente de prueba inhibe la desacetilación por la sirtuína.

Métodos para identificar un agente que modula, p. ej., estimula o inhibe, sirtuínas *in vivo* puede comprender (i) poner en contacto una célula con un agente de prueba y un sustrato que puede entrar en una célula en presencia de un inhibidor de HDAC de clase I y clase II en condiciones apropiadas para que la sirtuína desacetile el sustrato en ausencia del agente de prueba; y (ii) determinar el nivel de acetilación del sustrato, en donde un nivel inferior de acetilación del sustrato en presencia del agente de prueba con respecto a la ausencia del agente de prueba indica que el agente de prueba estimula la desacetilación por la sirtuína, mientras que un nivel mayor de acetilación del sustrato en presencia del agente de prueba con respecto a la ausencia del agente de prueba indica que el agente de

prueba inhibe la desacetilación por la sirtuína. Un sustrato preferido es un péptido acetilado, que es también preferiblemente fluorogénico, tal como se describe adicionalmente en la presente memoria. El método puede comprender adicionalmente lisar las células para determinar el nivel de acetilación del sustrato. Los sustratos pueden añadirse a células a una concentración que oscila desde aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  hasta aproximadamente 10 mM, preferiblemente desde aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  hasta 1 mM, incluso más preferiblemente desde aproximadamente 100  $\mu\text{M}$  hasta 1 mM, 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 clase II es tricostatina A (TSA), que puede usarse a concentraciones que oscilan desde aproximadamente 0,01 a 100  $\mu\text{M}$ , preferiblemente desde aproximadamente 0,1 hasta 10  $\mu\text{M}$ , tal como 1  $\mu\text{M}$ . La incubación de células con el compuesto de prueba y el sustrato puede realizarse durante aproximadamente 10 minutos a 5 horas, preferiblemente durante aproximadamente 1–3 horas. Puesto que TSA inhibe todos los HDAC de clase I y clase II, y que ciertos sustratos, p. ej., Fluor de Lys, es un mal sustrato para SIRT2 e incluso menos un sustrato para SIRT3–7, puede usarse un ensayo de este tipo para identificar moduladores de SIRT1 *in vivo*.

#### 5. Composiciones farmacéuticas

Los compuestos moduladores de la sirtuína que se describen en la presente memoria pueden formularse en una forma convencional usando uno o más portadores o excipientes fisiológicamente aceptables. Por ejemplo, los compuestos moduladores de la sirtuína y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables pueden formularse para administrarse, por ejemplo, por inyección (p. ej. SubQ, IM, IP), inhalación o insuflación (sea a través de la boca o la nariz) o administración oral, bucal, sublingual, transdérmica, nasal, parenteral o rectal. En una realización, un compuesto modulador de la sirtuína puede administrarse de forma local, en el sitio en donde las células diana estén presentes, es decir, en un tejido órgano o fluido específico, (por ejemplo, sangre, líquido cefalorraquídeo, etc.)

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

Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden adoptar la forma de, p. ej., comprimidos, pastillas para chupar o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes de unión (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (p. ej., lactosa, celulosa microcristalina, o hidrógenofosfato de calcio); lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco o sílice), disgregantes (p. ej., almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (p. ej., laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden estar recubiertos mediante métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden adoptar la forma de, por ejemplo, disoluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de suspensión (p. ej., jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (p. ej., lecitina o goma arábrica); vehículos no acuosos (p. ej., aceite ationdo, ésteres aceitosos, alcohol etílico, o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (p. ej. metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, aromatizantes, colorantes y agentes edulcorantes según sea apropiado. Las preparaciones para la administración oral pueden formularse de forma apropiada para proporcionar una liberación controlada del compuesto activo.

Para la administración por inhalación (p. ej. administración pulmonar), los compuestos moduladores de la sirtuína pueden administrarse convenientemente en forma de una presentación de pulverizador en aerosol de paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente apropiado, p. ej. diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas apropiado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad dosificada. Las cápsulas y cartuchos de p. ej., gelatina, para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Los compuestos moduladores de la sirtuína pueden formularse para la administración parenteral por inyección, p. ej., mediante inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, p. ej., en ampollas o envases de múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos acuosos o aceitosos, y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Como alternativa, el principio activo puede encontrarse en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, p. ej. agua estéril libre de pirógenos, antes del uso.

Los compuestos moduladores de la sirtuína también pueden formularse en composiciones rectales tales como



supositorios o enemas de retención, p. ej., que contienen bases para supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones que se describen previamente, los compuestos moduladores de la sirtuina pueden formularse también como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implante (por ejemplo, por vía subcutánea o por vía intramuscular) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos moduladores de la sirtuina pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos apropiados (por ejemplo, como una emulsión con un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados parcialmente solubles, por ejemplo, como una sal parcialmente soluble. La fórmula de liberación controlada también incluye parches.

En ciertas realizaciones, los compuestos que se describen en la presente memoria pueden formularse para su suministro al sistema nervioso central (SNC) (revisado en Begley, *Pharmacology & Therapeutics* 104: 29–45 (2004)). Las formas convencionales para la administración de fármacos al SNC incluyen: estrategias neuroquirúrgicas (p. ej. intracerebral o infusión intracerebroventricular); manipulación molecular del agente (p. ej., producción de una proteína de fusión quimérica que comprende un péptido de transporte que tiene afinidad por una molécula de superficie celular endotelial en combinación con un agente que es por sí mismo capaz de cruzar la BBB) en un intento de explotar una de las rutas de transporte endógenas de BBB; las estrategias farmacológicas diseñadas para aumentar la solubilidad de un agente (p. ej., la conjugación de agentes solubles en agua con portadores lípidos o de colesterol); y la interrupción transitoria de la integridad de BBB por alteración hiperosmótica (dando como resultado la infusión de una disolución de manitol en la arteria carótida o el uso de un agente biológicamente activo como un péptido de angiotensina).

Una posibilidad para lograr una cinética de liberación sostenida es incrustar o encapsular el compuesto activo con 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 diámetro pequeño.

Las nanopartículas son partículas con un diámetro de aproximadamente 5 nm hasta to aproximadamente 1.000 nm. La expresión “nanopartículas” como se usa a continuación en la presente memoria hace referencia a partículas formadas por una matriz polimérica en la que el compuesto activo está dispersado, también conocida como “nanoesferas”, y también hace referencia a nanopartículas que están compuestas por un núcleo que contiene el compuesto activo que está rodeado por una membrana polimérica, también conocidas como “nanocápsulas”. En ciertas realizaciones, se prefieren nanopartículas que tengan un diámetro de desde aproximadamente 50 nm hasta aproximadamente 500 nm, en particular desde aproximadamente 100 nm hasta aproximadamente 200 nm.

Las nanopartículas pueden prepararse por polimerización in situ de monómeros dispersados o usando polímeros preformados. Puesto que los polímeros preparados in situ con frecuencia no son biodegradables y/o contienen subproductos graves toxicológicos, se prefieren las nanopartículas de polímeros preformados. Las nanopartículas de polímeros preformados pueden prepararse mediante diferentes técnicas, p. ej., mediante evaporación en emulsión, desplazamiento del disolvente, precipitación con sales, molienda mecánica, microprecipitación, y mediante difusión con emulsificación.

Con los métodos que se describen anteriormente, las nanopartículas pueden formarse con varios tipos de polímeros. Para su uso en el método de la presente invención, se prefieren las nanopartículas preparadas a partir de polímeros biocompatibles. La expresión “biocompatible” hace referencia a un material que tras su introducción en un entorno biológico no tiene efectos graves para el entorno biológico. De los polímeros biocompatibles se prefieren especialmente aquellos polímeros que son también biodegradables. La expresión “biodegradable” hace referencia a un material que tras la introducción en un entorno biológico se degrada enzimática o químicamente en moléculas más pequeñas, que pueden eliminarse posteriormente. Los ejemplos son poliésteres de ácidos hidroxicarboxílicos tales como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), policaprolactona (PCL), copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico (PLGA), copolímeros de ácido láctico y caprolactona, poliépsilon caprolactona, ácido polihidroxibutírico y poli(orto)ésteres, poliuretanos, polianhídridos, poliacetales, polidihidropiranos, polialcanoacrilatos, polímeros naturales tal como alginato y otros polisacáridos incluyendo dextrano y celulosa, colágeno y albúmina.

Los modificadores de superficie adecuados pueden seleccionarse preferiblemente de excipientes farmacéuticos orgánicos e inorgánicos conocidos. Tales excipientes incluyen diversos polímeros, oligómeros de bajo peso molecular, productos naturales y tensioactivos. Los modificadores de superficie preferidos tensioactivos no iónicos e iónicos. Ejemplos representativos de modificadores de superficie incluyen gelatina, caseína, lecitina (fosfátidos), goma arábiga, colesterol, tragacanto, ácido esteárico, cloruro de benzalconio, estearato de calcio, monoestearato de glicerol, alcohol citoestearílico, cera emulsionante de cetomacrogol, ésteres de sorbitano, polioxietileno alquil éteres, p. ej., éteres de macrogol tales como cetomacrogol 1.000, derivados de aceite de ricino y polioxietileno, ésteres de ácido graso y polioxietileno sorbitano, p. ej., los Tweens<sup>TM</sup> comercialmente disponibles, polietilenglicoles, estearatos de polioxietileno, dióxido de silicio coloidal, fosfatos, dodecilsulfato de sodio, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa ftalato, celulosa no cristalina, silicato de aluminio y magnesio, trietanolamina, poli(alcohol vinílico), y

polivinilpirrolidona (PVP). La mayoría de estos modificadores de superficie son excipientes farmacéuticos conocidos y se describen en detalle en *The Handbook of Pharmaceutical Excipients*, publicado conjuntamente por la American Pharmaceutical Association y The Pharmaceutical Society of Great Britain, The Pharmaceutical Press, 1986.

5 Una descripción adicional sobre la preparación de nanopartículas puede encontrarse, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos n.º 6.264.922, los contenidos de la cual se incorporan en la presente memoria por referencia.

10 Los liposomas son un sistema de suministro de fármacos adicional que es fácilmente inyectable. Por consiguiente, en el método de la invención los compuestos activos también pueden administrarse en forma de un sistema de suministro de liposomas. Los liposomas son bien conocidos por un experto en la técnica. Los liposomas pueden formarse a partir de una variedad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas. Los liposomas que pueden usarse para el método de invención abarcan todo tipo de liposomas incluyendo, pero sin limitarse a, vesículas pequeñas unilamelares, vesículas grandes unilamelares y vesículas multilamelares.

15 Los liposomas se usan para una variedad de fines terapéuticos, y en particular, para portar agentes terapéuticos hasta células diana. De forma ventajosa, las formulaciones de fármacos en liposoma ofrecen el potencial de propiedades de suministro de fármacos mejoradas, que incluyen, por ejemplo, liberación de fármacos controlada. Un tiempo de circulación prolongado se necesita con frecuencia para que los liposomas alcancen una región, célula o sitio diana. En particular, esto es necesario cuando la región, célula o sitio no está ubicado cerca del sitio de administración. Por ejemplo, cuando los liposomas se administran de manera sistémica, es deseable recubrir los liposomas con un agente hidrófilo, por ejemplo, un recubrimiento de cadenas de polímero hidrófilo tales como polietilenglicol (PEG) para prolongar la vida en circulación en la sangre de los liposomas. Tales liposomas modificados en superficie se denominan comúnmente liposomas “de larga circulación” o “estabilizados estéricamente”.

20 Una modificación superficial en un liposoma es la unión de cadenas de PEG, que tiene típicamente un peso molecular de desde aproximadamente 1.000 daltons (Da) hasta aproximadamente 5000 Da, y hasta aproximadamente 5 por ciento en moles (%) de los lípidos que constituyen los liposomas (véase, por ejemplo, *Stealth Liposomas*, CRC Press, Lasic, D. y Martin, F., eds., Boca Raton, Fla., (1995)), y las referencias citadas en el mismo. La farmacocinética presentada por tales liposomas se caracterizan por una reducción independiente de la dosis en la captación de liposomas por el hígado y el bazo a través del sistema fagocítico mononuclear (MPS), y un tiempo de circulación en la sangre significativamente prolongado, en comparación con liposomas no modificados en superficie, que tienden a eliminarse rápidamente de la sangre y a acumularse en el hígado y el bazo.

30 En ciertas realizaciones, el complejo está protegido para aumentar la semivida circulatoria del complejo o protegido para aumentar la resistencia de ácido nucleico a la degradación, por ejemplo degradación por nucleasas.

35 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “protección”, y sus derivados tales como “protegido”, hace referencia a la capacidad de “restos protectores” para reducir la interacción no específica de los complejos que se describen en la presente memoria con complemento sérico o con otras especies presentes en el suero *in vitro* o *in vivo*. Los restos protectores pueden disminuir la interacción del complejo con o la unión a estas especies a través de uno o más mecanismos, incluyendo, por ejemplo, interacciones estéricas no específicas o electrónicas no específicas. Los ejemplos de tales interacciones incluyen interacciones electrostáticas no específicas, interacciones de carga, interacciones de Van der Waals, impedimento estérico y similares. Para que un resto actúe como un resto protector, el mecanismo o mecanismos mediante los que puede reducir la interacción con, asociación con o unión al complemento del suero u otra especie no tiene que identificarse. Puede determinarse si un resto puede actuar como un resto protector determinando si, o en qué medida, un complejo se une a especies en suero.

45 Debe observarse que los “restos protectores” pueden ser multifuncionales. Por ejemplo, un resto protector puede funcionar también como, por ejemplo, un factor de selección como diana. Un resto protector puede denominarse también como multifuncional con respecto a el/los mecanismo(s) mediante el/los que protege al complejo. Aunque no se desea limitarse por el mecanismo o la teoría propuestas, ejemplos de un resto protector multifuncional de este tipo son polímeros sintéticos perturbadores de la membrana endosómica sensibles a pH, tales como PPAA o PEAA. Ciertos poli(ácidos alquilacrílicos) han mostrado perturbar las membranas endosómicas mientras que dejan intacta la membrana superficial de la célula externa (Stayton y col. (2000) *J. Controll. Release* 65:203–220; Murthy y col. (1999) *J. Controll. Release* 61:137–143; WO 99/34831), aumentando de ese modo la biodisponibilidad celular y funcionando como un factor de selección como diana. Sin embargo, PPAA reduce la unión del complemento del suero a complejos en los que se incorpora, funcionando así como un resto protector.

50 Otro modo de producción de una formulación, de forma particular una disolución, de un modulador de la sirtuína tal como un resveratrol o un derivado del mismo, es a través del uso de ciclodextrina. Por ciclodextrina quiere decirse  $\alpha$ -,  $\beta$ -, o  $\gamma$ -ciclodextrina. Las ciclodextrinas se describen en detalle en Pitha y col., patente de los Estados Unidos n.º 4.727.064 que se incorpora en la presente memoria por referencia. Las ciclodextrinas son oligómeros cíclicos de glucosa; estos compuestos forman complejos de inclusión con cualquier fármaco cuya molécula pueda caber en las cavidades que buscan 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; la  $\gamma$ -ciclodextrina contiene ocho unidades de glucopiranosas. Se cree que la molécula forma un cono truncado que tiene una abertura del 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, sin embargo, la composición de acuerdo con la invención comprenderá sólo una de las  $\alpha$ -,  $\beta$ - o  $\gamma$ -ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas más preferidas en las composiciones de acuerdo con la invención son compuestos de ciclodextrina amorfa. Por ciclodextrina amorfa quiere decirse mezclas no cristalinas de ciclodextrinas en donde la mezcla se prepara a partir de  $\alpha$ -,  $\beta$ - o  $\gamma$ -ciclodextrina. En general, la ciclodextrina amorfa se prepara mediante alquilación no selectiva de la especie de ciclodextrina deseada. Los agentes de alquilación adecuados para este fin incluyen pero no se limitan a óxido de propileno, glicidol, yodoacetamida, cloroacetato, y 2-dietilaminoetilcloruro. Las reacciones se llevan a cabo para producir mezclas que contienen una pluralidad de componentes impidiendo de ese modo la cristalización de la ciclodextrina. Pueden prepararse diversas ciclodextrinas alquiladas y por supuesto variarán, dependiendo de la especie de ciclodextrina de partida y del agente de alquilación usado. Entre las ciclodextrinas amorfas adecuadas para composiciones de acuerdo con la invención son derivados de hidroxipropilo, hidroxietilo, glucosilo, maltosilo y 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 proporciona en Marier y col., J. Pharmacol. Exp. Therap. 302:369–373 (2002), los contenidos de la cual se incorporan en la presente memoria por referencia, donde se preparó una disolución de 6 mg/ml de resveratrol usando solución salina al 0,9 % que contiene un 20 % de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.

Tal como se mencionó anteriormente, las composiciones de materia de la invención comprenden una preparación acuosa de ciclodextrina amorfa preferiblemente sustituida y uno o más moduladores de la sirtuína. Las cantidades relativas de moduladores de la sirtuína y ciclodextrina variarán dependiendo de la cantidad relativa de cada uno de los moduladores de la sirtuína y del efecto de la ciclodextrina sobre el compuesto. En general, la relación del peso del compuesto de los moduladores de la sirtuína con respecto al peso del compuesto de ciclodextrina estará en un intervalo entre 1:1 y 1:100. Una relación de peso con respecto 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 de moduladores de la sirtuína con respecto a ciclodextrina se creen que son las más efectivas para una disponibilidad en circulación aumentada del modulador de la sirtuína.

De manera importante, si la disolución acuosa comprende los moduladores de la sirtuína y una ciclodextrina va a administrarse por vía parenteral, especialmente a través de la vía intravenosa, una ciclodextrina estará sustancialmente libre de contaminantes pirógenos. Varias formas de ciclodextrina, tal como formas de ciclodextrina amorfa, pueden adquirirse de varios proveedores incluyendo Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, Mo., EE.UU.). Un método para la producción de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina se da a conocer en Pitha y col., patente de los Estados Unidos n.º 4,727,064 que se incorpora en la presente memoria por referencia.

Una descripción adicional del uso de ciclodextrina para solubilizar compuestos puede encontrarse en el documento US 2005/0026849, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria por referencia.

Las formas farmacéuticas de rápida disgregación o disolución son útiles para la rápida absorción, en particular absorción bucal y sublingual, de agentes farmacéuticamente activos. Las formas farmacéuticas de fusión rápida son beneficiosas para pacientes, tales como pacientes de edad avanzada y pediátricos, que tienen dificultad para tragar las formas farmacéuticas sólidas típicas, tales como comprimidos oblongos y comprimidos. Adicionalmente, las formas farmacéuticas de rápida fusión evitan las desventajas asociadas con, por ejemplo, las formas farmacéuticas masticables, en donde la duración del tiempo que un agente activo permanece en la boca de un paciente desempeña un papel importante en la determinación de la cantidad de enmascaramiento del sabor y la medida en la que un paciente puede oponerse a la sensación de arena en la garganta del agente activo.

Para superar tales problemas, los fabricantes han desarrollado varias formulaciones orales de dosis sólida de fusión rápida. Éstas se encuentran disponibles de fabricantes incluyendo Cima Labs, Fuisz Technologies Ltd., Prographarm, R. P. Scherer, Yamanouchi-Shaklee, y McNeil-PPC, Inc. Todos estos fabricantes comercializan diferentes tipos de formas farmacéuticas orales sólidas de rápida disolución. Véanse p. ej., las patentes y publicaciones de Cima Labs tales como las patentes de los Estados Unidos n.º 5.607.697, 5.503.846, 5.223.264, 5.401.513, 5.219.574, y 5.178.878, documentos WO 98/46215, WO 98/14179; patentes concedidas a Fuisz Technologies, ahora parte de BioVail, tal como patentes de los Estados Unidos n.º 5.871.781, 5.869.098, 5.866.163, 5.851.553, 5.622.719, 5.567.439, y 5.587.172; patente de los Estados Unidos n.º 5.464.632 concedidas a Prographarm; patentes concedidas a R. P. Scherer tales como las patentes de los Estados Unidos n.º 4.642.903, 5.188.825, 5.631.023 y 5.827.541; patentes concedidas a Yamanouchi-Shaklee tales como las patentes de los Estados Unidos n.º 5.576.014 y 5.446.464; patentes concedidas a Janssen tales como las patentes de los Estados Unidos n.º 5.807.576, 5.635.210, 5.595.761, 5.587.180 y 5.776.491; patentes de los Estados Unidos n.º 5.639.475 y 5.709.886 concedidas a Eurand America, Inc.; patentes de los Estados Unidos n.º 5.807.578 y 5.807.577 concedidas a L.A.B. Pharmaceutical Research; patentes concedidas a Schering Corporation tales como las patentes de los

Estados Unidos n.º 5.112.616 y 5.073.374; patente de los Estados Unidos n.º 4.616.047 concedida a Laboratoire L. LaFon; patente de los Estados Unidos n.º 5.501.861 concedida a Takeda Chemicals Inc., Ltd.; y patente de los Estados Unidos n.º 6.316.029 concedida a Elan.

- 5 En un ejemplo de preparación de comprimido de rápida fusión, gránulos para comprimidos de rápida fusión preparados mediante procesos o bien de secado por pulverización o bien con precompactación se mezclan con excipientes y se comprimen para dar comprimidos usando maquinaria de preparación de comprimidos convencional. Los gránulos pueden combinarse con una variedad de vehículos incluyendo sacáridos de baja densidad, de alta moldeabilidad, combinaciones de poliol, y luego comprimidos directamente en un comprimido que presenta una disolución mejorada y perfil de disgregación.
- 10 Los comprimidos de acuerdo con la presente invención tienen típicamente una dureza de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 unidades Strong-Cobb (scu). Los comprimidos dentro de este intervalo de dureza se disgregan o disuelven rápidamente cuando se mastican. Adicionalmente, los comprimidos se disgregan rápidamente en agua. En promedio, un comprimido típico de 1,1 a 1,5 gramos se disgrega en 1–3 minutos sin agitación. Esta disgregación rápida facilita el suministro del material activo.
- 15 Los gránulos que se usan para preparar los comprimidos pueden ser, por ejemplo, mezclas de sales de metales alcalinotérreos de baja densidad o carbohidratos. Por ejemplo, una mezcla de sales de metales alcalinotérreos incluye una combinación de carbonato de calcio e hidróxido de magnesio. De manera similar, un comprimido de rápida fusión puede prepararse de acuerdo con los métodos de la presente invención que incorpora el uso de A) carbonato de calcio extra ligero secado por pulverización/ maltodextrina, B) hidróxido de magnesio y C) una combinación de poliol eutéctica incluyendo Sorbitol Instant, xilitol y manitol. Estos materiales se han combinado para producir un comprimido de baja densidad que disuelve muy fácilmente y promueve la disgregación rápida del principio activo. Adicionalmente, los gránulos precompactados y secados por pulverización pueden combinarse en el mismo comprimido.

25 Para una preparación de comprimido de rápida fusión, un modulador de la sirtuina útil en la presente invención puede encontrarse en una forma tal como sólida, particulada, granular, cristalina, aceitosa o disolución. El modulador de la sirtuina para su uso en la presente invención puede ser un producto secado por pulverización o un adsorbato que se ha precompactado para dar una forma granular más dura que reduce el sabor del medicamento. Un principio activo farmacéutico para su uso en la presente invención puede secarse por pulverización con un vehículo que impide que el principio activo se extraiga fácilmente del comprimido cuando se mastica.

30 Además de añadirse directamente a los comprimidos de la presente invención, el propio fármaco de medicamento puede procesarse mediante el proceso de precompactación para conseguir un aumento de densidad antes de incorporarse en la formulación.

35 El proceso de precompactación que se usa en la presente invención puede usarse para suministrar materiales farmacéuticos poco solubles con el fin de mejorar la liberación de tales materiales farmacéuticos con respecto a las formas farmacéuticas tradicionales. Esto podría permitir el uso de niveles de dosificación más bajos para suministrar niveles biodisponibles equivalentes de fármaco y de ese modo menores niveles de toxicidad tanto de fármaco actualmente comercializado como de nuevas entidades químicas. Los materiales farmacéuticos poco solubles pueden usarse en forma de nanopartículas, que son partículas de tamaño nanométrico.

40 Además del principio activo y los gránulos preparados a partir de sales de metales alcalinotérreos de baja densidad y/o carbohidratos solubles en agua, los comprimidos de rápida fusión pueden formularse usando vehículos o excipientes convencionales y técnicas farmacéuticas bien establecidas. Los vehículos o excipientes convencionales incluyen, pero no se limitan a, diluyentes, aglutinantes, adhesivos (es decir, derivados de celulosa y derivados acrílicos), lubricantes (es decir, estearato de magnesio o calcio, aceites vegetales, polietilenglicoles, talco, laurilsulfato de sodio, monoestearato de polioxitileno), disgregantes, colorantes, aromas, conservantes, edulcorantes y materiales mixtos tales como tampones y adsorbentes.

45 Una descripción adicional de la preparación de comprimidos de fusión rápida puede encontrarse, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos n.º 5.939.091, los contenidos de la cual se incorporan en la presente memoria por referencia.

50 Las composiciones farmacéuticas (incluyendo preparaciones cosméticas) pueden comprender desde aproximadamente el 0,00001 hasta el 100 % tal como desde el 0,001 hasta el 10 % o desde el 0,1 % hasta el 5 % en peso de uno o más compuestos moduladores de la sirtuina que se describen en la presente memoria.

55 En una realización, un compuesto modulador de la sirtuina que se describe en la presente memoria, se incorpora en una formulación tópica que contiene un vehículo tópico que es en general adecuado para la administración tópica de fármacos y que comprende cualquier material de este tipo conocido en la técnica. El vehículo tópico puede seleccionarse con el fin de proporcionar la composición en la forma deseada, p. ej., como una pomada, loción, crema, microemulsión, gel, aceite, disolución o similares, y puede componerse de un material o bien que se producen de manera natural o bien de origen sintético. Es preferible que el vehículo seleccionado no afecte de manera adversa al agente activo o a otros componentes de la formulación tópica. Los ejemplos de vehículos tópicos

adecuados para su uso en la presente memoria incluyen agua, alcoholes y otros disolventes orgánicos no tóxicos, glicerina, aceite mineral, silicona, vaselina, lanolina, ácidos grasos, aceites vegetales, parabenos, ceras y similares.

Las formulaciones pueden ser pomadas, lociones, cremas, microemulsiones y geles incoloros, inodoros.

5 Los compuestos moduladores de la sirtuína pueden incorporarse en pomadas, que en general son preparaciones semisólidas que se basan típicamente en petrolato u otros derivados de petróleo. La base de pomada específica que va a usarse, como se apreciará por los expertos en la técnica, es una base que proporcionará un suministro de fármaco óptimo, y, preferiblemente, proporcionará otras características deseadas también, p. ej., emolencia o similares. Tal como con otros portadores o vehículos, una base de pomada deberá ser inerte, estable, no irritantes y no sensibilizadores. Tal como se explica en Remington's (citado anteriormente) las bases de pomada pueden agruparse en cuatro clases: bases oleaginosas; bases emulsionables; bases de emulsión; y bases solubles en agua. 10 Las bases de pomada oleaginosas incluyen, por ejemplo, aceites vegetales, grasas obtenidas de animales, e hidrocarburos semisólidos obtenidos del petróleo. Las bases de pomada emulsionables, también conocidas como bases de pomada absorbentes, contienen poco o nada de agua e incluyen, por ejemplo, sulfato de hidroxistearina, lanolina anhidra y petrolato hidrófilo. Las bases de pomada en emulsión son emulsiones de agua en aceite (W/O) o emulsiones de aceite en agua (O/W), e incluyen, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerilo, lanolina y ácido esteárico. Las bases de pomada solubles en agua a modo de ejemplo se preparan a partir de polietilenglicoles

(PEG) de diverso peso molecular; nuevamente, puede hacerse referencia a la obra de Remington, citado anteriormente, para más información.

20 Los compuestos moduladores de la sirtuína pueden incorporarse en lociones, que en general son preparaciones para aplicarse en la superficie de la piel sin fricción, y son típicamente preparaciones líquidas o semilíquidas en las que las partículas sólidas, incluyendo el agente activo, están presentes en una base de agua o de alcohol. Las lociones son habitualmente suspensiones de sólidos, y pueden comprender una emulsión aceitosa líquida del tipo aceite en agua. Las lociones son formulaciones preferidas para el tratamiento de grandes áreas corporales, debido a la facilidad de aplicación de una composición más fluida. Generalmente resulta necesario que la materia insoluble en una loción se encuentre finamente dividida. Las lociones típicamente contienen agentes de suspensión para producir mejores dispersiones, así como compuestos útiles para localizar y mantener el agente activo en contacto con la piel, p. ej. metilcelulosa, o carboximetilcelulosa sódica, o similares. Una formulación de loción a modo de ejemplo para su uso conjuntamente con el presente método contiene propilenglicol mezclado con un petrolato hidrófilo, tal como el que puede obtenerse con la marca comercial Aquaphor<sup>RTM</sup>, de Beiersdorf, Inc. (Norwalk, Conn.).

30 Los compuestos moduladores de la sirtuína pueden incorporarse en cremas, que en general con emulsiones viscosas líquidas o semisólidas, o bien de aceite en agua o de agua en aceite. Las bases de crema son lavables en agua, y contienen una fase aceite, un emulsionante y una fase acuosa. La fase de aceite generalmente comprende petrolato y un alcohol graso, tal como alcohol cetílico o estearílico; la fase acuosa habitualmente, aunque no necesariamente, presenta un volumen superior al de la fase aceite, y contiene generalmente un humectante. El emulsionante en una formulación de crema, tal como se explica en la obra de Remington, citado anteriormente, generalmente es un tensioactivo no iónico, aniónico, catiónico o anfotérico.

40 Los compuestos moduladores de la sirtuína pueden incorporarse en microemulsiones, que generalmente son dispersiones termodinámicamente estables e isotrópicamente transparentes de dos líquidos inmiscibles, tales como aceite y agua, estabilizadas por una película interfacial de moléculas tensioactivas (Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, New York: Marcel Dekker, 1992, volumen 9). Para la preparación de microemulsiones, resultan necesarios el tensioactivo (emulsionante), el cotensioactivo (coemulsionante), una fase de aceite y una fase de agua. Los tensioactivos adecuados incluyen cualquier tensioactivo que resulte útil en la preparación de emulsiones, p. ej. emulsionantes que se usan típicamente en la preparación de cremas. El cotensioactivo (o "coemulsionante") generalmente se selecciona del grupo de derivados del poliglicerol, los derivados de glicerol y alcoholes grasos. Las combinaciones preferidas de emulsionante/coemulsionante generalmente, aunque no necesariamente, se seleccionan de entre el grupo que consiste en: monoestearato de glicerilo y estearato de polioxietileno; polietilenglicol y palmitoestearato de etilenglicol; triglicéridos caprílicos y cápricos y oleil macroglicéridos. La fase de agua incluye no sólo agua sino además, típicamente, tampones, glucosa, propilenglicol, polietilenglicoles, preferentemente polietilenglicoles de bajo peso molecular (por ejemplo PEG 300 y PEG 400) y/o glicerol, y similares, mientras que la fase aceite generalmente comprende, por ejemplo, ésteres de ácido graso, aceites vegetales modificados, aceites de silicona, mezclas de monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos, monoésteres y diésteres de PEG (p. ej. oleil macroglicéridos), etc.

55 Los compuestos moduladores de la sirtuína pueden incorporarse en formulaciones de gel, que generalmente son sistemas semisólidos que consisten en o bien suspensiones de partículas inorgánicas pequeñas (sistemas de dos fases) o bien grandes moléculas orgánicas distribuidas de manera sustancialmente uniforme en un líquido portador (geles de una sola fase). Los geles de una sola fase pueden prepararse, por ejemplo, combinando el agente activo, un líquido portador y un agente gelificante adecuado, tal como tragacanto (al 2 – 5%), alginato sódico (al 2 – 10%), gelatina (al 2 – 15%), metilcelulosa (al 3 – 5%), carboximetilcelulosa sódica (al 2 – 5%), carbómero (al 0,3 – 5%) o poli(alcohol vinílico) (al 10 – 20%), y mezclando hasta producir un producto semisólido característico. Otros agentes gelificantes adecuados se incluyen metilhidroxilcelulosa, polioxietileno-polioxipropileno, hidroxietilcelulosa y gelatina.

60

Aunque los geles emplean comúnmente un líquido portador acuoso, pueden asimismo usarse alcoholes y aceites como líquido portador.

5 Pueden incluirse diversos aditivos, conocidos por los expertos en la materia, en las formulaciones, p. ej. formulaciones tópicas. Los ejemplos de aditivos incluyen, pero sin limitarse a ellos, solubilizantes, intensificadores de la permeación en la piel, opacificadores, conservantes (p. ej. antioxidantes), agentes gelificantes, agentes tamponadores, tensioactivos (particularmente tensioactivos no iónicos y anfotéricos), emulsionantes, emolientes, agentes espesantes, estabilizantes, humectantes, colorantes, fragancia, y similares. La inclusión de solubilizantes y/o de intensificadores de permeación en la piel resulta particularmente preferida, junto con emulsionantes, emolientes y conservantes. Una formulación tópica óptima comprende aproximadamente: del 2% en peso al 60% en peso, preferentemente del 2% en peso al 50% en peso, de solubilizante y/o de intensificador de la permeación en la piel; del 2% en peso al 50% en peso, preferentemente del 2% en peso al 20% en peso, de emulsionantes; del 2% en peso al 20% en peso de emoliente; y del 0,01% al 0,2% en peso de conservante, constituyendo el agente activo y el portador (por ejemplo agua), el resto de la formulación.

15 Un intensificador de la permeación en la piel sirve para facilitar el paso de niveles terapéuticos de agente activo a través de un área de tamaño razonable de piel intacta. Los intensificadores adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo: alcanoles inferiores, tales como metanol, etanol y 2-propanol; alquilmetilsulfóxidos, tales como dimetilsulfóxido (DMSO), decilmetilsulfóxido (C<sub>10</sub> MSO) y tetradecilmetilsulfóxido; pirrolidonas, tales como 2-pirrolidona, N-metil-2-pirrolidona y N-(hidroxiethyl)pirrolidona; urea; N,N-dietil-m-toluamida; alcanodiolos C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>; disolventes varios, tales como dimetilformamida (DMF), N,N-dimetilacetamida (DMA) y alcohol tetrahidrofurfúrico y las azacicloheptán-2-onas 1-sustituidas, particularmente 1-N-dodecilciclazacicloheptán-2-ona (laurocapramo; disponible con la marca comercial Azone<sup>RTM</sup>, de Whitby Research Incorporated, Richmond, Va.).

25 Los ejemplos de solubilizantes incluyen, pero sin limitarse a ellos, los siguientes: éteres hidrofílicos, tales como dietilenglicol monoetil éter (etoxidiglicol; disponible comercialmente como Transcutol<sup>RTM</sup>) y oleato de dietilenglicol monoetil éter (disponible comercialmente como Softcutol<sup>RTM</sup>); derivados de polietileno de aceite de ricino, tales como el aceite de ricino polioxi 35, el aceite de ricino hidrogenado polioxi 40, etc.; polietilenglicol, particularmente los polietilenglicoles de bajo peso molecular, tales como PEG 300 y PEG 400, y derivados de polietilenglicol, tales como los glicéridos caprílicos/cápricos PEG-8 (disponibles comercialmente como Labrasol<sup>RTM</sup>); los alquilmetilsulfóxidos, tales como DMSO; las pirrolidonas, tales como 2-pirrolidona y N-metil-2-pirrolidona; y DMA. Muchos solubilizantes pueden asimismo actuar como intensificadores de la absorción. Puede incorporarse un solo solubilizador en la formulación, o incorporarse una mezcla de solubilizadores en la misma.

30 Los emulsionantes y coemulsionantes adecuados incluyen, aunque sin limitación, aquellos emulsionantes y coemulsionantes que se describen con respecto a las formulaciones en microemulsión. Los emolientes incluyen, por ejemplo, propilenglicol, glicerol, miristato de isopropilo, y propionato de polipropilenglicol-2 (PPG-2) miristil éter.

35 Pueden incluirse también otros agentes activos en las formulaciones, p. ej. otros agentes antiinflamatorios, analgésicos, agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos, antibióticos, vitaminas, antioxidantes, y agentes bloqueantes solares que se encuentran frecuentemente en las formulaciones de pantalla solar, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, antranilatos, benzofenonas (particularmente benzofenona-3), derivados de alcanfor, cinamatos (p. ej. metoxicinamato de octilo) dibenzoilmetanos (p. ej. butilmetoxidibenzoil metano), ácido p-aminobenzoico (PABA) y derivados de los mismos, y salicilatos (p. ej. salicilato de octilo).

40 En ciertas formulaciones tópicas, el agente activo está presente en una cantidad en el intervalo de aproximadamente el 0,25% en peso al 75% en peso de la formulación, preferentemente en el intervalo de aproximadamente el 0,25% en peso al 30% en peso de la formulación, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente el 0,5% en peso al % en peso de la formulación, y todavía más preferentemente en el intervalo de aproximadamente el 1,0% en peso al 10% en peso de la formulación.

45 Las composiciones para el tratamiento tópico de la piel pueden empaquetarse en un recipiente adecuado para adecuarse a su viscosidad y uso pretendido por el consumidor. Por ejemplo, una loción o crema puede empaquetarse en una botella o un aplicador de bola, o un aerosol impulsado por propelente o un recipiente equipado con una bomba adecuada para el funcionamiento con el dedo. Cuando la composición es una crema, puede almacenarse simplemente en una botella no deformable o recipiente comprimible, tal como un tubo o un bote con tapa. La composición puede incluirse también en cápsulas tales como aquéllas que se describen en la patente de los Estados Unidos n.º 5.063.507. Por consiguiente, se proporcionan también recipientes cerrados que contienen una composición cosméticamente aceptable tal como se define en la presente memoria.

55 En una realización alternativa, una formulación farmacéutica se proporciona para su administración oral o parenteral, en cuyo caso la formulación puede comprender una microemulsión que contiene compuesto modulador tal como se describe anteriormente, pero puede contener portadores, vehículos, aditivos etc. alternativos farmacéuticamente aceptables. en particular adecuados para la administración de fármacos oral o parenteral. Como alternativa, una microemulsión que contiene compuesto modulador puede administrarse por vía oral o por vía parenteral sustancialmente tal como se describe anteriormente, sin modificación.

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

Estados del ojo pueden tratarse o prevenirse mediante, por ejemplo, inyección intraocular, sistémica, tópica de un compuesto modulador de la sirtuína, o mediante inserción de un dispositivo de liberación sostenida que libera un compuesto modulador de la sirtuína. Un compuesto modulador de la sirtuína que aumenta o disminuye el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuína puede administrarse en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable, de tal modo que el compuesto se mantiene en contacto con la superficie ocular durante un período de tiempo suficiente para permitir que el compuesto penetre en la córnea y las regiones internas del ojo, como por ejemplo, la cámara anterior, la cámara posterior, el cuerpo vítreo, el humor acuoso, el humor vítreo, la córnea, el iris/ciliar, el cristalino, la retina/coroide y la esclerótica. El vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable puede, por ejemplo, ser una pomada, un aceite vegetal o un material de encapsulación. Como alternativa, los compuestos de la invención pueden inyectarse directamente en el humor vítreo y en el humor acuoso. En una alternativa adicional, los compuestos pueden administrarse de forma sistémica, tal como mediante infusión intravenosa o inyección, para el tratamiento del ojo.

Los compuestos moduladores de la sirtuína que se describen en la presente memoria pueden almacenarse en un entorno libre de oxígeno. Por ejemplo, el resveratrol o un análogo del mismo pueden prepararse en una cápsula sellada al aire para la administración oral, tal como Capsugel de Pfizer, Inc.

Las células, p. ej., tratadas *ex vivo*, con un compuesto modulador de la sirtuína, pueden administrarse de acuerdo con métodos para administrar un injerto en un sujeto, los cuales pueden ir acompañados, p. ej., de la administración de un fármaco inmunosupresor, p. ej., ciclosporina A. Para principios generales en la formulación médica, el lector es referido a Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, y Cellular Immunotherapy, por 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 compuestos moduladores de la sirtuína pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o en animales experimentales. La  $DL_{50}$  es la dosis letal para el 50 % de la población. La  $DE_{50}$  es la dosis terapéuticamente efectiva, en el 50 % de la población. La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos ( $DL_{50}/DE_{50}$ ) es el índice terapéutico. Se prefieren los compuestos moduladores de la sirtuína que presentan grandes índices terapéuticos. Aunque pueden usarse los compuestos moduladores de la sirtuína que presentan efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado de diseñar un sistema de suministro que dirija a dichos compuestos al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por tanto, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y los estudios animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de tales compuestos puede estar dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la  $DE_{50}$  con poco o nada de toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma en circulación que incluya la  $CI_{50}$  (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición media máxima de los síntomas) como se determina en el cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar de forma más precisa las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

## 6. Kits

También se proporcionan en la presente memoria kits, p. ej., kits para fines terapéuticos o kits para modular la vida útil de células o modular la apoptosis. Un kit puede comprender uno o más compuestos moduladores de la sirtuína, p. ej., en dosis premedidas. Un kit puede opcionalmente comprender dispositivos para poner en contacto células con los compuestos e instrucciones para su uso. Los dispositivos incluyen jeringas, stents y otros dispositivos para introducir un compuesto modulador de la sirtuína en un sujeto (p. ej., los vasos sanguíneos de un sujeto) o aplicarlos a la piel de un sujeto.

Otro tipo de kit que se contempla por la invención son kits para identificar compuestos moduladores de la sirtuína. Tales kits contienen (1) una sirtuína o material que contiene sirtuína y (2) un compuesto modulador de la sirtuína de la invención, que se encuentran en recipientes separados. Tales kits pueden usarse, por ejemplo, para realizar un ensayo de tipo competición para someter a prueba otros compuestos (típicamente proporcionados por el usuario) para determinar la actividad de modulación de la sirtuína. En ciertas realizaciones, estos kits comprenden además medios para determinar la actividad de la sirtuína (p. ej., un péptido con un indicador apropiado, tal como aquéllos que se dan a conocer en los ejemplos).

- Aún en otra realización, la invención proporciona una composición de materia que comprende un modulador de la sirtuína de la presente invención y otro agente terapéutico (los mismos usados en terapias de combinación y composiciones de combinación) en formas farmacéuticas separadas, pero asociadas una con otra. La expresión "asociada una con otra", tal como se usa en la presente memoria, significa que las formas farmacéuticas separadas se empaquetan conjuntamente o de otro modo unidas entre sí de forma que sea fácilmente evidente que se pretende que las formas separadas de dosificación se vendan y administren como parte del mismo régimen. El agente y el modulador sirtuína se empaquetan preferiblemente juntos en un empaque de tipo blíster u otro paquete multi-cámara, o como recipientes conectados sellados por separado (tales como bolsas de papel de metalizado o similares) que pueden separarse por el usuario (p. ej., rasgando por las líneas punteadas entre dos recipientes).
- En todavía otra realización, la invención proporciona un kit que comprende en recipientes separados, a) un modulador de la sirtuína de la presente invención; y b) otro agente terapéutico tal como aquéllos que se describen en otra parte en la memoria descriptiva.

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, ADN recombinante, e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas están explicadas completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2ª Ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); *DNA Cloning*, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); Mullis y col. Patente de los EE.UU. n.º: 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*, Vols. 154 and 155 (Wu y col. eds.), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-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).

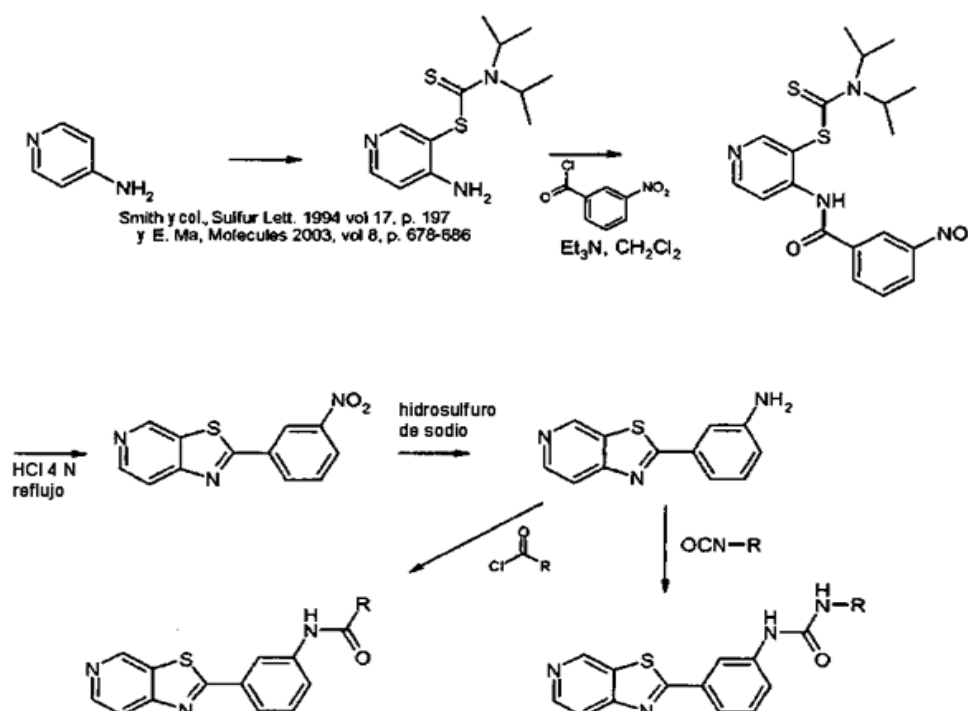
### Ejemplos

La invención que se describe ahora en general, se entenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos que están incluidos meramente para fines de ilustración de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención, y no pretenden limitar la invención en ningún modo.

#### Ejemplo 1: Síntesis y caracterización de moduladores de la sirtuína

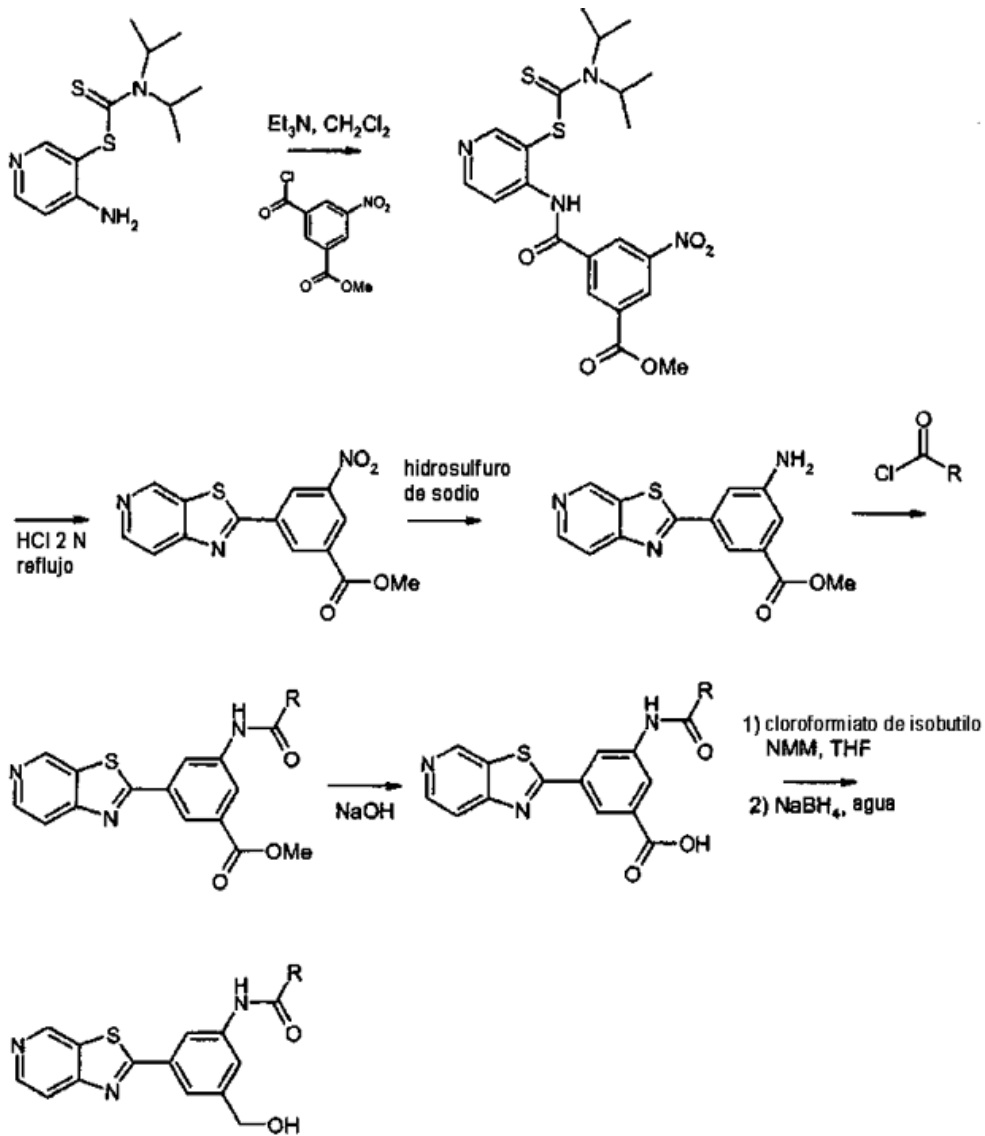
Esquemas generales

Esquema 1:





Esquema 2:

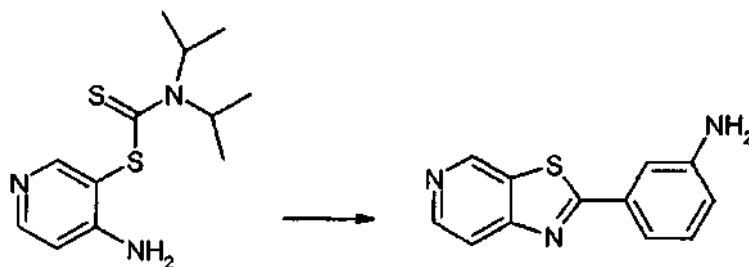


Sección experimental:

Abreviaturas usadas en la sección experimental:

- 5 HATU = hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
- NMM = 4-metilmorfolina
- DIEA = N,N-diisopropiletilamina
- DMF = N,N-dimetilformamida
- CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = diclorometano
- 10 EtOAc = acetato de etilo
- MeOH = metanol
- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = sulfato de sodio
- PPA= poli(ácido fosfórico)
- Et<sub>3</sub>N = trietilamina
- 15 ta = temperatura ambiente

Preparación de 3-(tiazolo[5,4-c]piridin-2-il)bencenamina:



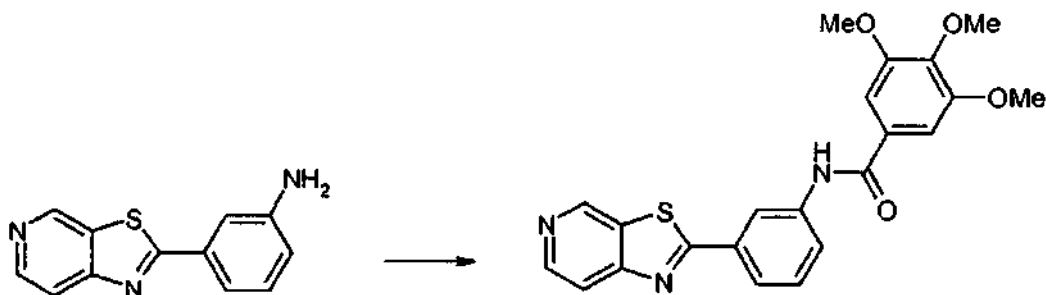
Se preparó diisopropilcarbamoeditoato de 4-aminopiridin-3-ilo de acuerdo con los procedimientos que se esbozan en Smith y col., Sulfur Lett. 1994, vol. 17, p. 197 y E. Ma, Molecules 2003, vol. 8, p. 678-686.

- 5 220 mg de diisopropilcarbamoeditoato de 4-aminopiridin-3-ilo (0,81 mmol) se disolvieron en 6 ml de cloruro de metileno y se enfriaron a 10 grados C (baño de hielo) junto con trietilamina (0,175 ml, 1,5 equiv.). Se disolvió cloruro de 3-nitrobenzoilo (150 mg, 1 equiv., 0,81 mmol) en 3 ml de cloruro de metileno y se añadió a continuación a la solución enfriada de diisopropilcarbamoeditoato de 4-aminopiridin-3-ilo. La mezcla de reacción se calentó a ta y se agitó durante 45 min. La mezcla de reacción se diluyó con 5 ml de cloruro de metileno y se lavó con salmuera. La capa orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró para dar 280 mg del compuesto de la amida intermedia (83 % de rendimiento en bruto).

- 15 Esta amida intermedia (280 mg) se suspendió en 5 ml de HCl ac. 4 N y se agitó a reflujo durante 30 min. La mezcla de reacción se enfrió a ta y se neutralizó con NaOH 3 N y se extrajo con cloruro de metileno. La capa orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a presión reducida para dar 200 mg del compuesto de 2-(3-nitrofenil)-tiazolo[5,4-c]piridina (95 % de rendimiento en bruto).

- 20 310 mg de 2-(3-nitrofenil)tiazolo[5,4-c]piridina (1,2 mmol) se mezclaron con 30 ml de MeOH junto con 6 ml de agua. Hidrosulfuro de sodio hidratado (6 equiv., 7,24 mmol, 400 mg) se añadió y la mezcla de reacción se agitó a la temperatura de reflujo durante 3 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. La capa acuosa se extrajo con cloruro de metileno. Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentraron para dar 230 mg de 3-(tiazolo[5,4-c]piridin-2-il)bencenamina (84 % de rendimiento en bruto) (EM, M<sup>+</sup> + H = 228).

Preparación del compuesto 115:

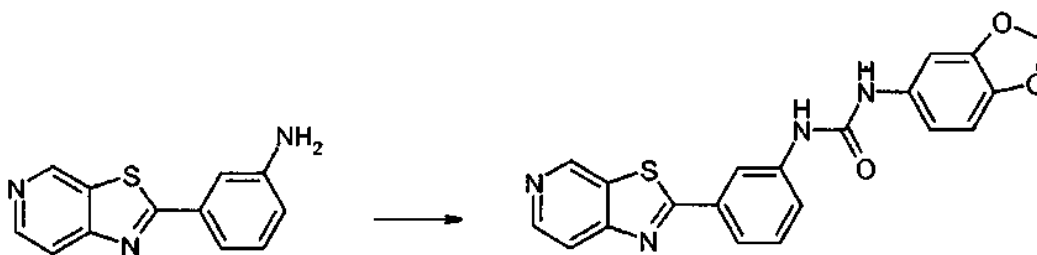


- 25 En una ejecución típica, 40 mg de 3-(tiazolo[5,4-c]piridin-2-il)bencenamina (0,176 mmol) se suspendieron en 1 ml de piridina junto con 1 equiv. de cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo. Después, la mezcla de reacción se calentó en un reactor de microondas de Biotage a 160 grados durante 10 min. Esta se enfrió a continuación a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía usando una mezcla 9:1 de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> con respecto a MeOH (EM, M<sup>+</sup> + H = 422)

Preparación de los compuestos 113 y 114:

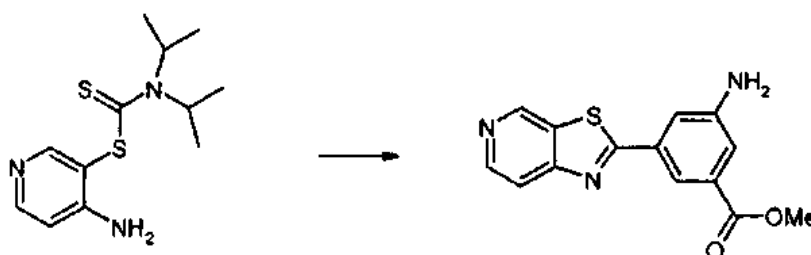
- 30 El mismo procedimiento que se usa en la preparación del compuesto 115 se empleó usando el cloruro de ácido apropiado.

Preparación del compuesto 99:



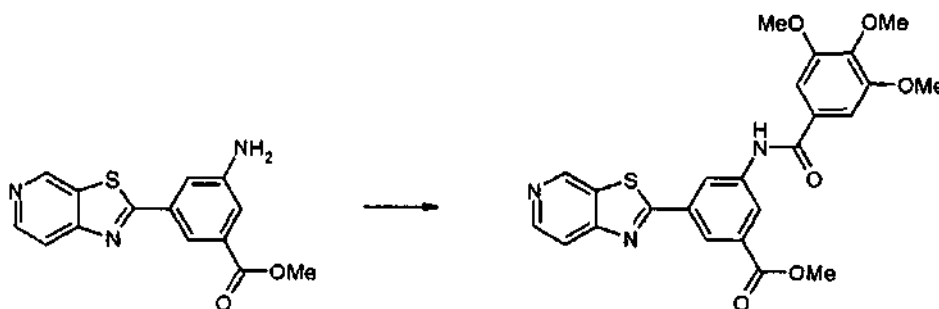
5 En una ejecución típica, 3-(tiazolo[5,4-c]piridin-2-il)benzenamina (25 mg, 0,11 mmol) se suspendió en 1 ml de piridina junto con 18 mg de isocianato de 3,4-(metilendioxi)fenilo. Después, la mezcla de reacción se calentó en un reactor de microondas de Biotage a 140 grados durante 10 min. Esta se enfrió a continuación a temperatura ambiente y se concentró. El residuo resultante se purificó por cromatografía usando una mezcla 9:1 de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> con respecto a MeOH (EM, M<sup>+</sup> + H = 391).

Preparación de 3-amino-5-(tiazolo[5,4-c]piridin-2-il)benzoato de metilo:



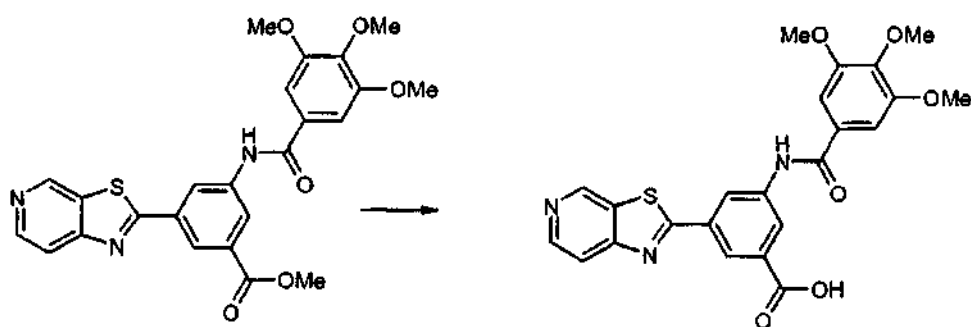
10 5-nitro-isoftalato de mono-metilo (1,25 g, 5,58 mmol) se suspendió en 25 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se añadió cloruro de oxalilo (0,49 ml, 5,58 mmol). Después de que se añadieran 3 gotas de DMF, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta que hubo cesado todo el desprendimiento de gas y la totalidad de los sólidos se hubieron disueltos. Esta solución recién preparada del cloruro de ácido se añadió a continuación gota a gota a una solución de diisopropilcarbodiimato de 4-aminopiridin-3-ilo (1,5 g, 5,58 mmol) y tri-etilamina (0,77 ml, 5,58 mmol) en 50 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 0 °C. La mezcla de reacción resultante se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. Esta se extinguió a continuación con 25 ml de salmuera y las dos capas se separaron. La capa orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El residuo resultante se suspendió en 25 ml de HCl 2 N y se agitó a reflujo durante 30 min. Este se enfrió a continuación a temperatura ambiente y los sólidos se recogieron por filtración y se secaron para dar 1,0 g de 3-nitro-5-(tiazolo[5,4-c]piridin-2-il)benzoato de metilo. Este material se mezcló a continuación con 20 ml de metanol y 3 ml de agua junto con 1 g de hidrosulfuro de sodio hidratado y se agitó a reflujo durante 2 horas. La mezcla de reacción resultante se enfrió 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 se concentraron para dar 150 mg de 3-amino-5-(tiazolo[5,4-c]piridin-2-il)benzoato de metilo (EM, M<sup>+</sup> + H = 286).

Preparación del compuesto 133:



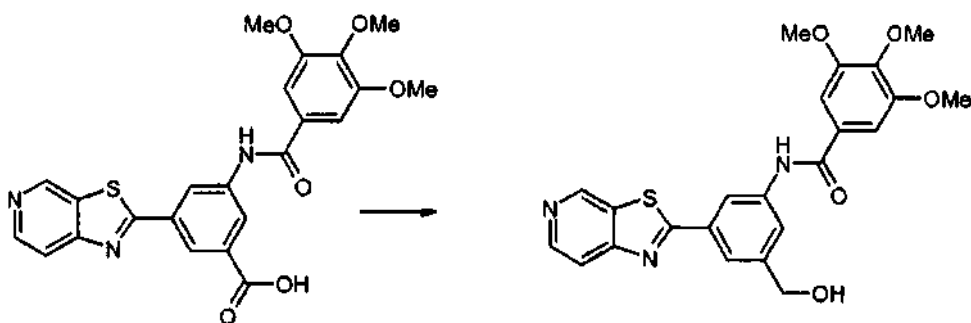
25 3-amino-5-(tiazolo[5,4-c]piridin-2-il)benzoato de metilo (150 mg, 0,526 mmol) se mezcló junto con cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo (121 mg, 0,526 mmol) en 1 ml de piridina. La mezcla de reacción se hizo reaccionar en un reactor de microondas de Biotage a 160 grados durante 10 min. Esta se enfrió a continuación a temperatura ambiente y se concentró. El residuo resultante se purificó por cromatografía usando una mezcla 9:1 de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> con respecto a MeOH para dar 90 mg de 3-(tiazolo[5,4-c]piridin-2-il)-5-(3,4,5-trimetoxibenzamido)benzoato de metilo (36 % de rendimiento) (EM, M<sup>+</sup> + H = 480).

Preparación del compuesto 134:



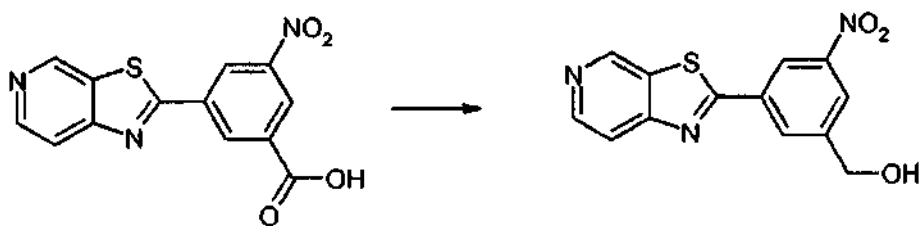
5 3-(tiazolo[5,4-c]piridin-2-il)-5-(3,4,5-trimetoxibenzamido)benzoato de metilo (80 mg, 0,167 mmol) se disolvió en 5 ml de THF y 2 ml de agua que contenía 30 mg de hidróxido de sodio. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Esta se acidificó a continuación a pH 4 con HCl 6 N y se concentró. Los sólidos se recogieron por filtración y se secaron para dar 60 mg de ácido 3-(tiazolo[5,4-c]piridin-2-il)-5-(3,4,5-trimetoxibenzamido)benzoico (78 % de rendimiento) (EM,  $M^+ + H = 466$ ).

Preparación del compuesto 135:



10 Se suspendió ácido 3-(tiazolo[5,4-c]piridin-2-il)-5-(3,4,5-trimetoxibenzamido)benzoico (50 mg, 0,108 mmol) en 2 ml de THF anhidro y se enfrió a 0 °C junto con 1 equiv. de NMM. Se añadió cloroformiato de isobutilo (1 equiv.) y la mezcla de reacción se agitó durante 45 min. Se añadió a continuación  $\text{NaBH}_4$  (1 equiv.) como una solución en 0,5 ml de agua. La mezcla de reacción se agitó durante 30 min y a continuación 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 se concentraron para dar el producto en bruto. Este se purificó por cromatografía usando una mezcla 9:1 de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  con respecto a MeOH (EM,  $M^+ + H = 452$ ).

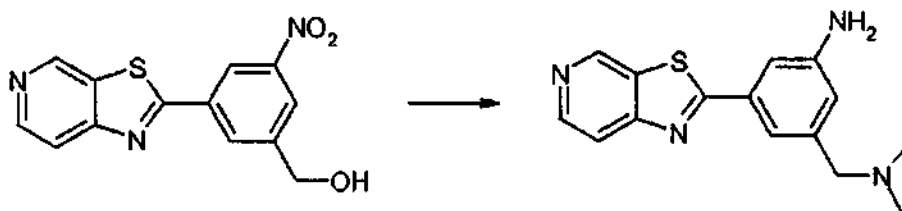
Preparación de (3-nitro-5-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenil)-metanol



20 Ácido 3-nitro-5-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-benzoico (880 mg, 2,92 mmol) se suspendió en 50 ml de THF anhidro junto con NMM (0,32 ml, 2,92 mmol). La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y se añadió cloroformiato de isobutilo (0,38 ml, 2,92 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 40 min.  $\text{NaBH}_4$  (110 mg, 2,92 mmol) se añadió a continuación como una solución en 5 ml de agua. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 min y a continuación se calentó a temperatura ambiente. Se concentró y a continuación se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Las capas orgánicas combinadas se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentraron para dar el producto en bruto. La purificación por cromatografía (Isco, elución en gradiente,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en 9:1  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ) da 150 mg de (3-nitro-5-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenil)-metanol.

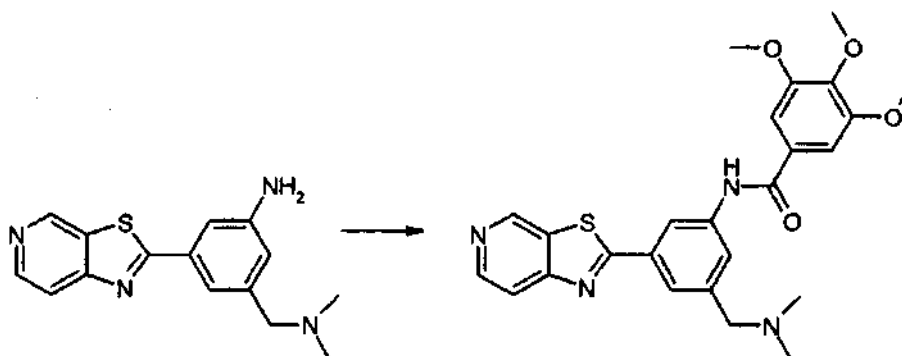
25

Preparación de 3-dimetilaminometil-5-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenilamina:



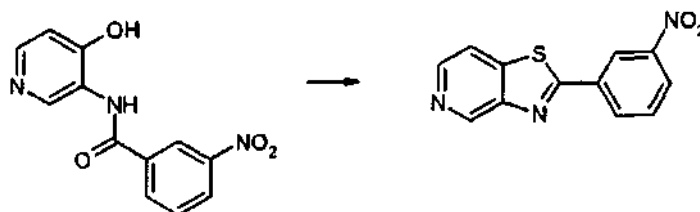
5 (3-Nitro-5-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenil)-metanol (120 mg, 0,418 mmol) se suspendió en 20 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> junto con Et<sub>3</sub>N (87  $\mu$ l, 1,5 equiv.) se enfrió en un baño de hielo. Cloruro de metanosulfonilo (32  $\mu$ l, 0,418 mmol) se añadió y la mezcla de reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente. La mezcla de reacción 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 se concentró para dar el producto intermedio de mesilato en bruto. Este material se disolvió en 2 ml de CH<sub>3</sub>CN junto con 2 ml de 2 N dimetilamina en THF. La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Esta se concentró a continuación. El residuo resultante se mezcló con 6 ml de MeOH y 2 ml de agua que contenía 200 mg de hidrosulfuro de sodio hidratado. La mezcla de reacción se agitó a la temperatura de reflujo durante 3 horas. Esta se enfrió a continuación a temperatura ambiente, se diluyó con 100 ml de EtOH absoluto, y se concentró a sequedad. El residuo resultante se mezcló con 10 ml de 9:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH y se filtró. El filtrado se concentró para dar esencialmente el rendimiento cuantitativo de 3-dimetilaminometil-5-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenilamina.

Preparación del compuesto 174:



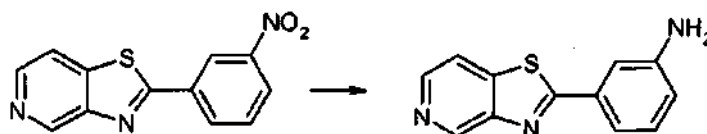
15 3-Dimetilaminometil-5-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenilamina (0,2 mmol) se mezcló con 1 ml de piridina junto con 47 mg de cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo (0,2 mmol). La mezcla de reacción se hizo reaccionar en un reactor de microondas de Biotage a 160 °C durante 10 min. Esta se enfrió a continuación a temperatura ambiente y se concentró. El residuo resultante se purificó por cromatografía (Isco, elución en gradiente, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 95 % de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4 % de MeOH y 1 % de Et<sub>3</sub>N) para dar 30 mg del producto deseado (EM, M<sup>+</sup> + H = 479).

Preparación de 2-(3-nitrofenil)tiazolo[4,5-c]piridina:



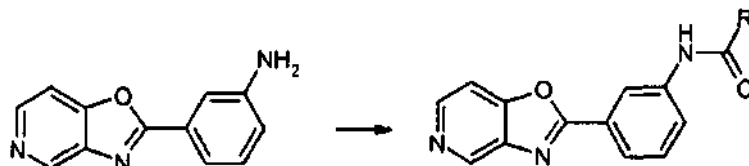
25 Una mezcla de N-(4-hidroxipiridin-3-il)-3-nitrobenzamida (1,33 g, 5,2 mmol) y P<sub>2</sub>S<sub>5</sub> (2,40 g, 10,4 mmol) en piridina (6,0 ml) y *p*-xileno (24 ml) se agitó a 140 °C durante 18 h. El disolvente se retiró a vacío mientras que estaba caliente y el residuo se purificó por recristalización en EtOH para dar 2-(3-nitrofenil)tiazolo[4,5-c]piridina en forma de un sólido de color amarillo (1,08 g, rendimiento: 81 %). EM (ESI) calc. para C<sub>12</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S (*m/z*): 257, encontrado: 258 [M+1]<sup>+</sup>.

Preparación de 3-(tiazolo[4,5-c]piridin-2-il)benzenamina:



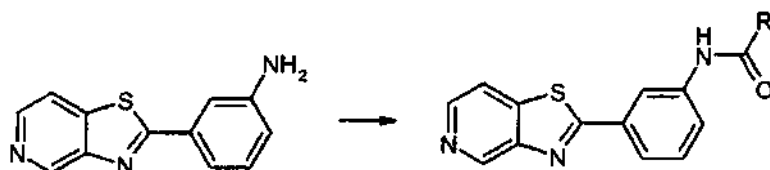
Una mezcla de 2-(3-nitrofenil)tiazolo[4,5-c]piridina (1,53 g, 5,9 mmol),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2,76 g, 51,6 mmol), polvo de hierro (1,80 g, 32,2 mmol),  $\text{H}_2\text{O}$  (30 ml) y metanol (120 ml) se calentó a reflujo durante 5,5 h bajo  $\text{N}_2$ . La mezcla se filtró y el filtrado se diluyó con  $\text{H}_2\text{O}$  (400 ml). El precipitado se recogió por filtración y se secó a vacío para dar 3-(tiazolo[4,5-c]piridin-2-il)bencenammina en forma de un sólido de color pardo (841 mg, 63 %). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 9,28 (1H, s); 8,52 (1H, s); 8,21 (1H, s); 7,23–7,38 (3H, d), 6,79 (1H, s), 5,51 (2H, s); EM (ESI) calc. para  $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_3\text{S}$  ( $m/z$ ): 227, encontrado: 228  $[\text{M}+\text{H}]^+$

Procedimiento general para preparar el compuesto de referencia 343:



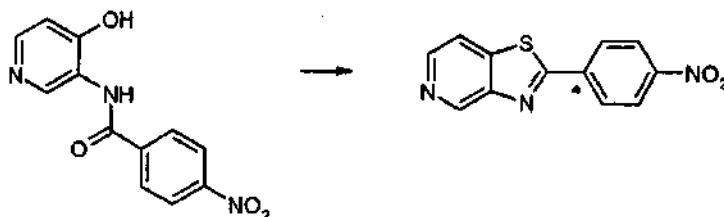
- 10 Los cloruros de ácido, a su vez, o bien se encontraban comercialmente disponibles o bien se prepararon a partir del ácido carboxílico correspondiente tal como sigue: 1,0 g del ácido carboxílico se calentó a reflujo en 10 ml de cloruro de tionilo y 0,1 ml de DMF durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida para dar el cloruro de ácido deseado. Una mezcla de la 3-(oxazolo[4,5-c]piridin-2-il)bencenammina (0,2 mmol de cada una) y el cloruro de ácido apropiado (0,24 mmol de cada uno) en piridina (2 ml) se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se diluyó con  $\text{H}_2\text{O}$  (5 ml de cada uno).
- 15 Los precipitados se recogieron por filtración y se trituraron con MeOH (5 ml) y se secaron para dar unos compuestos de biblioteca, que se analizaron por HPLC y EM. Los compuestos de biblioteca se purificaron adicionalmente haciendo que pasaran a través de almohadilla de gel de sílice eluyendo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$  o éter de petróleo/EtOAc.

Procedimiento general para preparar los compuestos 272, 273, 400, 401, 402 y 403:



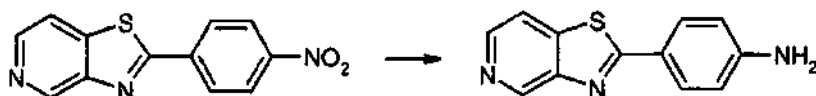
- 20 Esencialmente el mismo procedimiento que se ha detallado en lo precedente para la preparación del compuesto de referencia 343 usando 3-(tiazolo[4,5-c]piridin-2-il)bencenammina como el material de partida y el cloruro de ácido apropiado.

Preparación de 2-(4-nitrofenil)tiazolo[4,5-c]piridina:



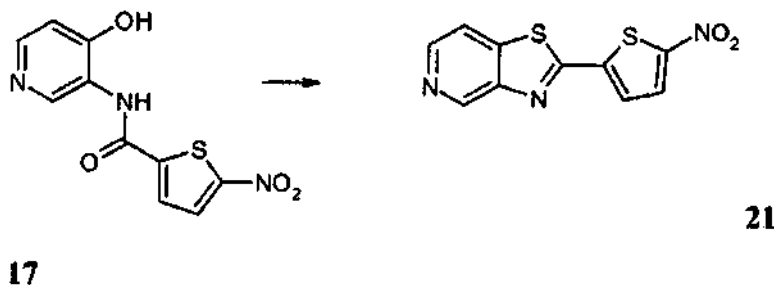
- 25 Una mezcla de N-(4-hidroxipiridin-3-il)-4-nitrobenzamida (5,18 g, 0,02 mol) y  $\text{P}_2\text{S}_5$  (8,90 g, 0,04 mol) en piridina (25 ml) y p-xileno (100 ml) se agitó a 140 °C durante 18 h. El disolvente se retiró a vacío mientras que estaba caliente y el residuo se purificó por recristalización en EtOH para dar 2-(4-nitrofenil)tiazolo[4,5-c]piridina en forma de un sólido de color amarillo (3,00 g, rendimiento: 59 %). EM (ESI), calc. para  $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$  ( $m/z$ ): 257, encontrado: 258  $[\text{M}+1]^+$ .

- 30 Preparación de 4-(tiazolo[4,5-c]piridin-2-il)bencenammina:



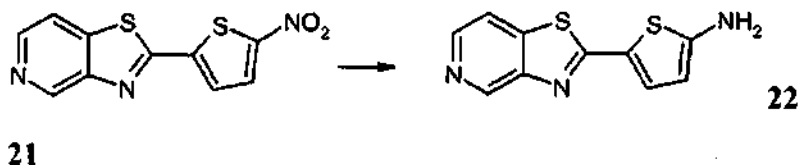
- 35 2-(4-nitrofenil)tiazolo[4,5-c]piridina (2,57 g, 0,01 mol), polvo de hierro (2,8 g, 0,05 mmol) y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (4,32 g, 0,08 mol) se calentaron a reflujo en  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (4:1, 200 ml) durante 6 h. La mezcla se filtró y el filtrado se evaporó a vacío. El residuo se lavó con agua (30 ml) para dar 4-(tiazolo[4,5-c]piridin-2-il)bencenammina en forma de un sólido de color blanco (1,37 g, Rendimiento: 60 %).

Preparación de 2-(5-nitrotiofen-2-il)tiазolo[4,5-c]piridina:



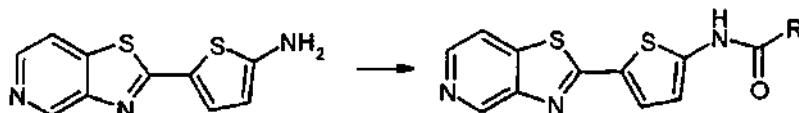
Una mezcla de compuesto 17 (1,97 g, 7,43 mmol) y  $P_2S_5$  (3,30 g, 15 mmol) en piridina (30 ml) y p-xileno (120 ml) se agitó a 140 °C durante 18 h. El disolvente se retiró a vacío mientras que estaba caliente y el residuo se purificó por recristalización en EtOH para dar compuesto 21 en forma de un sólido de color amarillo (700 mg, rendimiento: 35 %, N° de lote: MC0052-050-21). EM (ESI) calc. para  $C_{10}H_5N_3O_2S_2$  ( $m/z$ ): 263, encontrado: 264,1  $[M+1]^+$ .

Preparación de 5-(tiазolo[4,5-c]piridin-2-il)tiofen-2-amina:



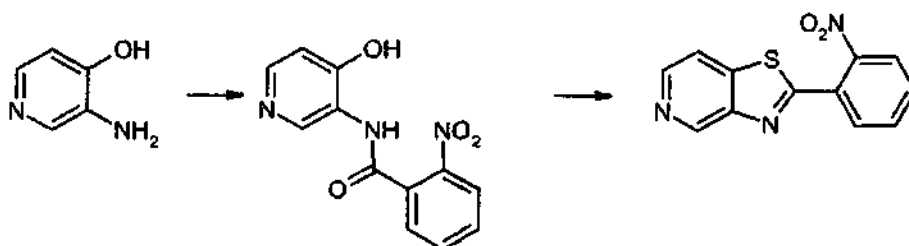
El compuesto 21 (700 mg, 2,66 mmol), polvo de hierro (745 mg, 13,30 mmol) y  $NH_4Cl$  (1,36 g, 22 mmol) se calentaron a reflujo en  $CH_3OH/H_2O$  (4:1, 150 ml) durante 6 h. La mezcla se filtró y el filtrado se evaporó a vacío. El residuo se lavó con agua (30 ml) y se secó para dar el compuesto 22 en forma de un sólido de color amarillo (306 mg, rendimiento: 50 %).

Preparación de los compuestos 515, 516, 517, 518, 519 y 520:



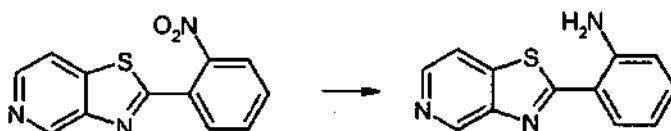
Los compuestos 515, 516, 517, 518, 519 y 520 se prepararon mediante esencialmente el mismo procedimiento que se ha detallado en lo precedente para la preparación del compuesto de referencia 343 usando 5-(oxazolo[4,5-c]piridin-2-il)tiofen-2-amina (compuesto 22) como el material de partida y el cloruro de ácido apropiado.

Preparación de 2-(2-nitrofenil)tiазolo[4,5-c]piridina:



N-(4-hidroxi-piridin-3-il)-2-nitro-benzamida se preparó usando un procedimiento similar al que se ha descrito en lo precedente usando 4-hidroxi-3-aminopiridina y cloruro de 2-nitrobenzoílo. Una mezcla de -(4-hidroxi-piridin-3-il)-2-nitro-benzamida (2,6 g, 0,01 mol) y  $P_2S_5$  (4,44 g, 0,02 mol) en piridina (12,5 ml) y p-xileno (50 ml) se agitó a 140 °C durante 18 h. El disolvente se retiró a vacío y el residuo se purificó por recristalización para dar 2-(2-nitrofenil)-tiазolo[4,5-c]piridina en forma de un sólido de color amarillo (1,43 g, rendimiento: 55 %).

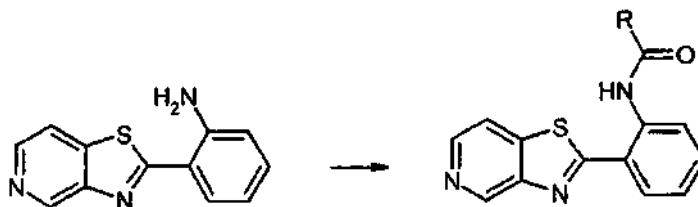
Preparación de 2-tiазolo[4,5-c]piridin-2-il-fenilamina:



Una suspensión de 2-(2-nitrofenil)tiазolo[4,5-c]piridina (1,170 g, 4,6 mmol), polvo de Fe (1,26 g, 22,8 mmol) y NH<sub>4</sub>Cl (1,97 g, 36,8 mmol) en CH<sub>3</sub>OH : H<sub>2</sub>O (4:1, 80 ml) se calentó a reflujo durante 6 h. La mezcla se filtró y el filtrado se evaporó a vacío. El residuo se vertió en agua. El precipitado se recogió por filtración, y se lavó con agua (20 ml × 3) para dar 2-tiazolo[4,5-c]piridin-2-il-fenilamina en forma de un sólido de color amarillo (0,760 g, rendimiento: 73 %).

5

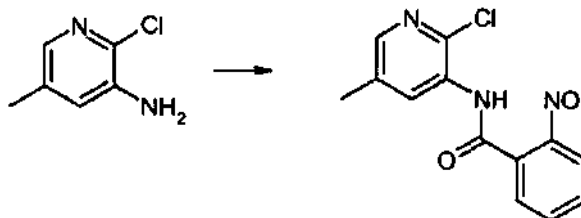
Preparación de los compuestos 317, 318, 319, 320 y 321:



Los compuestos 317, 318, 319, 320 y 321 se prepararon mediante esencialmente el mismo procedimiento que se ha detallado en lo precedente para la preparación del compuesto 343 usando 2-(2-nitrofenil)tiазolo[4,5-c]piridina como el material de partida y el cloruro de ácido apropiado.

10

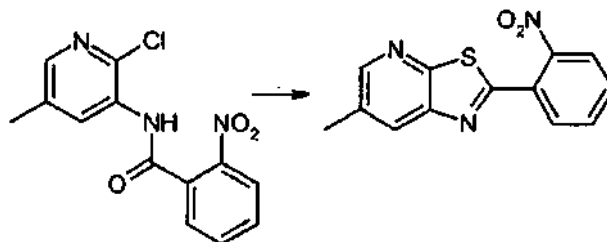
Preparación de N-(2-cloro-5-metilpiridin-3-il)-2-nitrobenzamida:



A una solución de 5-amino-6-cloro-3-picolina (9,54 g, 66,9 mmol) en piridina (200 ml) se añadió cloruro de 2-nitrobenzoílo (13,65 g, 73,6 mmol) gota a gota a 0 °C. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla de color oscuro se diluyó a continuación con agua (1500 ml) y se añadió solución de bicarbonato de sodio sat. hasta pH = 8. El precipitado se recogió por filtración, se aclaró con agua (30 ml × 3) y se secó en horno para dar N-(2-cloro-5-metilpiridin-3-il)-2-nitrobenzamida como un sólido de color pálido (17,70 g, rendimiento: 91 %).

15

Preparación de 6-metil-2-(2-nitrofenil)tiазolo[5,4-b]piridina:



20

Una mezcla de N-(2-cloro-5-metilpiridin-3-il)-2-nitrobenzamida (5,0 g, 17,1 mmol) y P<sub>2</sub>S<sub>5</sub> (7,6 g, 34,2 mmol) en piridina (50 ml) y *p*-xileno (200 ml) se agitó a 140 °C durante 20 h. La solución caliente se transfirió a otro matraz y el disolvente se retiró a vacío. El residuo se purificó por recristalización en EtOH para dar 6-metil-2-(2-nitrofenil)tiазolo[5,4-b]piridina en forma de un sólido de color amarillo (3,5 g, rendimiento: 75 %).

25

Preparación de 6-(bromometil)-2-(2-nitrofenil)tiазolo[5,4-b]piridina:



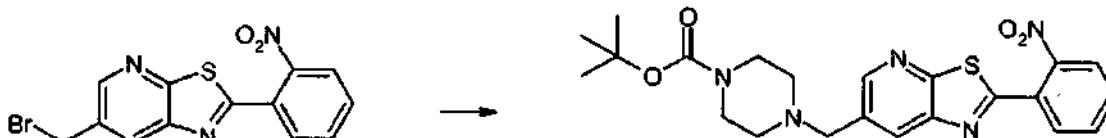
6-metil-2-(2-nitrofenil)tiазolo[5,4-b]piridina (2,9 g, 10,7 mmol), N-bromosuccinimida (NBS, 1,91 g, 10,7 mmol), CCl<sub>4</sub> (200 ml) y peróxido de benzoílo (0,021 g) se añadieron en un matraz de tres bocas (500 ml) en una atmósfera de argón. La mezcla de color amarillo resultante se calentó a reflujo durante 2 h. Se añadieron NBS (1,91 g) y peróxido de benzoílo (0,021 g) adicionales. Dos horas más tarde, se añadieron más NBS (0,95 g) y peróxido de benzoílo (0,021 g) y la mezcla se sometió a reflujo de forma continua durante 3 h. La mezcla se enfrió a continuación

30



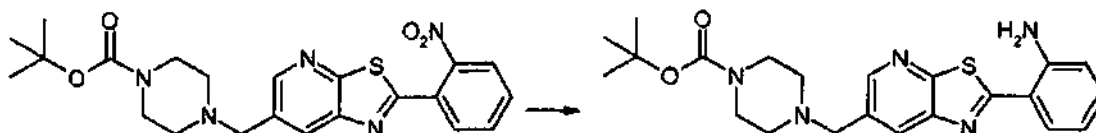
a temperatura ambiente. La solución se transfirió en otro matraz y se concentró a vacío para dar 6-(bromometil)-2-(2-nitrofenil)tiazolo[5,4-b]piridina en bruto (4,0 g), que se usó directamente para la próxima etapa.

Preparación de 4-((2-(2-nitrofenil)tiazolo[5,4-b]piridin-6-il)metil)piperacina-1-carboxilato de *tert*-butilo:



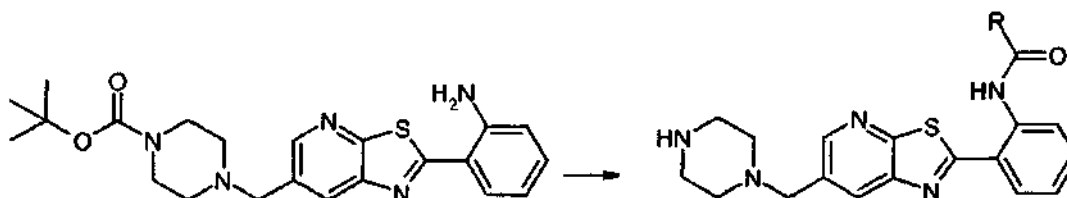
- 5 Una solución de 6-(bromometil)-2-(2-nitrofenil)tiazolo[5,4-b]piridina en bruto (4,0 g), Boc-piperazina (1,99 g, 10,7 mmol), Et<sub>3</sub>N (1,5 ml, 10,7 mmol) y acetonitrilo (100 ml) se agitó a 50 °C durante 4 h y, a continuación, a temperatura ambiente durante 60 h. La CCF mostró que la reacción se había completado. La mezcla se concentró a vacío y se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (éter de petróleo : acetato de etilo : Et<sub>3</sub>N = 100 : 10 : 1) para dar 4-((2-(2-nitrofenil)tiazolo[5,4-b]piridin-6-il)metil)piperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo en forma de un sólido de color
- 10 amarillo (3,6 g, rendimiento: 74 % a lo largo de 2 etapas).

Preparación de 4-((2-(2-aminofenil)tiazolo[5,4-b]piridin-6-il)metil)piperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo:



- 15 Una mezcla de 4-((2-(2-nitrofenil)tiazolo[5,4-b]piridin-6-il)metil)piperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo (2,13 g, 4,7 mmol), NH<sub>4</sub>Cl (2,00 g, 37 mmol), polvo de hierro (1,31 g, 23,5 mmol), H<sub>2</sub>O (40 ml) y metanol (160 ml) se calentó a reflujo durante 3 h bajo N<sub>2</sub>. La mezcla de reacción se filtró, y el filtrado se concentró a vacío y se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (éter de petróleo : acetato de etilo : Et<sub>3</sub>N = 800 : 200 : 1) para dar 4-((2-(2-aminofenil)tiazolo[5,4-b]piridin-6-il)metil)piperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo en forma de un sólido de color
- 20 amarillo (1,63 g, rendimiento: 81 %).

- 20 Procedimiento general para preparar los compuestos 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 622, 646, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 701, 702, 722, 723, 724, 725, 730, 731 y 732:



- 25 Una mezcla de la estructura principal de amino (4-((2-(2-aminofenil)tiazolo[5,4-b]piridin-6-il)metil)piperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo, 0,141 mmol de cada uno) y el cloruro de ácido apropiado (0,17 mmol) en piridina (2 ml) se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después, la mezcla de reacción se diluyó con NaHCO<sub>3</sub> sat. (5 ml de cada uno). Los precipitados se recogieron por filtración y se trituraron con MeOH (5 ml) y se secaron para dar unos compuestos de biblioteca protegidos con Boc, que se analizaron por HPLC y EM. Para esos compuestos de biblioteca protegidos con Boc con una pureza por debajo de 95 %, los compuestos se purificaron adicionalmente haciendo que pasaran a través de almohadilla de gel de sílice eluyendo con éter de petróleo/EtOAc.

- 30 Los compuestos protegidos con Boc se disolvieron en una solución de TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 25 % (1 ó 2 ml) y se agitaron a temperatura ambiente y se supervisaron por CCF o LC/EM. Las mezclas se concentraron a continuación a vacío y se evaporaron conjuntamente con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,0 ml × 2) a vacío para dar los productos deseados en forma de las sales de TFA, que se analizaron por RMN de <sup>1</sup>H, HPLC y EM.

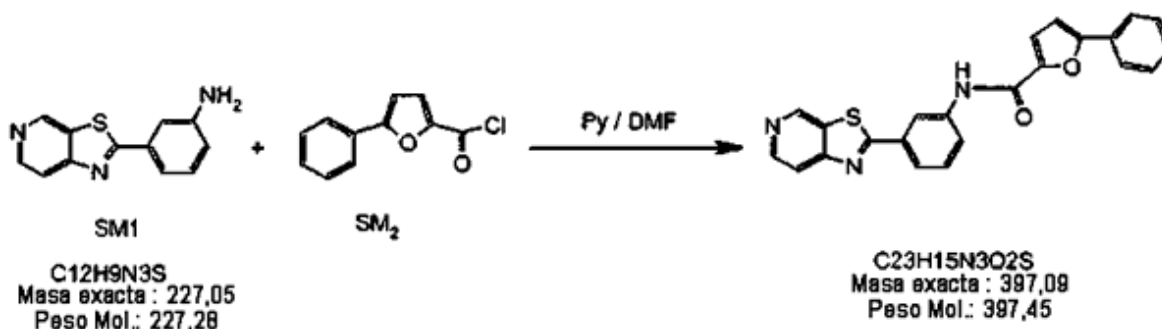
Preparación de los compuestos 690, 726, 727, 728 y 729:

- 35 Los compuestos 690, 726, 727, 728 y 729 se prepararon mediante esencialmente el mismo procedimiento que se ha detallado en la preparación del compuesto 646 excepto en que se usó 3-amino-2-hidroxi-6-metilpiridina como el material de partida.

Procedimiento general para preparar los compuestos 240, 608, 241, 221, 280, 222, 223, 225, 244, 245, 246, 247, 226, 303, 238, 227, 304, 228, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 248, 249 y 396:

- 40 Los compuestos 240, 608, 241, 221, 280, 222, 223, 225, 244, 245, 246, 247, 226, 303, 238, 227, 304, 228, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 248, 249 y 396 se prepararon mediante esencialmente el mismo procedimiento que se detalla en

lo sucesivo para la preparación del compuesto 241 usando 3-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenilamina como el material de partida y el cloruro de ácido apropiado.

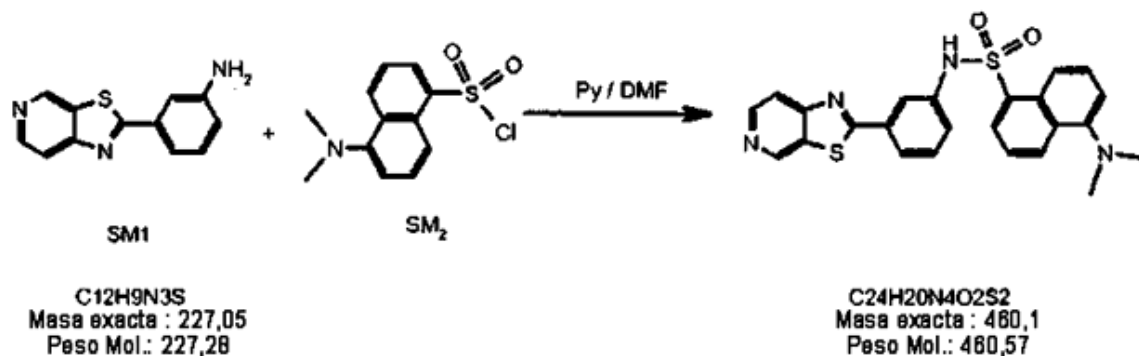


5 A una mezcla de 3-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenilamina en 1,5 ml de DMF se añadió cloruro de 5-fenil furan-2-carbonilo (62 mg, MW = 206,63, 0,3 mmol) en piridina (0,25 ml). La reacción se mantuvo durante 72 horas a 40 °C y se supervisó con CCF. Al final de la reacción, se añadieron 5 ml de H<sub>2</sub>O, y la suspensión resultante se filtró para recoger el sólido, que se lavó a continuación con H<sub>2</sub>O y se secó. El producto en bruto se purificó adicionalmente por CCF preparativa (acetona / éter de petróleo = 1/2) y se lavó con acetona para dar un polvo de color blanco (43 mg, 36,1 %). El producto se confirmó por RMN de <sup>1</sup>H. RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz), δ 10,50 (1H, s), 9,45 (1H, s), 8,70 (1H, s a), 8,68 (1H, d, J = 5,5 Hz), 8,13 (1H, d, J = 7,8 Hz), 8,08 (1H, d, J = 5,5 Hz), 8,02 (2H, d, J = 7,6 Hz), 7,93 (1H, d, J = 7,7 Hz), 7,63 (1H, t, J = 7,9 Hz), 7,5 (3 H, m), 7,43 (1H, t, J = 7,3 Hz), 7,23 (1 H, d, J = 3,4 Hz). IE-EM m/z (%): 397,2 (M<sup>+</sup>).

10

Procedimiento general para preparar los compuestos 466, 398, 229, 230, 282, 250, 231, 399, 251, 283, 232, 252, 284, 285, 287, 234, 235, 236, 237, 239, 289, 288, 290 y 280:

15 Los compuestos 466, 398, 229, 230, 282, 250, 231, 399, 251, 283, 232, 252, 284, 285, 287, 234, 235, 236, 237, 239, 289, 288, 290 y 280 se prepararon mediante esencialmente el mismo procedimiento que se detalla en lo sucesivo para la preparación del compuesto 398 usando 3-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenilamina como el material de partida y el cloruro de sulfonilo apropiado.

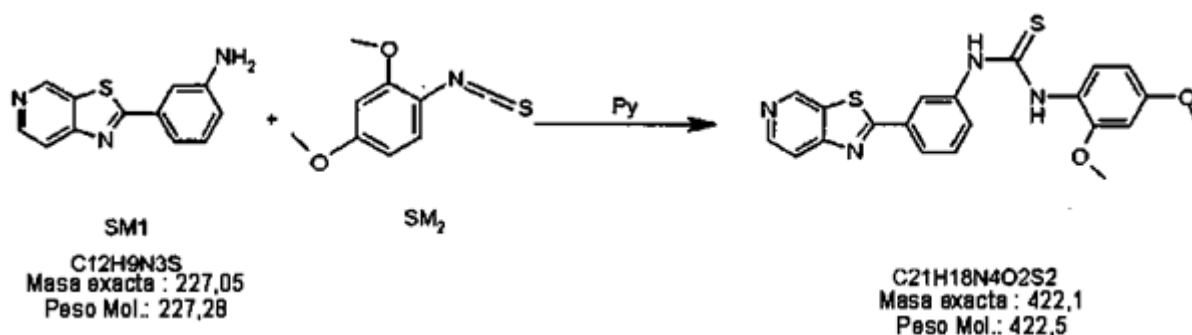


20 3-Tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenilamina (68 mg, 0,3 mmol) en 2 ml de piridina se añadió a cloruro de dansilo (81 mg, 0,3 mmol) mientras se agitaba. La reacción se mantuvo a aproximadamente 40 °C durante 24 horas. La piridina se evaporó a vacío, y se añadió agua. La suspensión resultante se filtró y se lavó por THF para dar el producto en forma de un sólido de color amarillo (29 mg, 21,0 %). RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz) δ 9,38 (1H, s), 8,64 (1H, d, J = 2,8 Hz), 8,45 (1H, d, J = 8,5 Hz), 8,38 (1H, d, J = 8,6 Hz), 8,30 (1H, d, J = 7,1 Hz), 8,03 (1H, d, J = 5,4 Hz), 7,87 (1H, s), 7,71 (1H, d, J = 7,6 Hz), 7,64 (2H, m), 7,40 (1H, t, J = 7,9 Hz), 7,31 (1H, d, J = 8,1 Hz), 7,26 (1H, d, J = 7,6 Hz), 2,77 (6H, s). IE-EM m/z 460,01 (M<sup>+</sup>, 31).

25

Procedimiento general para preparar los compuestos 599, 600, 498, 610, 601, 611, 485, 484, 481, 612, 475, 473, 472, y 491:

30 Los compuestos 600, 498, 610, 601, 611, 485, 484, 481, 612, 475, 473, 472, y 491 se prepararon mediante esencialmente el mismo procedimiento que se detalla en lo sucesivo para la preparación del compuesto 599 usando 3-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenilamina como el material de partida y el isotiocianato apropiado.

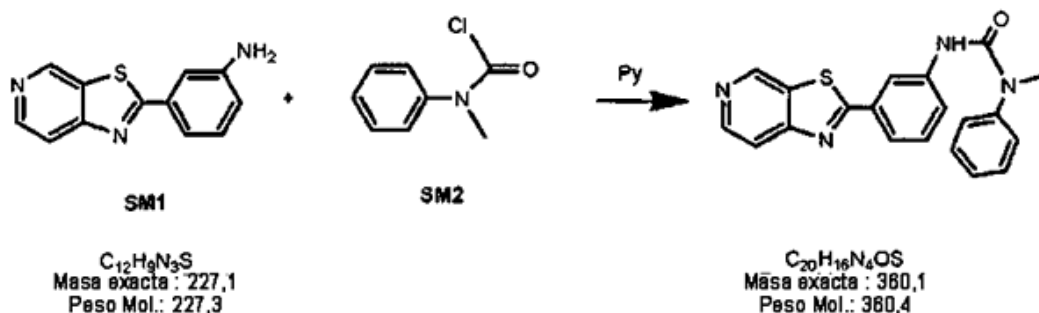


5 A una mezcla de 3-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenilamina en 1 ml de piridina se añadió 2,4-Dimetoxifenilo Isotiocianato (59 mg, 0,3 mmol). La reacción se mantuvo durante 24 horas a 60 °C con agitación y la reacción se controló por CCF. Una vez que se hubo completado, a la mezcla en bruto se añadieron 5 ml de H<sub>2</sub>O, y la suspensión resultante se filtró para recoger el sólido, que se lavó a continuación con H<sub>2</sub>O y se purificó por CCF preparativa (acetona / éter de petróleo = 1/2). El sólido aislado se lavó adicionalmente con acetona y se secó al aire para

10 proporcionar el producto deseado 38 mg (30,3 %). El producto se confirmó por RMN de <sup>1</sup>H. RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz) δ 9,40 (1H, s), 8,65 (1H, d, J = 5,4 Hz), 8,55 (1H, s), 8,05 (1H, d, J = 5,2 Hz), 7,90 (1H, d, J = 7,4 Hz), 7,77 (1H, d, J = 7,7 Hz), 7,55 (1H, t, J = 7,8 Hz), 7,47 (1H, d, J = 6,6 Hz), 6,63 (1 H, s), 6,54 (1 H, d, J = 7,8 Hz), 3,82 (3H, s), 3,77 (3H, s). EM: 422,26 (M<sup>+</sup>).

Procedimiento general para preparar los compuestos 604, 605 y 607:

Los compuestos 605 y 607 se prepararon mediante esencialmente el mismo procedimiento que se detalla en lo sucesivo para la preparación del compuesto 604 usando 3-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenilamina como el material de partida y el clorofornio apropiado.

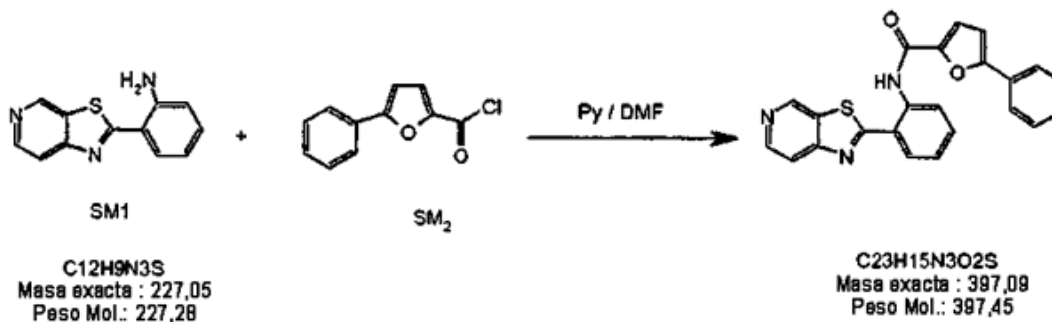


15 A una mezcla de 3-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenilamina (68 mg, 0,3 mmol) en 2,5 ml. Se añadió piridina a cloruro de N-metil-N-fenilcarbamoilo (50,7 mg, 0,3 mmol). La reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 48 horas. A la mezcla se añadió a continuación agua (5 ml) y la suspensión resultante se filtró. El sólido recogido se purificó adicionalmente por CCF preparativa (éter de petróleo / acetona = 2/1). El producto se confirmó por RMN de <sup>1</sup>H. RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>) δ 9,34 (1H, s), 8,66 (1H, d, J = 5,3 Hz), 8,43 (1H, s), 7,97 (1H, d, J = 5,4 Hz), 7,79 (2H, d, J = 7,9 Hz), 7,74 (1H, d, J = 8,1 Hz), 7,50 (2H, t, J = 8,1 Hz), 7,44 (2H, d, J = 8,0 Hz), 7,37 (1H, d, J = 7,2 Hz), 3,36 (3H, s).

20

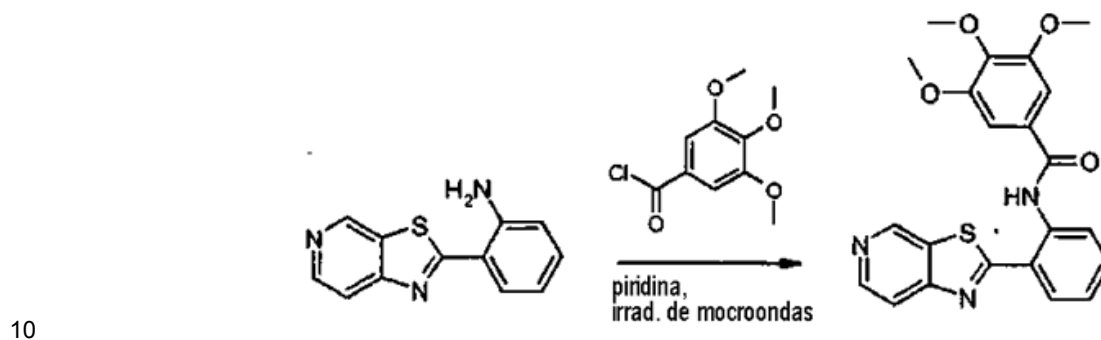
Procedimiento general para preparar los compuestos 385, 387, 609, 390, 391, 462, 392, 393, 436, 461, 460, 596, 465 y 463:

25 Los compuestos 387, 609, 390, 391, 462, 392, 393, 436, 461, 460, 596, 465 y 463 se prepararon mediante esencialmente el mismo procedimiento que se detalla en lo sucesivo para la preparación del compuesto 385 usando 2-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenilamina como el material de partida y el cloruro de ácido apropiado.



- 5 A una mezcla de 2-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenilamina en 1,5 ml de DMF se añadió cloruro de 5-fenil furan-2-carbonilo (62 mg, 0,3 mmol) en piridina (0,25 ml). La reacción se mantuvo durante 24 horas a 40 °C mientras se agitaba y se supervisó por CCF. Una vez que se hubo completado, a la mezcla en bruto se añadieron 5 ml de H<sub>2</sub>O, y la suspensión resultante se filtró para recoger el producto sólido, que se lavó subsiguientemente con H<sub>2</sub>O y se secó. El producto en bruto se purificó adicionalmente por CCF preparativa (acetona / éter de petróleo = 1 / 2) para producir 38 mg de producto (36,80 %), confirmados por RMN de <sup>1</sup>H: RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,44 (1H, s), 7,74 (4H, d, J = 7, 5 Hz), 7,41 (4H, t, J = 7,7 Hz), 7,29 (1H, t, J = 7,4 Hz), 6,87 (2H, d, J = 3,0 Hz), 6,75 (2H, d, J = 2,6 Hz). IE-EM *m/z*: 397,2 (M<sup>+</sup>).

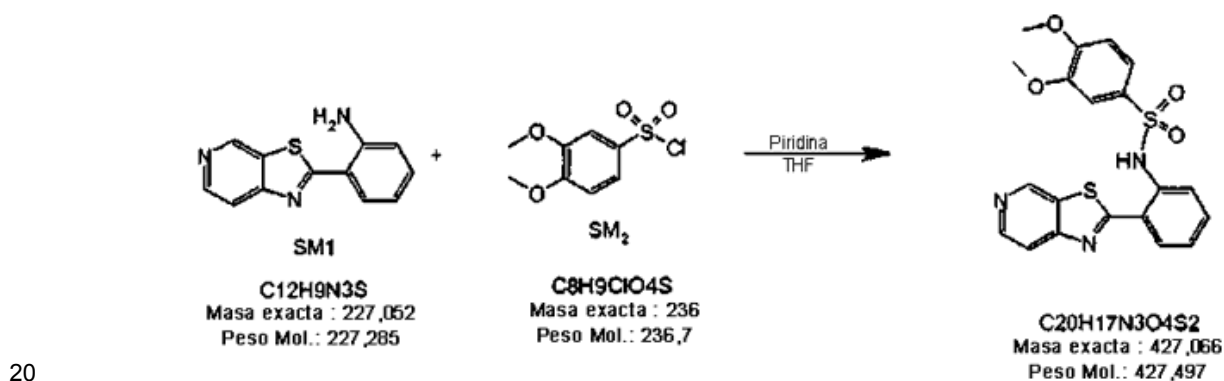
Preparación de los compuestos 162 y 163:



- Un vial para microondas se cargó con 2-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenilamina (40 mg, 0,2 mmol), cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo (40,6 mg, 0,2 mmol) y 1 ml de piridina. La mezcla se sometió a irradiación con microondas a 160 °C durante 10 minutos. Después de la refrigeración, MeOH se añadió a la solución, causando la formación de un precipitado. El sólido se filtró, se lavó con MeOH y se secó para dar el producto de amida deseado. (Calc. para C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S: 391,45, [M+H]<sup>+</sup> encontrado: 392,1).

Procedimiento general para preparar los compuestos 467, 394 y 469:

Los compuestos 394 y 469 se prepararon mediante esencialmente el mismo procedimiento que se detalla en lo sucesivo para la preparación del compuesto 467 usando 2-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenilamina como el material de partida y el cloruro de sulfonilo apropiado.

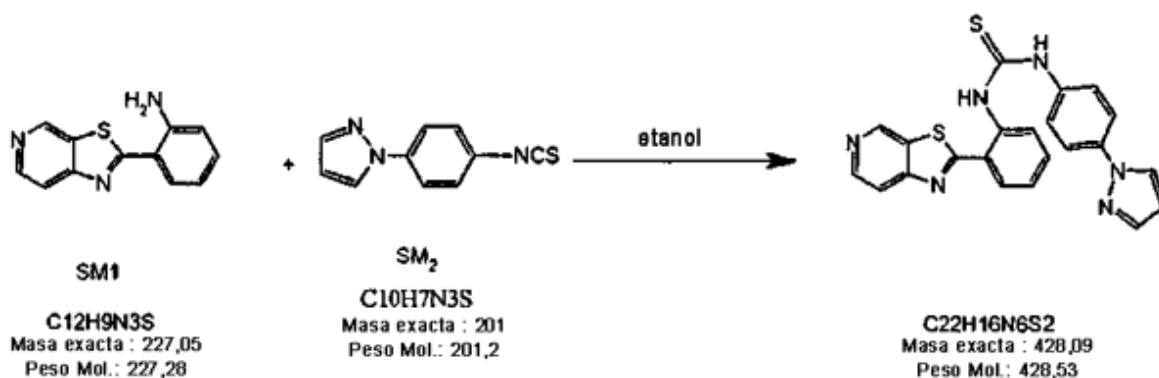


- A una mezcla de 2-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenilamina (71 mg, 0,3 mmol) en 1 ml de THF se añadió SM2 (68 mg, 0,3 mmol) en 2 ml de piridina con agitación a temperatura ambiente. La reacción se mantuvo a 60 °C en un baño de aceite durante 2 días y se supervisó a través de CCF hasta que el material de partida hubo desaparecido. Se añadieron subsiguientemente 5 ml de agua y la suspensión resultante se filtró para recoger el producto en bruto, que se lavó con acetona para producir 13 mg de un polvo de color amarillo fino (10,2 %).

RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9,43 (1H, s), 8,70 (1H, d, J = 5,5 Hz), 8,12 (1H, d, J = 5,4 Hz), 8,04 (1H, d, J = 7,6 Hz), 7,58 (1H, t, J = 7,5 Hz), 7,45 (1H, d, J = 8,1 Hz), 7,3 (1H, t, J = 7,1 Hz), 7,17 (1H, d, J = 8,3 Hz), 7,00 (1H, s), 6,90 (1H, d, J = 8,4 Hz), 3,71 (3H, s), 3,46 (3H, s). IE-EM *m/z*: 427,17 (M<sup>+</sup>, 10).

Procedimiento general para preparar los compuestos 614, 615 y 616:

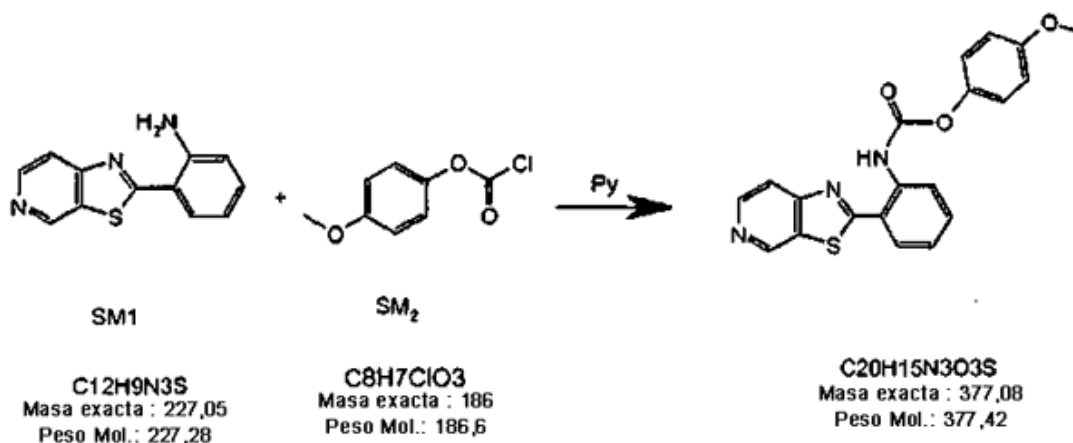
- 30 Los compuestos 615 y 616 se prepararon mediante esencialmente el mismo procedimiento que se detalla en lo sucesivo para la preparación del compuesto 614 usando 2-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenilamina como el material de partida y el isotiocianato apropiado.



A una mezcla de 2-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenilamina (68 mg, 0,3 mmol), isotiocianato de 4-(1H-pirazol-1-il)fenilo (60 mg, 0,3 mmol) y a una cantidad catalítica de DMAP se añadieron 8 ml de etanol. La reacción se mantuvo a 50 °C durante 48 horas. La suspensión se filtró, y se lavó con acetona meticulosamente para producir 10 mg (7 %) de producto. RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ 9,43 (1H, s), 8,58 (1H, d, J = 5,5 Hz), 8,47 (1H, m), 8,21 (1H, d, J = 7,9 Hz), 8,19 (1H, d, J = 7,4 Hz), 7,85 (2H, d, J = 8,9 Hz), 7,80 (1H, d, J = 8,9 Hz), 7,75 (1H, d, J = 6,7 Hz), 7,68 (2H, m), 7,61 (1H, m), 7,46 (1H, m), 6,55 (1H, m).

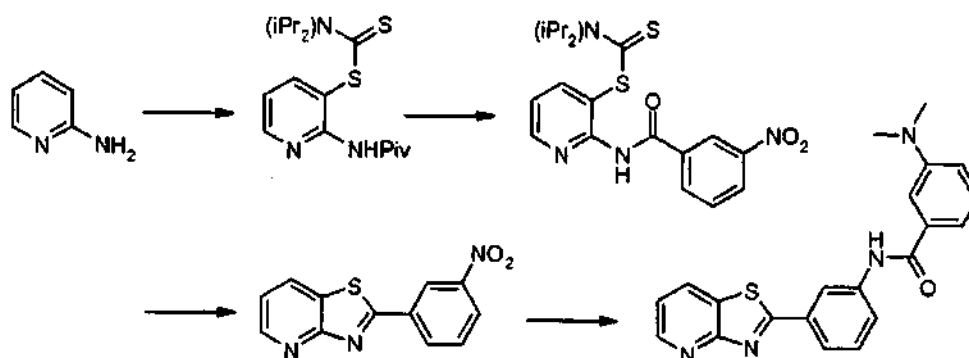
Procedimiento general para preparar el compuesto 597:

El compuesto 597 se preparó usando 2-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenilamina como el material de partida y el cloroformiato apropiado.



Se añadió cloroformiato de 4-metoxifenilo (56 mg, 0,3 mmol) a 2-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenilamina (68 mg, 0,3 mmol) en 2,5 ml de piridina y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Se añadió agua (5 ml) y la mezcla resultante se filtró. El producto en bruto recogido se lavó con agua y se secó para dar 11 mg (12 %). RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>) δ 9,27 (1H, s), 8,73 (1H, d, J = 5,5 Hz), 8,62 (1H, d, J = 8,4 Hz), 8,02 (1H, d, J = 5,5 Hz), 7,98 (1H, d, J = 7,8 Hz), 7,58 (1H, m), 7,23 (3H, m), 6,97 (2H, d, J = 8,9 Hz), 3,87 (3H, s).

Preparación del compuesto 200:



Se preparó 2-(3-nitrofenil)-tiazolo[4,5-b]piridina a partir de 2-amino-piridina en seis etapas usando el procedimiento descrito en Sulfur Letters 1995, 18 (2), 79-95. Paladio(0) sobre carbono (10 % p/p, 40 mg, 0,038

mmol) se añadió a ta a una mezcla de 2-(3-nitrofenil)-tiazolo[4,5-b]piridina (403 mg, 1,57 mmol), tolueno (2,5 ml), AcOH (2,5 ml) y metoxietanol (2,5 ml). La mezcla de reacción se puso bajo una atmósfera de H<sub>2</sub> (vacío / argón tres veces; vacío / H<sub>2</sub> tres veces) y se agitó a 50 °C durante 3 h y a 60 °C durante 1,5 h. Debido a que la reacción no se completó, se añadió otra porción de paladio sobre carbono (40 mg, 0,038 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 20 h. La mezcla de reacción se enfrió a ta, se filtró sobre Celite, y el filtrado se concentró a vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre SiO<sub>2</sub> con EtOAc / hexano (80:20) para dar la anilina deseada en forma de un sólido de color pardo. (Calc. para C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>S: 227,27, [M+H]<sup>+</sup> encontrado: 228,2).

A una solución de la tiazolo[4,5-b]piridin-2-il-fenilamina (40 mg, 0,176 mmol) y trietilamina (0,02 ml, 0,143 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 ml) se añadió clorhidrato de cloruro de 3-dimetilaminobenzóilo (47 mg, 0,213 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante una noche. Después de la dilución con agua, la capa ac. se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y la capa orgánica combinada se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a vacío. El producto en bruto se purificó por HPLC preparativa para dar el producto deseado. (Calc. para C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S: 74,46, [M+H]<sup>+</sup> encontrado: 375).

La preparación de los compuestos 198, 199, 201 y 202 se realizó de una forma análoga a la del compuesto 200.

#### *Ejemplo 2: Identificación de moduladores de la sirtuína*

Se usó un ensayo basado en espectrometría de masas o de polarización fluorescente para identificar moduladores de la actividad SIRT1. El mismo ensayo puede usarse para identificar moduladores de cualquier proteína sirtuína. El ensayo de polarización fluorescente utiliza uno de dos péptidos diferentes basados en un fragmento de p53, una diana de desacetilación de la sirtuína conocida. Los compuestos 1-18 se sometieron a prueba usando un sustrato que contiene péptido 1 que tiene 14 residuos de aminoácido tal como sigue: GQSTSSHK(Ac)NleSTEG (SEQ ID NO: 1) en donde K(Ac) es un residuo de lisina acetilada y Nle es una norleucina. El péptido está marcado con el fluoróforo MR121 (excitación 635 nm/ emisión 680 nm) en el extremo C-terminal y biotina en el extremo N-terminal. La secuencia del sustrato de péptido se basa en p53 con varias modificaciones. En particular, todos los residuos de arginina y de leucina distintos de la lisina acetilada se han sustituido con serina de tal modo que el péptido no es sensible a escisión con tripsina en ausencia de desacetilación. Además, el residuo de metionina naturalmente presente en la secuencia se ha sustituido con la norleucina debido a que la metionina puede ser sensible a la oxidación durante la síntesis y purificación. Los compuestos 19-56 se sometieron a prueba usando un sustrato que contiene el péptido 2 que tiene 20 residuos de aminoácido tal como sigue: EE-K(biotina)-GQSTSSHK(Ac)NleSTEG-K(MR121)-EE-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 2) en donde K(biotina) es un residuo de lisina biotinilado, K(Ac) es un residuo de lisina acetilada, Nle es norleucina y K(MR121) es un residuo de lisina modificado mediante un fluoróforo MR121. Este péptido está marcado con el fluoróforo MR121 (excitación 635 nm/ emisión 680 nm) en los extremos C-terminales y biotina en los extremos N-terminales. La secuencia de los sustratos de péptido se basan en p53 con varias modificaciones. En particular, todos los residuos de arginina y de leucina distintos de los residuos de lisina acetilada se han sustituido con serina de tal modo que los péptidos no son sensibles a escisión con tripsina en ausencia de desacetilación. Además, los residuos de metionina naturalmente presentes en las secuencias se han sustituido con la norleucina debido a que la metionina puede ser sensible a la oxidación durante la síntesis y purificación. Como un sustrato alternativo en el ensayo, el siguiente péptido 3 se ha usado también para someter a prueba los compuestos 19 a 56: Ac-EEK(biotina)-GQSTSSHK(Ac)NleSTEG-K(5TMR)-EE-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 3) en donde K(Ac) es un residuo de lisina acetilada y Nle es una norleucina. El péptido está marcado con el fluoróforo 5TMR (excitación 540 nm/ emisión 580 nm) en el extremo C-terminal. La secuencia del sustrato de péptido se basa también en p53 con varias modificaciones. Además, el residuo de metionina naturalmente presente en la secuencia se sustituyó con la norleucina debido a que la metionina puede ser sensible a la oxidación durante la síntesis y purificación.

Los sustratos de péptido se expusieron a una proteína sirtuína en presencia de NAD<sup>+</sup> para permitir la desacetilación del sustrato y hacerlo sensible a la escisión mediante tripsina. Entonces se añadió tripsina y la reacción se llevó hasta su compleción (es decir, se escinde el sustrato desacetilado) liberando el fragmento MR121 o 5TMR. Entonces se añade estreptavidina a la reacción cuando puede unir tanto el sustrato no escindido (es decir, cualquier sustrato acetilado restante) y la parte no fluorescente del sustrato de péptido escindido (es decir, el fragmento que contiene biotina). La señal de polarización fluorescente observada para los sustratos de péptido de longitud completa unidos a estreptavidina era mayor que la señal de polarización fluorescente observada para el fragmento C-terminal MR121 o 5TMR liberado. De este modo, la polarización fluorescente obtenida es inversamente proporcional al nivel de desacetilación (p. ej., la señal es inversamente proporcional a la actividad de la proteína sirtuína). Los resultados se leyeron en un lector de polarización fluorescente de microplata (Molecular Devices Spectramax MD) con filtros de excitación y emisión apropiados.

Los ensayos de polarización fluorescente ensayos usando el péptido 1 se realizaron tal como sigue: 0,5 μM de sustrato de péptido y 150 μM de βNAD<sup>+</sup> se incubó con 0,1 μg/ml de SIRT1 durante 60 minutos a 37 °C en un tampón de reacción (25 mM de Tris-acetato pH 8, 137 mM de Na-Ac, 2,7 mM de K-Ac, 1 mM de Mg-Ac, 0,05 % de Tween-20, 0,1 % de Pluronic F127, 10 mM de CaCl<sub>2</sub>, 5 mM de DTT, 0,025 % de BSA, 0,15 mM de nicotinamida). Los compuestos de prueba 1-18 se solubilizaron en DMSO y se añadieron a la reacción a 11 concentraciones que oscilaban desde 0,7 μM hasta 100 μM.

Los ensayos de polarización fluorescente usando el péptido 2 pueden realizarse tal como sigue: 0,5  $\mu\text{M}$  de sustrato de péptido y 120  $\mu\text{M}$  de  $\beta\text{NAD}^+$  se incubaron con 3 nM de SIRT1 durante 20 minutos a 25 °C en un tampón de reacción (25 mM de Tris–acetato pH 8, 137 mM de Na–Ac, 2,7 mM de K–Ac, 1 mM de Mg–Ac, 0,05 % de Tween–20, 0,1 % de Pluronic F127, 10 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM de DTT, 0,025 % de BSA). Los compuestos de prueba 19–56 se solubilizaron en DMSO y se añadieron a la reacción a 10 concentraciones que oscilaban desde 300  $\mu\text{M}$  hasta 0,15  $\mu\text{M}$  en diluciones de tres veces.

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 añadieron 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de tripsina para escindir el sustrato desacetilado. La reacción se incubó durante 30 minutos a 37 °C en presencia de 1  $\mu\text{M}$  de estreptavidina. La polarización fluorescente se determinó a longitudes de onda de excitación (650 nm) y de emisión (680 nm). El nivel de actividad de la proteína sirtuina en presencia de las diversas concentraciones de compuesto de prueba se determina entonces y puede compararse con el nivel de actividad de la proteína sirtuina en ausencia del compuesto de prueba, y/o el nivel de actividad de las proteínas sirtuina en el control negativo (p. ej., nivel de inhibición) y control positivo (p. ej., nivel de activación) que se describen a continuación.

Para los ensayos de polarización fluorescente, un control para la inhibición de la actividad de la sirtuina se realiza añadiendo 1  $\mu\text{l}$  de nicotinamida 500 mM como control negativo al inicio de la reacción (p. ej., permite la determinación de la inhibición máxima de la sirtuina). Un control para la activación de la actividad de la sirtuina se realizó usando 3 nM de proteína sirtuina, con 1  $\mu\text{l}$  de DMSO en lugar de compuesto, para alcanzar la desacetilación de referencia del sustrato (p. ej., para determinar la actividad de la sirtuina normalizada).

El ensayo basado en espectrometría de masas utiliza un péptido que tiene 20 residuos de aminoácido tal como sigue: Ac–EE–K(biotina)–GQSTSSHAK(Ac)NleSTEG–K(5TMR)–EE–NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 3) en donde K(Ac) es un residuo de lisina acetilada y Nle es una norleucina. El péptido está marcado con el fluoróforo 5TMR (excitación 540 nm/ emisión 580 nm) en el extremo C–terminal. La secuencia del sustrato de péptido se basa en p53 con varias modificaciones. Además, el residuo de metionina naturalmente presente en la secuencia se sustituyó con la norleucina debido a que la metionina puede ser sensible a la oxidación durante la síntesis y purificación.

El ensayo de espectrometría de masa se realiza tal como sigue: 0,5  $\mu\text{M}$  de sustrato de péptido y 120  $\mu\text{M}$  de  $\beta\text{NAD}^+$  se incuban con 10 nM de SIRT1 durante 25 minutos a 25 °C en un tampón de reacción (50 mM de Tris–acetato pH 8, 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 1 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM de DTT, 0,05 % de BSA). Los compuestos de prueba pueden añadirse a la reacción tal como se describe anteriormente. El gen SirT1 se clona en un promotor de T7 que contiene vector y se transforma en BL21(DE3). Después de la incubación de 25 minutos con SIRT1, se añaden 10  $\mu\text{l}$  de ácido fórmico al 10 % para detener la reacción. Las reacciones se sellan y congelan para su posterior análisis mediante espectrometría de masas. La determinación de la masa del péptido de sustrato permite una determinación precisa del grado de acetilación (es decir material de partida) en comparación con el péptido desacetilado (producto).

Para el ensayo basado en espectrometría de masas, se realiza un control para la inhibición de la actividad de la sirtuina añadiendo 1  $\mu\text{l}$  de nicotinamida 500 mM como control negativo al inicio de la reacción (p. ej., permite la determinación de la inhibición máxima de la sirtuina). Se realiza un control para la activación de la actividad de la sirtuina usando 10 nM de proteína sirtuina, con 1  $\mu\text{l}$  de DMSO en lugar de compuesto, para determinar la cantidad de desacetilación del sustrato en un momento dado dentro del intervalo lineal del ensayo. Este momento es el mismo que se usa para compuestos de prueba y, dentro del intervalo lineal, el punto final representa un cambio en la velocidad.

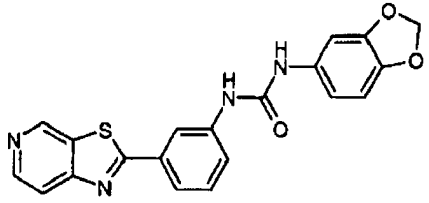
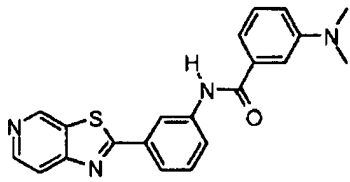
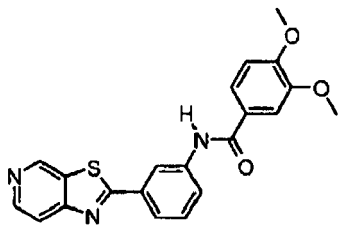
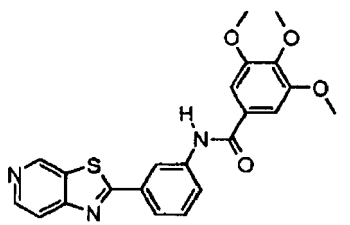
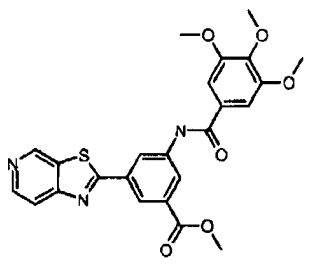
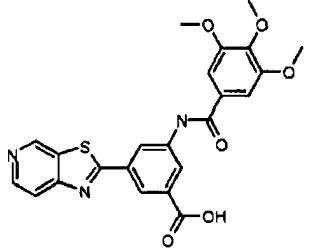
Para cada uno de los ensayos anteriores, la proteína SIRT1 se expresó y se purificó tal como sigue. El gen SirT1 se clonó en un promotor de T7 que contiene vector y se transformó en BL21(DE3). La proteína se expresó mediante inducción con 1 mM de IPTG como una proteína de fusión de cola de His N–terminal a 18 °C durante la noche y se recogió a 30.000 x g. Las células se lisaron con lisozima en tampón de lisis (50 mM de Tris–HCl, 2 mM de Tris[2–carboxietil]fosfina (TCEP), 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$ , 200 mM de NaCl) y se trataron adicionalmente con sonicación durante 10 min para la lisis completa. La proteína se purificó sobre una columna de Ni–NTA (Amersham) y se reunieron las fracciones que contenían proteína pura, se concentraron y se pasaron sobre una columna de clasificación por tamaños (Sephadex S200 26/60 global). El pico que contiene proteína soluble se recogió y se pasó sobre una columna de intercambio iónico (MonoQ). La elución en gradiente (200 mM – 500 mM de NaCl) produjo la proteína pura. Esta proteína se concentró y se dializó frente a tampón de diálisis (20 mM de Tris–HCl, 2 mM de TCEP) durante la noche. Se tomaron alícuotas de la proteína y se congelaron a –80°C hasta un uso posterior.

Los compuestos moduladores de la sirtuina que activaban SIRT1 se identificaron usando el ensayo que se describe anteriormente y se muestran a continuación en la tabla 4. Los compuestos moduladores de la sirtuina que inhibían SIRT1 se identificaron usando el ensayo que se describe anteriormente y se muestran a continuación en la tabla 5. Los valores de  $\text{DE}_{50}$  para los compuestos activantes en el ensayo de polarización fluorescente ensayo (FP) o ensayo de espectrometría de masas (EM) se representan mediante A' ( $\text{DE}_{50} = < 5 \mu\text{M}$ ), A ( $\text{DE}_{50} = 5–50 \mu\text{M}$ ), B ( $\text{DE}_{50} = 51–100 \mu\text{M}$ ), C ( $\text{DE}_{50} = 101–150 \mu\text{M}$ ), y D ( $\text{DE}_{50} = >150 \mu\text{M}$ ). NT significa que el compuesto no se sometió a prueba usando el ensayo indicado. NA significa que el compuesto no fue activo en el ensayo indicado. La activación en veces, tal como se determina mediante EM se representa mediante A (activación en veces  $> 250 \%$ ), B (activación

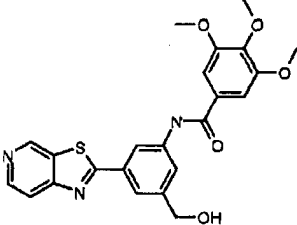
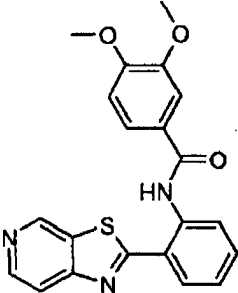
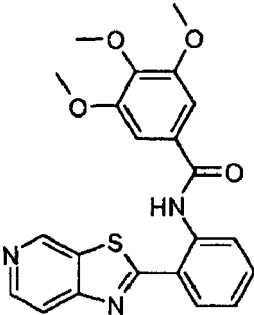
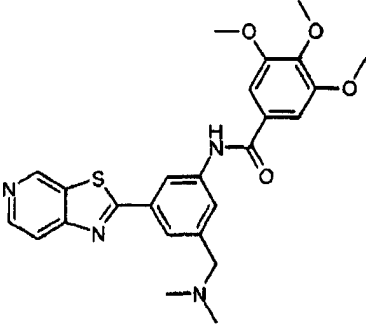
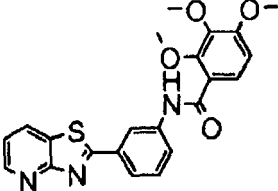
en veces < 250 %), o C (ninguna activación en veces). La  $DE_{50}$  de resveratrol para activación de SIRT1 es 16  $\mu\text{M}$  y la activación en veces de resveratrol para SIRT1 en el ensayo de EM es aproximadamente 200 %. De forma similar, los valores de  $CI_{50}$  para los compuestos inhibidores se representan por A ( $CI_{50} = < 50 \mu\text{M}$ ), B ( $CI_{50} = 51-100 \mu\text{M}$ ), C ( $CI_{50} = 101-150 \mu\text{M}$ ), y D ( $CI_{50} = > 150 \mu\text{M}$ ).

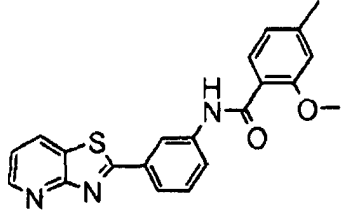
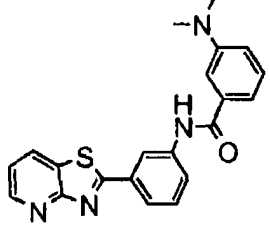
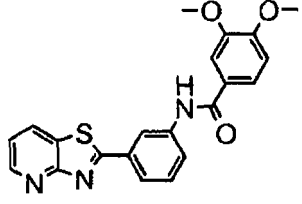
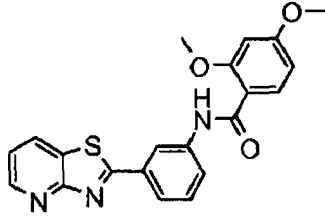
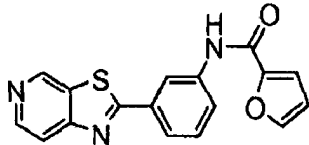
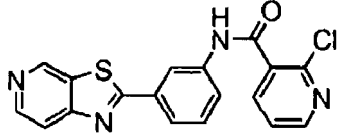
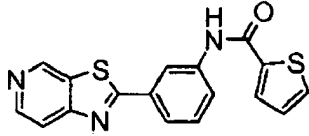
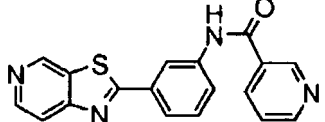
5

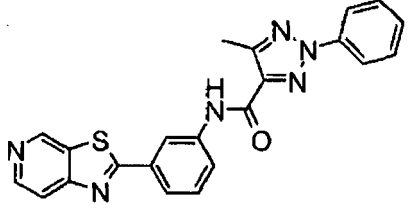
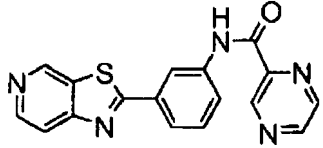
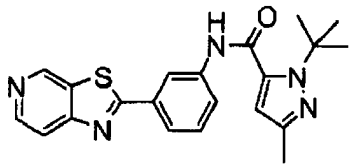
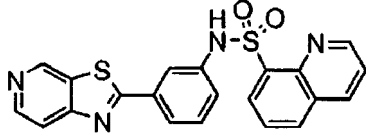
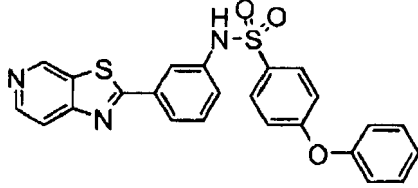
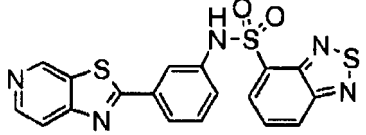
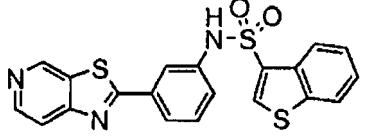
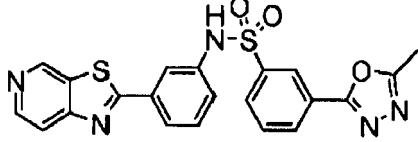
Tabla 4. Activadores de Sirt1

COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	$DE_{50}$ ENSAYO DE FP	$DE_{50}$ ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
99	391			A'	A
113	375			A	B
114	392			A'	A
115	422			A	A
133	480			A'	B
134	466			A'	B

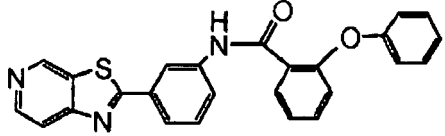
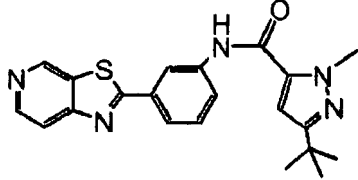
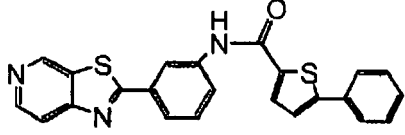
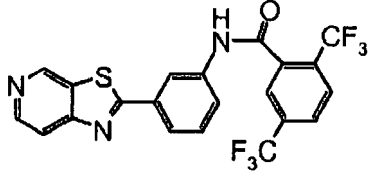
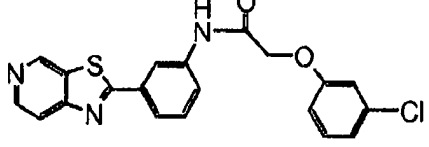
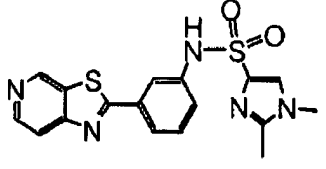
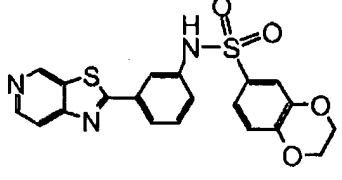


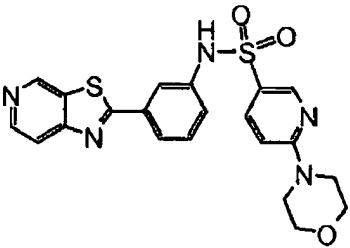
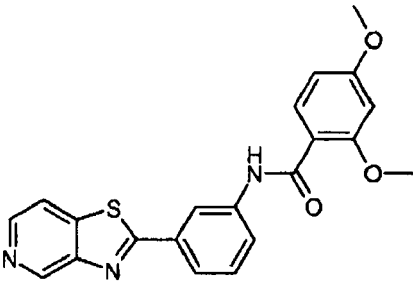
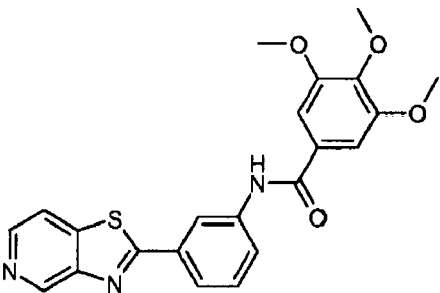
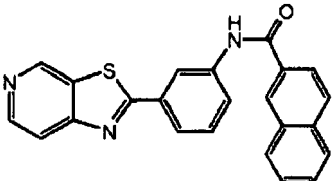
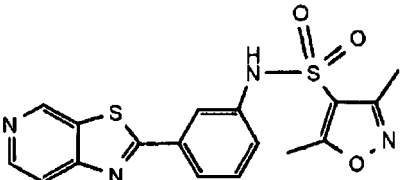
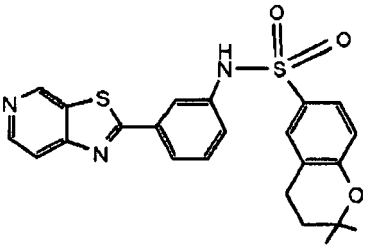
COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
135	452			A'	B
162	392,1			A'	B
163	422,1			A'	B
174	479			B	A
198	422,4			A	B

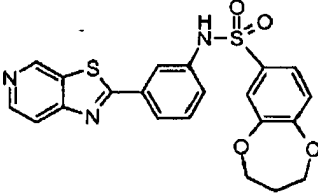
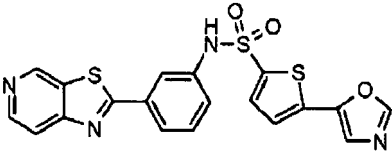
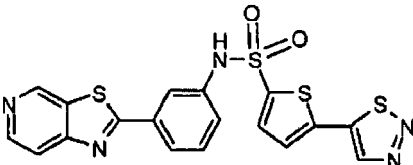
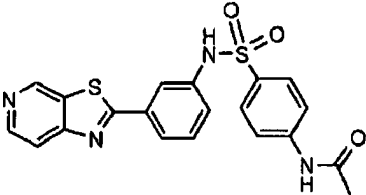
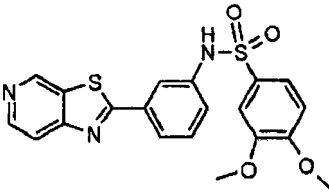
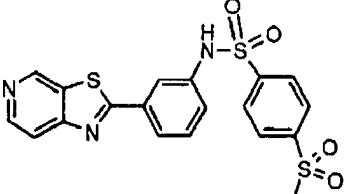
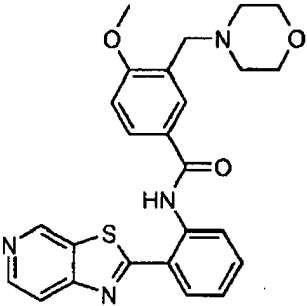
COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
199	375,9			A'	B
200	375,4			A'	B
201	391,9			A	B
202	392,4			A'	B
221	321,4			A	B
222	366,8			A	B
223	337,4			A'	B
225	332,4			NA	C

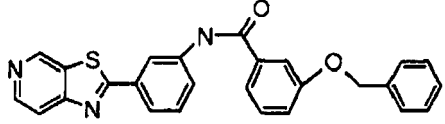
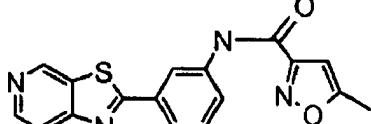
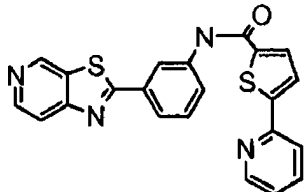
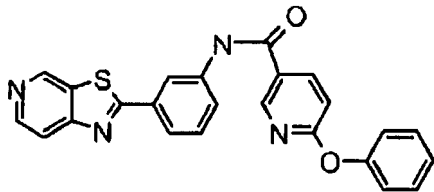
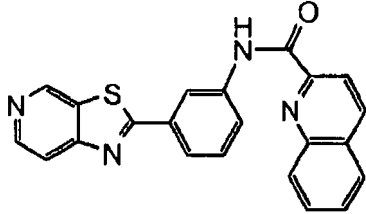
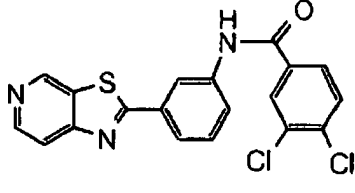
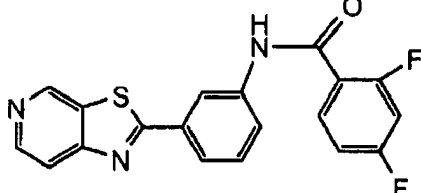
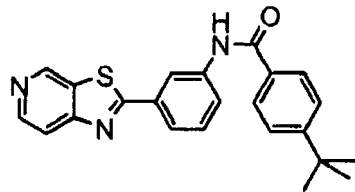
COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
226	412,5				
227	333,4			NA	C
228	391,5			A	A
229	418,5			NA	C
230	459,5			NA	C
231	425,5			NA	C
232	423,5			NA	C
234	449,5			NA	C

COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
235	436,3			NA	C
236	423,5			NA	C
237	450,5			NA	C
238	480,5			A'	B
239	466,5			A	B
240	392,4			NA	C
241	397,2			A'	B
244	332,4			NA	C

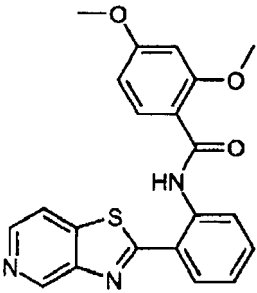
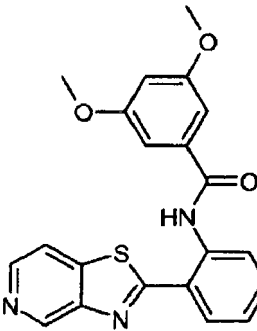
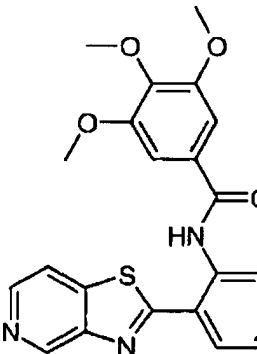
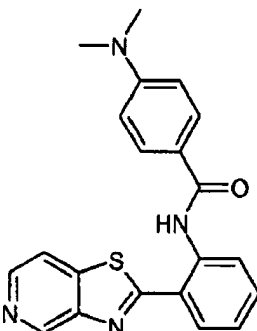
COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
245	423,5			A'	B
246	391,5			A'	B
247	413,5			NA	C
248	467,4			A	B
249	395,9			NA	C
250	385,5			NA	C
251	425,5			NA	C

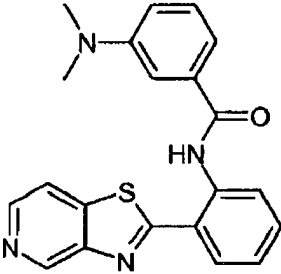
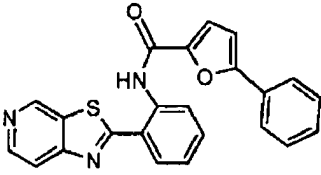
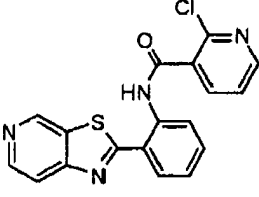
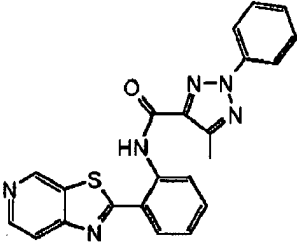
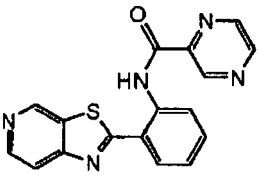
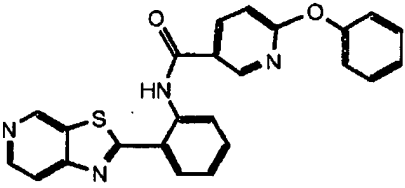
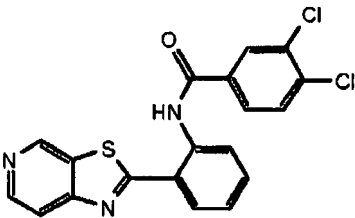
COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
252	453,5			NA	C
272	392			A'	B
273	422			A	A
280	381,5				
282	386,5			NA	C
283	451,6			NA	C

COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
284	439,5			NA	C
285	440,5			NA	C
287	457,6				
288	424,5			A	B
289	427,5			A	B
290	445,5			NA	C
295	252,1			A'	B

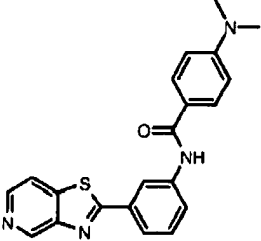
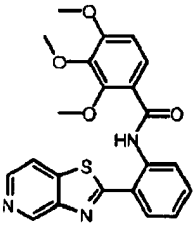
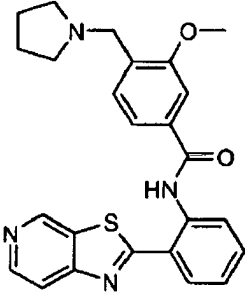
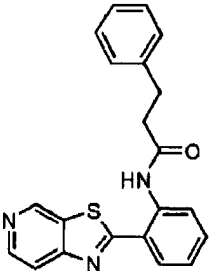
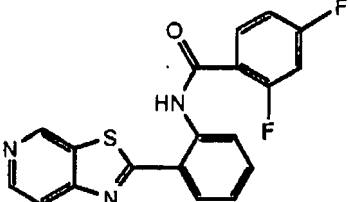
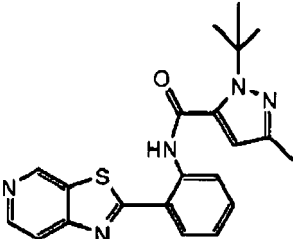
COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
303	437,5			NA	
304	336,4			A'	B
305	414,5			NA	
306	424,5			A	B
307	382,4			A'	A
308	400,3			NA	
309	367,4			NA	
310	387,5			NA	

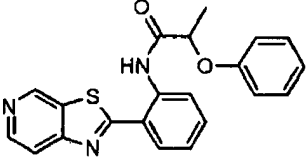
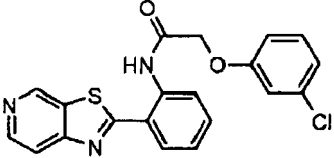
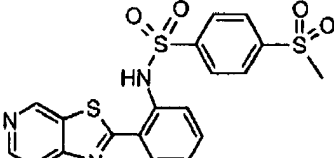
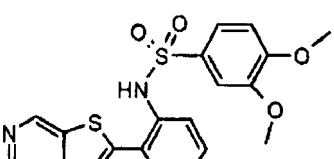
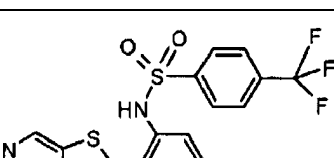
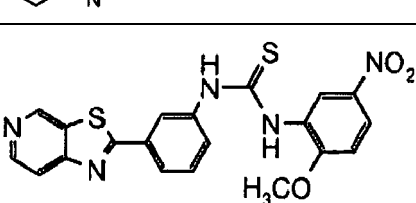
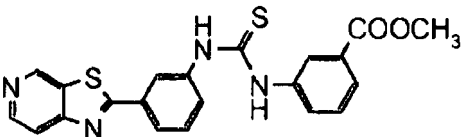
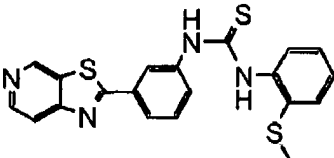


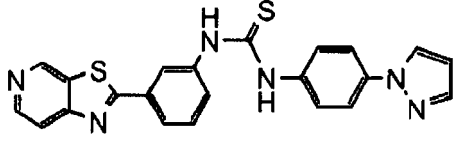
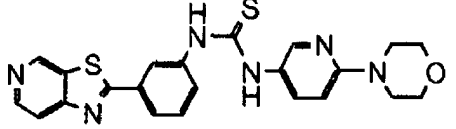
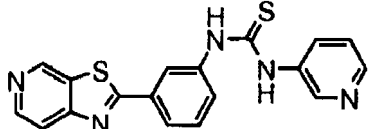
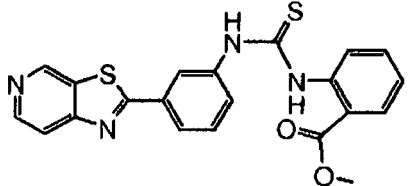
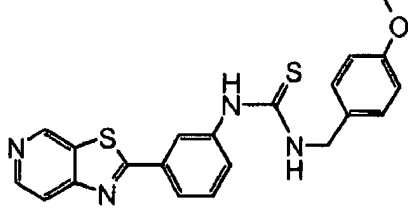
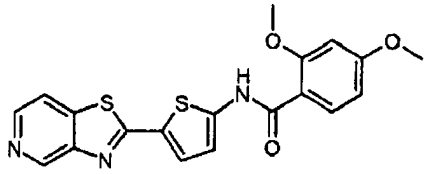
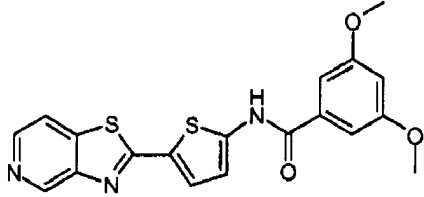
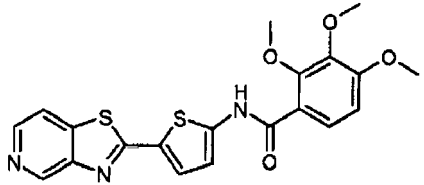
COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
317	392			A'	B
318	392			A	B
319	422			A'	B
320	375			A'	B

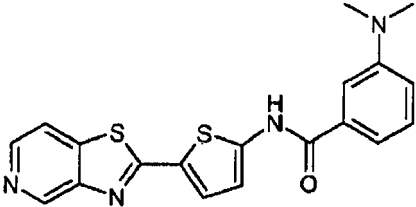
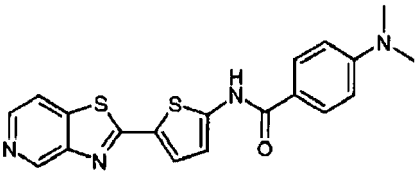
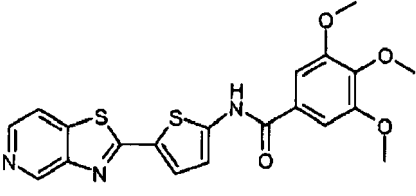
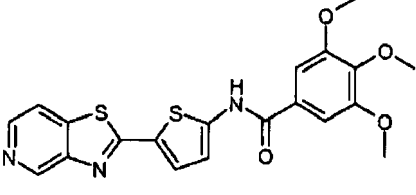
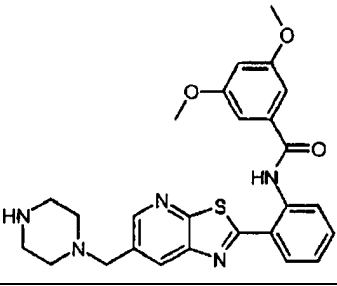
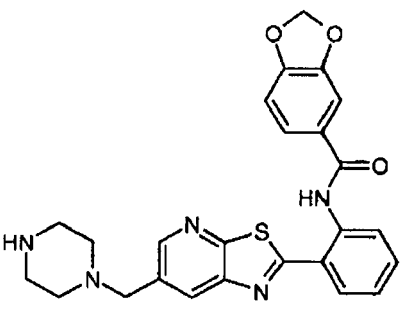
COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
321	375			A'	B
385	397,2			NA	
387	366,8			NA	
390	412,5			A	B
391	333,4			A	B
392	424,5			A	B
393	400,3			NA	

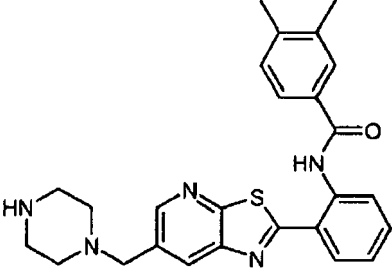
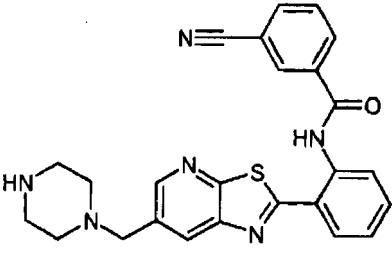
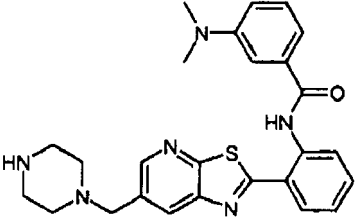
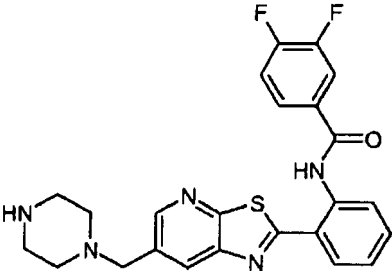
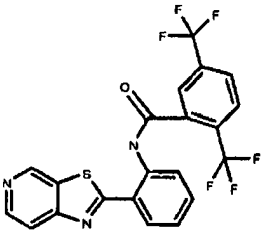
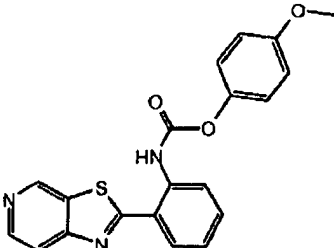
COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
394	457,6			NA	
396	389,5			A	B
398	460,1			A	B
399	424,5			A	B
400	392			NA	
401	422			A	B
402	375			A'	B

COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
403	375			A'	B
411	422			A	B
436	445,1			A	A
460	359,4			A	B
461	367,4			NA	
462	391,5			A'	B

COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
463	375,4			A	B
465	395,9			NA	
466	445,5			NA	
467	427,2			NA	
469	435,4			NA	
472	437,5			NA	
473	420,5			A'	B
475	408,6			NA	

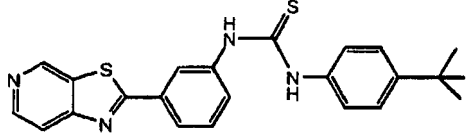
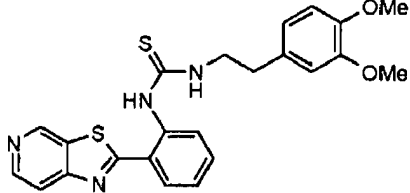
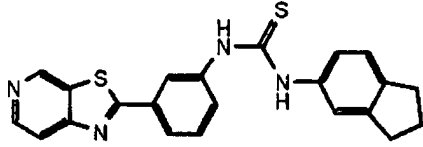
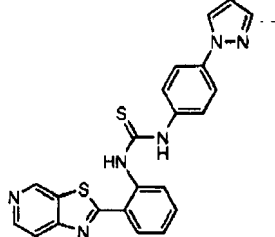
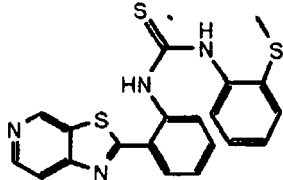
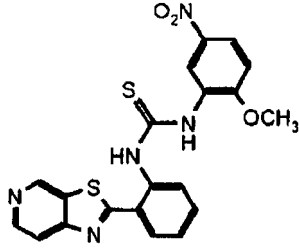
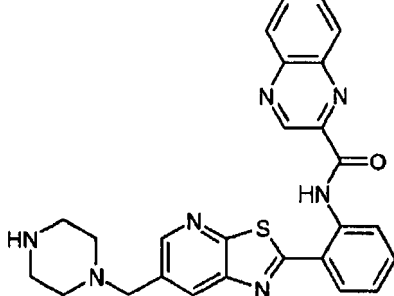
COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
481	428,5			A	B
484	448,6			A	B
485	363,5			A	A
491	420,5			NA	
498	406,5			A	B
515	398			A'	B
516	398			NA	
517	428			NA	

COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
518	381			A'	B
519	381			A'	B
520	428			A'	B
588	520			A	A
589	490			A'	A
590	474			A	B

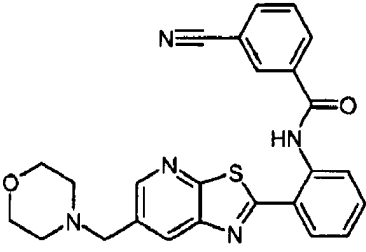
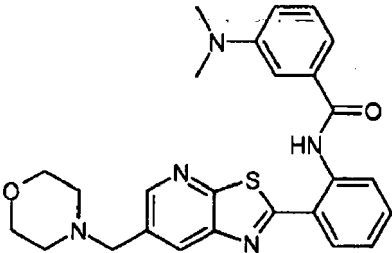
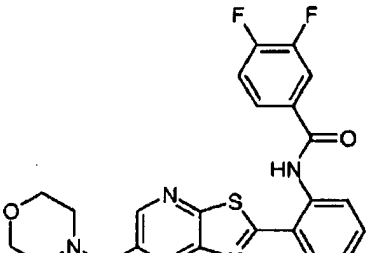
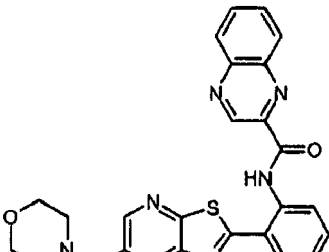
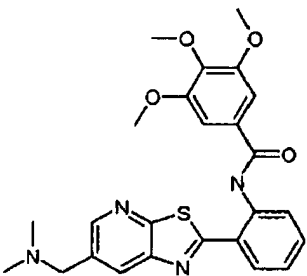
COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
591	458			A'	A
592	455			A'	B
593	473			A'	A
594	466			A	B
596	467,4			A'	B
597	377,2			A'	B

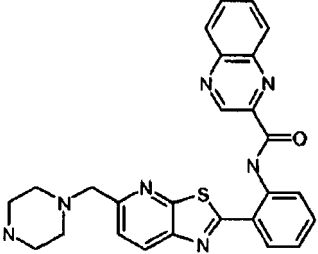
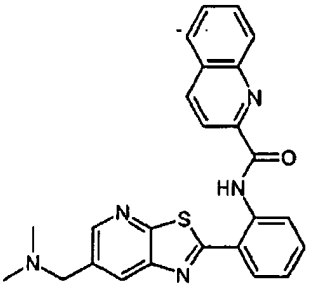
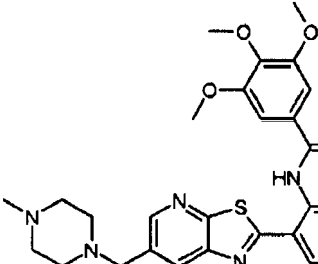
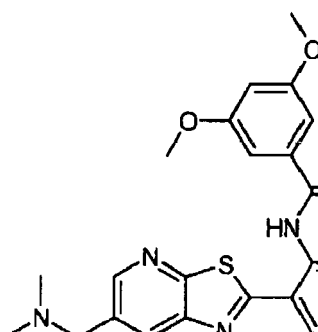


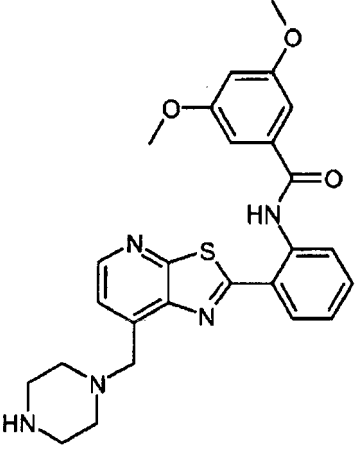
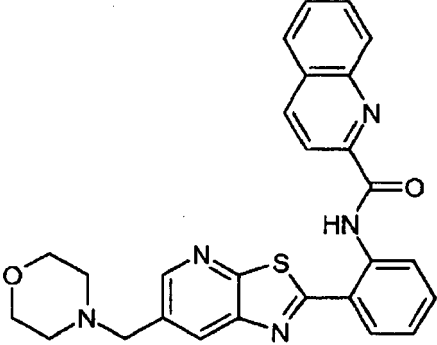
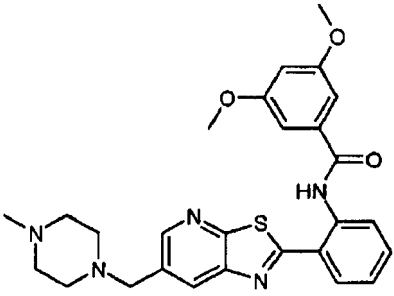
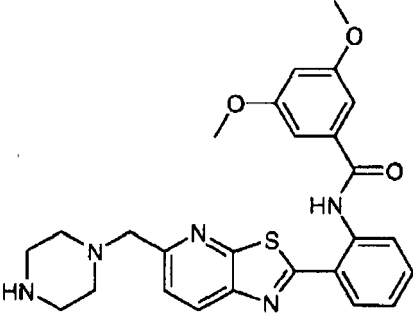
COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
599	422,3			A'	B
600	422,5			D	B
601	405,5			NA	
604	360,4			NA	
605	377,4			NA	
607	415,4			NA	
608	331,4			NA	
609	439,3			NA	

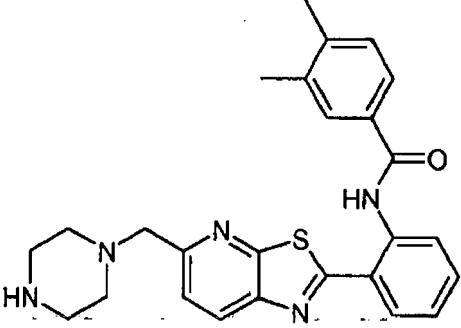
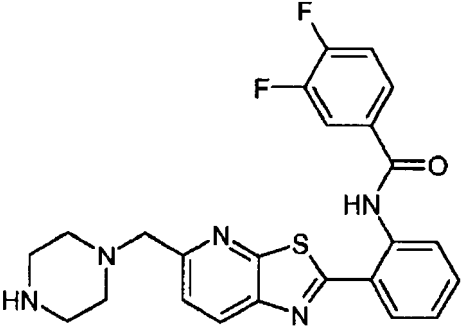
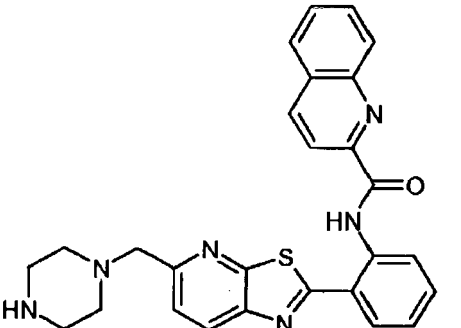
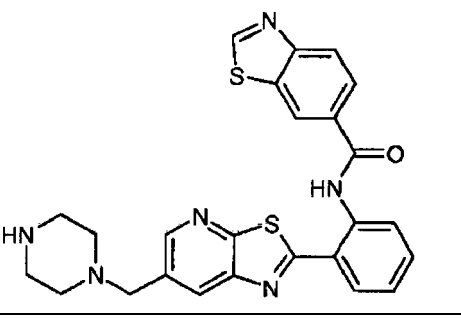
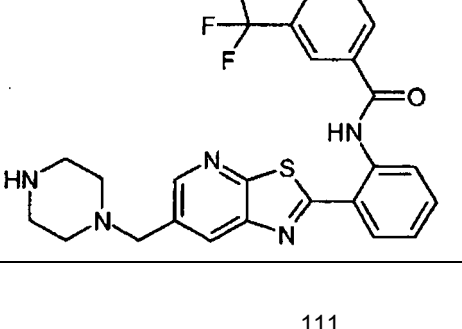
COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
610	418,6			NA	
611	465,6			A'	B
612	402,5			NA	
614	428,3			NA	
615	408,6			NA	
616	437,5				
622	482			A'	A

COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
646	481			A	A
681	522			A	A
682	492			A'	A
683	475			A	B
684	460			A	B

COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
685	456			A'	B
686	475			A'	A
687	467			NA	C
688	483			NA	C
689	479			A	A

COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
690	483			A'	A
701	477			A'	A
702	534			A	A
722	449			A'	A

COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
723	490			A	A
724	482			A'	A
725	505			A'	A
726	491			A'	A

COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
727	458			A'	A
728	466			A	A
729	481			A'	A
730	488			A	A
731	498			A	A

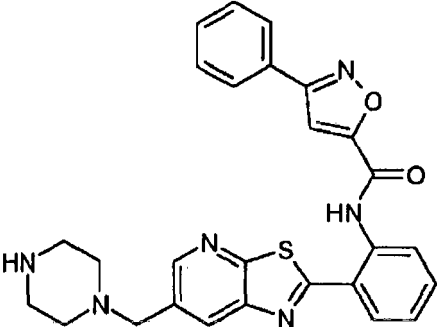
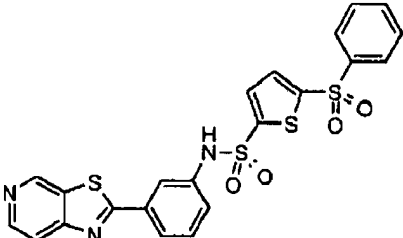
COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE EM	ACT. EN VECES EM
732	497			A'	B

Table 5. Inhibidores de Sirt1

COMPUESTO N.º	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	CI <sub>50</sub> ENSAYO DE FP	CI <sub>50</sub> ENSAYO DE EM
654				D

*Ejemplo 3: Identificación de Moduladores de la sirtuína usando SIRT3*

Se usó un ensayo de polarización fluorescente para identificar la actividad e moduladores de SIRT3. El mismo ensayo puede usarse para identificar moduladores de cualquier proteína sirtuína. El ensayo utiliza un sustrato de péptido basado en un fragmento de histona H4, una diana de desacetilación de la sirtuína conocida. El sustrato contiene un péptido que tiene 14 residuos de aminoácido tal como sigue: Biotina–GASSHSK(Ac)VLK(MR121) (SEQ ID NO: 4) en donde K(Ac) es un residuo de lisina acetilada. El péptido está marcado con el fluoróforo MR121 (excitación 635 nm/ emisión 680 nm) en el extremo C–terminal y biotina en el extremo N–terminal.

El sustrato de péptido se expone a una proteína sirtuína en presencia de NAD<sup>+</sup> para permitir la desacetilación del sustrato y hacerlo sensible a render a escisión por tripsina. La tripsina se añade entonces y la reacción se lleva a to compleción (es decir, el sustrato desacetilado se escinde) liberando el fragmento MR121. Entonces se añade estreptavidina a la reacción en la que puede unir tanto el sustrato no escindido (es decir, cualquier resto acetilado restante) y la parte no fluorescente del sustrato de péptido escindido (es decir, el fragmento que contiene biotina). La señal de polarización fluorescente observada para el sustrato de péptido de longitud completa unido a estreptavidina es mayor que la señal de polarización fluorescente observada para el fragmento MR121 C–terminal liberado. Por lo tanto, la polarización fluorescente obtenida es inversamente proporcional al nivel de desacetilación (p. ej., la señal es inversamente proporcional a la actividad de la proteína sirtuína). Los resultados se leen en un lector de polarización fluorescente de microplaca (Molecular Devices Spectramax MD) con filtros de excitación y emisión apropiados.

Los ensayos de polarización fluorescente pueden realizarse tal como sigue: 0,5 μM de sustrato de péptido y 50 μM de βNAD<sup>+</sup> se incuba con 2 nM de SIRT3 durante 60 minutos a 37 °C en un tampón de reacción (25 mM de Tris–acetato pH 8, 137 mM de Na–Ac, 2,7 mM de K–Ac, 1 mM de Mg–Ac, 0,1 % de Pluronic F127, 10 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1 mM de TCEP, 0,025 % de BSA). Los compuestos de prueba se solubilizan en DMSO y se añaden a la reacción a 11 concentraciones que oscilaban desde 0,7 μM hasta 100 μM. La proteína SIRT3 usada en los ensayos correspondía a los residuos de aminoácido 102–399 de SIRT3 humana con una cola de His N–terminal. La proteína se sobreexpresó *E. coli* y se purificó sobre una columna de quelato de níquel usando técnicas convencionales. Después de la 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 añaden 0,5 μg/ml de tripsina para escindir el sustrato desacetilado. La reacción se incuba durante 30 minutos a 37 °C en presencia de 1 mM de estreptavidina. La polarización fluorescente se determina a longitudes de onda de excitación (650 nm) y de emisión (680 nm). El nivel de actividad de la proteína sirtuína en presencia de las diversas concentraciones de compuesto de prueba se



determinan entonces y pueden compararse con el nivel de actividad de la proteína sirtuina en ausencia del compuesto de prueba, y/o el nivel de actividad de las proteínas sirtuina en el control negativo (p. ej., nivel de inhibición) y control positivo (p. ej., nivel de activación) que se describen a continuación.

- 5 Se realiza un control para la inhibición de la actividad de la sirtuina añadiendo 30 mM de nicotinamida al inicio de la reacción (p. ej., permite la determinación de la inhibición máxima de la sirtuina). Un control para la activación de la actividad de la sirtuina se realiza 0,5 µg/ml de proteína sirtuina para alcanzar la desacetilación de referencia del sustrato (p. ej., para determinar la actividad de la sirtuina normalizada).

*Ejemplo 4: Ensayos basados en células de la actividad de la sirtuina*

- 10 *Ensayo de movilización de grasa.* Se siembran en placa células 3T3 L1 con 2 ml de 30.000 células/ml en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)/10 % de suero de ternero recién nacido en placas de 24 pocillos. Entonces se dejan diferenciarse los pocillos individuales mediante la adición de rosiglitazona 100 nM. Las células control no diferenciadas se mantienen en DMEM reciente/10 % de suero de ternero recién nacido durante toda la duración del ensayo. A las 48 horas (2 días), se inicia adipogénesis mediante la adición de DMEM/10 % de suero de ternero fetal /0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX)/1 µM de dexametasona. A las 96 horas (4 días), se permite progresar la adipogénesis mediante la eliminación de los medios y añadiendo 2 ml de DMEM/10 % de suero de ternero fetal a cada pocillo junto con o bien 10 µg/ml de insulina o bien 100 nM de rosiglitazona. A las 144 horas (6 días) y 192 horas (8 días), todos los pocillos se cambian a DMEM/10 % de suero de ternero fetal.

- 20 A las 240 horas (10 días a partir del cultivo en placa de células original), se añaden compuestos de prueba a un intervalo de concentraciones a pocillos individuales por triplicado junto con 100 nM de rosiglitazona. Tres pocillos de células no diferenciadas se mantienen en DMEM reciente/10 % de suero de ternero recién nacido y tres pocillos de células control diferenciadas se mantienen en DMEM reciente/10 % de suero de ternero recién nacido con 100 nM de rosiglitazona. Como un control positivo para la movilización de grasa, se usa resveratrol (un activador de SIRT1) a concentraciones que oscilan en diluciones de tres veces desde 100 µM hasta 0,4 µM.

- 25 A las 312 horas (13 días), los medios se retiran y las células se lavan dos veces con PBS. Se añaden 0,5 ml de disolución Oil Red O (suministrado en Adipogenesis Assay Kit, n.º de cat. ECM950, Chemicon International, Temecula, CA) por pocillo, incluyendo pocillos que no tienen ninguna células como control de referencia. Las placas se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente, y entonces se añade la disolución de tinción Oil Red O y los pocillos se lavan 3 veces con 1 ml de disolución de lavado (Adipogenesis Ensayo Kit). Después de retirarse el último lavado, se visualizan las placas teñidas, se escanean o fotografían. Se extrae el colorante (Adipogenesis Assay Kit) y se cuantifica en un lector de placas a 520 nM. Los resultados cuantitativos y visuales se muestran en la figura 16.

- 30 *Ensayo de protección de células de ganglión de raíz dorsal primario (DRG).* Se someten a prueba compuestos de prueba un ensayo de protección de axón tal como se describe (Araki y col. (2004) Science 305(5686):1010–3). Brevemente, se cultivan explantos de DRG de ratón de embriones E12.5 en presencia de 1 nM de factor de crecimiento nervioso. Las células no neuronales se retiran de los cultivos añadiendo 5-fluorouracilo al medio de cultivo. Los compuestos de prueba se añaden de 12 a 24 horas antes de transacciones de axón. La transección de neuritas se realizó a los 10–20 días *in vitro* (DIV) usando una aguja de calibre 18 para eliminar los cuerpos de célula neuronal.

*Ejemplo 5: Ensayo basado en células de ATP*

- 40 Este ejemplo describe el efecto del activador de SIRT1, resveratrol sobre los niveles de ATP celular en células NCI-H358. Los niveles de ATP celular son una medición indirecta de las tasas metabólicas celulares y, por extensión, la función mitocondrial. Como activación de SIRT1 se ha vinculado una biogénesis mitocondrial aumentada *in vivo*, este estudio está diseñado para determinar si el resveratrol aumenta la función mitocondrial, usando los niveles de ATP celular como la lectura. El ensayo de ATP se combina con un ensayo de viabilidad celular de tal modo que los niveles de ATP celular pueden normalizarse con respecto a células viables. Los niveles de ATP celular se midieron usando el kit ATPLite 1Step (PerkinElmer) y la viabilidad celular se midió usando el colorante permeable para las células, AlamarBlue™.

El ensayo de ATP celular es un ensayo multiplexado que mide tanto los niveles de ATP como la viabilidad de una muestra de células dada. Este ensayo se ejecuta en una placa de ensayo de 96 pocillos y los datos se notifican como la [ATP]/viabilidad para cada pocillo en la placa de ensayo.

- 50 El kit ATPLite 1Step™ es un ensayo basado en células luminiscente de una sola etapa para la detección de ATP. El kit contiene mezcla de sustrato liofilizado, compuesta por luciferina D15 y la enzima luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*). Adicionalmente, el kit contiene un tampón de reconstitución basado en detergente que induce la lisis de membranas celulares. La luciferasa en la mezcla de ensayo cataliza una reacción entre el ATP celular libre y D-luciferina para producir bioluminiscencia de acuerdo con la reacción esquemática resumida a continuación. La cantidad de luz producida es proporcional a la concentración de ATP celular.

El ensayo AlamarBlue™ es un ensayo de una sola etapa que utiliza un colorante soluble, no tóxico, permeable para las células que se añade a medios de crecimiento celular. Este colorante experimenta reducción de electrones en

células viables pero no células muertas. El producto de colorante reducido proporciona una señal fluorescente que puede monitorizarse con un lector de placas de fluorescencia (excitación 545 nm y emisión 575 nm). La cantidad de fluorescencia generada en un pocillo dado es proporcional al número de células viables. La señal de viabilidad generada mediante este ensayo se usa para normalizar la señal de ATP a partir de los resultados del ensayo ATPLite 1Step™.

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

El efecto de resveratrol sobre los niveles de ATP celular en NCI-H358 células (100 µl) se examinó usando el ensayo de ATP celular tal como se describe. El diseño experimental se resume en la figura 1. En este ensayo se sembraron células NCI-H358 (obtenidas de Colección Americana de Cultivo de Tejidos, ATCC) en microplacas de 96 pocillos (10<sup>4</sup> células/pocillo). El medio de crecimiento NCI-H358 consiste en medio RPMI 1640 complementado con el 10 % de FBS, 100 mg/ml estreptomina, 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 del 0,5 %; 12 réplicas por placa). Después de 48 horas de tratamiento con compuesto en condiciones de crecimiento celular, las placas se retiraron del incubador, y se añadieron 15 µl de colorante AlamarBlue™ a cada pocillo. Se incubaron microplacas celulares con colorante durante 2 horas en condiciones de crecimiento, y posteriormente se midió la fluorescencia usando un lector de placas. El medio que contiene AlamarBlue™ se retiró, y se lavaron las placas en 100 µl de PBS por pocillo. Este lavado se retiró, y se añadieron 200 µl de 1x reactivo ATPLite 1Step a cada pocillo. Entonces se midió la luminiscencia usando un lector de placas. La señal de ATP para cada pocillo, medida mediante la exploración de luminiscencia, se normalizó con respecto a su valor de viabilidad celular correspondiente, medido mediante la exploración de fluorescencia, para generar el nivel de ATP promedio por unidad de célula viable (ATP/vCell). La ATP/vCell para cada tratamiento se normalizó entonces con respecto a la ATP/vCell de vehículo promedio para su microplaca celular respectiva, proporcionando la ATP/vCell normalizada (ATP/vCell norm.). Finalmente, la ATP/vCell norm. para cada tratamiento único se promedió a través de replicados de placa, generando la ATP/vCell norm. promedio. Dosis de resveratrol que aumentan los niveles de ATP celular tienen valores de ATP/vCell normalizados mayores de 1,0. la concentración de resveratrol que proporciona el 50 % del aumento máximo en ATP/vCell normalizada (CE<sub>50</sub> ATP) se determinó mediante un análisis de curva de mejor ajuste usando un modelo de curva dosis-respuesta sigmoidal.

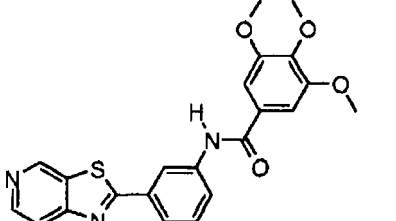
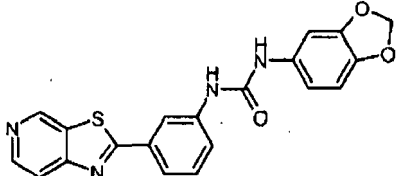
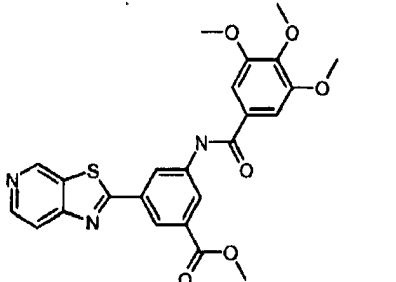
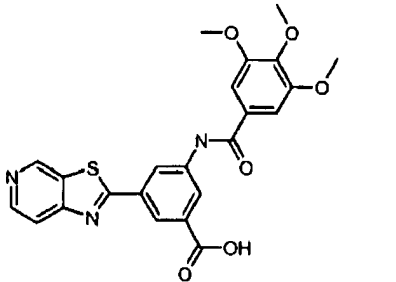
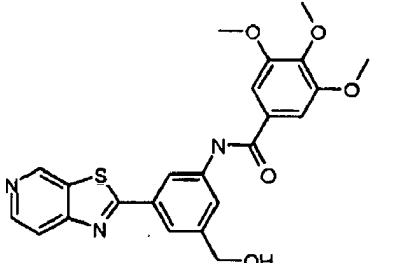
Se midieron los niveles de ATP de células tratadas con 10 concentraciones de resveratrol o vehículo solo. Cada uno de estos niveles de ATP se normalizó con respecto a la viabilidad celular en el pocillo de tratamiento correspondiente, generando el valor de ATP/vCell. Cada valor de ATP/vCell se normalizó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

Los datos se representan como la ATP/vCell normalizada (unidades arbitrarias). La figura 2 muestra la curva dosis-respuesta sigmoidal de mejor ajuste para las 10 concentraciones de resveratrol representadas frente a sus valores de ATP/vCell normalizados correspondientes. Estos valores representan un promedio de tres réplicas de placas. El resveratrol aumenta los niveles de ATP celular en células NCI-H358 de una manera dependiente de la dosis. El aumento máximo en los niveles de ATP celular era de 3,0 veces y se produjo con tratamiento de 50 µM de resveratrol. La CE<sub>50</sub> ATP para resveratrol se determinó que era de 29 µM.

#### *Ejemplo 6: Selección de compuestos de prueba en Ensayo basado en células de ATP*

Un número de compuestos se seleccionaron por su efecto sobre los niveles de ATP en el ensayo según se describe en el Ejemplo 5. Los resultados se muestran en la Tabla 8. Los valores de DE<sub>50</sub> para los compuestos que elevaron los niveles de ATP intracelular se representan por A (DE<sub>50</sub> = < 50 µM), B (DE<sub>50</sub> = 51–100 µM), C (DE<sub>50</sub> = 101–150 µM), y D (DE<sub>50</sub> = > 150 µM). NA significa que el compuesto no se probó usando el ensayo indicado. De forma análoga, los valores de CI<sub>50</sub> para los compuestos que redujeron los niveles de ATP intracelular se representan por A (CI<sub>50</sub> = < 50 µM), B (CI<sub>50</sub> = 51–100 µM), C (CI<sub>50</sub> = 101–150 µM), y D (CI<sub>50</sub> = > 150 µM).

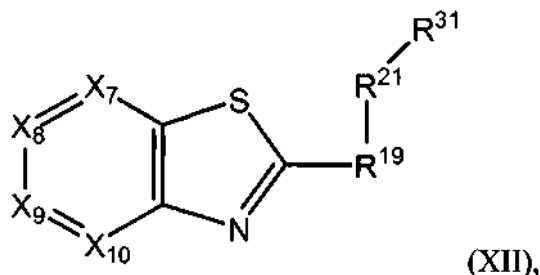
Tabla 8

COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> ENSAYO DE ATP	CI <sub>50</sub> ENSAYO DE ATP
115		D	
99		A	
133		NA	
134		NA	
135		A	

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto:

A) de la fórmula:



5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

cada uno de X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub> y X<sub>10</sub> se selecciona independientemente de N, CR<sup>20</sup>, o CR<sub>1</sub>' , en donde:

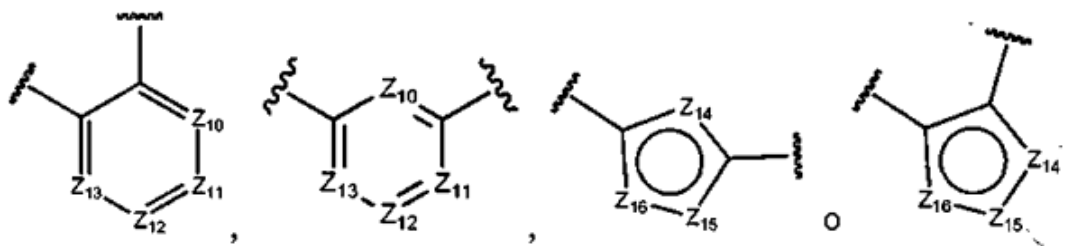
cada R<sup>20</sup> se selecciona independientemente de H o un grupo de solubilización;

cada R<sub>1</sub>' se selecciona independientemente de H o alquilo recto o ramificado C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> opcionalmente sustituido;

uno de X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub> y X<sub>10</sub> es N y los otros se seleccionan de CR<sup>20</sup> o CR<sub>1</sub>' ; y

10 de cero a un R<sup>20</sup> es un grupo de solubilización;

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



en donde:

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

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

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

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

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

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

20 de cero a un R<sup>20</sup> es un grupo de solubilización;

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

R<sup>21</sup> se selecciona de -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>'-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- o -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-;

en donde, 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>),

5  $-C(=NR^c)-NH_2$ ,  $-C(=NR^c)-NHR^a$ ,  $-C(=NR^c)-N(R^aR^b)$ ,  $-NH-C(=NH)-NH_2$ ,  $-NH-C(=NH)-NHR^a$ ,  $-NH-C(=NH)-N(R^aR^b)$ ,  $-NH-C(=NR^c)-NH_2$ ,  $-NH-C(=NR)-NHR^a$ ,  $-NH-C(=NR^c)-N(R^aR^b)$ ,  $-NR^d-C(=NH)-NHR^a$ ,  $-NR^d-C(=NH)-N(R^aR^b)$ ,  $-NR^d-C(=NR^c)-NH_2$ ,  $-NR^d-C(=NR^c)-NHR^a$ ,  $-NR^d-C(=NR^c)-N(R^aR^b)$ ,  $-NHNH_2$ ,  $-NHNHR^a$ ,  $-SO_2NH_2$ ,  $-SO_2NHR^a$ ,  $-SO_2NR^aR^b$ ,  $-CH=CHR^a$ ,  $-CH=CR^aR^b$ ,  $-CR^c=CR^aR^b$ ,  $-CR^c=CHR^a$ ,  $-CR^c=CR^aR^b$ ,  $-CCR^a$ ,  $-SH$ ,  $-SO_kR^a$ ,  $-(S(O))_kOR^a$  y  $-NH-C(=NH)-NH_2$ , en donde

k es 0, 1 ó 2;

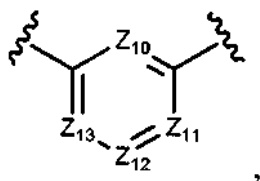
cada uno de  $R^a-R^d$  es independientemente un grupo alifático, bencilo o aromático; y

$-NR^aR^b$ , tomados juntos, pueden formar también un grupo heterocíclico no aromático;

10 en donde un grupo heterocíclico no aromático, grupo bencílico o grupo arilo pueden tener también un grupo alifático como un sustituyente; un grupo alifático puede tener también un anillo heterocíclico no aromático, a bencilo, o grupo arilo como un sustituyente; y un grupo alifático, heterocíclico no aromático, grupo arilo o bencilo pueden tener más de un sustituyente, en donde, cuando un grupo alifático se selecciona de alquenilo o alquinilo, alquenilo es un hidrocarburo ramificado o de cadena recta que contiene uno o más dobles enlaces y alquinilo es un hidrocarburo ramificado o de cadena recta que contiene uno o más triples enlaces; y

15  $R^{31}$  se selecciona de un arilo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, o un heteroarilo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, con la condición de que:

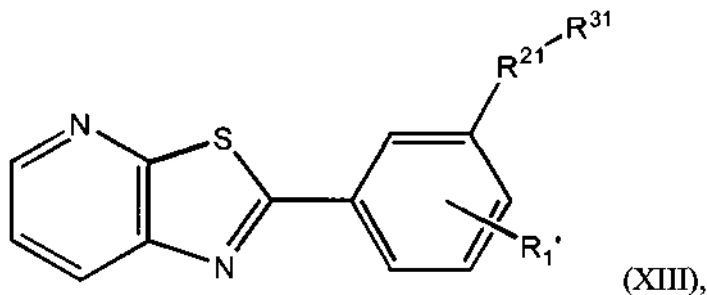
cundo  $X_7$  es N,  $R^{19}$  es



y cada uno de  $Z_{10}$ ,  $Z_{11}$ ,  $Z_{12}$  y  $Z_{13}$  se selecciona independientemente de  $CR^{20}$ , o  $CR_1'$ , entonces:

- 20 a) por lo menos uno de  $X_8$ ,  $X_9$  o  $X_{10}$  es C-(alquilo recto o ramificado  $C_1-C_3$ ) o C-(grupo de solubilización); o  
b) por lo menos uno de  $Z_{10}$ ,  $Z_{11}$ ,  $Z_{12}$  y  $Z_{13}$  es  $CR^{20}$ , en donde  $R^{20}$  es un grupo de solubilización; o

B) de la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

25  $R_1'$  se selecciona de H o alquilo recto o ramificado  $C_1-C_3$  opcionalmente sustituido;

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

35 en donde, cuando  $R_1'$  está sustituido,  $R_1'$  está sustituido con uno o más de  $-OH$ , halógeno,  $-OR^a$ ,  $-O-COR^a$ ,  $-COR^a$ ,  $-C(O)R^a$ ,  $-CN$ ,  $-NO_2$ ,  $-COOH$ ,  $-COOR^a$ ,  $-OCO_2R^a$ ,  $-C(O)NR^aR^b$ ,  $-OC(O)NR^aR^b$ ,  $-SO_3H$ ,  $-NH_2$ ,  $-NHR^a$ ,  $-N(R^aR^b)$ ,  $-COOR^a$ ,  $-CHO$ ,  $-CONH_2$ ,  $-CONHR^a$ ,  $-CON(R^aR^b)$ ,  $-NHCOR^a$ ,  $-NRCOR^a$ ,  $-NHCONH_2$ ,  $-NHCONR^aH$ ,  $-NHCON(R^aR^b)$ ,  $-NR^cCONH_2$ ,  $-NR^cCONR^aH$ ,  $-NR^cCON(R^aR^b)$ ,  $-C(=NH)-NH_2$ ,  $-C(=NH)-NHR^a$ ,  $-C(=NH)-N(R^aR^b)$ ,  $-C(=NR^c)-NH_2$ ,  $-C(=NR^c)-NHR^a$ ,  $-C(=NR^c)-N(R^aR^b)$ ,  $-NH-C(=NH)-NH_2$ ,  $-NH-C(=NH)-NHR^a$ ,  $-NH-C(=NH)-N(R^aR^b)$ ,  $-NH-C(=NR^c)-NH_2$ ,  $-NH-C(=NR^c)-NHR^a$ ,  $-NH-C(=NR^c)-N(R^aR^b)$ ,  $-NR^d-C(=NH)-NHR^a$ ,  $-NR^d-C(=NH)-$

$N(R^aR^b)$ ,  $-NR^d-C(=NR^c)-NH_2$ ,  $-NR^d-C(=NR^c)-NHR^a$ ,  $-NR^d-C(=NR^c)-N(R^aR^b)$ ,  $-NHNH_2$ ,  $-NHNHR^a$ ,  $-SO_2NH_2$ ,  $-SO_2NHR^a$ ,  $-SO_2NR^aR^b$ ,  $-CH=CHR^a$ ,  $-CH=CR^aR^b$ ,  $-CR^c=CR^aR^b$ ,  $-CR^c=CHR^a$ ,  $-CR^c=CR^aR^b$ ,  $-CCR^a$ ,  $-SH$ ,  $-SO_kR^a$ ,  $-S(O)_kOR^a$  y  $-NH-C(=NH)-NH_2$ , en donde

k es 0, 1 ó 2;

- 5 cada uno de  $R^a-R^d$  es independientemente un grupo alifático, bencilo o aromático; y  $-NR^aR^b$ , tomados juntos, pueden formar también un grupo heterocíclico no aromático;

en donde un grupo heterocíclico no aromático, grupo bencilo o grupo arilo pueden tener también un grupo alifático como un sustituyente; un grupo alifático puede tener también un anillo heterocíclico no aromático, bencilo, o grupo arilo como un sustituyente; y un grupo alifático, heterocíclico no aromático, grupo arilo o bencilo pueden tener más de un sustituyente, en donde, cuando un grupo alifático o no aromático se selecciona de alquenilo o alquinilo, alquenilo es un hidrocarburo no aromático cíclico, ramificado o de cadena recta que contiene uno o más dobles enlaces y alquinilo es un hidrocarburo no aromático cíclico, ramificado o de cadena recta que contiene uno o más triples enlaces; y

15  $R^{31}$  se selecciona de un arilo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, o un heteroarilo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, con las condiciones de que:

cuando  $R^{21}$  es  $-NH-C(O)-$ ,  $R^{31}$  no es furanilo no sustituido, 5-bromofuranilo, fenilo no sustituido, fenilo monosustituido con halo o metilo, 3- o 4-metoxifenilo, 4-butoxifenilo, 4-t-butilfenilo, 3-trifluorometilfenilo, 2-benzoilfenilo, 2- o 4-etoxifenilo, 2,3-, 2,4-, 3,4-, o 3,5-dimetoxifenilo, 3,4,5-tri-metoxifenilo, 2,4- o 2,6-difluorofenilo, 3,4-dioximetilfenilo, 3,4- o 3,5-dimetilfenilo, 2-cloro-5-bromofenilo, 2-metoxi-5-clorofenilo, quinolinilo no sustituido, tiazolilo sustituido de forma simultánea con metilo y fenilo, o piridinilo sustituido con etoxilo; cuando  $R^{21}$  es  $-NH-C(O)-CH(CH_2-CH_3)-$ ,  $R^{31}$  no es fenilo no sustituido;

20 cuando  $R^{21}$  es  $-NH-C(O)-CH_2-$ ,  $R^{31}$  no es fenilo no sustituido, 3-metilfenilo, 4-clorofenilo, 4-etoxifenilo, 4-fluorofenilo o 4-metoxifenilo; y

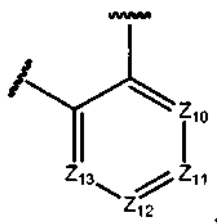
cuando  $R^{21}$  es  $-NH-C(O)-CH_2-O-$ ,  $R^{31}$  no es fenilo no sustituido o 4-clorofenilo; y

25 cuando  $R^{21}$  es  $-NH-S(O)_2-$ ,  $R^{31}$  no es 3,4-dioximetilfenilo, 2,4,5-trimetilfenilo, 2,4,6-trimetilfenilo, 2,4- o 3,4-dimetilfenilo, 2,5-difluorofenilo, 2,5- o 3,4-dimetoxifenilo, fluorofenilo, 4-clorofenilo, 4-bromofenilo, 4-etilfenilo, 4-metilfenilo, 3-metil-4-metoxifenilo, fenilo no sustituido, piridinilo no sustituido, tienilo no sustituido, tienilo sustituido con cloro o benzotiazolilo sustituido con metilo.

30 2. El compuesto según la reivindicación 1, opción A, en donde  $R^{19}$  se selecciona de fenilo opcionalmente sustituido, piridilo opcionalmente sustituido, tienilo opcionalmente sustituido o furanilo opcionalmente sustituido.

3. El compuesto según la reivindicación 1, opción A, en donde:

$R^{19}$  es



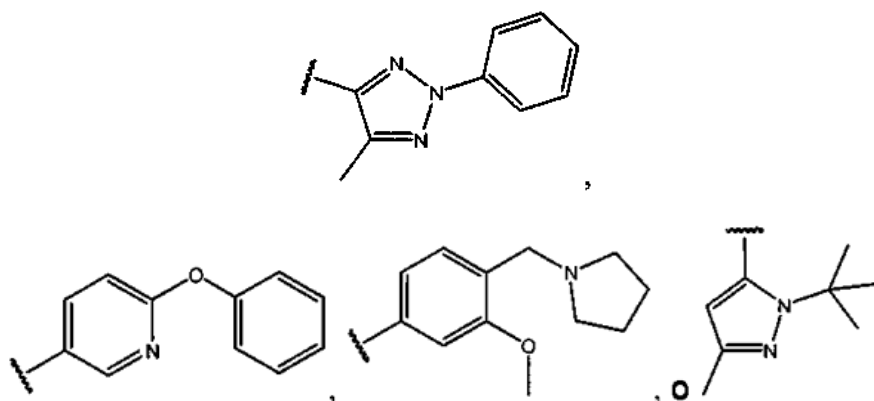
en donde cada uno de  $Z_{10}$ ,  $Z_{11}$ ,  $Z_{12}$  y  $Z_{13}$  se selecciona independientemente de  $CR^{20}$  o  $CR^1$ ; y

35  $R^{21}$  se selecciona de  $-NH-C(O)-$ ,  $-NH-C(O)-CH(CH_3)-O-$ ,  $-NH-C(O)-CH_2-O-$  o  $-NH-S(O)_2-CH_2-CH_2-$ ; y

$R^{31}$  se selecciona de un arilo opcionalmente sustituido o un heteroarilo opcionalmente sustituido que no sea furanilo sustituido son fenilo.

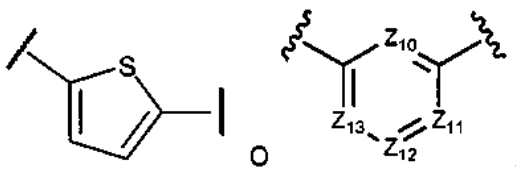
40 4. El compuesto según la reivindicación 3, en donde  $R^{31}$  está opcionalmente sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre  $-OCH_3$ ,  $-CH_3$ ,  $-N(CH_3)_2$ , fenilo, fenoxilo, 3,4-dioximetileno, flúor u otro grupo de solubilización.

5. El compuesto según la reivindicación 3, en donde  $R^{31}$  se selecciona de quinolinilo no sustituido, 2,4-dimetoxifenilo, 3,4-dimetoxifenilo, 3,5-dimetoxifenilo, 3,4,5-trimetoxifenilo, 2,3,4-trimetoxifenilo, 2-dimetilaminofenilo, 3-dimetilaminofenilo, 4-dimetilaminofenilo, 3,5-dimetilfenilo, 3,5-difluorofenilo, 3-trifluorometoxifenilo, quinoxalinilo no sustituido, benzopirimidinilo no sustituido,



6. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 en donde  $R^{21}$  es  $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ .

7. El compuesto según la reivindicación 1, opción A, en donde  $R^{19}$  se selecciona de



5

cada uno de  $Z_{10}$ ,  $Z_{11}$ ,  $Z_{12}$  y  $Z_{13}$  se selecciona independientemente de  $\text{CR}^{20}$ , o  $\text{CR}_1$ ;

$R^{21}$  se selecciona de  $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O}-$ ,  $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}-\text{C}(\text{S})-\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}-\text{C}(\text{S})-\text{NH}-\text{CH}_2-$  o  $-\text{NH}-\text{S}(\text{O})_2-$ ;

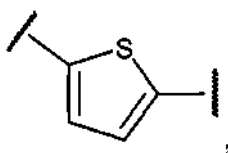
10  $R^{31}$  se selecciona de un fenilo opcionalmente sustituido, un naftilo opcionalmente sustituido o un heteroarilo opcionalmente sustituido, en donde:

cuando  $X_8$  es N,  $R^{21}$  es  $-\text{NH}-\text{C}(\text{S})-\text{NH}-$ , y  $R^{19}$  es fenilo,  $R^{31}$  no es 2-metoxi-5-nitrofenilo, 2-S-metilfenilo o 2-acetilfenilo;

cuando  $X_8$  es N,  $R^{21}$  es  $-\text{NH}-\text{S}(\text{O})_2-$ , y  $R^{19}$  es fenilo,  $R^{31}$  no es tienilo sustituido con tiadiazolo o 4-metilsulfonyl-fenilo;

15 cuando  $X_8$  es N,  $R^{21}$  es  $-\text{NH}-\text{CO}-$ , y  $R^{19}$  es fenilo,  $R^{31}$  no es 2,4-difluorofenilo, tienilo sustituido con piridilo, 3,4-diclorofenilo, 4-*t*-butilfenilo, o 3-benciloxifenilo;

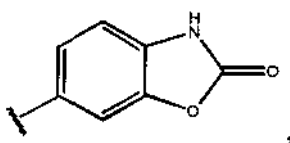
cuando  $X_9$  es N,  $R^{21}$  es  $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$  y  $R^{19}$  es



$R^{31}$  no es 2,3,4-trimetoxifenilo o 3,5-dimetoxifenilo; y

20 cuando  $X_9$  es N,  $R^{21}$  es  $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$  y  $R^{19}$  es fenilo,  $R^{31}$  no es 3,5-dimetoxifenilo.

8. El compuesto según la reivindicación 7, en donde  $R^{31}$  se selecciona de fenilo, naftilo, pirazolilo, furanilo, tienilo, piridilo, isoxazolilo, benzopirazolilo, benzofuranilo, benzotienilo, quinolinilo, benzoisoxazolilo, o

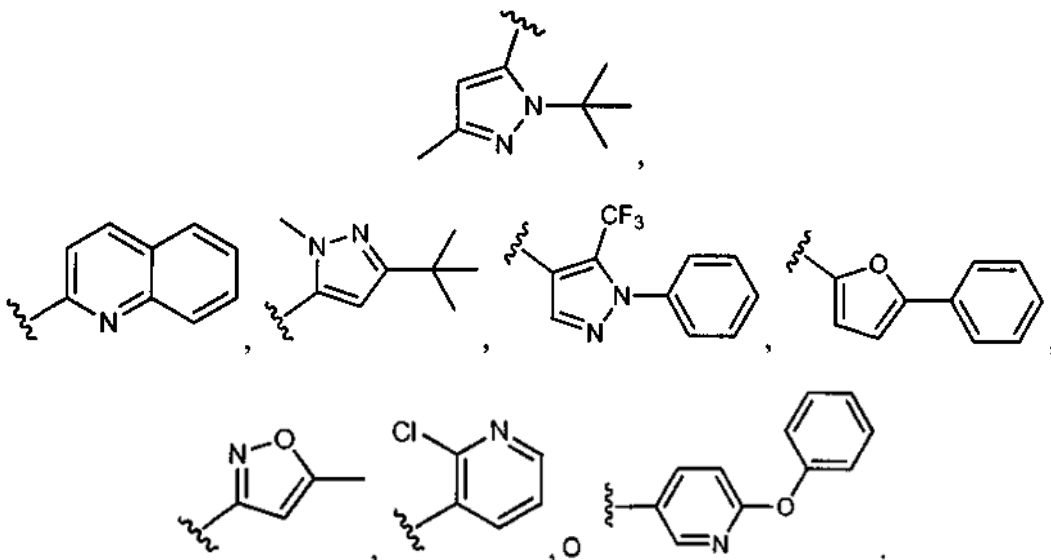


y en donde  $R^{31}$  está opcionalmente sustituido.

25 9. El compuesto según la reivindicación 8, en donde  $R^{31}$  está opcionalmente sustituido con hasta tres sustituyentes

seleccionados independientemente entre  $-\text{OCH}_3$ ,  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{O}$ -fenilo u otro grupo de solubilización.

10. El compuesto según la reivindicación 8, en donde  $\text{R}^{31}$  se selecciona de fenilo no sustituido, 3-metoxifenilo, 4-metoxifenilo, 2,3 dimetoxifenilo, 2,4-dimetoxifenilo, 2,5-bis(trifluorometil)fenilo, 3,4-dimetoxifenilo, 3,5-dimetoxifenilo, 3,4,5-trimetoxifenilo, 2,3,4-trimetoxifenilo, 2-metoxi-4-metilfenilo, 2-fenoxifenilo, 3-dimetilaminofenilo, 4-dimetilaminofenilo, 2-furanilo no sustituido, 2-tienilo no sustituido,



11. El compuesto según la reivindicación 1, opción B, en donde:

- 10  $\text{R}_1'$  se selecciona de H o alquilo recto o ramificado  $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$  opcionalmente sustituido;

- $\text{R}^{21}$  se selecciona de  $-\text{NR}_1'-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{NR}_1'-\text{S}(\text{O})_2-$ ,  $-\text{NR}_1'-\text{C}(\text{O})-\text{NR}_1'-$ ,  $-\text{NR}_1'-\text{C}(\text{S})-\text{NR}_1'-$ ,  $-\text{NR}_1'-\text{C}(\text{S})-\text{NR}_1'-\text{CR}_1'\text{R}_1'-$ ,  $-\text{NR}_1'-\text{C}(\text{O})-\text{CR}_1'\text{R}_1'-\text{NR}_1'-$ ,  $-\text{NR}_1'-\text{C}(\text{O})-\text{NR}_1'-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-\text{NR}_1'-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-\text{NR}_1'-\text{S}(\text{O})_2-$ ,  $-\text{NR}_1'-$ ,  $-\text{CR}_1'\text{R}_1'-$ ,  $-\text{NR}_1'-\text{C}(\text{O})-\text{CR}_1'=\text{CR}_1'-$ ,  $-\text{NR}_1'-\text{S}(\text{O})_2-\text{NR}_1'-$ ,  $-\text{NR}_1'-\text{C}(\text{O})-\text{NR}_1'-\text{S}(\text{O})_2-$ ,  $-\text{NR}_1'-\text{CR}_1'\text{R}_1'-\text{C}(\text{O})-\text{NR}_1'-$ ,  $-\text{CR}_1'\text{R}_1'-\text{C}(\text{O})-\text{NR}_1'-$ ,  $-\text{NR}_1'-\text{C}(\text{O})-\text{CR}_1'=\text{CR}_1'-\text{CR}_1'\text{R}_1'-$ ,  $-\text{NR}_1'-\text{C}(\text{O})-\text{NR}_1'-\text{S}(\text{O})_2-$ ,  $-\text{NR}_1'-\text{C}(\text{O})-\text{CR}_1'\text{R}_1'-\text{O}-$ ,  $-\text{NR}_1'-\text{C}(\text{O})-\text{CR}_1'\text{R}_1'-\text{CR}_1'\text{R}_1'-\text{O}-$ ,  $-\text{NR}_1'-\text{S}(\text{O})_2-\text{CR}_1'\text{R}_1'-$ ,  $-\text{NR}_1'-\text{S}(\text{O})_2-\text{CR}_1'\text{R}_1'-\text{CR}_1'\text{R}_1'-$  o  $-\text{NR}_1'-\text{C}(\text{O})-\text{CR}_1'\text{R}_1'-$ ; y

$\text{R}^{31}$  se selecciona de un arilo monocíclico o bicíclico o un heteroarilo monocíclico o bicíclico, y comprende un sustituyente de grupo de solubilización.

12. El compuesto según la reivindicación 1, opción B, en donde  $\text{R}^{31}$  se selecciona de fenilo, naftilo, pirazolilo, furanilo, tienilo, piridilo, isoxazolilo, benzopirazolilo, benzofuranilo, benzotienilo, quinolinilo, benzoisoxazolilo, o



y en donde  $\text{R}^{31}$  está opcionalmente sustituido.

13. El compuesto según la reivindicación 1, opción B, en donde:

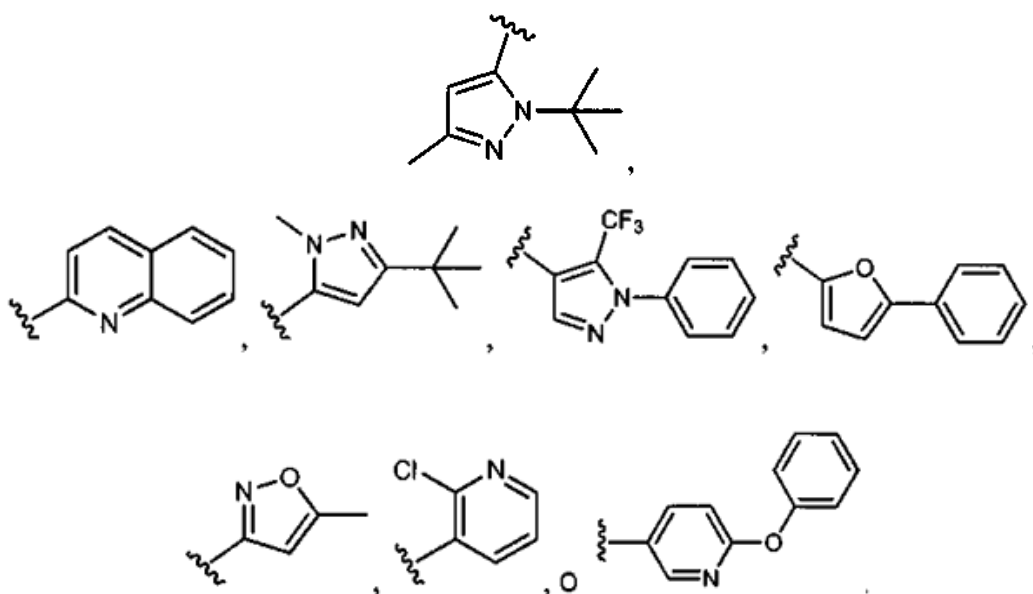
$\text{R}^{21}$  se selecciona de  $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O}-$ ,  $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}-\text{C}(\text{S})-\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}-\text{C}(\text{S})-\text{NH}-\text{CH}_2-$  o  $-\text{NH}-\text{S}(\text{O})_2-$ ; y

- 25  $\text{R}^{31}$  se selecciona de un fenilo opcionalmente sustituido, un naftilo opcionalmente sustituido o un heteroarilo opcionalmente sustituido.

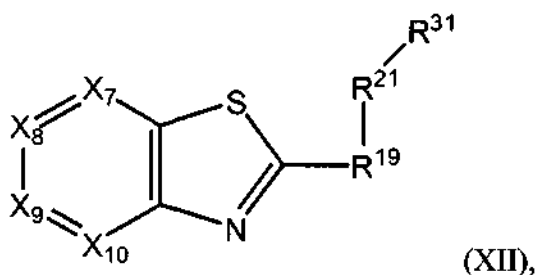
14. El compuesto según la reivindicación 13, en donde  $\text{R}^{31}$  se selecciona de fenilo no sustituido, 3-metoxifenilo, 4-metoxifenilo, 2,3 dimetoxifenilo, 2,4-dimetoxifenilo, 2,5-bis(trifluorometil)fenilo, 3,4-dimetoxifenilo, 3,5-dimetoxifenilo, 3,4,5-trimetoxifenilo, 2,3,4-trimetoxifenilo, 2-metoxi-4-metilfenilo, 2-fenoxifenilo, 3-dimetilaminofenilo, 4-dimetilaminofenilo, 2-furanilo no sustituido, 2-tienilo no sustituido,

30



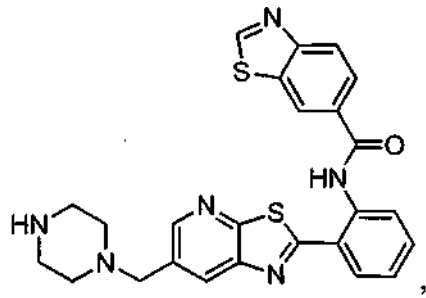


15. Un compuesto según la reivindicación 1, en donde R<sup>31</sup> es heteroarilo seleccionado de imidazolilo, tienilo, furanilo, piridilo, pirimidilo, piranilo, pirazolilo, pirrolilo, pirazinilo, tiazolilo, oxazolilo y tetrazolilo.
- 5 16 Una composición que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1–15, en donde la composición está libre de pirógenos.
17. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1–15.
18. Una composición para tratar o prevenir resistencia a la insulina, un síndrome metabólico, diabetes, o complicaciones de los mismos, o para aumentar la sensibilidad a la insulina en un sujeto humano que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1–15.
- 10 19. Una composición para reducir el peso de un sujeto humano, o prevenir la ganancia de peso en un sujeto humano que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1–15.
- 15 20. Una composición para prolongar la vida de un sujeto humano que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1–15.
21. Una composición para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno ocular en un sujeto humano que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1–15.
22. La composición de la reivindicación 21, en donde la enfermedad o trastorno ocular es deficiencia de la visión, glaucoma, neuritis óptica, degeneración macular, o neuropatía óptica isquémica anterior.
- 20 23. Una composición para tratar o prevenir neuropatía inducida por quimioterapia en un sujeto humano que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1–15.
24. El compuesto de la reivindicación 1, opción A, de la fórmula:



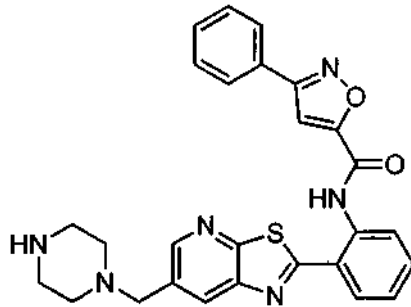
o una sal del mismo, en donde las variables son según se define en la reivindicación 1.

- 25 25. Un compuesto según la reivindicación 1, representado por la fórmula estructural:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

26. Un compuesto según la reivindicación 1, representado por la fórmula estructural:



5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

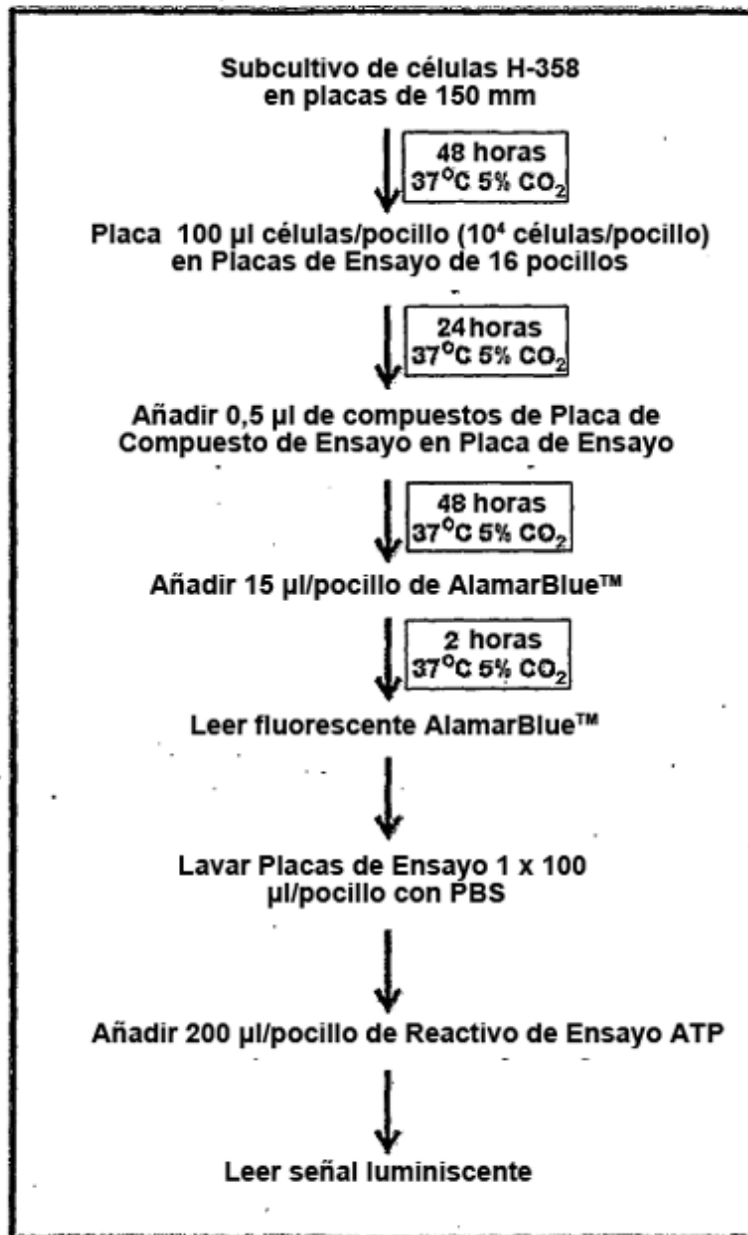


FIG. 1

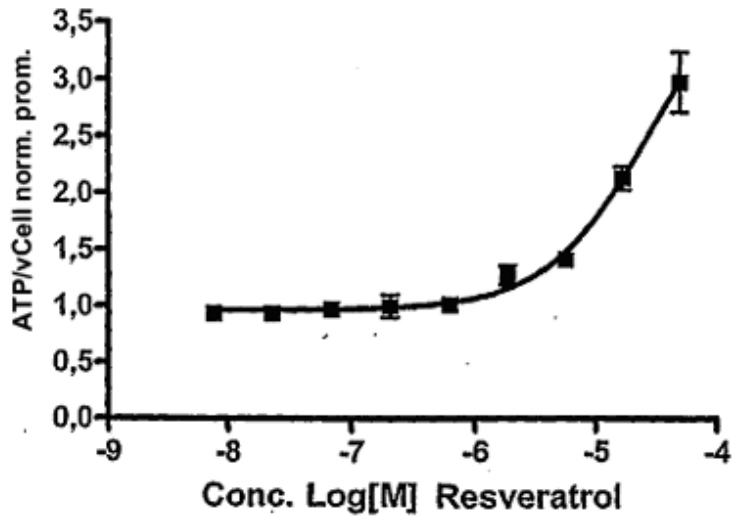


FIG. 2