

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 972**

51 Int. Cl.:

A61K 31/445 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)
A61K 31/38 (2006.01)
A61K 31/35 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07D 209/82 (2006.01)
A61K 31/403 (2006.01)
C07D 209/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2004 E 04788727 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 1677794**

54 Título: **Métodos de tratamiento de trastornos**

30 Prioridad:

12.09.2003 US 502811 P
19.12.2003 US 531443 P
07.04.2004 US 560509 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.03.2015

73 Titular/es:

ELIXIR PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
ONE KENDALL SQUARE, BUILDING 1000-FIFTH
FLOOR
CAMBRIDGE, MA 02139, US

72 Inventor/es:

NAPPER, ANDREW;
DISTEFANO, PETER;
HIXON, JEFFREY;
MCDONAGH, THOMAS;
SOLOMON, JONATHAN, M.;
HUBER, L. JULIE;
CURTIS, RORY;
THOMAS, RUSSELL.J y
PONS, JEAN-FRANCOIS.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 530 972 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

Métodos de tratamiento de trastornos

5 **Antecedentes**

La proteína Sir2 es una desacetilasa que usa NAD como cofactor (Imai *et al.*, 2000; Moazed, 2001; Smith *et al.*, 2000; Tanner *et al.*, 2000; Tanny y Moazed, 2001). A diferencia de otras desacetilasas, muchas de las cuales están implicadas en el silenciamiento génico, Sir2 es insensible a los inhibidores de histona desacetilasa tales como tricostatina A (TSA) (Imai *et al.*, 2000; Landry *et al.*, 2000a; Smith *et al.*, 2000).

Parshin *et al.* desvelan el uso de amida del ácido 6-cloro-2,3,4,9-tetrahidro-1H-carbazol-1-carboxílico como anticonvulsivo. Los documentos de Patente US 3859304, US 3769298, GB 1436893, US 4009181, WO 03/051837, WO 03/062392 y DE 2431292 desvelan derivados de tetrahidrocarbazol para su uso como antidepresivos, frente a coccidiosis, como antifúngicos, como agentes reductores del azúcar en sangre, como inhibidores de la fertilidad, como antiinflamatorios, como analgésicos, como agentes antirreumáticos y como agentes anticancerígenos.

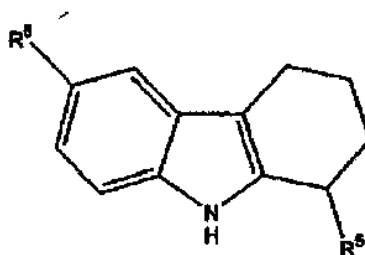
Los documentos de Patente US 5830911 y WO 96/03377 desvelan el uso de derivados de tetrahidrocarbazol en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer y demencia.

Grozinger *et al.*, Journal of Biological Chemistry, American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 276, nº 42, pp. 38837-38843; el documento de Patente US 2003/124101, Konrad *et al.*, Nature (Londres), vol. 425, nº 6954, pp. 191-196; y Bodai *et al.*, Current Medicinal Chemistry, vol. 10, nº 23, pp. 2577-2587 desvelan moduladores de sirtuína y su uso frente a trastornos neurodegenerativos.

25

Sumario

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (XI) mostrada a continuación:



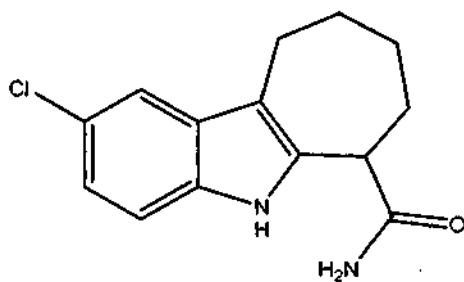
fórmula (XI).

(I)

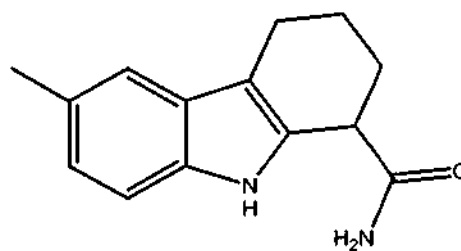
30

en la que R⁶ es halo o alquilo y R⁵ es aminocarbonilo para su uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo.

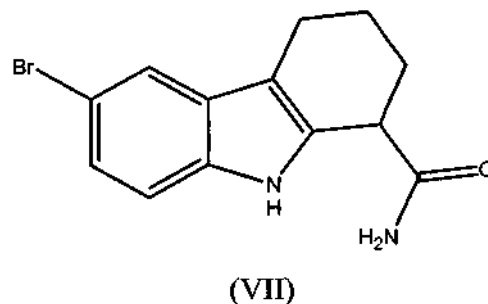
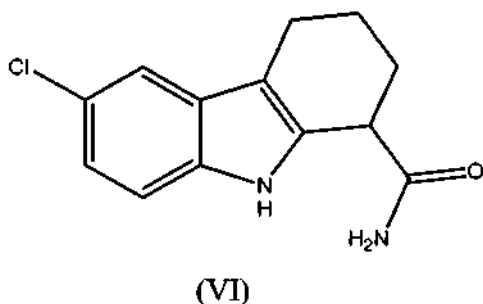
35 El compuesto de fórmula (XI) puede ser un compuesto seleccionador entre la Figura 1 o los compuestos (IV), (V), (VI), o (VII).



(IV)



(V)



En algunos casos, el compuesto puede ser un compuesto de fórmula (VI) que tiene un exceso enantiomérico elevado de un isómero individual, en el que la rotación óptica del isómero predominante es $-14,1$ ($c = 0,33$, DCM). En algunos casos, se administra un compuesto de fórmula (IV), (V), o (VII) que tiene un exceso enantiomérico elevado de un isómero individual, en el que el isómero predominante corresponde al isómero de fórmula (VI) que tiene una rotación óptica de $-14,1$ ($c = 0,33$, DCM).

El compuesto puede inhibir preferentemente sirtuína SIRT1 con respecto a no SIRT1, por ejemplo, al menos con una preferencia de 1,5, 2, 5, o 10 veces. El compuesto puede tener una K_i para SIRT1 que es menos de 500, 100, 50, o 40 nM.

En algunos casos, el compuesto reduce la actividad de un factor de transcripción de FOXO tal como FoxO1 o FoxO3.

La cantidad puede ser eficaz para mejorar al menos un síntoma del trastorno. En una realización, la enfermedad o el trastorno puede ser una enfermedad o trastorno neurodegenerativo en la que el trastorno neurodegenerativo puede estar mediado al menos en parte por agregación de poliglutamina, por ejemplo, enfermedad de Huntington, Atrofia Muscular Espinobulbar (SBMA o Enfermedad de Kennedy) Atrofia Dentato-rubro-pálido-luisiana (DRPLA), Ataxia Espinocerebelosa de tipo 1 (SCA1), Ataxia Espinocerebelosa de tipo 2 (SCA2), Enfermedad de Machado-Joseph (MJD; SCA3), Ataxia Espinocerebelosa de tipo 6 (SCA6), Ataxia Espinocerebelosa de tipo 7 (SCA7), y Ataxia Espinocerebelosa de tipo 12 (SCA12). El trastorno neurodegenerativo puede ser enfermedad de Parkinson o Alzheimer.

La enfermedad o el trastorno puede ser un trastorno neurológico tal como enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson. La cantidad puede ser, por ejemplo, eficaz para reducir uno o más síntomas del trastorno neurológico.

La prevención o el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo puede incluir administrar el compuesto más de una vez, por ejemplo, administrar repetidamente el compuesto. El compuesto se puede administrar en uno o más bolos o de forma continua. El compuesto se puede administrar desde fuera (por ejemplo, mediante inyección, ingestión, inhalación, etc.), o desde dentro, por ejemplo, mediante un dispositivo implantado.

La prevención o el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo puede incluir administrar el compuesto localmente.

La cantidad puede ser eficaz para aumentar la acetilación de un sustrato de sirtuína (por ejemplo, una proteína nuclear, por ejemplo, una historia o un factor de transcripción, por ejemplo, p53, FoxO1, o FoxO3) en al menos algunas células del sujeto.

El sujeto puede ser un mamífero, por ejemplo, un ser humano.

Se puede identificar que el sujeto tiene la necesidad de tal tratamiento o prevención.

En otro aspecto, en el presente documento se desvela un método de inhibición de la desacetilación mediada por sirtuína de un sustrato, tal como un factor de transcripción FoxO. El método incluye poner en contacto una sirtuína con un compuesto de fórmula (I). La inhibición se puede producir *in vitro*, en medio exento de células, en cultivo celular, o en un organismo, por ejemplo, un mamífero, preferentemente un ser humano.

También se desvela en el presente documento un producto envasado. El producto envasado incluye un recipiente, uno de los compuestos mencionados anteriormente en el recipiente, y una leyenda (por ejemplo, una etiqueta o prospecto) asociada al recipiente y que indica la administración del compuesto para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos.

El sujeto puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano. El sujeto también puede ser un sujeto no humano, por ejemplo, un modelo animal. En ciertas realizaciones en método puede incluir además identificar un sujeto. La identificación de un sujeto con necesidad de tal tratamiento puede recaer en el juicio de un sujeto o de un

profesional de atención médica y puede ser subjetiva (por ejemplo, opinión) u objetiva (por ejemplo, medible mediante al menos un método diagnóstico).

El término "mamífero" incluye organismos, que incluyen ratones, ratas, vacas, ovejas, cerdos, conejos, cabras, y caballos, monos, perros, gatos, y preferentemente seres humanos.

El término "tratamiento" o "tratado" se refiere a la administración de un compuesto que se describe en el presente documento a un sujeto con el fin de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar, progresar, o afectar una enfermedad, por ejemplo, una infección, los síntomas de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad.

Una cantidad eficaz del compuesto descrito anteriormente puede variar de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, alternativamente de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mg/kg. Las dosis eficaces también variarán dependiendo de la vía de administración, así como de la posibilidad del uso conjunto con otros agentes.

El término "halo" o "halógeno" se refiere a cualquier radical de flúor, cloro, bromo o yodo.

El término "alquilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo que puede ser una cadena lineal o una cadena ramificada, que contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, alquilo C₁-C₁₂ indica que el grupo puede tener de 1 a 12 (inclusive) átomos de carbono en el mismo.

El término "aminocarbonilo", se refiere a los radicales -C(O)NH₂.

El término "sustituyentes" se refiere a un grupo "sustituido" en un grupo alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, heterociclilo, heterocicloalquenilo, cicloalquenilo, arilo, o heteroarilo en cualquier átomo de ese grupo. Cualquier átomo puede estar sustituido. Sustituyentes adecuados incluyen, sin limitación, alquilo (por ejemplo, alquilo C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂ de cadena lineal o ramificada), cicloalquilo, haloalquilo (por ejemplo, perfluoroalquilo tal como CF₃), arilo, heteroarilo, aralquilo, heteroaralquilo, heterociclilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquenilo, heterocicloalquenilo, alcoxi, haloalcoxi (por ejemplo, perfluoroalcoxi tal como OCF₃), halo, hidroxilo, carboxi, carboxilato, ciano, nitro, amino, alquilo amino, SO₃H, sulfato, fosfato, metilendioxi (-O-CH₂-O- en el que los oxígenos están unidos a átomos vecinales), etilendioxi, oxo, tioxo (por ejemplo, C=S), imino (alquilo, arilo, aralquilo), S(O)_nalquilo (en el que n es 0-2), S(O)_narilo (en el que n es 0-2), S(O)_nheteroarilo (en el que n es 0-2), S(O)_nheterociclilo (en el que n es 0-2), amina (mono-, di-, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, heteroaralquilo, arilo, heteroarilo, y las combinaciones de los mismos), éster (de alquilo, aralquilo, heteroaralquilo, arilo, heteroarilo), amida (mono-, di-, alquilo, aralquilo, heteroaralquilo, arilo, heteroarilo, y las combinaciones de los mismos), sulfonamida (mono-, di-, alquilo, aralquilo, heteroaralquilo, y las combinaciones de los mismos). En un aspecto, los sustituyentes en un grupo son independientemente uno cualquiera individual, o cualquier subconjunto de los sustituyentes mencionados anteriormente. En otro aspecto, el propio sustituyente puede estar sustituido con uno cualquiera de los sustituyentes anteriores.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en las figuras acompañantes y en la descripción posterior. Otras características, objetos, y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y las figuras, y de las reivindicaciones.

Descripción de las figuras

La Figura 1 es una tabla de compuestos y datos representativos.

La Figura 2 es un modelo generado por ordenador que muestra una posible orientación del compuesto 8 unido en el sitio activo de SIRT.

La Figura 3a es un gráfico que representa la inhibición de SirT1 de mamífero por el compuesto 8.

La Figura 3b es una transferencia de Western de células NCI-H460 tratadas con etopósido solo o con etopósido y el compuesto 8.

La Figura 4 es un gráfico de barras que representa que el enantiómero 8(-) del compuesto 8 conduce a un aumento en la acetilación de p53.

La Figura 5 es una transferencia de Western que representa que los compuestos que inhiben la actividad catalítica de SirT también pueden efectuar la acetilación de p53.

La Figura 6 es un gráfico que representa que el enantiómero 8(-) del compuesto 8 inhibe preferentemente sir2 de levadura con respecto al enantiómero 8(+).

La Figura 7 es un ensayo en gel que representa la eficacia del compuesto 8 para inhibir SirT1 en células U2 OS y células MCF-7.

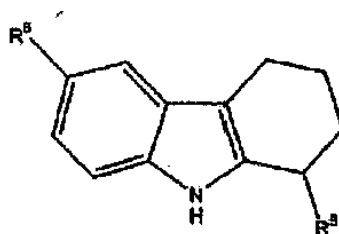
La Figura 8 es un gráfico que representa el efecto del compuesto 8 en la supervivencia celular después del deterioro del ADN.

La Figura 9 son gráficos que representan el efecto del compuesto 8 en la supervivencia celular de células NCI-H460.

La Figura 10 es un gráfico de barras que representa que el compuesto 8 conduce a la anulación de la sobreexpresión en suero mediada por ayuno del inhibidor del ciclo celular p27.

Descripción detalladaEstructura de los compuestos

- 5 Los compuestos que se pueden usar en la práctica de la invención tienen una fórmula general (XI) como se define en las reivindicaciones,



fórmula (XI).

- 10 Las combinaciones de sustituyentes y variables previstas por la presente invención son únicamente las que dan como resultado la formación de compuestos estables. El término "estable", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que poseen la estabilidad suficiente para permitir su fabricación y que mantienen la integridad del compuesto durante un período de tiempo suficiente para que sean útiles para los fines que se detallan en el presente documento (por ejemplo, administración terapéutica o profiláctica a un sujeto).

- 15 Compuestos ejemplares incluyen los compuestos con los números 4 y 8 representados en la siguiente Tabla 1. El resto son Compuestos de Comparación:

Tabla 1: Compuestos ejemplares y Compuestos de Comparación

Número de compuesto	Nombre químico	CI50 Prom. de SirT1 p53-382 (μM)
1	Amida del ácido 7-cloro-1,2,3,4-tetrahydro-ciclopenta[b]indol-3-carboxílico	A
2	Amida del ácido 2,3,4,9-tetrahydro-1H-b-carolina-3-carboxílico	C
3	Amida del ácido 6-bromo-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-2-carboxílico	B
4	Amida del ácido 6-metil-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	A
5	Amida del ácido 2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	B
6	Amida del ácido 2-cloro-5,6,7,8,9,10-hexahidro-ciclohepta[b]indol-6-carboxílico	A
7	Hidroxiamida del ácido 6-cloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	C
8	Amida del ácido 6-cloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	A
9	Amida del ácido 6-cloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-2-carboxílico	C
10	Amida del ácido 1,2,3,4-tetrahydro-ciclopenta[b]indol-3-carboxílico	B
11	(5-Cloro-piridin-2-il)-amida del ácido 6-cloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	B
12	Amida del ácido 1,6-dimetil-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	C
13	Amida del ácido 6-trifluorometoxi-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-2-carboxílico	C
14	Dietilamida del ácido 6-cloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	D
15	Carbamoilmetil-amida del ácido 6-cloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	D
16	Ácido 8-carbamoil-6,7,8,9-tetrahydro-5H-carbazol-1-carboxílico	D
17	Ácido 6-metil-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	D
18	Éster de etilo del ácido 8-carbamoil-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	D

ES 2 530 972 T3

19	Éster de etilo del ácido [(6-cloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carbonil)-amino]-acético	D
20	Amida del ácido 9-bencil-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	D
21	Éster de metilo del ácido 6-cloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	D
22	Ácido 6-cloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	D
23	C-(6-Metil-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-il)-metilamina	D
24	Amida del ácido 6,9-dimetil-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	D
25	Amida del ácido 7-metil-1,2,3,4-tetrahydro-ciclopenta[b]indol-3-carboxílico	D
26	Etilamida del ácido 6-cloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	D
27	2-(1-Bencil-3-metilsulfanil-1H-indol-2-il)-N-p-tolil-acetamida	D
28	N-Bencil-2-(1-metil-3-fenilsulfanil-1H-indol-2-il)-acetamida	D
29	N-(4-Cloro-fenil)-2-(1-metil-3-fenilsulfanil-1H-indol-2-il)-acetamida	D
30	N-(3-Hidroxi-propil)-2-(1-metil-3-fenilsulfanil-1H-indol-2-il)-acetamida	D
31	2-(1-Bencil-3-fenilsulfanil-1H-indol-2-il)-N-(3-hidroxi-propil)-acetamida	D
32	2-(1-Bencil-3-metilsulfanil-1H-indol-2-il)-N-(4-metoxi-fenil)-acetamida	D
33	2-(1-Bencil-1H-indol-2-il)-N-(4-metoxi-fenil)-acetamida	D
34	2-(1-Metil-3-metilsulfanil-1H-indol-2-il)-N-p-tolil-acetamida	D
35	2-(1-Bencil-3-metilsulfanil-1H-indol-2-il)-N-(2-cloro-fenil)-acetamida	D
36	2-(1,5-Dimetil-3-metilsulfanil-1H-indol-2-il)-N-(2-hidroxietil)-acetamida	D
37	(6-Cloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-il)-[4-(furan-2-carbonil)-piperazin-1-il]-metanona	D
38	2-(1-Bencil-1H-indol-2-il)-N-(2-cloro-fenil)-acetamida	D
39	Éster de etilo del ácido 6-cloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	D
40	Éster de etilo del ácido 6-cloro-9-metil-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-4-carboxílico	D
41	Éster de etilo del ácido 5,7-dicloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	D
42	Éster de etilo del ácido 7-cloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	D
43	Ácido 5,7-dicloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	D
44	Ácido 6-cloro-9-metil-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-4-carboxílico	D
45	Amida del ácido 6-cloro-9-metil-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-4-carboxílico	D
46	Éster de etilo del ácido 6-morfolin-4-il-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	D
47	Amida del ácido 6-morfolin-4-il-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	D
48	Éster de etilo del ácido 6-bromo-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	D
49	Éster de etilo del ácido 6-fluoro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	D
50	Éster de terc-butilo del ácido 3-carbamoi-1,3,4,9-tetrahydro-b-carbolina-2-carboxílico	D
51	(1-Fenil-etil)-amida del ácido 6-cloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-carboxílico	D

52	(1-Fenil-etil)-amida del ácido 6-cloro-2,3,4,9-tetrahidro-1H-carbazol-1-carboxílico	D
53	Amida del ácido 7,8-difluoro-2,3,4,9-tetrahidro-1H-carbazol-1-carboxílico	D
* Los compuestos que tienen una actividad designada con una A tienen un valor de CI_{50} de menos de 1,0 μM . Los compuestos que tienen una actividad designada con una B tienen un valor de CI_{50} entre 1,0 μM y 10,0 μM . Los compuestos que tienen una actividad designada con una C tienen un valor de CI_{50} de más de 10,0 μM . Los compuestos designados con una D no se ensayaron en este ensayo.		

Los compuestos que pueden ser útiles en la práctica de la presente invención se pueden identificar a través de métodos tanto *in vitro* (basados y no basados en células) como *in vivo*. En los Ejemplos se describe una descripción de estos métodos.

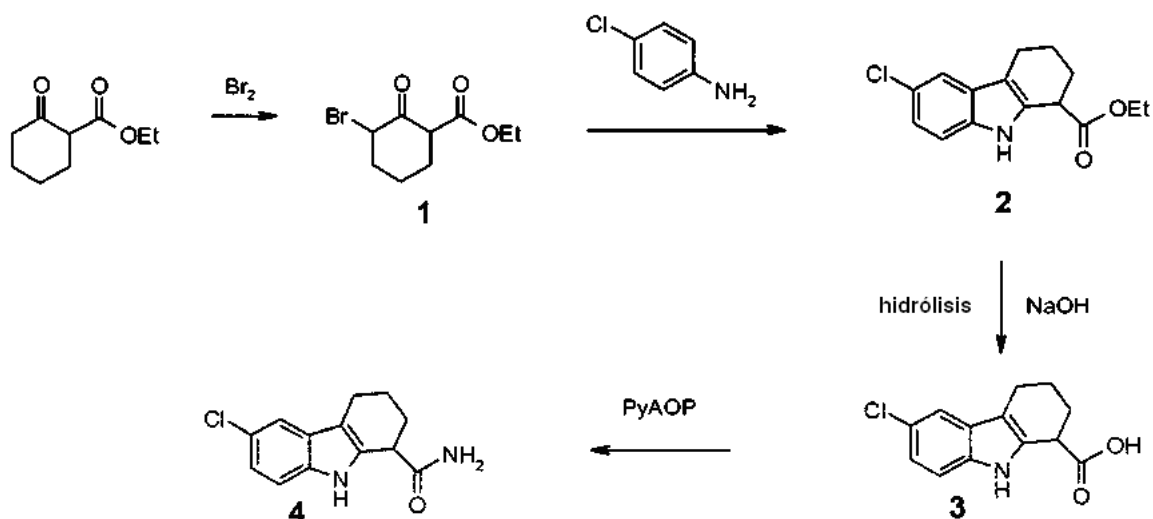
5

Síntesis de los compuestos

Los compuestos que se describen en el presente documento se pueden obtener a partir de fuentes comerciales (por ejemplo, Asinex, Moscú, Rusia; Bionet, Camelford, Inglaterra; ChemDiv, SanDiego, CA; Comgenex, Budapest, Hungría; Enamina, Kiev, Ucrania; IF Lab, Ucrania; Interbioscreen, Moscú, Rusia; Maybridge, Tintagel, UK; Specs, Holanda; Timtec, Newark, DE; Vitas-M Lab, Moscú, Rusia) o sintetizarse mediante métodos convencionales como se muestra a continuación usando materiales de partida y reactivos disponibles en el mercado. Por ejemplo, el compuesto ejemplar 4 se puede sintetizar como se muestra en el siguiente Esquema 1.

10

Esquema 1



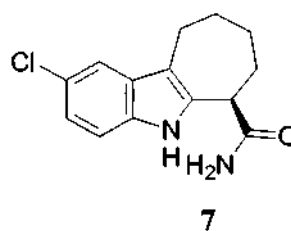
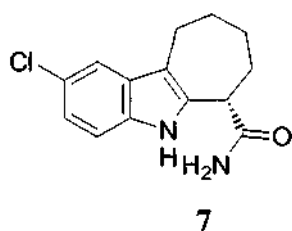
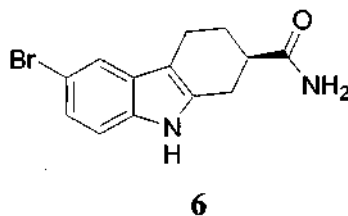
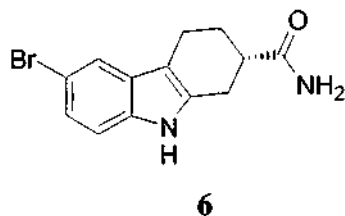
15

El β -ceto éster bromado 1 se puede condensar con 4-cloroanilina y seguido de ciclación puede proporcionar el indol 2. La saponificación del éster puede proporcionar el ácido 3. Finalmente la aminación con PyAOP puede producir la amida 4. Se conocen otros métodos en la técnica; véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N° 3.859.304, el documento de Patente de Estados Unidos N° 3.769.298, J. Am. Chem. Soc. 1974, 74, 5495. La síntesis anterior se puede extender a otras anilinas, por ejemplo, 3,5-dicloroanilina, 3-cloroanilina, y 4-bromoanilina. Los productos regioisoméricos, por ejemplo, 5, se pueden obtener usando anilinas N-sustituidas, por ejemplo, 4-cloro-N-metil-anilina.

20

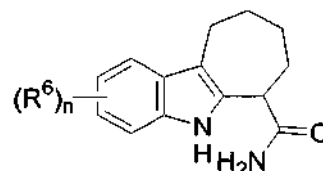
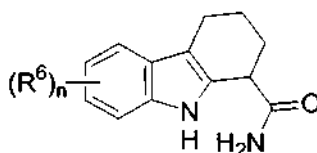
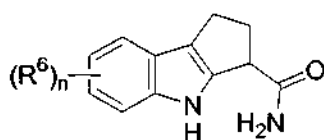
beneficioso administrar a un sujeto un compuesto 4 que tiene un exceso enantiomérico elevado del isómero que tiene una rotación óptica de -14,1 (c = 0,33, DCM) para tratar una enfermedad.

5 Aunque los enantiómeros del compuesto 4 proporcionan un ejemplo de estereoisómeros, también se prevén otros estereoisómeros, por ejemplo, como se representa a continuación en los compuestos 6 y 7.



10 Como en el compuesto de fórmula 4, en algunos casos es beneficioso administrar a un sujeto un isómero del compuesto 6 o 7 que tiene una mayor afinidad por SirT1 que es su enantiómero. Por ejemplo, en algunos casos, es beneficioso administrar un compuesto 7 en el que la amida tiene la misma configuración que el isómero del compuesto 4 que tiene una rotación óptica de -14,1 (c = 0,33, DCM).

15 En algunos casos, es beneficioso administrar un compuesto que tiene una de las siguientes estructuras en las que la estructura estereoquímica de la amida corresponde con la amida del compuesto 4 que tiene una rotación óptica de -14,1 (c = 0,33, DCM).



20 (n es un número entero de 0 a 4.)

25 Los compuestos que se describen en el presente documento incluyen los propios compuestos, así como sus sales y sus profármacos, si fuera aplicable. Se puede formar una sal, por ejemplo, entre un anión y un sustituyente cargado positivamente (por ejemplo, amino) de un compuesto que se describe en el presente documento. Aniones adecuados incluyen cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, nitrato, fosfato, citrato, metanosulfonato, trifluoroacetato, y acetato. De forma análoga, también se puede formar una sal entre un catión y un sustituyente cargado negativamente (por ejemplo, carboxilato) de un compuesto que se describe en el presente documento. Cationes adecuados incluyen ion sodio, ion potasio, ion magnesio, ion calcio, y un catión amonio tal como un ion tetrametilamonio. Ejemplos de profármacos incluyen ésteres y otros derivados farmacéuticamente aceptables que, tras la administración a un sujeto, son capaces de proporcionar compuestos activos.

35 Los compuestos que se describen en el presente documento se pueden modificar añadiendo funcionalidades apropiadas para mejorar propiedades biológicas seleccionadas, por ejemplo, dirección a un tejido en particular. Tales modificaciones se conocen la técnica e incluyen las que aumentan la penetración biológica en un compartimento biológico determinado (por ejemplo, sangre, sistema linfático, sistema nervioso central), aumentan la disponibilidad oral, aumentan la solubilidad para permitir la administración mediante inyección, alteran el metabolismo y alteran la velocidad de excreción.

40 En tal realización alternativa, los compuestos que se describen en el presente documento se pueden usar como plataformas o andamios que se pueden utilizar en técnicas de química combinatoria para la preparación de

derivados y/o librerías químicas de compuestos. Tales derivados y librerías de compuestos tienen actividad biológica y son útiles para identificar y diseñar compuestos que poseen una actividad particular. Las técnicas combinatorias adecuadas para utilizar los compuestos que se describen en el presente documento se conocen en la técnica como se muestra a modo de ejemplo en Obrecht, D. y Villalgrado, J.M., *Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries*, Pergamon-Elsevier Science Limited (1998), e incluyen técnicas tales como las técnicas de síntesis de "dividir y juntar" o "en paralelo", técnicas en fase sólida y en fase disuelta, y técnicas de codificación (véase, por ejemplo Czarnik, A.W., *Curr. Opin. Chem. Bio.*, (1997) 1, 60. De ese modo, una realización que se desvela en el presente documento se refiere un método de uso de los compuestos descritos en el presente documento para generar derivados o librerías químicas que comprende: 1) proporcionar un cuerpo que comprende una pluralidad de pocillos; 2) proporcionar uno o más compuestos identificados mediante los métodos descritos en el presente documento en cada pocillo; 3) proporcionar uno o más compuestos químicos adicionales en cada pocillo; 4) aislar los uno o más productos resultantes de cada pocillo. Una realización alternativa se refiere a un método de uso de los compuestos descritos en el presente documento para generar derivados o librerías químicas que comprende: 1) proporcionar uno o más compuestos descritos en el presente documento unidos a un soporte sólido; 2) tratar los uno o más compuestos identificados mediante los métodos descritos en el presente documento unidos a un soporte sólido con uno o más compuestos químicos adicionales; 3) aislar los uno o más productos resultantes del soporte sólido. En los métodos descritos anteriormente, se pueden unir y/o separar "marcas" o identificadores o restos de marcaje de los compuestos que se describen en el presente documento o sus derivados, para facilitar el seguimiento, identificación o aislamiento de los productos deseados o sus compuestos intermedios. Tales restos se conocen en la técnica. Los compuestos químicos usados en los métodos mencionados anteriormente pueden incluir, por ejemplo, disolventes, reactivos, catalizadores, reactivos de protección de grupos y de desprotección de grupos y similares. Ejemplos de tales compuestos químicos son los que aparecen en los diversos textos y tratados de química sintética y de protección de grupos a los que se hace referencia en el presente documento.

Sirtuínas

Las sirtuínas son miembros de la familia de genes Reguladores de la Información Silenciada (SIR). Las sirtuínas son proteínas que incluyen un dominio SIR2 que se define como las secuencias de aminoácidos que se puntúan como éxitos en la familia Pfam "SIR2" - PF02146. Se hace referencia a esta familia en la base de datos INTERPRO como la descripción INTERPRO (entrada IPR003000). Para identificar la presencia de un dominio "SIR2" en una secuencia de proteínas, y realizar la determinación de que un polipéptido o proteína de interés tiene un perfil particular, se puede buscar la secuencia de aminoácidos de la proteína en la base de datos Pfam de los HMM (por ejemplo, la base de datos Pfam, versión 9) usando los parámetros por defecto (http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/HMM_search). El dominio SIR2 se indexa en Pfam como PF02146 y en INTERPRO como la descripción INTERPRO (entrada IPR003000). Por ejemplo, el programa hmmsf, que está disponible como parte del paquete HMMER de programas de búsqueda, es un programa por defecto específico de familia para MILPAT0063 y una puntuación de 15 es la puntuación umbral por defecto para determinar un éxito. Alternativamente, se puede disminuir la puntuación umbral para determinar un éxito (por ejemplo, a 8 bits). Se puede encontrar una descripción de la base de datos Pfam en "The Pfam Protein Families Database" Bateman A, Birney E, Cerruti L, Durbin R, Ewlinger L, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Howe KL, Marshall M, Sonnhammer EL (2002) *Nucleic Acids Research* 30(1):276-280 y Sonnhammer *et al.* (1997) *Proteins* 28(3):405-420 y se puede encontrar una descripción detallada de los HMM, por ejemplo, en Gribskov *et al.* (1990) *Meth. Enzymol.* 183:146-159; Gribskov *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4355-4358; Krogh *et al.* (1994) *J. Mol. Biol.* 235:1501-1531; y Stultz *et al.* (1993) *Protein Sci.* 2:305-314.

Las proteínas codificadas por los miembros de la familia de genes SIR2 pueden mostrar una elevada conservación de secuencia en un dominio central de 250 aminoácidos. Un gen bien caracterizado en esta familia es SIR2 de *S. cerevisiae*, que está implicado en el lugar HM de silenciamiento que contiene la información que especifica el tipo de acoplamiento de levadura, los efectos de posición de telómeros y el envejecimiento celular (Guarente, 1999; Kaeberlein *et al.*, 1999; Shore, 2000). La proteína Sir2 de levadura pertenece a una familia de histona desacetilasas (revisada en Guarente, 2000; Shore, 2000). La proteína Sir2 es una desacetilasa que puede usar NAD como cofactor (Imai *et al.*, 2000; Moazed, 2001; Smith *et al.*, 2000; Tanner *et al.*, 2000; Tanny y Moazed, 2001). A diferencia de otras desacetilasas, muchas de las cuales están implicadas en el silenciamiento de genes, Sir2 es relativamente insensible a los inhibidores de histona desacetilasa tales como tricostatina A (TSA) (Imai *et al.*, 2000; Landry *et al.*, 2000a; Smith *et al.*, 2000). Los homólogos de Sir2 de mamífero, tales como SIRT1, tienen actividad de desacetilasa dependiente de NAD (Imai *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000).

Sirtuínas de mamífero a modo de ejemplo incluyen SIRT1, SIRT2, y SIRT3, por ejemplo, SIRT1, SIRT2, y SIRT3 humanas. Un compuesto descrito en el presente documento puede inhibir una o más actividades de una sirtuína de mamífero, por ejemplo, SIRT1, SIRT2, o SIRT3, por ejemplo, con una Ki de menos de 500, 200, 100, 50, o 40 nM. Por ejemplo, el compuesto puede inhibir la actividad de desacetilasa, por ejemplo, con respecto a un sustrato natural o artificial, por ejemplo, un sustrato descrito en el presente documento, por ejemplo, como sigue a continuación.

Los sustratos naturales para SIRT1 incluyen histonas, p53, y factores de transcripción FoxO tales como FoxO1 y FoxO3. Las proteínas SIRT1 se unen a diversas proteínas distintas, denominadas de "compañeros de unión de

SIRT1". Por ejemplo, SIRT1 se une a p53 y desempeña un papel en la ruta de p53, por ejemplo, K370, K371, K372, K381, y/o K382 de p53 o un péptido que incluye una o más de estas lisinas. Por ejemplo, el péptido puede tener entre 5 y 15 aminoácidos de longitud. Las proteínas SIRT1 también pueden desacetilar histonas. Por ejemplo, SIRT1 puede desacetilar las lisinas 9 o 14 de la histona H3 o pequeños péptidos que incluyen una o más de estas lisinas.

5 La desacetilación de la histona altera la estructura local de la cromatina y por lo tanto puede regular la transcripción de un gen en esa venciada. Muchos de los compañeros de unión de SIRT1 son factores de transcripción, por ejemplo, proteínas que reconocen sitios de ADN específicos. Por ejemplo, SIRT1 desacetila y regula negativamente proteínas *forkhead* (es decir, proteínas FoxO). La interacción entre SIRT1 y los compañeros de unión de SIRT1 puede suministrar SIRT1 a regiones específicas de un genoma y puede dar como resultado la manifestación local de

10 sustratos, por ejemplo, histonas y factores de transcripción, localizados en la región específica.

Los sustratos naturales para SIRT2 incluyen tubulina, por ejemplo, alfa-tubulina. Véase, por ejemplo, North *et al.* Mol Cell. Febrero de 2003; 11(2):437-44. Sus tratos a modo de ejemplo incluyen un péptido que incluye lisina 40 de alfa-tubulina.

15

Otros sustratos más de sirtuína a modo de ejemplo incluyen citocromo c y de péptidos acetilados del mismo.

Las expresiones "proteína SIRT1" y "polipéptido SIRT1" se usan de forma intercambiable en el presente documento y se refieren a un polipéptido que es al menos un 25 % idéntico al dominio catalítico de SIRT1 conservado de 250 aminoácidos, restos de aminoácidos 258 a 451 de SEC ID N°: 1. SEC ID N°: 1 representa la secuencia de aminoácidos de la SIRT1 humana. En realizaciones preferentes, un polipéptido SIRT1 puede ser al menos un 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 99 % homólogo a SEC ID N°: 1 o a la secuencia de aminoácidos entre los restos de aminoácido 258 y 451 de SEC ID N°: 1. En otras realizaciones, el polipéptido SIRT1 puede ser un fragmento, por ejemplo, un fragmento de SIRT1 capaz de uno o más de: desacetilar un sustrato en presencia de NAD y/o un análogo de NAD y ser capaz de unirse a una proteína diana, por ejemplo, un factor de transcripción. Tales funciones se pueden evaluar, por ejemplo, mediante los métodos que se describen en el presente documento. En otras realizaciones, el polipéptido SIRT1 puede ser un polipéptido SIRT1 de "longitud completa". La expresión "longitud completa", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que tiene al menos la longitud de un polipéptido SIRT1 de origen natural (u otra proteína descrita en el presente documento). Un polipéptido SIRT1 de "longitud completa" o un fragmento del mismo también puede incluir otras secuencias, por ejemplo, una marca de purificación, u otros compuestos añadidos, por ejemplo, un fluoróforo unido, o un cofactor. La expresión "polipéptidos SIRT1" también puede incluir secuencias o variantes que incluyen una o más sustituciones, por ejemplo, entre una y diez sustituciones, con respecto al miembro de las familias Sir2 de origen natural. "Actividad de SIRT1" se refiere a una o más actividades de SIRT1, por ejemplo, desacetilación de un sustrato (por ejemplo, un aminoácido, un péptido, o una proteína), por ejemplo, factores de transcripción (por ejemplo, p53) o proteínas histonas (por ejemplo, en presencia de un cofactor tal como NAD y/o un análogo de NAD) y unión a una diana, por ejemplo, una proteína diana, por ejemplo, un factor de transcripción.

20

25

30

35

Como se usa en el presente documento, una "parte biológicamente activa" o un "dominio funcional" de una proteína incluye un fragmento de una proteína de interés que participa en una interacción, por ejemplo, una interacción intramolecular o intermolecular, por ejemplo, una unión o interacción catalítica. Una interacción intermolecular puede ser una interacción de unión o una interacción enzimática específicas (por ejemplo, la interacción puede ser transitoria y se forma o se rompe un enlace covalente). Una interacción intermolecular se puede producir entre la proteína y otra proteína, entre la proteína y otro compuesto, o entre una primera molécula y una segunda molécula de la proteína (por ejemplo, una interacción de dimerización). Las partes biológicamente activas/dominios funcionales de una proteína incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente homologas a, o derivadas de, una secuencia de aminoácidos de la proteína que incluye menos aminoácidos que la proteína natural de longitud completa, y exhibe al menos una actividad de la proteína natural. Las partes biológicamente activas/dominios funcionales se pueden identificar mediante diversas técnicas que incluyen análisis de truncación, mutagénesis dirigida al sitio, y proteolisis. Se puede evaluar la actividad de los mutantes o los fragmentos proteolíticos mediante un ensayo bioquímico o biológico apropiado (por ejemplo, genético). En algunas realizaciones, un dominio funcional se pliega independientemente. Por lo general, las partes biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de una proteína, por ejemplo, SIRT1. Un dominio a modo de ejemplo es el dominio catalítico central de SIRT1. Una parte biológicamente activa/dominio funcional de una proteína puede ser un polipéptido que tiene, por ejemplo, 10, 25, 50, 100, 200 o más aminoácidos de longitud. Las partes biológicamente activas/dominios funcionales de una proteína se pueden usar como dianas para desarrollar agentes que modulan SIRT1.

40

45

50

55

Las siguientes son secuencias de SIR a modo de ejemplo:

60

>sp|Q96EB6|SIR1_HUMAN sirtuína desacetilasa dependiente de NAD 1 (EC 3,5,1,-) (hSIRT1) (hSIR2) (proteína 1 de tipo SIR2) - *Homo sapiens* (Ser humano).

MADEAALALQPGGSPSAAGADREAASSPAGEPLRKRPRRDGPGGLERSPGEPGGAAPERE
V
PAAARGCPGAAAAALWREAEAEAAAAGGEQEAQATAAAGEGDNGPGLQGPSREPPLADN
L
YDEDDDEGESEEEEEAAAAAIGYRDNLLFGDEIITNGFHSCESEDEEDRASHASSSDWTPR
P
RIGPYTFVQQHLMIGTDPRTILKDLLPETIPPELDDMTLWQIVINILSEPPKRKKRKD
I
NTIEDAVKLLQECKKIIIVLTGAGVSVSCGIPDFRSRDGIYARLAVDFPDLDPQAMFDI
E
YFRKDP RPFFKFAKEIYPGQFQPSLCHKFIALSDKEGKLLRNYTQNI DTLEQVAGIQRI
I
QCHGSFATASCLICKYKVDCEAVRGDIFNQVVRCPRCPADEPLAIMKPEIVFFGENLP
E
QFHRAMKYDKDEVDLLIVIGSSLKVRPVALIPSSIPHEVPQILINREPLPHLHFDVELL
G
DCDVIINELCHRLGGEYAKLCCNPVKLSEITEKPPRTQKELAYLSEL PPTPLHVSEDSS
S
PERTSPDSSVIVTLLDQAAKSNDDL DVSESKGCMEEKPQEVQTSRNVESIAEQMENPD
L
KNVGSSTGEKNERTSVAGTVRKWCWPNRVAKEQISRRLDGNQYLFPPNRYIFHGAEVYS
D
SEDDVLSSSSCGSNSDSGTCQSPSLEEPMEDESEIEEFYNGLEDEPDVPERAGGAGFGT
D
GDDQEAINEAISVKQEV TDMNYP SNKS (SEC ID N°: 1)

- 5 >sp|Q8IXJ6|SIR2_HUMAN sirtuina desacetilasa dependiente de NAD 2 (EC 3,5,1,-) (tipo SIR2) (proteína 2 de tipo SIR2) - *Homo sapiens* (Ser humano).

MAEPDP SHPLETQAGKVQEAQDS DSDSEGGAAGGEADMDFLRNLFSQTL SLSGQKERLL
D
ELTLEGVARYMQSERCRRVICLVGAGIST SAGIPDFRSPSTGLYDNLEKYHLPYPEAIF
E
ISYFKKHPEPFFALAKELYPGQFKPTICHYFMRL LKDKGLLLRCYTQNI DTLERIAGLE
Q
EDLVEAHGTFY TSHCVSASCRHEYPLSWMKEKIFSEVTPKCEDCQSLVKPDIVFFGESL
P
ARFFSCMQSDFLKVDLLLVMGTSLQVQPFASLISKAPLSTPRL LINKEKAGQSDPFLGM
I
MGLGGGMDFDSKKAYRDVAWLGECDQGCLALAE LLGWKKELEDLVRREHASIDAQSGAG
V
PNPSTSASPKKSPPPAKDEARTTEREKPQ (SEC ID N°: 2)

- 10 >sp|Q9NTG7|SIR3_HUMAN sirtuina desacetilasa dependiente de NAD 3, precursor mitocondrial (EC 3,5,1,-) (proteína 3 de tipo SIR2) (hSIRT3) - *Homo sapiens* (Ser humano).

MAFWGWRAAAALRLWGRVVERVEAGGGVGPFFQACGCRLVLGGRDDVSAGLRGSHGARGE
P
LDPARPLQRPPRPEVPRAFRRQPRAAAPSTFFSSIKGGRRSISFSVGASSVVGSGGSSD
K
GKLSLQDVAELIRARACQRVVVMVGAGISTPSGIPDFRSPGSGLYSNLQQYDLPYPEAI
F
ELPFFFHNPKEFFTLAKELYPGNYKPNVTHYFLRLLHDKGLLLRLYTQNIDGLERVSGI
P
ASKLVEAHGTFASATCTVCQRPFPGEDIRADVMADRVPRCPVCTGVVKPDIVFFGEPLP
Q
RFLLVVDFPMADLLLILGTSLEVEPFASLTEAVRSSVPRLINRDLVGPLAWHPRSRD
V

AQLGDVVHGVESLVELLWTEEMRDLVQRETGKLDGPK (SEC ID N°: 3)

>sp|Q9Y6E7|SIR4_HUMAN sirtuína desacetilasa dependiente de NAD 4 (EC 3,5,1,-) (proteína 4 de tipo SIR2) - *Homo sapiens* (Ser humano).

5
MKMSFALTFRSAKGRWIANPSQPCSKASIGLFPASPPLDPEKVKELQRFITLSKRLLV
M
TGAGISTESGIPDYRSEKVGLYARTDRRPIQHGDVFVSAPIRQRYWARNFVWGPQFSSH
Q
PNPAHWALSTWEKLGKLYWLVTQNVDAHHTKAGSRRLTELHGCMDRVLCDCGEQTPRG
V
LQERFQVLNPTWSAEAHGLAPDGDVFLSEEQVRSFQVPTCVQCGLLKPVVFFGDTVN
P
DKVDFVHKRVKEADSLVVGSSLQVYSGYRIFILTAWKLPAILNIGPTRSDDLACK
L
NSRCGELLPLIDPC (SEC ID N°: 4)

>sp|Q9NXA8|SIR5_HUMAN sirtuína desacetilasa dependiente de NAD 5 (EC 3,5,1,-) (proteína 5 de tipo SIR2) - *Homo sapiens* (Ser humano).

10
MRPLQIVPSRLISQLYCGLKPPASTRNQICLKMARPSSSMADFRKFFAKAKHIVIISGA
G
VSAESGVPTFRGAGGYWRKWQAQDLATPLAFAHNPSRVWEFYHYRREVMGSKEPNAGHR
A
IAECETRLGKQGRVVVITQNI DELHRKAGTKNLEIHGSLFKTRCTSCGVVAENYKSP
I
CPALSGKGAPEPGTQDASIPVEKLP RCEEAGCGLLRPHVVWFGENLDPAIL EVDREL
A
HCDLCLVVGTSVVYPAAMFAPQVAARGVPVAEFNTETTPATNRFRFHFQGPCGTTLPE
A
LACHENETVS (SEC ID N°: 5)

>sp|Q8N6T7|SIR6_HUMAN sirtuína desacetilasa dependiente de NAD 6 (EC 3,5,1,-) (proteína 6 de tipo SIR2) - *Homo sapiens* (Ser humano).

15

MSVNYAAGLSPYADKKGKGLPEIFDPPEELERKQVWELARLVWQSSSVVFHTGAGISTAS
 G
 IPDFRGPBGVWTMEERGLAPKFDTTTFESARPTQTHMALVQLERVGLLRFLVSQNVLDGLH
 V
 RSGFPRDKLAELHGNMFVEECAKCKTQYVRDTPVGTMLKATGRLCTVAKARGLRACRG
 E
 LRDTILDWEDSLPDRDLALADEASRNADLSITLGTSLQIRPSGNLPLATKRRGGRLVIV
 N
 LQPTKHDRHADLRIHGYVDEVMTRLMKHLGLEIPAWDGPRVLERALPPLPRPPTPKLEP
 K
 EESPTRINGSIPAGPKQEPQAQHNHNGSEPASPKRERPTSPAPHRPPKRVKAKAVPS
 (SEC ID Nº: 6)

>sp|Q9NRC8|SIR7_HUMAN sirtuina desacetilasa dependiente de NAD 7 (EC 3,5,1,-) (proteína 7 de tipo SIR2) - *Homo sapiens* (Ser humano).

5
 MAAGGLSRSERKAAERVRLREEQQRERLRQVSRILRKAAAERSAEEGRLLAESADLVT
 E
 LQGRSRRREGLKRRQEEVCDDPEELRGKVRELASAVRNAKYLVVYTGAGISTAASIPDY
 R
 GPNGVWTLQKGRSVSAADLSEAEPTLTHMSITRLHEQKLVQHVVSQNCGLHLRSGLP
 R
 TAISELHGNMYIEVCTSCVPNREYVRVDFVTERTALHRHQTGRTCHKCGTQLRDTIVHF
 G
 ERGTLGQPLNWEAATEAASRADTILCLGSSSLKVLKKYPRLWCMTKPPSRRPKLYIVNLQ
 W
 TPKDDWAALKLHGKDDVMRLMAELGLEIPAYSRWQDPIFSLATPLRAGEEGSHSRKS
 L
 CRSREEAPPGDRGAPLSSAPILGGWFGRGCTKRTRKRVKVT (SEC ID Nº: 7)

10 Los compuestos a modo de ejemplo descritos en el presente documento pueden inhibir la actividad de SIRT1 o un dominio funcional de la misma en al menos un 10, 20, 25, 30, 50, 80, o 90 %, con respecto a un sustrato natural o artificial descrito el presente documento. Por ejemplo, los compuestos pueden tener una K_i de menos de 500, 200, 100, o 50 nM.

15 Un compuesto descrito en el presente documento también puede modular un complejo entre una sirtuina y un factor de transcripción, por ejemplo, aumentar o disminuir la formación, destrucción, y/o estabilidad del complejo. Complejos sirtuina-TF a modo de ejemplo incluyen Sir2-PCAF, SIR2-MyoD, Sir2-PCAF-MyoD, Sir2-p53, Sir2-FoxO1, y Sir2-FoxO3. Un compuesto descrito en el presente documento también puede modular la expresión de un gen regulado por Sir2, por ejemplo, un gen descrito en la Tabla 1 de Fulco *et al.* (2003) Mol. Cell 12:51-62.

20 *Ensayos in vitro*

En algunas realizaciones, se puede ensayar *in vitro* la interacción con, por ejemplo, la unión de, SIRT1. La mezcla de reacción puede incluir un cofactor de SIRT1 tal como NAD y/o un análogo de NAD.

25 En otras realizaciones, la mezcla de reacción puede incluir un compañero de unión de SIRT1, por ejemplo, un factor de transcripción, por ejemplo, p53 o un factor de transcripción distinto de p53 tal como FoxO o FoxO3, y los compuestos se pueden analizar sistemáticamente, por ejemplo, en un ensayo *in vitro*, para evaluar la capacidad de un compuesto de ensayo para modular la interacción entre SIRT1 y un compañero de unión de SIRT1, por ejemplo, un factor de transcripción. Este tipo de ensayo se puede conseguir, por ejemplo, mediante acoplamiento de uno de los componentes a un radioisótopo o marcaje enzimático de modo que la unión del componente marcado al otro
 30 componente se pueda determinar mediante la detección del componente marcado en un complejo. Un componente se puede marcar con ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , o ^3H , directa o indirectamente, y el radioisótopo se detecta mediante la cuenta directa de radioemisión o mediante la cuenta de centelleo. Alternativamente, un componente se puede marcar enzimáticamente, por ejemplo, con peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, o luciferasa, y el marcaje enzimático se detecta mediante la determinación de la conversión de un sustrato apropiado en producto. También se pueden usar
 35 ensayos competitivos para evaluar la interacción física entre un compuesto ensayo y una diana.

Los ensayos exentos de células implican preparar una mezcla de reacción de la proteína diana (por ejemplo, SIRT1) y el compuesto de ensayo en unas condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir que los dos componentes interactúen y se unan, formando de ese modo un complejo que se puede retirar y/o detectar.

5 La interacción entre las dos moléculas también se puede detectar, por ejemplo, usando un ensayo de fluorescencia en el que al menos una molécula está marcada fluorescentemente. Un ejemplo de tal ensayo incluye la transferencia de energía por fluorescencia (FET o FRET para transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) (véase, por ejemplo Lakowicz *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N° 5.631.169; Stavrianopoulos, *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N° 4.868.103). Se selecciona un marcaje fluoróforo en una primera
10 molécula "donadora" de modo que su energía fluorescente emitida se absorba por un marcaje fluorescente en una segunda molécula "aceptora", que a su vez es capaz de emitir fluorescencia debido a la energía absorbida. Alternativamente, la molécula "donadora" de la proteína puede utilizar simplemente la energía fluorescente natural de los restos de triptófano. Se seleccionan marcajes que emitan diferentes longitudes de onda de luz, de modo que el marcaje de la molécula "aceptora" se pueda diferenciar del de la "donadora". Dado que la eficacia de la transferencia de energía entre los marcajes está relacionada con la distancia que separa las moléculas, se puede
15 evaluar la relación espacial entre las moléculas. En una situación en la que se produce un enlace entre las moléculas, la emisión fluorescente del marcaje de la molécula "aceptora" en el ensayo debería ser máxima. Un suceso de FET de una unión se puede medir convenientemente a través de medios de detección fluorométricos convencionales bien conocidos en la técnica (por ejemplo, usando un fluorímetro).

20 Otro ejemplo de un ensayo de fluorescencia es la polarización por fluorescencia (FP). En la FP, solo necesita marcarse un componente. La interacción de unión se detecta mediante el cambio en el tamaño molecular del componente marcado. El cambio de tamaño altera la velocidad de rotación del componente en solución y se detecta como un cambio en la FP. Véase, por ejemplo, Nasir *et al.* (1999) *Comb Chem HTS* 2:177-190; Jameson *et al.* (1995) *Methods Enzymol* 246:283; Seethala *et al.* (1998) *Anal Biochem.* 255:257. La polarización por fluorescencia se puede monitorizar en placas de múltiples pocillos usando, por ejemplo, el lector Tecan Polarion™. Véase, por
25 ejemplo, Parker *et al.* (2000) *Journal of Biomolecular Screening* 5:77 - 88; y Shoeman, *et al.* (1999) 38, 16802-16809.

30 En otra realización, la determinación de la capacidad de la proteína SIRT1 para unirse a una molécula objetivo se puede llevar a cabo usando Análisis de Interacción Biomolecular (BIA) en tiempo real (véase, por ejemplo, Sjolander, S. y Urbaniczky, C. (1991) *Anal. Chem.* 63:2338-2345 y Szabo *et al.* (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705). La "resonancia de plasmones de superficie" o "BIA" detecta interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los componentes que interactúan (por ejemplo, BIAcore). Los cambios de masa en la superficie de unión (indicativo de un suceso de unión) dan como resultado alteraciones del índice de refracción de la luz cerca de la
35 superficie (el fenómeno óptico de la resonancia de plasmones de superficie (SPR)), dando como resultado una señal detectable que se puede usar como un indicador de reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.

40 En una realización, se ancla SIRT1 en una fase sólida. Los complejos SIRT1/compuesto de ensayo anclados en la fase sólida se pueden detectar al final de la reacción, por ejemplo, la reacción de unión. Por ejemplo, se puede anclar SIRT1 en una superficie sólida, y el compuesto de ensayo (que no está anclado) se puede marcar, directa o indirectamente, con los marcajes detectables que se discuten en el presente documento.

45 Puede ser deseable inmovilizar SIRT1 o un anticuerpo anti-SIRT1 para facilitar la separación de la forma que está complejada de la forma que está sin complejar de una o ambas proteínas, así como para permitir la automatización del ensayo. La unión de un compuesto de ensayo a una proteína SIRT1, o la interacción de una proteína SIRT1 con un segundo componente en presencia y en ausencia de un compuesto candidato, se puede llevar a cabo en cualquier recipiente adecuado para contener los reactantes. Ejemplos de tales recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo, y tubos de microcentrífuga. En una realización, se puede proporcionar una proteína de fusión que añade un dominio que permite que una o ambas proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, se
50 pueden adsorber proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa/SIRT1 o proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa/diana en perlas de sefarosa con glutatión (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que a continuación se combinan con el compuesto de ensayo y el compuesto de ensayo y la proteína diana o la proteína SIRT1 no absorbida, y la mezcla se incuba en condiciones que favorecen la formación de los complejos (por ejemplo, en condiciones fisiológicas de salinidad y pH). Después de la incubación,
55 las perlas o los pocillos de la placa de microtitulación se lavan para retirar cualquier componente sin unir, se inmoviliza la matriz en el caso de las perlas, y se determina el complejo directa o indirectamente, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, los complejos se pueden disociar de la matriz, y se puede determinar el nivel de unión o actividad de SIRT1 usando técnicas convencionales.

60 Otras técnicas para inmovilizar la proteína SIRT1 o una molécula diana en matrices incluyen usar conjugación con biotina y estreptavidina. La proteína SIRT1 o las moléculas diana biotiniladas se pueden preparar a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) usando técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, kit de biotinización, Pierce Chemicals, Rockford, IL), e inmovilizar en los pocillos de una placa de 96 pocillos revestida con estreptavidina (Pierce Chemical).

65

Con el fin de llevar a cabo el ensayo, se añade el componente no inmovilizado a la superficie revestida que contiene el componente anclado. Después de que se haya completado la reacción, se retiran los componentes que no han reaccionado (por ejemplo, mediante lavado) en condiciones tales que cualquier complejo formado permanezca inmovilizado en la superficie sólida. La detención de los complejos anclados en la superficie sólida se puede llevar a cabo mediante diversas formas. Cuando el componente no inmovilizado se ha marcado previamente, la detección de marcaje inmovilizado en la superficie indica que se han formado complejos. Cuando el componente previamente no inmovilizado no se marca previamente, se puede usar un marcaje indirecto para detectar los complejos anclados en la superficie, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado específico para el componente inmovilizado (el anticuerpo, a su vez, puede estar marcado directamente o marcado indirectamente, por ejemplo, con un anticuerpo anti-Ig marcado).

En una realización, este ensayo se lleva a cabo utilizando anticuerpos reactivos con una proteína SIRT1 o moléculas diana pero que no interfieren con la unión de la proteína SIRT1 a su molécula diana. Tales anticuerpos se pueden derivatizar a los pocillos de la placa, y la diana o la proteína SIRT1 sin unir se pueden atrapar en los pocillos mediante conjugación con el anticuerpo. Los métodos para detectar tales complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados de GST, incluyen la inmunodetección de complejos usando anticuerpos reactivos con la proteína SIRT1 o la molécula diana, así como ensayos ligados a enzimas que dependen de la detección de la actividad enzimática asociada a la proteína SIRT1 o a la molécula diana.

Alternativamente, se pueden llevar a cabo ensayos exentos de células en fase líquida. En tal ensayo, los productos de reacción se separan de los componentes que no han reaccionado mediante cualquiera de diversas técnicas convencionales que incluyen, pero no se limitan a: centrifugación diferencial (véase, por ejemplo, Rivas, G., y Minton, A.P., (1993) Trends Biochem Sci 18:284-7); cromatografía (cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico); electroforesis (véase, por ejemplo, Ausubel, F. *et al.*, eds. Current Protocols in Molecular Biology 1999, J. Wiley: Nueva York); e inmunoprecipitación (véase, por ejemplo, Ausubel, F. *et al.*, eds. (1999) Current Protocols in Molecular Biology, J. Wiley: Nueva York). Los expertos en la materia conocen tales resinas y técnicas cromatográficas (véase, por ejemplo, Heegaard, N.H., (1998) J Mol Recognit 11:141-8; Hage, D.S., y Tweed, S.A. (1997) J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 699:499-525). Además, también se puede usar de forma conveniente la transferencia de energía por fluorescencia, como se describe en el presente documento, para detectar la unión sin purificación adicional del complejo a partir de la solución.

En una realización preferente, el ensayo incluye poner en contacto la proteína SIRT1 o la parte biológicamente activa de la misma con un compuesto conocido que se une a la SIRT1 para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto de ensayo, y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para interactuar con la proteína SIRT1, en el que la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para interactuar con la proteína SIRT1 incluye determinar la capacidad del compuesto de ensayo para unirse preferentemente a la SIRT1 o a la parte biológicamente activa de la misma, o para modular la actividad de una molécula diana, en comparación con el compuesto conocido.

Un método de ensayo a modo de ejemplo incluye un formato de 1536 pocillos del ensayo enzimático de SirT1 que se basa en el principio del ensayo comercial "*Fluor-de-Lys*" de Biomol, que es fluorogénico (www.biomol.com/store/Product_Data_PDFs/ak500.pdf). En este ensayo, la desacetilación de la función e-amino de un resto de lisilo se acopla a una etapa de revelado fluorogénico que depende de la funcionalidad e-amino sin bloquear y genera aminometilcumarina fluorescente. La fluorescencia se puede leer en un lector macroscópico comercial.

Ensayos adicionales

También se puede evaluar un compuesto o una librería de compuestos que se describe en el presente documento usando uno de los siguientes sistemas modelo para una enfermedad o trastorno, u otros modelos conocidos para una enfermedad o trastorno que se describe en el presente documento.

Modelos animales de enfermedad de Parkinson a modo de ejemplo incluyen primates que se vuelven parkinsonianos por tratamiento con la neurotoxina dopaminérgica 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (véase, por ejemplo, el documento de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20030055231 y Wichmann *et al.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., 991:199-213 (2003)); ratas lesionadas con 6-hidroxidopamina (por ejemplo, Lab. Anim. Sci., 49:363-71 (1999)); y modelos de invertebrados transgénicos (por ejemplo, Lakso *et al.*, J. Neurochem., 86:165-72 (2003) y Link, Mech. Ageing Dev., 122:1639-49 (2001)).

Relaciones estructura-actividad y diseño basado en la estructura. También es posible usar relaciones estructura-actividad (SAR) y principios de diseño basado en la estructura para producir un compuesto que interactúe con una sirtuína, por ejemplo, que antagonice o agonice una sirtuína. Las SAR proporcionan información de la actividad de compuestos relacionados en al menos un ensayo pertinente. Se realizan correlaciones entre las características estructurales de un compuesto interés y una actividad. Por ejemplo, puede ser posible evaluando las SAR para una familia de compuestos relacionada con un compuesto descrito en el presente documento para identificar las una o más características estructurales requeridas para la actividad agonista. A continuación se puede

producir químicamente una librería de compuestos que varía estas características. En otro ejemplo, un compuesto individual que se predice que interactúa se produce y se evalúa *in vitro* o *in vivo*.

5 El diseño basado en la estructura puede incluir determinar un modelo estructural de la interacción física de un dominio funcional de una sirtuina y un compuesto. El modelo estructural puede indicar la forma en que se puede diseñar el compuesto, por ejemplo, para mejorar la interacción o reducir las interacciones desfavorables. La interacción del compuesto con la sirtuina se puede identificar, por ejemplo, mediante solución de una estructura cristalina, RMN, o modelado basado en ordenador, por ejemplo, métodos de acoplamiento. Véase, por ejemplo, Ewing *et al.* J Comput Aided Mol Des. Mayo de 2001; 15(5):411-28.

10 Se pueden usar tanto el enfoque SAR como el enfoque del diseño basado en estructura, así como otros métodos, para identificar un farmacóforo. Un farmacóforo se define como una disposición tridimensional (3D) distintiva de grupos químicos. La selección de tales grupos puede ser favorable para la actividad biológica. Dado que una molécula farmacéuticamente activa debe interactuar con una o más estructuras moleculares en el cuerpo del sujeto con el fin de ser eficaz, y las propiedades funcionales deseadas de la molécula derivan de estas interacciones, cada compuesto activo debe contener una disposición distintiva de grupos químicos que permita que se produzca esta interacción. Los grupos químicos, denominados habitualmente centros descriptores, pueden estar representados por (a) un átomo o grupo de átomos; (b) pseudoátomos, por ejemplo, un centro de un anillo, o el centro de masa de una molécula; (c) vectores, por ejemplo, pares atómicos, direcciones de pares de electrones no apareados, o la normal a un plano. Una vez formulado un farmacóforo se puede usar para buscar en una base de datos de compuestos químicos, por ejemplo, los que tienen una estructura compatible con el farmacóforo. Véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N° 6.343.257; Y. C. Martin, 3D Database Searching in Drug Design, J. Med. Chem. 35, 2145(1992); y A. C. Good y J. S. Mason, Three Dimensional Structure Database Searches, Reviews in Comp. Chem. 7, 67(1996). Las consultas de búsqueda de base de datos se basan no solo en la información de las propiedades químicas sino también en información geométrica precisa.

15 Los enfoques basados en ordenador pueden usar búsquedas de base de datos para encontrar plantillas que concuerden; Y. C. Martin, Database searching in drug design, J. Medicinal Chemistry, vol. 35, pp 2145-54 (1992), que se incorpora en el presente documento por referencia. Son aplicables los métodos existentes de búsqueda de compuestos en bases de datos 2D y 3D. Lederle de American Cyanamid (Pearl River, N.Y.) ha sido pionero en la búsqueda por forma molecular, la búsqueda 3D y los vectores de moda de bases de datos. Los proveedores comerciales y otros grupos de investigación también proporcionan posibilidades de búsqueda (MACSS-3D, Molecular Design Ltd. (San Leandro, Calif.); CAVEAT Lauri, G. *et al.*, University of California (Berkeley, Calif.); CHEM-X, Chemical Design, Inc. (Mahwah, N.J.)). El software para estas búsquedas se pueden usar para analizar bases de datos de compuestos farmacológicos potenciales indexados por su estructura química y geométrica significativa (por ejemplo, Archivo de Fármacos Convencionales (Derwent Publications Ltd., Londres, Inglaterra), base de datos de Bielstein (Bielstein Information, Frankfurt, Alemania o Chicago), y base de datos de Chemical Registry (CAS, Columbus, Ohio)).

20 Una vez se identifica que el compuesto coincide con el farmacóforo, se pueden ensayar su actividad *in vitro*, *in vivo*, o *in silico*, por ejemplo, por unión a una sirtuina o a un dominio de la misma.

25 En una realización, un compuesto que es un agonista o un candidato a agonista, por ejemplo, un compuesto descrito en Nature, 11 de septiembre de 2003; 425(6954):191-196 se puede modificar para identificar un antagonista, por ejemplo, usando el método que se describe en el presente documento. Por ejemplo, se puede preparar una librería de compuestos relacionados y se puede analizar sistemáticamente la librería en un ensayo que se describe en el presente documento.

30 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención incluyen las obtenidas a partir de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de sales de ácido adecuadas incluyen acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptanoato, glicolato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, palmoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, salicilato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Se pueden emplear otros ácidos, tales como el oxálico, aunque no sean en sí mismos farmacéuticamente aceptables, en la preparación de sales útiles como compuestos intermedios en la obtención de los compuestos de la invención y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables. Sales derivadas de bases apropiadas incluyen sales de metal alcalino (por ejemplo, sodio), metal alcalinotérreo (por ejemplo, magnesio), amonio y N-(alquil)₄⁺. También se describe la cuaternarización de cualquier grupo básico que contiene nitrógeno de los compuestos que se desvelan en el presente documento. Se pueden obtener productos solubles o dispersables en agua o aceite mediante tal cuaternarización. Las formas salinas de los compuestos de cualquiera de las fórmulas del presente documento pueden ser sales de aminoácido de grupos carboxi (por ejemplo, sales de L-arginina, -lisina, -histidina).

Los compuestos de las fórmulas descritas en el presente documento se pueden administrar, por ejemplo, mediante inyección, por vía intravenosa, intraarterial, subdérmica, intraperitoneal, intramuscular, o subcutánea; o por vía oral, bucal, nasal, transmucosa, tópica, en una preparación oftálmica, o mediante inhalación, con una dosificación que varía de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, alternativamente dosificaciones entre 1 mg y 1000 mg/dosis, cada 4 a 120 horas, o de acuerdo con los requisitos del fármaco en particular. Los métodos del presente documento contemplan la administración de una cantidad eficaz de compuesto o composición de compuesto para conseguir el efecto deseado o indicado. Por lo general, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administrarán de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 veces por día o, alternativamente, en forma de una infusión continua. Tal administración se puede usar como terapia crónica o aguda. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los materiales de vehículo para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del receptor tratado y de la vía particular de administración. Una preparación habitual contendrá de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 95 % de compuesto activo (p/p). Alternativamente, tales preparaciones contienen de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 80 % de compuesto activo.

Se pueden requerir dosis menores o mayores que las indicadas anteriormente. La dosificación y los regímenes de tratamiento específicos para cualquier paciente en particular dependerán de diversos factores, que incluyen la actividad de compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, estado general de salud, sexo, dieta, período de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos, gravedad y desarrollo de la enfermedad, afección o síntomas, predisposición del paciente a la enfermedad, afección o síntomas, y del juicio del médico responsable del tratamiento.

Después de la mejoría de la afección del paciente, se puede administrar una dosis de mantenimiento de un compuesto, composición o combinación de la presente invención, si fuera necesario. Posteriormente, la dosificación o la frecuencia de administración, o ambas, se pueden reducir en función de los síntomas, hasta un nivel en el que se mantenga la mejoría de la afección cuando se han aliviado los síntomas hasta el nivel deseado. Sin embargo, los pacientes pueden requerir un tratamiento intermitente a largo plazo después de cualquier reaparición de los síntomas de la enfermedad.

Las composiciones descritas en el presente documento incluyen los compuestos de las fórmulas descritas en el presente documento, así como agentes terapéuticos adicionales, si estuvieran presentes, en cantidades eficaces para conseguir una modulación de la enfermedad o de los síntomas de la enfermedad, incluyendo los que se describen en el presente documento.

La expresión "vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o adyuvante que se puede administrar a un paciente, junto con un compuesto de la presente invención, y que no destruye la actividad farmacológica del mismo y no es tóxico cuando se administra en dosis suficientes para suministrar una cantidad terapéutica del compuesto.

Vehículos, ayudantes y portadores farmacéuticamente aceptables que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, sistemas de suministro de fármacos autoemulgentes (SEDDS) tales como succinato de d- α -tocoferol polietilenglicol 1000, tensioactivos usados en las formas de dosificación farmacéuticas tales como Tweens u otras matrices poliméricas de suministro similares, proteínas de suero, tales como alúmina de suero humano, sustancias de tamponamiento tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos saturados vegetales, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilato, ceras, copolímeros en bloque de poliestireno-polioxiopropileno, polietilenglicol y grasa de lana. También se pueden usar de forma ventajosa ciclodextrinas tales como α -, β -, γ -ciclodextrina, o derivados modificados químicamente tales como hidroxialquilciclodextrinas, incluyendo 2- y 3-hidroxipropil- β -ciclodextrinas, u otros derivados solubilizados, para mejorar el suministro de los compuestos de las fórmulas que se describen en el presente documento.

Las composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento se pueden administrar por vía oral, parenteral, mediante pulverización por inhalación, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o a través de un depósito implantado, preferentemente mediante administración oral o administración mediante inyección. Las composiciones farmacéuticas pueden contener cualquier vehículo, adyuvante o portador farmacéuticamente aceptable no tóxico convencional. En algunos casos, se puede ajustar el pH de la formulación con ácidos, bases o tampones farmacéuticamente aceptables para mejorar la estabilidad de la composición formulada o su forma de suministro. El término parenteral, como se usa en el presente documento, incluye inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinoval, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una preparación estéril inyectable, por ejemplo, en forma de una suspensión estéril inyectable acuosa u oleaginosas. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes de dispersión o humectantes (tales como, por ejemplo, Tween 80)

y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, en forma de una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran manitol, agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean convencionalmente aceites estériles no volátiles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite no volátil insípido incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como el ácido oleico y sus glicéridos derivados, son útiles en la preparación de inyectables, como lo son los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como aceite de oliva y aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones de aceite también puede contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, o carboximetilcelulosa o agentes de dispersión similares que se usan habitualmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables tales como emulsiones y/o suspensiones. También se pueden usar con fines de formulación otros tensioactivos usados habitualmente tales como Tweens o Spans y/o otros agentes emulgentes similares o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan habitualmente en la fabricación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables sólidas, líquidas o en otras formas.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable que incluye, pero no se limita a, cápsulas, comprimidos, emulsiones y suspensiones, dispersiones y soluciones acuosas. En el caso de los comprimidos para uso oral, los vehículos que se usan habitualmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se usan por lo general agentes lubricantes tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se administran por vía oral suspensiones y/o emulsiones acuosas, el ingrediente activo se puede suspender o disolver en una fase aceitosa y se combina con agentes emulgentes y/o de suspensión. Si se desea, se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes y/o aromatizantes y/o colorantes.

Las composiciones farmacéuticas también se pueden administrar en forma de supositorios para administración rectal. Estas composiciones se pueden preparar por mezcla de un compuesto de la presente invención con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a la temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal y por lo tanto se fundirá en el recto para liberar los componentes activos. Tales materiales incluyen, pero no se limitan a, manteca de cacao, cera de abeja y polietilenglicoles.

La administración tópica de las composiciones farmacéuticas es útil cuando el tratamiento deseado implica áreas u órganos fácilmente accesibles mediante aplicación tópica. Para la aplicación por vía tópica en la piel, la composición farmacéutica se debería formular con una pomada adecuada que contenga los componentes activos suspendidos o disueltos en un vehículo. Los vehículos para administración tópica de los compuestos de la presente invención incluyen, pero se limitan a, aceite mineral, petróleo líquido, vaselina blanca, propilenglicol, compuesto de polioxietileno y polioxipropileno, cera emulgente y agua. Alternativamente, la composición farmacéutica se puede formular con una loción o crema adecuada que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en un vehículo con agentes emulgentes adecuados. Los vehículos adecuados incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres de cetilo, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua. Las composiciones farmacéuticas también se pueden aplicar por vía tópica al tracto intestinal inferior mediante una formulación de supositorio rectal o en una formulación de enema adecuada. También se incluyen parches transdérmicos por vía tópica.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante aerosol o inhalación nasal. Tales composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica y se pueden preparar en forma de soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/o otros agentes solubilizantes o de dispersión conocidos en la técnica.

Una composición que tiene el compuesto de las fórmulas del presente documento y un agente adicional (por ejemplo, un agente terapéutico) se puede administrar usando un dispositivo implantable. Los dispositivos implantables y la tecnología relacionada se conocen la técnica y son útiles como sistemas de suministro cuando se desea un suministro continuo, o de liberación temporizada de los compuestos o las composiciones que se describen en el presente documento. Además, el sistema de suministro mediante dispositivo implantable es útil para la dirección a puntos específicos del compuesto o la composición suministrados (por ejemplo, sitios localizados, órganos). Negrin *et al.*, *Biomaterials*, 22(6):563 (2001). También se puede usar en la presente invención tecnología de liberación temporizada que implica métodos de suministro alternativos. Por ejemplo, también se pueden usar formulaciones de liberación temporizada basadas en tecnologías de polímeros, tecnologías de liberación sostenida y técnicas de encapsulación (por ejemplo, polimérica, liposomal) para el suministro de los compuestos y las composiciones que se describen en el presente documento.

También se describe en el presente documento un parche para suministrar combinaciones quimioterapéuticas activas del presente documento. Un parche incluye una capa de material (por ejemplo, polimérico, tela, gasa, venda) y el compuesto de las fórmulas del presente documento como se describe en el presente documento. Una cara de la capa de material puede tener una capa protectora adherida a la misma para evitar el paso de los compuestos o las composiciones. El parche puede incluir además un adhesivo para mantener el parche en su lugar en un sujeto. Un

adhesivo es una composición, que incluye las de origen natural o sintético, que cuando entra en contacto con la piel de un sujeto, se adhiere temporalmente a la piel. Puede ser resistente al agua. El adhesivo se puede colocar en el parche para mantenerlo en contacto con la piel del sujeto durante un periodo prolongado de tiempo. El adhesivo puede estar compuesto por un material pegajoso, o adhesivo resistente, de modo que mantenga el dispositivo en un lugar sujeto a contacto accidental aunque, sin embargo, después de un acto firme (por ejemplo, desgarrar, pelado, u otra retirada intencionada) el adhesivo cede a la presión externa aplicada en el dispositivo o en el propio adhesivo, y permite la ruptura del contacto de adhesión. El adhesivo puede ser sensible a la presión, es decir, puede permitir el posicionamiento del adhesivo (y del dispositivo que se va a adherir a la piel) en la piel mediante la aplicación de presión (por ejemplo, presionar, frotar) en el adhesivo o dispositivo.

Cuando las composiciones comprenden una combinación de un compuesto de las fórmulas que se describen en el presente documento y uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales, tanto el compuesto como el agente adicional deberían estar presentes en niveles de dosificación entre aproximadamente un 1 y un 100 %, y más preferentemente entre aproximadamente un 5 y un 95 % de la dosificación administrada normalmente en un régimen de monoterapia. Los agentes adicionales se pueden administrar por separado, como parte de un régimen de dosis múltiple, de los compuestos de la presente invención. Alternativamente, los agentes pueden ser parte de una forma de dosificación individual, mezclada junto con los compuestos de la presente invención en una composición individual.

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (AD) es una enfermedad neurodegenerativa compleja que da como resultado la pérdida irreversible de neuronas y es un ejemplo de una enfermedad degenerativa que tiene síntomas causados al menos en parte por agregación de proteínas. Se puede usar un compuesto descrito en el presente documento para mejorar al menos un síntoma de un sujeto que tiene AD.

Los distintivos clínicos de la enfermedad de Alzheimer incluyen deterioro progresivo de la memoria, juicio, orientación en el entorno físico, y lenguaje. Los distintivos neuropatológicos de la AD incluyen pérdida neuronal específica en regiones, placas amiloides, y ovillos neurofibrilares. Las placas amiloides son placas extracelulares que contienen el péptido amiloide β (también conocido como A β , o A β 42), que es un producto de escisión de la proteína precursora de amiloide β (también conocida como APP). Los ovillos neurofibrilares son agregados intracelulares insolubles compuestos por filamentos de la proteína tau asociada a microtúbulos anormalmente hiperfosforilada. Las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares pueden contribuir a sucesos secundarios que conducen a la pérdida neuronal por apoptosis (Clark y Karlawish, *Ann. Intern. Med.* 138(5):400-410 (2003). Por ejemplo, el amiloide β induce la apoptosis dependiente de caspasa 2 en neuronas cultivadas (Troy *et al.* *J. Neurosci.* 20(4):1386-1392). La deposición de placas *in vivo* puede desencadenar la apoptosis de neuronas proximales de una forma similar.

Las mutaciones de los genes que codifican APP, presenilina-1, y presenilina-2 se han visto implicados en la aparición prematura de AD (Lendon *et al.* *JAMA* 227:825 (1997)). Se ha mostrado que las mutaciones en estas proteínas aumentan el procesamiento proteolítico de APP a través de una ruta intracelular que produce A β . La regulación aberrante del procesamiento de A β puede ser fundamental en la formación de placas amiloides y el consecuente daño neuronal asociado con las placas.

Se pueden usar diversos criterios, incluyendo criterios genéticos, bioquímicos, fisiológicos, y cognitivos, para evaluar la AD en un sujeto. Los médicos practicantes conocen los síntomas y el diagnóstico de la AD. Posteriormente se presentan algunos síntomas y señales de AD a modo de ejemplo. La información acerca de estas indicaciones y de otras indicaciones conocidas por estar asociadas con AD se puede usar como "parámetro relacionado con AD". Un parámetro relacionado con AD puede incluir información cualitativa o cuantitativa. Un ejemplo de información cuantitativa es un valor numérico de una o más dimensiones, por ejemplo, una concentración de una proteína o un mapa tomográfico. La información cualitativa puede incluir una evaluación, por ejemplo, comentarios de un médico o un campo binario ("sí"/"no"), etc. Un parámetro relacionado con AD incluye información que indica que el sujeto no está diagnosticado con AD o no tiene una indicación particular de AD, por ejemplo, un resultado de un ensayo cognitivo que no es habitual de AD o un polimorfismo genético APOE no asociado con AD.

El deterioro cognitivo progresivo es un rasgo distintivo de AD. Este deterioro se puede presentar como declive en la memoria, juicio, capacidad de decisión, orientación en el entorno físico, y lenguaje (Nussbaum y Ellis, *New Eng. J. Med.* 348(14):1356-1364 (2003)). La exclusión de otras formas de demencia puede ayudar a realizar un diagnóstico de AD.

La muerte neuronal conduce a la atrofia cerebral progresiva en los pacientes con AD. Se pueden usar técnicas de formación de imágenes (por ejemplo, formación de imágenes por resonancia magnética, o tomografía computarizada) para detectar lesiones asociadas con AD en el cerebro y/o atrofia cerebral.

Los pacientes con AD puede exhibir anomalías bioquímicas que resultan de la patología de la enfermedad. Por ejemplo, los niveles de la proteína tau en líquido cefalorraquídeo son elevados en los pacientes con AD (Andreasen,

N. *et al.* Arch Neurol. 58:349-350 (2001)). Los niveles de péptido amiloide beta 42 (A β 42) pueden estar reducidos en el LCR de pacientes con AD (Galasko, D., *et al.* Arch. Neurol. 55:937-945 (1998)). Los niveles de A β 42 pueden estar aumentados en el plasma de los pacientes con AD (Ertekein-Taner, N., *et al.* Science 290:2303-2304 (2000)). Las técnicas para detectar anomalías bioquímicas en una muestra de un sujeto incluyen métodos celulares, inmunológicos, y otros métodos biológicos conocidos en la técnica. Para una orientación general, véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001), Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)), (Harlow, E. y Lane, D. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), y ediciones actualizadas de los mismos.

Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos, otras inmunoglobulinas, y otros ligandos de unión específica para detectar una biomolécula, por ejemplo, una proteína u otro antígeno asociado con AD. Por ejemplo, se pueden usar uno o más anticuerpos específicos para investigar una muestra. Son posibles diversos formatos, por ejemplo, ELISA, ensayos basados en fluorescencia, transferencias de Western, y conjuntos de proteínas. Los métodos de producción de conjuntos de polipéptidos se describen en la técnica, por ejemplo, en De Wildt *et al.* (2000). Nature Biotech. 18, 989-994; Lueking *et al.* (1999). Anal. Biochem. 270, 103-111; Ge, H. (2000). Nucleic Acids Res. 28, e3, I-VII; MacBeath, G., y Schreiber, S.L. (2000). Science 289, 1760-1763; y el documento de Patente WO 99/51773A1. También se pueden analizar las proteínas usando espectroscopía de masas, cromatografía, electroforesis, interacción enzimática o usando sondas que detecten una modificación postraduccional (por ejemplo, una fosforilación, ubiquitinación, glicosilación, metilación, o acetilación).

Se puede detectar la expresión de ácidos nucleicos en células de un sujeto, por ejemplo, retiradas por cirugía, extracción, *post mortem* u otra forma de toma de muestras (por ejemplo, sangre, LCR). Se puede evaluar la expresión de uno o más genes, por ejemplo, mediante técnicas basadas en hibridación, por ejemplo, análisis de Northern, RT-PCR, SAGE, y conjuntos de ácidos nucleicos. Los conjuntos de ácidos nucleicos son útiles para realizar un perfil de múltiples especies de ARNm en una muestra. Se puede generar un conjunto de ácidos nucleicos mediante diversos métodos, por ejemplo, mediante métodos fotolitográficos (véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.143.854; 5.510.270; y 5.527.681), métodos mecánicos (por ejemplo, métodos de flujo dirigido como se describe en el documento de Patente de Estados Unidos Nº 5.384.261), métodos basados en agujas (por ejemplo, como se describe en el documento de Patente de Estados Unidos Nº 5.288.514), y técnicas basadas en perlas (por ejemplo, como se describe en el documento de Patente PCT US/93/04145).

Se pueden detectar metabolitos que están asociados con AD mediante diversos medios, incluyendo ensayos acoplados a enzimas, usando precursores marcados, y resonancia magnética nuclear (RMN). Por ejemplo, se puede usar RMN para determinar las concentraciones relativas de compuestos basados en fosfatos en una muestra, por ejemplo, niveles de creatina. También se pueden detectar otros parámetros metabólicos tales como el estado redox, concentración de iones (por ejemplo, Ca²⁺) (por ejemplo, usando colorantes sensibles a iones), y potenciales de membrana (por ejemplo, usando tecnología parche-pinza).

Se puede registrar y/o almacenar información de una señal asociada con AD en un formato legible por un ordenador. Por lo general, la información se une a una referencia del sujeto y también se asocia (directa o indirectamente) con información de la identidad de los uno o más nucleótidos de un gen que codifican una sirtuina en un sujeto.

En una realización, se usa un modelo animal no humano de AD (por ejemplo, un modelo de ratón), por ejemplo, para evaluar un compuesto o un régimen terapéutico, por ejemplo, de un compuesto que se describe el presente documento. Por ejemplo, el documento de Patente US 6.509.515 describe uno de tales modelos animales que se puede usar de forma natural con ensayos de aprendizaje y memoria. El animal expresa una secuencia de la proteína precursora de amiloide (APP) a un nivel en los tejidos cerebrales de modo que el animal desarrolla un trastorno neurológico progresivo en un corto período de tiempo desde el nacimiento, generalmente en un año desde el nacimiento, preferentemente en 2 a 6 meses, desde el nacimiento. La secuencia de la proteína APP se introduce en el animal, o un progenitor del animal, en un estado embrionario, preferentemente una célula individual, u estadio de oocito fertilizado, y generalmente no después de aproximadamente el estadio de 8 células. A continuación se desarrolla el cigoto o embrión a término en una hembra de acogida pseudopreñada. Los genes de la proteína precursora de amiloide se introducen en un embrión animal de modo que se incorpore cromosómicamente en un estado que dé como resultado una expresión superendógena de la proteína precursora de amiloide y el desarrollo de una enfermedad neurológica progresiva en las áreas de la corteza límbica del cerebro, las áreas del cerebro que se ven afectadas principalmente en las patologías neurológicas progresivas tales como AD. La gliosis y las manifestaciones clínicas en los animales transgénicos afectados modelan la enfermedad neurológica. Los aspectos progresivos de la enfermedad neurológica se caracterizan por la disminución del comportamiento exploratorio y/o locomotor y la disminución de la captación/utilización de 2-desoxiglucosa y la gliosis hipertrófica en las regiones de la corteza límbica del cerebro. Además, los cambios que se observan son similares a los que se observan en algunos animales envejecidos. También se describen otros modelos animales en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.387.742; 5.877.399; 6.358.752; y 6.187.992.

Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson incluye neurodegeneración de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra dando como resultado la degeneración del sistema de dopamina nigroestriatal que regula la función motora. Esta patología, a su vez, conduce a disfunciones motoras (véase, por ejemplo, y Lotharius *et al.*, Nat. Rev. Neurosci., 3:932-42 (2002)). Síntomas motores a modo de ejemplo incluyen: aquinesia, postura inclinada, dificultad de marcha, inestabilidad postural, catalepsia, rigidez muscular, y temblores. Síntomas no motores a modo de ejemplo incluyen: depresión, falta de motivación, pasividad, demencia y disfunción gastrointestinal (véase, por ejemplo, Fahn, Ann. N.Y. Acad. Sci., 991:1-14 (2003) y Pfeiffer Lancet Neurol., 2:107-16 (2003)). La enfermedad de Parkinson se ha observado en un 0,5 a un 1 por ciento de personas de 65 a 69 años de edad y en un 1 a un 3 por ciento entre las personas de 80 años de edad o superior (véase, por ejemplo, Nussbaum *et al.*, N. Engl. J. Med., 348:1356-64 (2003)).

Se puede usar un compuesto que se describe en el presente documento para mejorar al menos un síntoma de un sujeto que tiene enfermedad de Parkinson.

Las señales moleculares de la enfermedad de Parkinson incluyen la reducción de L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) (véase, por ejemplo, el documento de Solicitud de Patente de Estados Unidos 20020172664); pérdida del contenido de dopamina en las neuronas nigroestriatales (véase, por ejemplo, Fahn, Ann. N.Y. Acad. Sci., 991:1-14 (2003) y Lotharius *et al.*, Nat. Rev. Neurosci., 3:932-42 (2002)). En algunos casos familiares, PD está unida a mutaciones en genes individuales que codifican las proteínas alfa-sinucleína y parkina (una E3 ubiquitina ligasa) (por ejemplo, Riess *et al.*, J. Neurol. 250 Suppl 1:13-10 (2003) y Nussbaum *et al.*, N. Engl. J. Med., 348:1356-64 (2003)). También se asocia a la enfermedad de Parkinson una mutación sin sentido invertida en un gen de ubiquitina hidrolasa C-terminal específico de neurona (por ejemplo, Nussbaum *et al.*, N. Engl. J. Med., 348:1356-64 (2003)).

Se puede evaluar un compuesto o una librería de compuestos que se describe en el presente documento en un modelo animal no humano de enfermedad de Parkinson. Modelos animales de enfermedad de Parkinson a modo de ejemplo incluyen primates que se vuelven parkinsonianos por tratamiento con la neurotoxina dopaminérgica 1-metil-4 fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (véase, por ejemplo, el documento de Solicitud de Patente de Estados Unidos 20030055231 y Wichmann *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 991:199-213 (2003); ratas lesionadas con 6-hidroxidopamina (por ejemplo Lab. Anim. Sci., 49:363-71 (1999)); y modelos de invertebrados transgénicos (por ejemplo Lakso *et al.*, J. Neurochem., 86:165-72 (2003) y Link, Mech. Ageing Dev., 122:1639-49 (2001)).

Evaluación de la agregación de poliglutamina

Está disponible diversos ensayos exentos de células, ensayos basados en células, y ensayos de organismos para la evaluación de la agregación de poliglutamina, por ejemplo, agregación de poliglutamina en Huntington. Se describen algunos ejemplos, por ejemplo, en el documento de Patente de Estados Unidos 2003-0109476.

Los ensayos (por ejemplo, exentos de células, basados en células, o de organismos) pueden incluir una proteína reportera que incluye una región de repetición de poliglutamina que tiene al menos 35 poliglutaminas. La proteína reportera se puede detectar fácilmente, por ejemplo, mediante fluorescencia. Por ejemplo, la proteína se conjuga a un fluoróforo, por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), alofococianina (APC), R-ficoeritrina (PE), proteína peridina clorofila (PerCP), Rojo Texas, Cy3, Cy5, Cy7, o un fluoróforo doble de energía por resonancia de fluorescencia tal como PerCP-Cy5,5, PE-Cy5, PE-Cy5,5, PE-Cy7, PE-Rojo Texas, y APC-Cy7. En otro ejemplo, la proteína es "intrínsecamente fluorescente" en que tiene un cromóforo que se codifica completamente mediante su secuencia de aminoácidos y puede emitir fluorescencia sin el requisito de un cofactor o sustrato. Por ejemplo, la proteína puede incluir un cromóforo del tipo proteína fluorescente verde (GFP). Como se usa en el presente documento, "cromóforo de tipo GFP" significa un resto de proteína intrínsecamente fluorescente que comprende un barril β de 11 hebras con una hélice α central, teniendo la hélice α central un sistema de resonancia π conjugado que incluye dos sistemas de anillos aromáticos y un puente entre los mismos.

El cromóforo de tipo GFP se puede seleccionar entre cromóforos de tipo GFP que se encuentran en proteínas de origen natural, tales como GFP de *A victoria* (número de referencia de GenBank AAA27721), GFP de *Renilla reniformis*, FP583 (número de referencia de GenBank AF168419) (DsRed), FP593 (AF272711), FP483 (AF168420), FP484 (AF168424), FP595 (AF246709), FP486 (AF168421), FP538 (AF168423), y FP506 (AF168422), y solo necesitan incluir tanta proteína nativa como sea necesaria para retener la fluorescencia intrínseca del cromóforo. Los métodos para determinar el dominio mínimo requerido para la fluorescencia se conocen en la técnica. Li *et al.*, J. Biol. Chem. 272:28545-28549 (1997).

Alternativamente, el cromóforo de tipo GFP se puede seleccionar entre cromóforos de tipo GFP modificados a partir de los encontrados en la naturaleza. Por lo general, tales modificaciones se realizan para mejorar la producción recombinante en sistemas de expresión heterólogos (con o sin cambio en la secuencia de proteínas), para alterar los espectros de excitación y/o emisión de la proteína nativa, para facilitar la purificación, para facilitar o como consecuencia de la clonación, o son una consecuencia fortuita de la investigación. Los métodos para modificar tales

cromóforos de tipo GFP modificados y ensayar su actividad de fluorescencia, tanto solos como siendo parte de proteínas de fusión, se conocen bien la técnica. En la actualidad está disponible en el mercado diversos cromóforos modificados de este tipo y se puede usar fácilmente en las proteínas de fusión de la presente invención. Por ejemplo, EGFP ("GFP mejorada"), Cormack *et al.*, Gene 173:33-38 (1996); documentos de Patente de Estados Unidos con números 6.090.919 y 5.804.387, es una variante de GFP optimizada para codón humano desplazada al rojo que se ha modificado para mayor fluorescencia, mayor expresión en células de mamífero, y para un espectro de excitación optimizado para su uso en citómetros de flujo. EGFP puede aportar de forma útil un cromóforo de tipo GFP a las proteínas de fusión que puede incluir además una región de poliglutamina. Está disponible en el mercado diversos vectores EGFP, tanto plásmidos como virales (Clontech Labs, Palo Alto, Calif., USA). Se conocen aún otras proteínas GFP modificadas. Véase, por ejemplo, Heim *et al.*, Curr. Biol. 6:178-182 (1996); Cormack *et al.*, Gene 173:33-38 (1996), BFP2, EYFP ("proteína fluorescente amarilla mejorada"), EBFP, Ormo *et al.*, Science 273:1392-1395 (1996), Heikal *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:11996-12001 (2000). ECFP ("proteína fluorescente cian mejorada") (Clontech Labs, Palo Alto, Calif., USA). El cromóforo de tipo GFP también se puede extraer de otras GFP modificadas, incluyendo las que se describen en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 6.124.128; 6.096.865; 6.090.919; 6.066.476; 6.054.321; 6.027.881; 5.968.750; 5.874.304; 5.804.387; 5.777.079; 5.741.668; y 5.625.048.

En una realización, una proteína reportera que incluye una región de repetición de poliglutamina que tiene al menos 35 poliglutaminas se usa en un ensayo basado en células.

En un ejemplo, se pueden usar líneas de células neuronales PC 12 que tienen un constructo sometido a ingeniería para expresar una proteína codificada por el exón 1 del gen HD que contiene codones de repetición, alternantes fusionados con un gen mejorado de GFP (proteína fluorescente verde). Véase, por ejemplo, Boado *et al.* J. Pharmacol. and Experimental Therapeutics 295 (1): 239-243 (2000) y Kazantsev *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 11404-09 (1999). La expresión de este gen conduce a la aparición de fluorescencia de color verde colocalizada en el sitio de agregados de proteína. El exón 1 del gen HD-gen de fusión de GFP está bajo el control de un promotor inducible regulado por la muristerona. Un constructo en particular tiene aproximadamente 46 repeticiones de glutamina (codificadas con CAA o CAG). Otros constructos tienen, por ejemplo, 103 repeticiones de glutamina. Las células PC 12 se cultivan en DMEM, suero de Caballo al 5 % (inactivado por calor), FBS al 2,5 % y Pen-Estrep al 1 %, y se mantienen en cantidades bajas de Zeocina y G418. Las células se siembran en placas de 24 pocillos revestidas con cubreobjetos de poli-L-lisina, a una densidad de $5 \cdot 10^5$ células/ml en medios sin ninguna selección. Se añade muristerona después de la incubación durante una noche para inducir la expresión del exón 1 del gen HD-GFP. Las células se pueden poner en contacto con un compuesto de ensayo, por ejemplo, antes o después de la siembra y antes o después de la inducción. Los datos se pueden adquirir en un Axioskop 100M invertido de Zeiss equipado con un microscopio confocal 510 LSM de Zeiss y un láser Coherente de Kriptón y Argón y un láser de Helio y Neón. Las muestras se pueden cargar en un sistema de cobertura de vidrio de cámara Lab-Tek II para mejorar la formación de imágenes. El número de agregaciones de Huntingtina-GFP dentro del campo de visión del objetivo se recuenta en experimentos independientes (por ejemplo, al menos tres o siete experimentos independientes).

Otros medios a modo de ejemplo para la evaluación de muestras incluyen un aparato de alto rendimiento, tales como el Sistema de Análisis de Células IN de Amersham Biosciences y el Sistema ArrayScan HCS de Cellomics™ que permiten la localización subcelular y la concentración de restos marcados con fluorescencia a detectar y cuantificar, tanto estática como cinéticamente. Véase también, la patente de Estados Unidos N° 5.989.835.

Otras líneas celulares de mamífero a modo de ejemplo incluyen: una línea de células CHO y una línea de células 293. Por ejemplo, las células CHO con copias integradas del exón 1 del gen HD con aproximadamente 103Q repeticiones fusionadas a GFP como un constructo de fusión que codifica el exón 1 Q103-GFP del gen HD producen una agregación visible GFP en la membrana nuclear, detectable por microscopía, mientras que las células CHO con copias integradas de constructos de fusión que codifican el exón 1 Q24-GFP del gen HD en células CHO no producen una agregación de GFP visible en la membrana nuclear. En otro ejemplo, se usan 293 células con copias integradas del exón 1 del gen HD que contiene 84 repeticiones de CAG.

Se encuentra disponible un número de sistemas de modelo animal para la enfermedad de Huntington. Véase, por ejemplo, Brouillet, Functional Neurology 15 (4): 239-251 (2000); Ona *et al.* Nature 399: 263-267 (1999), Bates *et al.* Hum Mol Genet. 6 (10): 1633-7 (1997); Hansson *et al.* J. of Neurochemistry 78: 694-703; y Rubinsztein, D. C., Trends in Genetics, Vol. 18, N° 4, pp. 202-209 (una revisión de diversos modelos animales y no humanos de HD).

En una realización, el animal es un ratón transgénico que puede expresar (en al menos una célula) una proteína Huntingtina humana, una porción de la misma, o proteína de fusión que comprende la proteína Huntingtina humana, o una porción de la misma, con, por ejemplo, al menos 36 glutaminas (por ejemplo, codificadas por repeticiones CAG (como alternativa, cualquier número de repeticiones de CAG puede ser CAA) en el segmento de repetición de CAG del exón 1 que codifica el tramo de poliglutamina).

Un ejemplo de tal cepa de ratón transgénico es la línea R6/2 (Mangiarini *et al.* Cell 87: 493-506 (1996)). Los ratones R6/2 son ratones transgénicos de la enfermedad de Huntington, que sobreexpresan un exón del gen HD humano (bajo el control del promotor endógeno). El exón 1 del gen HD humano de R6/2 tiene una ampliación de las longitudes de repetición de CAG/poliglutamina (150 repeticiones de CAG como promedio). Estos ratones desarrollan una enfermedad neurológica progresiva, en última instancia fatal con muchas características de la enfermedad humana de Huntington. Se observan agregados anormales, constituidos en parte por la parte N-terminal de la Huntingtina (codificada por el exón 1 de HD), en ratones R6/2, tanto en el citoplasma como en núcleos de las células (Davies *et al.* Cell 90: 537-548 (1997)). Por ejemplo, la proteína Huntingtina humana en el animal transgénico se codifica por un gen que incluye al menos 55 repeticiones de CAG y más preferentemente de aproximadamente 150 repeticiones de CAG.

Estos animales transgénicos pueden desarrollar un fenotipo de la enfermedad de tipo Huntington. Estos ratones transgénicos se caracterizan por la reducción del aumento de peso, la reducción de la vida útil y el deterioro motor caracterizado por alteración de la marcha, temblor en reposo, encogimiento de las extremidades posteriores e hiperactividad de 8 a 10 semanas después del nacimiento (por ejemplo, la cepa R6/2; véase Mangiarini *et al.* Cell 87: 493-506 (1996)). El fenotipo empeora progresivamente hacia la hipoquinesia. Los cerebros de estos ratones transgénicos también demuestran anomalías neuroquímicas e histológicas, tales como cambios en los receptores de neurotransmisores (glutamato, dopaminérgicos), disminución de la concentración de N-acetilaspártato (un marcador de la integridad neuronal) y reducción del cuerpo estriado y tamaño del cerebro. Por consiguiente, la evaluación puede incluir la evaluación de los parámetros relacionados con los niveles de neurotransmisores, niveles de receptores de neurotransmisores, tamaño del cerebro y tamaño del cuerpo estriado. Además, los agregados anómalos que contienen la parte transgénica de o proteína Huntingtina humana de longitud completa están presentes en el tejido cerebral de estos animales (por ejemplo, la cepa de ratón transgénico R6/2). Véase, por ejemplo, Mangiarini *et al.* Cell 87: 493-506 (1996), Davies *et al.* Cell 90: 537-548 (1997), Brouillet, Functional Neurology 15 (4): 239-251 (2000) y Cha *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 6480-6485 (1998).

Para someter a ensayo el efecto del compuesto de ensayo, por ejemplo, un compuesto que se describe en el presente documento o que está presente en una biblioteca que se describe en el presente documento, en un modelo animal, se administran diferentes concentraciones del compuesto de ensayo al animal transgénico, por ejemplo mediante la inyección del compuesto de ensayo en circulación del animal. En una realización, se evalúa un síntoma similar al de la enfermedad de Huntington en el animal. Por ejemplo, la progresión de los síntomas similares a los de la enfermedad de Huntington, por ejemplo, tal como se ha descrito anteriormente para el modelo de ratón, se controlan a continuación para determinar si el tratamiento con el compuesto de ensayos da como resultado la reducción o retraso de los síntomas. En otra realización, se controla la desagregación de los agregados de proteína Huntingtina en estos animales. El animal se puede sacrificar a continuación y se obtienen cortes de cerebro. Los cortes de cerebro se analizan a continuación para la presencia de agregados que contienen la proteína transgénica Huntingtina humana, una porción de la misma, o una proteína de fusión que comprende proteína Huntingtina humana, o una porción de la misma. Este análisis puede incluir, por ejemplo, tinción de de los cortes de tejido cerebral con el anticuerpo anti-Huntingtina y adición de un anticuerpo secundario conjugado con FITC que reconoce el anticuerpo de la anti-Huntingtina (por ejemplo, el anticuerpo anti-Huntingtina es anticuerpo de ratón anti-humano y el anticuerpo secundario es específico para el anticuerpo humano) y visualización de los agregados de proteína por microscopía fluorescente. Como alternativa, el anticuerpo anti-Huntingtina se puede conjugar directamente con FITC. Los niveles de agregados de proteína de Huntingtina se visualizan a continuación por microscopía de fluorescencia.

También está disponible un sistema modelo de *Drosophila melanogaster* para la enfermedad de Huntington. Véase, por ejemplo, Steffan *et al.*, Nature, 413: 739-743 (2001) y Marsh *et al.*, Human Molecular Genetics 9: 13-25 (2000). Por ejemplo, se puede diseñar una *Drosophila* transgénica para expresar la proteína Huntingtina humana, una porción de la misma (tal como exón 1), o proteína de fusión que comprende la proteína Huntingtina humana, o una porción de la misma, con, por ejemplo, una región de poliglutamina que incluye al menos 36 glutaminas (por ejemplo, codificadas por repeticiones de CAG (preferentemente 51 repeticiones o más) (como alternativa, cualquier número de repeticiones de CAG puede ser CAA)). La región de poliglutamina se puede calificar por el segmento de repetición de CAG del exón 1 que codifica el tramo de poli Q. Estas moscas transgénicas también se pueden diseñar para expresar proteína Huntingtina humana, una porción de la misma (tal como exón 1), o proteína de fusión que comprende proteína Huntingtina humana, o una porción de la misma, en las neuronas, por ejemplo, en el ojo de *Drosophila*.

El compuesto de ensayo (por ejemplo, diferentes concentraciones del compuesto de ensayo) o un compuesto que se describe en el presente documento se pueden administrar a la *Drosophila* transgénica, por ejemplo, mediante la aplicación de las composiciones farmacéuticas que incluyen el compuesto en el animal o añadiendo el compuesto como parte de los alimentos. La administración del compuesto se puede producir en diversas etapas del ciclo de vida de la *Drosophila*. El animal se puede controlar para determinar si el tratamiento con los resultados de los compuestos en la reducción o retraso de síntomas similares a los de la enfermedad de Huntington, desagregación agregados de la proteína Huntingtina, o letalidad y/o degeneración reducida de las neuronas fotorreceptoras.

La neurodegeneración debida a la expresión de la proteína Huntingtina humana, una porción de la misma (tal como exón 1), o proteína de fusión que comprende la proteína Huntingtina humana, o una porción de la misma, se observa fácilmente en el ojo compuesto de la mosca, que se compone de una disposición trapezoidal regular de siete rabdómeros visibles (estructuras subcelulares que captan la luz) producidos por las neuronas fotorreceptoras de cada ommatidio de *Drosophila*. La expresión de la proteína Huntingtina humana, una porción de la misma (tal como exón 1), o proteína de fusión que comprende la proteína Huntingtina humana, o una porción de la misma, conduce a una pérdida progresiva de rabdómeros. Por lo tanto, se puede evaluar la degeneración neuronal de un animal al que se administra un compuesto de ensayo.

10 Morely *et al.* (2002) Proc. Nat. Acad. USA Vol. 99: 10417 describen un sistema de *C. elegans* para evaluar la agregación de proteínas relacionadas con la enfermedad de Huntington.

Evaluación de la Enfermedad de Huntington

15 Un compuesto que se describe en el presente documento se puede usar para mejorar al menos un síntoma de la enfermedad de Huntington en un sujeto.

Diversos métodos están disponibles para evaluar y/o controlar la enfermedad de Huntington. Se conoce diversos síntomas clínicos e indicios de la enfermedad. La enfermedad de Huntington provoca un trastorno del movimiento, problemas psiquiátricos y cambios cognitivos. El grado, edad de inicio, y manifestación de estos síntomas pueden variar. El trastorno de movimiento puede incluir movimientos rápidos, aleatorios, similares a un baile llamados corea.

20 Un método para evaluar la enfermedad de Huntington usa la Escala de Clasificación de la Enfermedad de Huntington Sin Unificar (UNDRS). También es posible el uso de ensayos individuales solos o en combinación para evaluar si al menos uno de los síntomas de la enfermedad de Huntington mejora. La UNDRS se describe en Movement Disorders (vol. 11: 136-142, 1996) y Marder *et al.* Neurology (54: 452-458, 2000). La UNDRS cuantifica la gravedad de la Enfermedad de Huntington. Se divide en varias subsecciones: motora, cognitiva, conductual y funcional. En una realización, una sola subsección se usa para evaluar un sujeto. Estas puntuaciones se pueden calcular sumando las diversas preguntas de cada sección. Algunas secciones (tales como corea y distonía) pueden incluir la clasificación de cada uno de extremidades, cara, buco-oral-lingual y tronco por separado.

30 Las evaluaciones motoras a modo de ejemplo incluyen: persecución ocular, iniciación sacádica, velocidad sacádica, disartria, protrusión de la lengua, capacidad de golpetear con el dedo, pronación/supinación, una secuencia de puño-mano-palma, rigidez de los brazos, bradiquinesia, distonía máxima (tronco, extremidades superiores e inferiores), corea máxima (por ejemplo, tronco, cara, extremidades superiores e inferiores), marcha, caminar en tándem, y retroimpulsión. Un tratamiento a modo de ejemplo puede causar un cambio en la Puntuación Motora Total 4 (TMS-4), una subescala de la UHDRS, por ejemplo, durante un período de un año.

Atrofia del Músculo Esquelético

40 La atrofia muscular incluye numerosos trastornos neuromusculares, metabólicos, inmunológicos y neurológicos, así como hambre, deficiencia nutricional, estrés metabólico, diabetes, envejecimiento, distrofia muscular o miopatía. La atrofia muscular se produce durante el proceso de envejecimiento. La atrofia muscular también resulta de la reducción del uso o desuso del músculo. Los síntomas incluyen una disminución de la masa del tejido del músculo esquelético. En los machos humanos, la masa muscular se reduce en un tercio entre las edades de 50 y 80.

50 Algunas de las características moleculares de la atrofia muscular incluyen la regulación positiva de ubiquitina ligasas, y la pérdida de proteínas miofibrilares (Furuno *et al.*, J. Biol. Chem., 265: 8550-8557, 1990). La descomposición de estas proteínas se puede seguir, por ejemplo, midiendo la producción de 3-metil-histidina, que es un componente específico de la actina, y en determinados músculos de la miosina (Goodman, Biochem. J, 241: 121-12, 1987 y Lowell, *et al.*, Metabolism, 35: 1121-112, 1986; Stein y Schluter, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 272: E688-E696, 1997). La liberación de la creatina quinasa (un marcador del daño celular) (Jackson, *et al.*, Neurology, 41: 101-104, 1991) también puede ser indicativo.

55 Esclerosis Múltiple

60 La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neuromuscular caracterizada por la degeneración focal inflamatoria y autoinmune de la materia blanca cerebral. La materia blanca se inflama, y la inflamación la seguida por la destrucción de mielina (formando "lesiones" que se caracterizan por una infiltración de numerosas células inmunes, especialmente linfocitos y macrófagos de linfocitos T. La EM puede causar una disminución o bloqueo completo de la transmisión del impulso nervioso y, por lo tanto, la disminución o pérdida de la función corporal. Un paciente que tiene EM puede tener uno de diversos grados de EM (por ejemplo, EM remitente-recurrente, EM progresiva primaria, progresiva secundaria, y la variante de EM de Marburg).

65

Los síntomas pueden incluir problemas de visión, como visión borrosa o doble, distorsión de color rojo-verde, o incluso ceguera en un ojo, debilidad muscular en las extremidades, problemas de coordinación y equilibrio, espasticidad muscular, fatiga muscular, parestesias, sensaciones fugaces sensoriales anómalas tales como sensaciones de entumecimiento, hormigueo, o "alfileres y agujas", y en el peor de los casos, parálisis parcial o completa. Aproximadamente la mitad de las personas que parecen EM también experimentan deterioros cognitivos, tales como por ejemplo, falta de concentración, atención, memoria y/o juicio. (Véase, por ejemplo, el documento de patente US 2003-0130357 y el documento de patente 2003-0092089).

Los marcadores moleculares de EM incluyen un número de factores genéticos, por ejemplo, haplotipo de raza caucásica DRB*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 (Solicitud de patente de Estados Unidos N° 20030113752), una mutación puntual en el receptor de tipo C de la proteína tirosina fosfatasa. (Solicitud de patente de Estados Unidos N° 20030113752), ausencia de la proteína SARG-1 de tipo silvestre, presencia de proteína SARG-1 mutada, o ausencia o mutación en los ácidos nucleicos que codifican SARG-1 de tipo silvestre, (véase, por ejemplo, Solicitud de patente de Estados Unidos N° 20030113752) e indicadores de proteínas, por ejemplo, auto-anticuerpo de Proteína Básica de Mielina en el líquido cefalorraquídeo. (Véase, por ejemplo, Solicitud de patente de Estados Unidos N° 20030092089).

Los modelos celulares y animales de EM incluyen modelo de ratón transgénico para EM crónica (encefalomielitis autoinmune experimental (EAE)), por ejemplo, tal como se describe en Goverman *et al.*, Cell. 72: 551-60 (1993), y modelos de primate tal como se revisa en Brok *et al.*, Immunol. Rev., 183:173-85 (2001).

Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA; Enfermedad de Lou Gehrig)

Un compuesto que se describe en el presente documento se puede usar para modular la ELA. ELA se refiere a una clase de trastornos que comprenden las neuronas motoras superiores e inferiores. La incidencia de la ELA aumenta básicamente en los adultos mayores. Estos trastornos se caracterizan por importantes anomalías patológicas que incluyen degeneración selectiva y progresiva de las neuronas motoras inferiores en la médula espinal y las neuronas motoras superiores de la corteza cerebral dando como resultado la muerte de las neuronas motoras, que hace que los músculos bajo su control se debiliten y atrofién conduciendo a parálisis. Los ejemplos de trastornos de ELA incluyen ELA clásica (que afecta normalmente a las neuronas motoras tanto superiores como inferiores), Esclerosis Lateral Primaria (PLS, que por lo general solamente afecta a las neuronas motoras superiores), Parálisis Bulbar Progresiva (PBP o Inicio Bulbar, una versión de la ELA que por lo general comienza con dificultades para tragar, masticar y hablar), Atrofia Muscular Progresiva (PMA, por lo general afecta solamente a las neuronas motoras inferiores) o ELA familiar (una versión genética de la ELA), o una combinación de estas afecciones. (Véase, por ejemplo, Solicitud de patente de Estados Unidos N° 20020198236 y Solicitud de patente de Estados Unidos N° 20030130357).

El estado de la ELA de un individuo se puede evaluar mediante un examen neurológico o por otros medios, como MRI, FVC, MUNE, etc. (véase, por ejemplo, Solicitud de patente de Estados Unidos N° 20030130357). Los síntomas incluyen debilidad muscular en las manos, brazos, piernas; dificultad para tragar o respirar; sacudidas (fasciculaciones) y calambres de los músculos; y uso reducido de las extremidades. La invención incluye la administración de un agente que modula el eje IGF-1/GH en una cantidad eficaz para aliviar uno o más síntomas de ELA, por ejemplo, en un individuo que la padece o está en riesgo de padecerla.

Los métodos para evaluar el estado de la ELA de un individuo puede incluir la evaluación de la proteína o gen "transportador de aminoácido excitatorio de tipo 2" (EAAT2), la proteína o gen de Cobre-Cinc Superóxido Dismutasa (SOD1), actividad del Complejo I mitocondrial, niveles de poliaminas, tales como putraceína, espermina y espermidina, actividad descarboxilasa de ornitina, y un gen que codifica un regulador GTPasa supuesto (véase Nat. Genet., 29 (2): 166-73 (2001)).

Las células y animales para evaluar el efecto de un compuesto sobre el estado de ELA incluyen un ratón que tiene un gen SOD alterado, por ejemplo, un ratón transgénico SOD1-G93A que lleva un número variable de copias de la mutación de G93A SOD humana impulsada por el promotor endógeno, un ratón transgénico SOD1-G37R (Wong *et al.*, Neuron, 14 (6): 1105-16 (1995)); ratón transgénico SOD1-G85R (Bruijn *et al.*, Neuron, 18 (2): 327-38 (1997)); cepas de *C. elegans* expresan SOD1 humana mutante (Oeda *et al.*, Hum Mol Genet., 10: 2013-23 (2001)); y una *Drosophila* que expresa mutaciones en la Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD). (Phillips *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92: 8574-78 (1995) y McCabe, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92: 8533-34 (1995)).

Neuropatía

Un compuesto que se describe en el presente documento se puede usar para modular una neuropatía. Una neuropatía puede incluir una disfunción de los nervios centrales y/o periféricos causada por enfermedad sistémica, afección hereditaria o agente tóxico que afecta a nervios motores, sensoriales, sensoriomotores o autónomos. (Véase, por ejemplo, Solicitud de patente de Estados Unidos N° 20030013771).

Los síntomas pueden variar dependiendo de la causa del daño al nervio y los tipos particulares de nervios afectados. Por ejemplo, los síntomas de la neuropatía motora incluyen torpeza en el desempeño de tareas físicas o como debilidad muscular, agotamiento después de un esfuerzo menor, dificultad para estar de pie o caminar y atenuación o ausencia de un reflejo neuromuscular. (Solicitud de patente de Estados Unidos N° 20030013771). Los síntomas de neuropatía autonómica incluyen estreñimiento, irregularidades cardíacas y atenuación del reflejo hipotensor postural. (Solicitud de patente de Estados Unidos N° 20030013771), los síntomas de neuropatía sensorial incluyen dolor y entumecimiento; hormigueo en las manos, piernas o pies; y sensibilidad extrema al tacto, y los síntomas de retinopatía incluyen visión borrosa, pérdida repentina de la visión, puntos negros, y luces intermitentes.

5 El síndrome de Guillain-Barré es un tipo de neuropatía motora que normalmente se produce dos o tres semanas después de una enfermedad similar a la gripe u otra infección. Los síntomas incluyen debilidad ascendente en la que la debilidad comienza en las extremidades inferiores y asciende a las extremidades superiores. También se produce un aumento del nivel de proteínas en el líquido cefalorraquídeo sin un aumento en el número de glóbulos blancos. (Solicitud de patente de Estados Unidos N° 20030083242).

15 Trastornos

Por lo tanto, los trastornos adicionales para los que pueden ser útiles los compuestos que se describen en el presente documento y definiciones de los mismos incluyen los siguientes:

20 Un "trastorno asociado con la edad" o "trastorno relacionado con la edad" es una enfermedad o trastorno cuya incidencia es de al menos 1,5 veces más elevada entre individuos humanos con más de 60 años de edad con respecto a individuos humanos entre las edades de 30-40, en el momento de la presentación de la presente solicitud y en una población seleccionada con más de 100.000 individuos. Una población preferente es una población de Estados Unidos. Una población se puede restringir por el género y/o etnia.

30 Un "trastorno geriátrico" es una enfermedad o trastorno cuya incidencia, en el momento de la presentación de la presente solicitud y en una población seleccionada superiora 100.000 individuos, es al menos un 70 % entre los individuos humanos que son mayores de 70 años de edad. En una realización, el trastorno geriátrico es un trastorno distinto del cáncer o un trastorno cardiopulmonar. Una población preferente es una población de Estados Unidos. Una población se puede restringir por el género y/o etnia.

35 Un trastorno que tiene un "factor de susceptibilidad asociado con la edad" se refiere a una enfermedad o trastorno cuya causalidad está mediada por un factor externo, pero cuya gravedad o síntomas están aumentado básicamente en individuos humanos de aproximadamente 60 años de edad con respecto a los individuos humanos entre las edades de 30 a 40, en el momento de la presentación de la presente solicitud y en la población de Estados Unidos. Por ejemplo, la neumonía está causada por patógenos, pero la gravedad de la enfermedad es mayor en los seres humanos mayores de 60 años con respecto a los individuos humanos entre las edades de 30-40.

40 Un "trastorno neurológico" es una enfermedad o trastorno caracterizado por una anomalía o mal funcionamiento de las células neuronales o células neuronales de apoyo (por ejemplo, glía o músculo). La enfermedad o trastorno puede afectar al sistema nervioso central y/o periférico. Los trastornos neurológicos a modo de ejemplo incluyen neuropatías, atrofia del músculo esquelético, y enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, una enfermedad neurodegenerativa causada al menos en parte por la agregación de poliglutaminas o una enfermedad neurodegenerativa distinta a una causada al menos en parte por la agregación de poliglutaminas. Las enfermedades neurodegenerativas a modo de ejemplo incluyen: enfermedad de Alzheimer, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), y enfermedad de Parkinson. Un "trastorno neurológico asociado con la edad" es un trastorno neurológico que también es un trastorno asociado con la edad.

50 Los ejemplos de enfermedades y trastornos que son relevantes para determinadas aplicaciones incluyen: atrofia del músculo esquelético; neuropatía (por ejemplo, neuropatía sensorial, neuropatía autónoma, neuropatía motora, retinopatía); ELA, enfermedad de Alzheimer, Parálisis de Bell, síndrome de Guillain-Barre, pérdida de memoria a corto plazo y a largo plazo, SLE, y enfermedad de Parkinson. Además, también pueden estar relacionados con la edad muchos trastornos neurodegenerativos y trastornos asociados con la agregación de proteínas (por ejemplo, aparte de la agregación de poliglutaminas) o plegamiento anómalo de proteínas. Los síntomas y diagnóstico de enfermedades son bien conocidos por los practicantes de medicina. Las composiciones también se pueden administrar a individuos que se están tratando con otros medios para este tipo de enfermedades, por ejemplo, individuos que se están tratando con un agente quimioterapéutico (por ejemplo, y que tienen neutropenia, atrofia, caquexia, nefropatía, neuropatía) o una cirugía opcional.

60 Kits

65 Un compuesto que se describe en el presente documento se puede proporcionar en un kit. El kit incluye (a) un compuesto que se describe en el presente documento, por ejemplo, una composición que incluye un compuesto que se describe en el presente documento, y, opcionalmente (b) material informativo. El material informativo puede ser descriptivo, instructivo, marketing u otro material que se refiere a los métodos que se describen en el presente

documento y/o al uso de un compuesto que se describe en el presente documento para los métodos que se describen en el presente documento.

5 El material informativo de los kits no se limita en su forma. En una realización, el material informativo puede incluir información acerca de la producción del compuesto, peso molecular del compuesto, concentración, fecha de caducidad, lote o información del sitio de producción, y así sucesivamente. En una realización, el material informativo se refiere a métodos para administrar el compuesto.

10 En una realización, el material informativo puede incluir instrucciones para administrar un compuesto que se describe en el presente documento de una manera adecuada para realizar los métodos que se describen en el presente documento, por ejemplo, en una dosis adecuada, forma de dosificación, o modo de administración (por ejemplo, una dosis, forma de dosificación, o modo de administración que se describen en el presente documento). En otra realización, el material informativo puede incluir instrucciones para administrar un compuesto que se describe en el presente documento a un sujeto adecuado, por ejemplo, un ser humano, por ejemplo, un ser humano
15 que padece o está en riesgo de un trastorno que se describe en el presente documento.

20 El material informativo de los kits no se limita en su forma. En muchos casos, el material informativo, por ejemplo, instrucciones, se proporciona en material impreso, por ejemplo, un texto impreso, dibujo y/o fotografía, por ejemplo, una etiqueta u hoja impresa. Sin embargo, el material informativo también se puede proporcionar en otros formatos, como Braille, materiales que se pueden leer en ordenador, grabación de vídeo o grabación de audio. En otra realización, el material informativo del kit es información de contacto, por ejemplo, una dirección física, dirección de correo electrónico, página web o número de teléfono, en el que el usuario del kit puede obtener información básica sobre un compuesto que se describe en el presente documento y/o su uso en los métodos que se describen en el presente documento. Por supuesto, el material informativo también se puede proporcionar en cualquier combinación
25 de formatos.

Además de un compuesto que se describe en el presente documento, la composición del kit puede incluir otros ingredientes, tales como un disolvente o tampón, un estabilizante, un conservante, un agente saborizante (por ejemplo, un antagonista amargo o un edulcorante), una fragancia u otro ingrediente cosmético, y/o un segundo agente para tratar una afección o trastorno que se describe en el presente documento. Como alternativa, los otros ingredientes se pueden incluir en el kit, pero en diferentes composiciones o envases que un compuesto que se describe en el presente documento. En tales realizaciones, el kit puede incluir instrucciones para la mezcla de un compuesto que se describe en el presente documento y los otros ingredientes, o para el uso de un compuesto que se describe en el presente documento junto con los otros ingredientes.
30
35

Un compuesto que se describe en el presente documento se pueden proporcionar en cualquier forma, por ejemplo, forma líquida, seca o liofilizada. Se prefiere que un compuesto que se describe en el presente documento sea básicamente puro y/o estéril. Cuando un compuesto que se describe en el presente documento se proporciona en una solución líquida, la solución líquida es preferentemente una solución acuosa, siendo preferente una solución acuosa estéril. Cuando un compuesto que se describe en el presente documento se proporciona como una forma seca, la reconstitución se realiza generalmente mediante la adición de un disolvente adecuado. El disolvente, por ejemplo, agua estéril o tampón, se pueden proporcionar opcionalmente en el kit.
40

El kit puede incluir uno o más envases para la composición que contiene un compuesto que se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el kit contiene recipientes separados, divisores o compartimentos para la composición y material informativo. Por ejemplo, la composición está contenida en una botella, vial o jeringa, y el material informativo está contenido en una funda o paquete de plástico. En otras realizaciones, los elementos separados del kit están contenidos dentro de un único recipiente no dividido. Por ejemplo, la composición está contenida en una botella, vial o una jeringa que tiene unido a la misma el material informativo en forma de una etiqueta. En algunas realizaciones, el kit incluye una pluralidad (por ejemplo, un paquete) de envases individuales, que contienen cada uno una o más formas de dosificación unitaria (por ejemplo, una forma de dosificación que se describe en el presente documento) de un compuesto que se describe en el presente documento. Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de jeringas, ampollas, paquetes de aluminio, o envases blíster, conteniendo cada uno una única dosis unitaria de un compuesto que se describe en el presente documento. Los envases de los kits pueden ser herméticos, resistentes al agua (por ejemplo, impermeables a los cambios de humedad o evaporación), y/o herméticos a la luz.
45
50
55

El kit incluye opcionalmente un dispositivo adecuado para la administración de la composición, por ejemplo, una jeringa, inhalante, pipeta, pinzas, cuchara de medir, gotero (por ejemplo, cuentagotas), hisopo (por ejemplo, un hisopo de algodón o hisopo de madera), o cualquier dispositivo de administración. En una realización preferente, el dispositivo es un dispositivo de implante médico, por ejemplo, envasado para inserción quirúrgica.
60

Información genética

65 Se puede obtener la información genética de SIRT1, por ejemplo, por evaluación del material genético (por ejemplo, ADN o ARN) de un sujeto (por ejemplo, como se describe posteriormente). La información genética se refiere a

5 cualquier indicación acerca del contenido de la secuencia de ácidos nucleicos en uno o más nucleótidos. La información genética puede incluir, por ejemplo, una indicación acerca de la presencia o ausencia de un polimorfismo particular, por ejemplo, una o más variaciones de nucleótidos. Polimorfismos a modo de ejemplo incluyen un polimorfismo de nucleótido individual (SNP), un sitio de restricción o longitud de fragmento de restricción, una inserción, una inversión, una supresión, una repetición (por ejemplo, una repetición de trinucleótido, una repetición retroviral), etc.

En la Tabla 2 se enumeran los SNP de SIRT1 a modo de ejemplo.

10

Tabla 2: SNP de SIRT1 a modo de ejemplo

inicio	Para	dbSNP rs#	sitios locales	transID	prom.het	s.e.het
69520160	69520160	<u>rs730821</u>				0
69520607	69520607	<u>rs3084650</u>				0
69530733	69530733	<u>rs4746715</u>				0
69531621	69531621	<u>rs4745944</u>				0
69535743	69535743	<u>rs3758391</u>	SIRT1:sitio;		0,267438	0,153425
69536360	69536360	<u>rs3740051</u>	SIRT1:sitio;		0,424806	0,114325
69536618	69536618	<u>rs932658</u>	SIRT1:sitio;			0
69536736	69536736	<u>rs3740053</u>	SIRT1:sitio;			0
69536742	69536742	<u>rs2394443</u>	SIRT1:sitio;			0
69539733	69539733	<u>rs932657</u>	SIRT1:intrón;			0
69540006	69540006	<u>rs737477</u>	SIRT1:intrón;		0,118187	0,201473
69540390	69540390	<u>rs911738</u>	SIRT1:intrón;			0
69540762	69540762	<u>rs4351720</u>	SIRT1:intrón;			0
69540970	69540970	<u>rs2236318</u>	SIRT1:intrón;		0,222189	0,135429
69541621	69541621	<u>rs2236319</u>	SIRT1:intrón;		0,455538	0,102018
69544136	69544136	<u>rs768471</u>	SIRT1:intrón;		0	0,01
69547213	69547213	<u>rs1885472</u>	SIRT1:intrón;			0
69549191	69549191	<u>rs2894057</u>	SIRT1:intrón;			0
69551326	69551326	<u>rs4746717</u>	SIRT1:intrón;			0
69557788	69557788	<u>rs2224573</u>	SIRT1:intrón;			0
69558999	69558999	<u>rs2273773</u>	SIRT1;	NM_012238;	0,430062	0,135492
69559302	69559302	<u>rs3818292</u>	SIRT1:intrón;		0,456782	0,10598
69564725	69564725	<u>rs1063111</u>	SIRT1;	NM_012238;		0
69564728	69564728	<u>rs1063112</u>	SIRT1;	NM_012238;		0
69564741	69564741	<u>rs1063113</u>	SIRT1;	NM_012238;		0
69564744	69564744	<u>rs1063114</u>	SIRT1;	NM_012238;		0
69565400	69565400	<u>rs3818291</u>	SIRT1:intrón;		0,179039	0,132983
69566230	69566237	<u>rs5785840</u>	SIRT1:intrón;			0
69566318	69566318	<u>rs2394444</u>	SIRT1:intrón;			0
69567559	69567559	<u>rs1467568</u>	SIRT1:intrón;			0
69567728	69567728	<u>rs1966188</u>	SIRT1:intrón;			0
69568961	69568961	<u>rs2394445</u>	SIRT1;	NM_012238:UT R;		0
69568962	69568962	<u>rs2394446</u>	SIRT1;	NM_012238:UT R;		0
69569231	69569231	<u>rs4746720</u>	SIRT1;	NM_012238:UT R;		0
69569461	69569461	<u>rs752578</u>	SIRT1;	NM_012238:UT R;		0

69570479	69570479	<u>rs2234975</u>	SIRT1;	NM_012238:UT R;	0
69570580	69570580	<u>rs1022764</u>	SIRT1:sitio;		0
69570983	69570983	<u>rs1570290</u>	SIRT1:sitio;	0,0392	0,167405
69572334	69572334	<u>rs2025162</u>			0
69573968	69573968	<u>rs4141919</u>	DKFZP564G092: sitio;		0
69574252	69574252	<u>rs14819</u>	DKFZP564G092: sitio;		0
69575032	69575032	<u>rs14840</u>	DKFZP564G092: sitio;		

Es posible registrar o comunicar digitalmente información genética en diversas formas. Las representaciones habituales incluyen uno o más bits, o una cadena de texto. Por ejemplo, se puede describir un marcador bialélico usando dos bits. En una realización, el primer bit indica si está presente el primer alelo (por ejemplo, el alelo minoritario), y el segundo bit indica si está presente el otro alelo (por ejemplo, el alelo mayoritario). Para marcadores que son multialélicos, por ejemplo, cuando son posibles más de dos alelos, se pueden usar bits adicionales así como otras formas de codificación (por ejemplo, binarias, texto hexadecimal, por ejemplo, ASCII o Unicode, etc.). En algunas realizaciones, la información genética describe un haplotipo, por ejemplo, una pluralidad de polimorfismos en el mismo cromosoma. Sin embargo, en numerosas realizaciones, la información genética está desfasada.

La decisión de administrar un compuesto descrito el presente documento se puede tomar dependiendo de la información genética de SIRT1. Por ejemplo, un método para administrar un compuesto descrito en el presente documento puede incluir evaluar los ácidos nucleicos de un sujeto para obtener información genética de SIRT1 u otra sirtuina, y administrar un compuesto descrito el presente documento.

Bases de datos

También se presenta en el presente documento una base de datos que asocia información de, o identifica, uno o más de los compuestos descritos en el presente documento con un parámetro de un paciente, por ejemplo, un paciente que se va a tratar con un trastorno del presente documento. El parámetro puede ser un parámetro general, por ejemplo, presión sanguínea, temperatura corporal central, etc., un parámetro relacionado con una enfermedad o trastorno específico, por ejemplo, como se describe el presente documento.

Ejemplos

En todos los Ejemplos posteriores, los compuestos se denominan como corresponde su designación en la Tabla 1. Los Compuestos 4 y 8 son compuestos a modo de ejemplo de la presente invención. El resto de los compuestos son compuestos de comparación.

Ejemplo 1: ensayo de apoptosis de HeLa

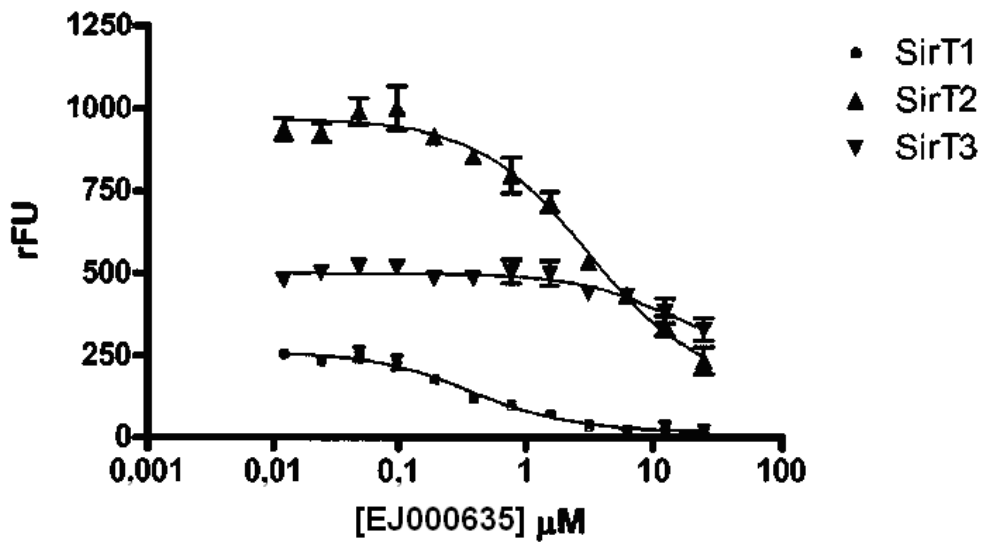
Se evaluaron los siguientes compuestos a modo de ejemplo para su efecto en un ensayo de apoptosis de células HeLa usando ELISA de Detección de Muerte Celular más el kit de Roche Applied Science.

Compuesto	dosis	promedio	SD
8	0	1,12	0,15
8	0,5	1,23	0,04
8	2,5	1,85	0,24
8	10	2,11	0,25
8	25	2,27	0,20
5	0	0,92	0,07
5	0,5	1,00	0,08
5	2,5	0,97	0,11
5	10	1,07	0,02
5	25	0,91	0,07

Resveratol	0	0,73	0,08
Resveratol	0,5	0,83	0,05
Resveratol	2,5	0,84	0,02
Resveratol	10	1,01	0,07
Resveratol	25	0,56	0,08
DMSO	0	0,72	0,09
DMSO	0,5	0,79	0,12
DMSO	2,5	0,91	0,13
DMSO	10	0,76	0,09
DMSO	25	1,18	0,20

Ejemplo 2

EJ-0000635 inhibición de enzimas SIRT con sustrato Fluor de Lys P53



	SirT1	SirT2	SirT3
Respuesta a dosis sigmoidea (pendiente variable)			
Valores que se ajustan mejor			
BOTTOM	17,24	156,1	248,2
TOP	261,7	966,4	499,2
LOGEC50	-0,4290	0,4890	1,111
HILLSLOPE	-1,080	-0,9944	-1,146
CE50	0,3724	3,083	12,90
eGFP No TSA			
eGFP + TSA			
mSIRT2 +TSA DMSO			
mSIRT2 +TSA EJ-527			
mSIRT2 +TSA EJ-540			
mSIRT2 +TSA EJ-566			



Lista de reactivos:

Nombre de reactivo	Suministrado como	Fuente	Número de catálogo	Almacenamiento
1 SirT1 humana	2,5 o 3,5U / ul	Biomol	SE-239	-20 °C
2 Sustrato Fluor de Lys	50 mM en DMSO	Biomol	KI-104	-20 °C
3 Revelador Fluor de Lys	Concentrado 20x	Biomol	KI-105	-20 °C
4 NAD	sólido	Sigma	N-1636	-20 °C
5 Nicotinamida	sólido	Calbiochem	481907	TA
6 Trizma-HCl	sólido	Sigma	T-5941	TA
7 Cloruro sódico	sólido	Sigma	S-9888	TA
8 Cloruro de magnesio	sólido	Sigma	M-2393	TA
9 Cloruro potásico	sólido	Sigma	P-3911	TA
10 Monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween-20)	100 %	Sigma	P-7949	TA
11 Patrón desacetilado Fluor de Lys	10 mM en DMSO	Biomol	KI-142	-20 °C

Lista de equipos:

5

Nombre de la herramienta	Fuente de la herramienta	Número de catálogo
1 Lector de placas de fluorescencia Synergy HT	BIO-TEK	SIAFR
2 Pipeta de 16 canales Matrix Impact2	Apogent Discoveries	2069
3 Incubadora a 37 °C	VWR	1540

Lista de fungibles:

Fungible	Fuente	Número de catálogo
1 Placas de 384 pocillos de bajo volumen de color blanco	Greiner / Bellco	4507-84075
2 Puntas para la pipeta de 16 canales Matrix	Apogent Discoveries	7421
3 Envases de reactivos divididos de 25 ml	Apogent Discoveries	8095
4 Películas para sellar placas	Apogent Discoveries	4418

10 Formulaciones de patrones de reactivos:

Nombre de reactivo preparado	Nombre del componente	P.M.	Cantidad del componente (en agua)	Concentración final del componente	Almacenamiento
1 Tris-HCl, pH 8,0	Trizma-HCl HCl	157,6	157,6 g / l a pH 8,0	pH 8,0 1 M	TA
2 Cloruro sódico	NaCl	58,44	292 g / l	5 M	TA
3 Cloruro de magnesio	MgCl ₂	203,3	20,33 g / l	100 mM	TA
4 Cloruro potásico	KCl	74,55	20,13 g / l	270 mM	TA
5 Monolaurato de polioxietilensorbitán	Tween-20		1 ml / 10 ml	10 %	TA
6 NAD	NAD	717	0,0717 g / ml	100 mM	-20 °C
7 Nicotinamida	Nicotinamida	122	0,0061 g / ml	50 mM	-20 °C
8 Tampón de ensayo	Tris-HCl, pH 8,0		25 ml de patrón 1 M	25 mM	4 °C

	/l		
NaCl	27,4 ml de patrón 5 M /l	137 mM	
KCl	10 ml de patrón 270 mM /l	2,7 mM	
MgCl ₂	10 ml de patrón 100mM /l	1 mM	
Tween-20	5 ml de patrón al 10 % /l	0,05 %	

**** Preparar los patrones de trabajo siguientes justo antes de su uso**

Los siguientes se preparan en tampón de ensayo

9	Sustratos 2x	Substrato Flour de Lys	6ul / ml	300 uM	hielo
		NAD	20 ul de patrón 100 mM / ml	2 mM	

**** Preparar los patrones de trabajo siguientes justo antes de su uso**

Los siguientes se preparan en tampón de ensayo

10	Mezcla enzimática	SirT1 Biomol	** depende de la actividad específica del lote lot. Ej: 3,5 U/ul, 35,71 ul / ml	0,125 U/ul (0,5 U/pocillo)	hielo
11	Revelador/reactivo de parada	Revelador concentrado 20x nicotinamida	50 ul / ml 20 ul de patrón 50 mM / ml	1 x en tampón de ensayo 1 mM	hielo

Ejemplo 3: con el fin de determinar si se inhibe la enzima de mamífero mediante el compuesto 8, se transfectan células 293T con un constructo diseñado para expresar SIRT1 humana fusionado con glutatión-S-transferasa para permitir una rápida purificación de los extractos celulares. Después de la lisis, los extractos celulares se incubaron con perlas de glutatión-sefarosa seguido de varios baños en tampón de lisis y un lavado final en tampón de ensayo de enzima SIRT1. Se añadieron perlas con GST-SIRT1 unido al ensayo Fleur-de-lys (Biomol) en presencia de diversas concentraciones del compuesto 8. Como se puede observar en la Figura 2a, el valor de CE₅₀ del compuesto 8 para SIRT1 de mamífero es comparable al obtenido para la enzima humana producida de forma recombinante en bacterias.

Como se puede observar en la Figura 2B, el compuesto 8 entra en las células y aumenta la acetilación de p53 (en la lisina 382) después de tratamiento con etopósido. En el experimento representado en la Figura 2B, se trataron células NCI-H460 con etopósido 20 uM (un agente que daña el ADN) en presencia o ausencia de inhibidores de SIRT1, compuesto 8 o nicotinamida y se visualizó la cantidad de p53 acetilada (en la lisina 382) mediante transferencia de Western. El compuesto 8 es capaz de aumentar la acetilación de p53 considerablemente en relación con el DMSO solo y 1 uM y 10 uM es igualmente eficaz.

Ejemplo 4: se ensayaron los enantiómeros del compuesto 8, donde cada enantiómero tenía una pureza mayor de un 90 % de exceso enantiomérico, para determinar si un enantiómero individual era más potente que una mezcla de enantiómeros. Se trataron células NCI-H460 durante 6 horas con los compuestos 8(+) y 8(-) en presencia de etopósido 20 micromolar seguido de lisis e inmunoprecipitación de p53 usando Ab-6 (Oncogene Science). Los extractos se examinaron con un anticuerpo que reconoce la lisina 382 acetilada de p53 (Cell Signaling). La Figura 3 demuestra que hay enantiómeros activos/inactivos del compuesto 8. Específicamente, el enantiómero inactivo, el compuesto 8(+), no conduce a un aumento de la acetilación de p53 en presencia de etopósido mientras que el compuesto 8(-) conduce a un aumento considerable en la acetilación y la estabilización de la proteína p53.

Ejemplo 5: en los resultados del siguiente experimento, que se representan en la Figura 4, los presentes inventores muestran que la capacidad de un compuesto para aumentar la acetilación de p53 correlaciona con su potencia *in vitro* frente a SIRT1. Se añadió una serie de compuestos similares estructuralmente a las células con una concentración 1 uM. Solo los compuestos que inhiben SIRT1 con valores de CI₅₀ inferiores a 1 uM aumentaron la acetilación de p53, mientras que los compuestos con valores de CI₅₀ superiores a 1 uM no lo hicieron.

Ejemplo 6:

El experimento representado en la Figura 5 demuestra que en un ensayo de silenciamiento de levadura dependiente de la actividad de SIRT1, el enantiómero inactivo del compuesto 8, el compuesto 8(+), no tiene ningún efecto en el crecimiento celular mientras que el enantiómero activo, 8(-), inhibe SIRT1 y permite la expresión de URA3 que bloquea el crecimiento en presencia de 5-fluorouracilo. Se usó la cepa SL8c (URA en el telómero) en un ensayo basado en levadura para analizar sistemáticamente los compuestos. Las células crecieron en medio URA para seleccionar las células desilenciadas. Al día siguiente de las células se diluyeron 1:20 en YPD reciente con un 2 % de glucosa y a continuación se hicieron crecer durante 5 horas. A continuación las células se diluyeron OD = 0,01 en medio 5FOA tanto SD como SD + 0,1 %. Los compuestos se diluyeron a continuación en serie en 10 ul de medio 5FOA SD o SD + 0,1 %. Se pipetearon 140 ml de células en una placa de 96 pocillos y se hicieron crecer a 30 °C durante 18-24 h.

Ejemplo 7: el compuesto 8 inhibe la enzima SIRT1 en células adicionales. Se trataron líneas celulares U2OS y líneas celulares MCF7 con el compuesto 8 en presencia de etopósido (TOPO) 20 micromolar durante 6 horas seguido de lisis e inmunoprecipitación de p53 con Ab-6 conjugado con perlas de agarosa. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y se realizó una inmunotransferencia con un anticuerpo que reconoce la lisina 382 acetilada de p53. Los resultados representados en la Figura 6 demuestran que el compuesto 8 es competente para inhibir SIRT1 en diversas líneas celulares con efectos similares en la acetilación de p53.

Ejemplo 8: con el fin de evaluar si los efectos del compuesto 8 en la acetilación de p53 conducen a cambios en la función de p53 se llevó a cabo un experimento para medir la supervivencia celular después de daño del ADN. Se dañaron células NCI-H460 con concentraciones variables de etopósido en presencia o ausencia de inhibidores de SIRT1. Como se representa en la Figura 7, el compuesto 8 por sí mismo no modula la función de p53 significativamente en este ensayo.

Ejemplo 9: se sembraron en placa células con una densidad de 800 por pocillo en placas cytostar de 96 pocillos en presencia de diversas concentraciones de etopósido y compuesto 8 1 micromolar. La incorporación de timidina se midió a intervalos de 24 horas. Como se representa en la Figura 9, este experimento demuestra que no existe ninguna sinergia entre el etopósido y el compuesto 8 en las características de crecimiento de las células NCI-H460 en unas condiciones en las que el compuesto se añadió simultáneamente, antes de, y después del tratamiento con etopósido.

Ejemplo 10: se realizó una privación de suero en células HEK293 en presencia o ausencia del compuesto 8 durante 24 horas seguido de lisis y análisis de inmunotransferencia de la proteína p27. Como se puede observar en la Figura 9, el tratamiento de las células con el compuesto 8 conduce a la eliminación de la sobrerregulación mediada por privación de suero del inhibidor del ciclo celular p27. La explicación propuesta para este resultado es que la desacetilación mediada por SIRT1 conduce a la inactivación de la transcripción de p27 mediada por FOXO1 y la adición del compuesto 8 invierte este efecto.

Ejemplo 11

Se transfectaron células HeLa con GFP-hSIRT2 isoforma 1 (verde). 36 horas después de la transfección se añadió 1 mM de TSA y DMSO o 50 mM de compuesto 8. A la mañana siguiente, las células se fijaron, se permeabilizaron, y se tiñeron para tubulina acetilada (rojo). En las células tratadas con DMSO había muy poca tubulina acetilada en las células que expresan SIRT2, y en las células tratadas con el compuesto 8 se produce una mayor acetilación de la tubulina lo que indica que se bloqueó el efecto de SIRT2.

También es posible observar el efecto de los compuestos usando análisis de Western. Se transfectaron células 293T con eGFP (control) o con isoforma 1 de SIRT2 de ratón (mSIRT2). Se añadió TSA para aumentar la cantidad de tubulina acetilada y al mismo tiempo se añadieron DMSO o el compuesto enumerado posteriormente a una concentración de 10 mM.

Descripción de Procedimiento:**Descripción de Etapa**

- 1 Preparar una cantidad de 2x Sustratos necesaria para el número de pocillos a someter a ensayo. Se necesitan 5 ul por pocillo
- 2 Dispensar 5 ul de 2x sustratos a los pocillos de ensayo
- 3 Dispensar 1 ul del compuesto de ensayo a los pocillos de ensayo
Dispensar 1 ul de disolvente / diluyente del compuesto a los pocillos de control positivo
Dispensar 1 ul de nicotinamida 1 mM a los pocillos de inhibición al 50 %
Dispensar 1 ul de nicotinamida 10mM a los pocillos de inhibición al 100 %
- 4 Dispensar 4 ul de tampón de ensayo a los pocillos de control negativo (sin controles de enzimas)
- 5 Preparar una cantidad de enzima necesaria para el número de pocillos a someter a ensayo. Se necesitan 4 ul

de mezcla de enzimas por pocillo

6 Dispensar 4 ul de mezcla de enzimas a los pocillos de ensayo y a los pocillos de control positivo

7 Cubrir e incubar a 37 °C durante 45 minutos

5 8 Menos de 30 minutos antes de su uso, preparar una cantidad de 1 x revelador / reactivo de parada para el número de pocillos que se están sometiendo ensayo

9 Dispensar 10 ul de 1 x desarrollado / reactivos de parada a todos los pocillos

10 Incubar a temperatura ambiente durante al menos 15 minutos

11. Leer en lector de placa de fluorescencia, excitación = 350-380 nm, emisión = 440-460

10 12 Fluor de Lys en el sustrato tiene una fluorescencia intrínseca que se debe restar como fondo antes de que se realice cualquier cálculo en los datos. Estos valores se pueden encontrar en los pocillos de control negativo.

Apéndice 1: Preparación de una curva estándar usando patrón desacetilado de Fluor de Lys

15 1 Determinar el intervalo de concentraciones de patrón desacetilado para usar en conjunto con el ensayo anterior preparando una dilución 1 uM del patrón. Mezclar 10 ul de la dilución 1 uM con 10 ul de revelador y leer a las mismas longitudes de onda y ajustes de sensibilidad a los que se lee el ensayo. Usar esta estimación de AFU (unidades de fluorescencia arbitraria)/uM para determinar el intervalo de concentraciones a someter a ensayo en la curva patrón.

20 2 Preparar, en tampón de ensayo, una serie de diluciones del patrón desacetilado de Fluor de Lys que abarca el intervalo de concentraciones deseadas

3 Pipetear 10 ul de tampón de ensayo a los pocillos 'cero'

4 Pipetear 10 ul de las diluciones patrón en los pocillos

5 Pipetear 10 ul de revelador a los pocillos e incubar 15 minutos a TA

6 Leer la placa en las longitudes de onda anteriores

25 7 Representar la señal de fluorescencia (y) frente a la concentración del patrón desacetilado de Fluor de Lys (x) y determinar la pendiente como AFU/uM

Protocolo para someter a ensayo inhibidores de la reacción de desarrollo

30 1 A partir de la curva patrón seleccionar la concentración de patrón desacetilado que proporciona una señal de fluorescencia equivalente a los controles positivos en el ensayo (por ejemplo, 5 uM)

2 Dispensar 5 ul de 2x patrón desacetilado (por ejemplo, 10 uM)

3 Dispensar 1 ul de compuesto, 4 ul de tampón de ensayo

4 Dispensar 10 ul de revelador

35 5 Incubar a temperatura ambiente 15 minutos (o tiempo equivalente como en una identificación sistemática) y leer con los mismos ajustes que en la identificación sistemática

LISTADO DE SECUENCIAS

40 <110> Elixir Pharmaceuticals, Inc.

<120> MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE TRASTORNOS

45 <130> EPP290650

<140> EP04788727.8

<141> 13-09-2004

50 <150> US 60/502.811

<151> 12-09-2003

<150> US 60/531.443

<151> 19-122003

55

<150> US 60/560.509

<151> 07-04-2003

60

<160> 7

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

65

<210> 1

<211> 747

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 530 972 T3

<400> 1

Met Ala Asp Glu Ala Ala Leu Ala Leu Gln Pro Gly Gly Ser Pro Ser
 1 5 10 15
 Ala Ala Gly Ala Asp Arg Glu Ala Ala Ser Ser Pro Ala Gly Glu Pro
 20 25 30
 Leu Arg Lys Arg Pro Arg Arg Asp Gly Pro Gly Leu Glu Arg Ser Pro
 35 40 45
 Gly Glu Pro Gly Gly Ala Ala Pro Glu Arg Glu Val Pro Ala Ala Ala
 50 55 60
 Arg Gly Cys Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ala Leu Trp Arg Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Ala Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Glu Gln Glu Ala Gln Ala Thr Ala
 85 90 95
 Ala Ala Gly Glu Gly Asp Asn Gly Pro Gly Leu Gln Gly Pro Ser Arg
 100 105 110
 Glu Pro Pro Leu Ala Asp Asn Leu Tyr Asp Glu Asp Asp Asp Glu
 115 120 125
 Gly Glu Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ile Gly Tyr Arg Asp
 130 135 140
 Asn Leu Leu Phe Gly Asp Glu Ile Ile Thr Asn Gly Phe His Ser Cys
 145 150 155 160
 Glu Ser Asp Glu Glu Asp Arg Ala Ser His Ala Ser Ser Ser Asp Trp
 165 170 175
 Thr Pro Arg Pro Arg Ile Gly Pro Tyr Thr Phe Val Gln Gln His Leu
 180 185 190
 Met Ile Gly Thr Asp Pro Arg Thr Ile Leu Lys Asp Leu Leu Pro Glu
 195 200 205
 Thr Ile Pro Pro Pro Glu Leu Asp Asp Met Thr Leu Trp Gln Ile Val
 210 215 220
 Ile Asn Ile Leu Ser Glu Pro Pro Lys Arg Lys Lys Arg Lys Asp Ile

ES 2 530 972 T3

225					230					235				240	
Asn	Thr	Ile	Glu	Asp	Ala	Val	Lys	Leu	Leu	Gln	Glu	Cys	Lys	Lys	Ile
				245					250					255	
Ile	Val	Leu	Thr	Gly	Ala	Gly	Val	Ser	Val	Ser	Cys	Gly	Ile	Pro	Asp
			260					265					270		
Phe	Arg	Ser	Arg	Asp	Gly	Ile	Tyr	Ala	Arg	Leu	Ala	Val	Asp	Phe	Pro
		275					280					285			
Asp	Leu	Pro	Asp	Pro	Gln	Ala	Met	Phe	Asp	Ile	Glu	Tyr	Phe	Arg	Lys
		290				295					300				
Asp	Pro	Arg	Pro	Phe	Phe	Lys	Phe	Ala	Lys	Glu	Ile	Tyr	Pro	Gly	Gln
305					310					315					320
Phe	Gln	Pro	Ser	Leu	Cys	His	Lys	Phe	Ile	Ala	Leu	Ser	Asp	Lys	Glu
				325					330					335	
Gly	Lys	Leu	Leu	Arg	Asn	Tyr	Thr	Gln	Asn	Ile	Asp	Thr	Leu	Glu	Gln
			340					345					350		
Val	Ala	Gly	Ile	Gln	Arg	Ile	Ile	Gln	Cys	His	Gly	Ser	Phe	Ala	Thr
		355					360					365			
Ala	Ser	Cys	Leu	Ile	Cys	Lys	Tyr	Lys	Val	Asp	Cys	Glu	Ala	Val	Arg
	370					375					380				
Gly	Asp	Ile	Phe	Asn	Gln	Val	Val	Pro	Arg	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Ala
385					390					395					400
Asp	Glu	Pro	Leu	Ala	Ile	Met	Lys	Pro	Glu	Ile	Val	Phe	Phe	Gly	Glu
			405						410					415	
Asn	Leu	Pro	Glu	Gln	Phe	His	Arg	Ala	Met	Lys	Tyr	Asp	Lys	Asp	Glu
			420					425					430		
Val	Asp	Leu	Leu	Ile	Val	Ile	Gly	Ser	Ser	Leu	Lys	Val	Arg	Pro	Val
		435					440					445			
Ala	Leu	Ile	Pro	Ser	Ser	Ile	Pro	His	Glu	Val	Pro	Gln	Ile	Leu	Ile
	450					455					460				
Asn	Arg	Glu	Pro	Leu	Pro	His	Leu	His	Phe	Asp	Val	Glu	Leu	Leu	Gly
465					470					475					480
Asp	Cys	Asp	Val	Ile	Ile	Asn	Glu	Leu	Cys	His	Arg	Leu	Gly	Gly	Glu
			485						490					495	
Tyr	Ala	Lys	Leu	Cys	Cys	Asn	Pro	Val	Lys	Leu	Ser	Glu	Ile	Thr	Glu
			500					505					510		
Lys	Pro	Pro	Arg	Thr	Gln	Lys	Glu	Leu	Ala	Tyr	Leu	Ser	Glu	Leu	Pro
		515					520						525		
Pro	Thr	Pro	Leu	His	Val	Ser	Glu	Asp	Ser	Ser	Ser	Pro	Glu	Arg	Thr
	530					535						540			
Ser	Pro	Pro	Asp	Ser	Ser	Val	Ile	Val	Thr	Leu	Leu	Asp	Gln	Ala	Ala
545					550					555					560
Lys	Ser	Asn	Asp	Asp	Leu	Asp	Val	Ser	Glu	Ser	Lys	Gly	Cys	Met	Glu
			565						570					575	
Glu	Lys	Pro	Gln	Glu	Val	Gln	Thr	Ser	Arg	Asn	Val	Glu	Ser	Ile	Ala
			580					585					590		
Glu	Gln	Met	Glu	Asn	Pro	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Gly	Ser	Ser	Thr	Gly
		595				600					605				
Glu	Lys	Asn	Glu	Arg	Thr	Ser	Val	Ala	Gly	Thr	Val	Arg	Lys	Cys	Trp
	610					615					620				
Pro	Asn	Arg	Val	Ala	Lys	Glu	Gln	Ile	Ser	Arg	Arg	Leu	Asp	Gly	Asn
625					630						635				640
Gln	Tyr	Leu	Phe	Leu	Pro	Pro	Asn	Arg	Tyr	Ile	Phe	His	Gly	Ala	Glu
			645						650					655	
Val	Tyr	Ser	Asp	Ser	Glu	Asp	Asp	Val	Leu	Ser	Ser	Ser	Ser	Cys	Gly
			660					665					670		
Ser	Asn	Ser	Asp	Ser	Gly	Thr	Cys	Gln	Ser	Pro	Ser	Leu	Glu	Glu	Pro
		675					680					685			
Met	Glu	Asp	Glu	Ser	Glu	Ile	Glu	Glu	Phe	Tyr	Asn	Gly	Leu	Glu	Asp
	690					695					700				
Glu	Pro	Asp	Val	Pro	Glu	Arg	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Phe	Gly	Thr	Asp
705					710						715				720

ES 2 530 972 T3

Gly Asp Asp Gln Glu Ala Ile Asn Glu Ala Ile Ser Val Lys Gln Glu
725 730 735
Val Thr Asp Met Asn Tyr Pro Ser Asn Lys Ser
740 745

5

<210> 2
<211> 389
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 530 972 T3

Met Ala Glu Pro Asp Pro Ser His Pro Leu Glu Thr Gln Ala Gly Lys
1 5 10 15
Val Gln Glu Ala Gln Asp Ser Asp Ser Asp Ser Glu Gly Gly Ala Ala
20 25 30
Gly Gly Glu Ala Asp Met Asp Phe Leu Arg Asn Leu Phe Ser Gln Thr
35 40 45
Leu Ser Leu Gly Ser Gln Lys Glu Arg Leu Leu Asp Glu Leu Thr Leu
50 55 60
Glu Gly Val Ala Arg Tyr Met Gln Ser Glu Arg Cys Arg Arg Val Ile
65 70 75 80
Cys Leu Val Gly Ala Gly Ile Ser Thr Ser Ala Gly Ile Pro Asp Phe
85 90 95
Arg Ser Pro Ser Thr Gly Leu Tyr Asp Asn Leu Glu Lys Tyr His Leu
100 105 110
Pro Tyr Pro Glu Ala Ile Phe Glu Ile Ser Tyr Phe Lys Lys His Pro
115 120 125
Glu Pro Phe Phe Ala Leu Ala Lys Glu Leu Tyr Pro Gly Gln Phe Lys
130 135 140
Pro Thr Ile Cys His Tyr Phe Met Arg Leu Leu Lys Asp Lys Gly Leu
145 150 155 160
Leu Leu Arg Cys Tyr Thr Gln Asn Ile Asp Thr Leu Glu Arg Ile Ala
165 170 175
Gly Leu Glu Gln Glu Asp Leu Val Glu Ala His Gly Thr Phe Tyr Thr
180 185 190
Ser His Cys Val Ser Ala Ser Cys Arg His Glu Tyr Pro Leu Ser Trp
195 200 205
Met Lys Glu Lys Ile Phe Ser Glu Val Thr Pro Lys Cys Glu Asp Cys
210 215 220
Gln Ser Leu Val Lys Pro Asp Ile Val Phe Phe Gly Glu Ser Leu Pro
225 230 235 240
Ala Arg Phe Phe Ser Cys Met Gln Ser Asp Phe Leu Lys Val Asp Leu
245 250 255
Leu Leu Val Met Gly Thr Ser Leu Gln Val Gln Pro Phe Ala Ser Leu
260 265 270
Ile Ser Lys Ala Pro Leu Ser Thr Pro Arg Leu Leu Ile Asn Lys Glu
275 280 285
Lys Ala Gly Gln Ser Asp Pro Phe Leu Gly Met Ile Met Gly Leu Gly
290 295 300
Gly Gly Met Asp Phe Asp Ser Lys Lys Ala Tyr Arg Asp Val Ala Trp
305 310 315 320
Leu Gly Glu Cys Asp Gln Gly Cys Leu Ala Leu Ala Glu Leu Leu Gly
325 330 335
Trp Lys Lys Glu Leu Glu Asp Leu Val Arg Arg Glu His Ala Ser Ile
340 345 350
Asp Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Asn Pro Ser Thr Ser Ala Ser
355 360 365
Pro Lys Lys Ser Pro Pro Pro Ala Lys Asp Glu Ala Arg Thr Thr Glu
370 375 380
Arg Glu Lys Pro Gln
385

<210> 3
<211> 399
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

```

Met Ala Phe Trp Gly Trp Arg Ala Ala Ala Ala Leu Arg Leu Trp Gly
 1      5      10      15
Arg Val Val Glu Arg Val Glu Ala Gly Gly Val Gly Pro Phe Gln
 20      25      30
Ala Cys Gly Cys Arg Leu Val Leu Gly Gly Arg Asp Asp Val Ser Ala
 35      40      45
Gly Leu Arg Gly Ser His Gly Ala Arg Gly Glu Pro Leu Asp Pro Ala
 50      55      60
Arg Pro Leu Gln Arg Pro Pro Arg Pro Glu Val Pro Arg Ala Phe Arg
 65      70      75      80
Arg Gln Pro Arg Ala Ala Ala Pro Ser Phe Phe Phe Ser Ser Ile Lys
 85      90      95
Gly Gly Arg Arg Ser Ile Ser Phe Ser Val Gly Ala Ser Ser Val Val
 100     105     110
Gly Ser Gly Gly Ser Ser Asp Lys Gly Lys Leu Ser Leu Gln Asp Val
 115     120     125
Ala Glu Leu Ile Arg Ala Arg Ala Cys Gln Arg Val Val Val Met Val
 130     135     140
Gly Ala Gly Ile Ser Thr Pro Ser Gly Ile Pro Asp Phe Arg Ser Pro
 145     150     155     160
Gly Ser Gly Leu Tyr Ser Asn Leu Gln Gln Tyr Asp Leu Pro Tyr Pro
 165     170     175
Glu Ala Ile Phe Glu Leu Pro Phe Phe His Asn Pro Lys Pro Phe
 180     185     190
Phe Thr Leu Ala Lys Glu Leu Tyr Pro Gly Asn Tyr Lys Pro Asn Val
 195     200     205
Thr His Tyr Phe Leu Arg Leu Leu His Asp Lys Gly Leu Leu Leu Arg
 210     215     220
Leu Tyr Thr Gln Asn Ile Asp Gly Leu Glu Arg Val Ser Gly Ile Pro
 225     230     235     240
Ala Ser Lys Leu Val Glu Ala His Gly Thr Phe Ala Ser Ala Thr Cys
 245     250     255
Thr Val Cys Gln Arg Pro Phe Pro Gly Glu Asp Ile Arg Ala Asp Val
 260     265     270
Met Ala Asp Arg Val Pro Arg Cys Pro Val Cys Thr Gly Val Val Lys
 275     280     285
Pro Asp Ile Val Phe Phe Gly Glu Pro Leu Pro Gln Arg Phe Leu Leu
 290     295     300
His Val Val Asp Phe Pro Met Ala Asp Leu Leu Ile Leu Gly Thr
 305     310     315     320
Ser Leu Glu Val Glu Pro Phe Ala Ser Leu Thr Glu Ala Val Arg Ser
 325     330     335
Ser Val Pro Arg Leu Leu Ile Asn Arg Asp Leu Val Gly Pro Leu Ala
 340     345     350
Trp His Pro Arg Ser Arg Asp Val Ala Gln Leu Gly Asp Val Val His
 355     360     365
Gly Val Glu Ser Leu Val Glu Leu Leu Gly Trp Thr Glu Glu Met Arg
 370     375     380
Asp Leu Val Gln Arg Glu Thr Gly Lys Leu Asp Gly Pro Asp Lys
 385     390     395

```

<210> 4
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4


```

Met Lys Met Ser Phe Ala Leu Thr Phe Arg Ser Ala Lys Gly Arg Trp
 1          5          10          15
Ile Ala Asn Pro Ser Gln Pro Cys Ser Lys Ala Ser Ile Gly Leu Phe
          20          25          30
Val Pro Ala Ser Pro Pro Leu Asp Pro Glu Lys Val Lys Glu Leu Gln
          35          40          45
Arg Phe Ile Thr Leu Ser Lys Arg Leu Leu Val Met Thr Gly Ala Gly
          50          55          60
Ile Ser Thr Glu Ser Gly Ile Pro Asp Tyr Arg Ser Glu Lys Val Gly
65          70          75          80
Leu Tyr Ala Arg Thr Asp Arg Arg Pro Ile Gln His Gly Asp Phe Val
          85          90          95
Arg Ser Ala Pro Ile Arg Gln Arg Tyr Trp Ala Arg Asn Phe Val Gly
          100          105          110
Trp Pro Gln Phe Ser Ser His Gln Pro Asn Pro Ala His Trp Ala Leu
          115          120          125
Ser Thr Trp Glu Lys Leu Gly Lys Leu Tyr Trp Leu Val Thr Gln Asn
          130          135          140
Val Asp Ala Leu His Thr Lys Ala Gly Ser Arg Arg Leu Thr Glu Leu
145          150          155          160
His Gly Cys Met Asp Arg Val Leu Cys Leu Asp Cys Gly Glu Gln Thr
          165          170          175
Pro Arg Gly Val Leu Gln Glu Arg Phe Gln Val Leu Asn Pro Thr Trp
          180          185          190
Ser Ala Glu Ala His Gly Leu Ala Pro Asp Gly Asp Val Phe Leu Ser
          195          200          205
Glu Glu Gln Val Arg Ser Phe Gln Val Pro Thr Cys Val Gln Cys Gly
          210          215          220
Gly His Leu Lys Pro Asp Val Val Phe Phe Gly Asp Thr Val Asn Pro
225          230          235          240
Asp Lys Val Asp Phe Val His Lys Arg Val Lys Glu Ala Asp Ser Leu
          245          250          255
Leu Val Val Gly Ser Ser Leu Gln Val Tyr Ser Gly Tyr Arg Phe Ile
          260          265          270
Leu Thr Ala Trp Glu Lys Lys Leu Pro Ile Ala Ile Leu Asn Ile Gly
          275          280          285
Pro Thr Arg Ser Asp Asp Leu Ala Cys Leu Lys Leu Asn Ser Arg Cys
          290          295          300
Gly Glu Leu Leu Pro Leu Ile Asp Pro Cys
305          310

```

<210> 5
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 5

```

Met Arg Pro Leu Gln Ile Val Pro Ser Arg Leu Ile Ser Gln Leu Tyr
 1          5          10          15
Cys Gly Leu Lys Pro Pro Ala Ser Thr Arg Asn Gln Ile Cys Leu Lys
          20          25          30
Met Ala Arg Pro Ser Ser Ser Met Ala Asp Phe Arg Lys Phe Phe Ala
          35          40          45
Lys Ala Lys His Ile Val Ile Ile Ser Gly Ala Gly Val Ser Ala Glu
          50          55          60
Ser Gly Val Pro Thr Phe Arg Gly Ala Gly Gly Tyr Trp Arg Lys Trp
65          70          75          80
Gln Ala Gln Asp Leu Ala Thr Pro Leu Ala Phe Ala His Asn Pro Ser

```

10

ES 2 530 972 T3

				85					90				95		
Arg	Val	Trp	Glu	Phe	Tyr	His	Tyr	Arg	Arg	Glu	Val	Met	Gly	Ser	Lys
			100					105					110		
Glu	Pro	Asn	Ala	Gly	His	Arg	Ala	Ile	Ala	Glu	Cys	Glu	Thr	Arg	Leu
		115					120					125			
Gly	Lys	Gln	Gly	Arg	Arg	Val	Val	Val	Ile	Thr	Gln	Asn	Ile	Asp	Glu
	130					135					140				
Leu	His	Arg	Lys	Ala	Gly	Thr	Lys	Asn	Leu	Leu	Glu	Ile	His	Gly	Ser
145						150					155				160
Leu	Phe	Lys	Thr	Arg	Cys	Thr	Ser	Cys	Gly	Val	Val	Ala	Glu	Asn	Tyr
				165					170					175	
Lys	Ser	Pro	Ile	Cys	Pro	Ala	Leu	Ser	Gly	Lys	Gly	Ala	Pro	Glu	Pro
			180					185					190		
Gly	Thr	Gln	Asp	Ala	Ser	Ile	Pro	Val	Glu	Lys	Leu	Pro	Arg	Cys	Glu
		195					200					205			
Glu	Ala	Gly	Cys	Gly	Gly	Leu	Leu	Arg	Pro	His	Val	Val	Trp	Phe	Gly
	210					215					220				
Glu	Asn	Leu	Asp	Pro	Ala	Ile	Leu	Glu	Glu	Val	Asp	Arg	Glu	Leu	Ala
225					230						235				240
His	Cys	Asp	Leu	Cys	Leu	Val	Val	Gly	Thr	Ser	Ser	Val	Val	Tyr	Pro
				245					250					255	
Ala	Ala	Met	Phe	Ala	Pro	Gln	Val	Ala	Ala	Arg	Gly	Val	Pro	Val	Ala
			260					265					270		
Glu	Phe	Asn	Thr	Glu	Thr	Thr	Pro	Ala	Thr	Asn	Arg	Phe	Arg	Phe	His
		275					280					285			
Phe	Gln	Gly	Pro	Cys	Gly	Thr	Thr	Leu	Pro	Glu	Ala	Leu	Ala	Cys	His
	290					295					300				
Glu	Asn	Glu	Thr	Val	Ser										
305					310										

<210> 6
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 6

ES 2 530 972 T3

```

Met Ser Val Asn Tyr Ala Ala Gly Leu Ser Pro Tyr Ala Asp Lys Gly
 1          5          10          15
Lys Cys Gly Leu Pro Glu Ile Phe Asp Pro Pro Glu Glu Leu Glu Arg
          20          25          30
Lys Val Trp Glu Leu Ala Arg Leu Val Trp Gln Ser Ser Ser Val Val
          35          40          45
Phe His Thr Gly Ala Gly Ile Ser Thr Ala Ser Gly Ile Pro Asp Phe
          50          55          60
Arg Gly Pro His Gly Val Trp Thr Met Glu Glu Arg Gly Leu Ala Pro
65          70          75          80
Lys Phe Asp Thr Thr Phe Glu Ser Ala Arg Pro Thr Gln Thr His Met
          85          90          95
Ala Leu Val Gln Leu Glu Arg Val Gly Leu Leu Arg Phe Leu Val Ser
          100          105          110
Gln Asn Val Asp Gly Leu His Val Arg Ser Gly Phe Pro Arg Asp Lys
          115          120          125
Leu Ala Glu Leu His Gly Asn Met Phe Val Glu Glu Cys Ala Lys Cys
          130          135          140
Lys Thr Gln Tyr Val Arg Asp Thr Val Val Gly Thr Met Gly Leu Lys
145          150          155          160
Ala Thr Gly Arg Leu Cys Thr Val Ala Lys Ala Arg Gly Leu Arg Ala
          165          170          175
Cys Arg Gly Glu Leu Arg Asp Thr Ile Leu Asp Trp Glu Asp Ser Leu
          180          185          190
Pro Asp Arg Asp Leu Ala Leu Ala Asp Glu Ala Ser Arg Asn Ala Asp

          195          200          205
Leu Ser Ile Thr Leu Gly Thr Ser Leu Gln Ile Arg Pro Ser Gly Asn
          210          215          220
Leu Pro Leu Ala Thr Lys Arg Arg Gly Gly Arg Leu Val Ile Val Asn
225          230          235          240
Leu Gln Pro Thr Lys His Asp Arg His Ala Asp Leu Arg Ile His Gly
          245          250          255
Tyr Val Asp Glu Val Met Thr Arg Leu Met Lys His Leu Gly Leu Glu
          260          265          270
Ile Pro Ala Trp Asp Gly Pro Arg Val Leu Glu Arg Ala Leu Pro Pro
          275          280          285
Leu Pro Arg Pro Pro Thr Pro Lys Leu Glu Pro Lys Glu Glu Ser Pro
          290          295          300
Thr Arg Ile Asn Gly Ser Ile Pro Ala Gly Pro Lys Gln Glu Pro Cys
305          310          315          320
Ala Gln His Asn Gly Ser Glu Pro Ala Ser Pro Lys Arg Glu Arg Pro
          325          330          335
Thr Ser Pro Ala Pro His Arg Pro Pro Lys Arg Val Lys Ala Lys Ala
          340          345          350
Val Pro Ser
          355

```

<210> 7
 <211> 400
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 7

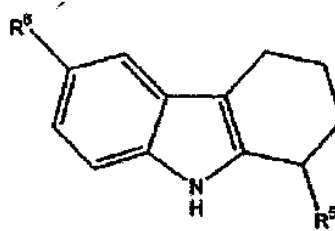
5

ES 2 530 972 T3

Met	Ala	Ala	Gly	Gly	Leu	Ser	Arg	Ser	Glu	Arg	Lys	Ala	Ala	Glu	Arg
1				5					10					15	
Val	Arg	Arg	Leu	Arg	Glu	Glu	Gln	Gln	Arg	Glu	Arg	Leu	Arg	Gln	Val
			20					25					30		
Ser	Arg	Ile	Leu	Arg	Lys	Ala	Ala	Ala	Glu	Arg	Ser	Ala	Glu	Glu	Gly
		35					40					45			
Arg	Leu	Leu	Ala	Glu	Ser	Ala	Asp	Leu	Val	Thr	Glu	Leu	Gln	Gly	Arg
	50					55					60				
Ser	Arg	Arg	Arg	Glu	Gly	Leu	Lys	Arg	Arg	Gln	Glu	Glu	Val	Cys	Asp
65					70					75					80
Asp	Pro	Glu	Glu	Leu	Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Glu	Leu	Ala	Ser	Ala	Val
				85					90					95	
Arg	Asn	Ala	Lys	Tyr	Leu	Val	Val	Tyr	Thr	Gly	Ala	Gly	Ile	Ser	Thr
			100					105					110		
Ala	Ala	Ser	Ile	Pro	Asp	Tyr	Arg	Gly	Pro	Asn	Gly	Val	Trp	Thr	Leu
		115					120					125			
Leu	Gln	Lys	Gly	Arg	Ser	Val	Ser	Ala	Ala	Asp	Leu	Ser	Glu	Ala	Glu
	130					135					140				
Pro	Thr	Leu	Thr	His	Met	Ser	Ile	Thr	Arg	Leu	His	Glu	Gln	Lys	Leu
145					150					155					160
Val	Gln	His	Val	Val	Ser	Gln	Asn	Cys	Asp	Gly	Leu	His	Leu	Arg	Ser
				165					170					175	
Gly	Leu	Pro	Arg	Thr	Ala	Ile	Ser	Glu	Leu	His	Gly	Asn	Met	Tyr	Ile
			180					185					190		
Glu	Val	Cys	Thr	Ser	Cys	Val	Pro	Asn	Arg	Glu	Tyr	Val	Arg	Val	Phe
		195					200					205			
Asp	Val	Thr	Glu	Arg	Thr	Ala	Leu	His	Arg	His	Gln	Thr	Gly	Arg	Thr
	210					215					220				
Cys	His	Lys	Cys	Gly	Thr	Gln	Leu	Arg	Asp	Thr	Ile	Val	His	Phe	Gly
225					230					235					240
Glu	Arg	Gly	Thr	Leu	Gly	Gln	Pro	Leu	Asn	Trp	Glu	Ala	Ala	Thr	Glu
				245					250					255	
Ala	Ala	Ser	Arg	Ala	Asp	Thr	Ile	Leu	Cys	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Lys
				260					265					270	
Val	Leu	Lys	Lys	Tyr	Pro	Arg	Leu	Trp	Cys	Met	Thr	Lys	Pro	Pro	Ser
		275					280					285			
Arg	Arg	Pro	Lys	Leu	Tyr	Ile	Val	Asn	Leu	Gln	Trp	Thr	Pro	Lys	Asp
	290					295					300				
Asp	Trp	Ala	Ala	Leu	Lys	Leu	His	Gly	Lys	Cys	Asp	Asp	Val	Met	Arg
305					310					315					320
Leu	Leu	Met	Ala	Glu	Leu	Gly	Leu	Glu	Ile	Pro	Ala	Tyr	Ser	Arg	Trp
				325					330					335	
Gln	Asp	Pro	Ile	Phe	Ser	Leu	Ala	Thr	Pro	Leu	Arg	Ala	Gly	Glu	Glu
			340					345					350		
Gly	Ser	His	Ser	Arg	Lys	Ser	Leu	Cys	Arg	Ser	Arg	Glu	Glu	Ala	Pro
	355						360					365			
Pro	Gly	Asp	Arg	Gly	Ala	Pro	Leu	Ser	Ser	Ala	Pro	Ile	Leu	Gly	Gly
	370					375					380				
Trp	Phe	Gly	Arg	Gly	Cys	Thr	Lys	Arg	Thr	Lys	Arg	Lys	Lys	Val	Thr
385					390					395					400

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la siguiente fórmula (XI):



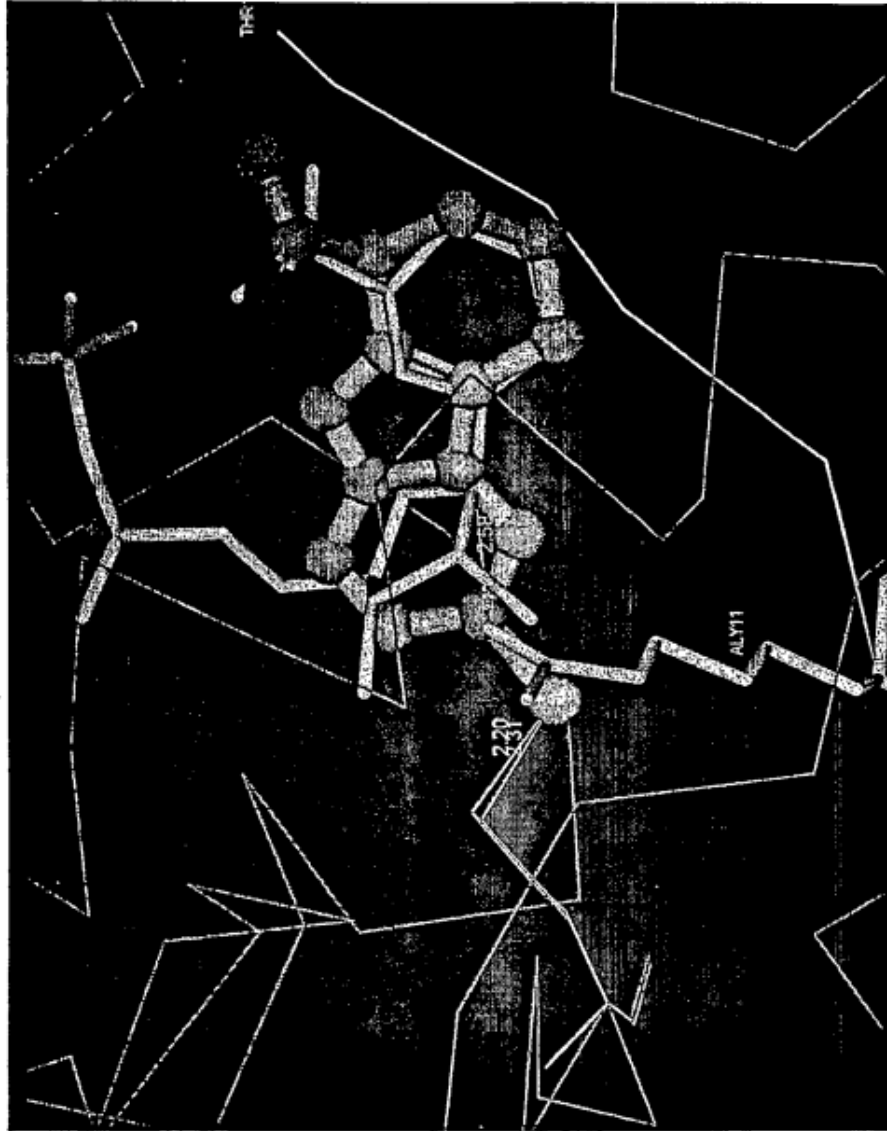
fórmula (XI).

- 5
- en la que R⁶ es halo o alquilo y R⁵ es aminocarbonilo para su uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo.
- 10 2. Un compuesto de fórmula (XI) para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en la prevención o el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo que puede estar mediado al menos en parte por agregación de poliglutamina.
3. Un compuesto de fórmula (XI) para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho trastorno se selecciona entre el grupo que consiste en Enfermedad de Huntington, Atrofia Muscular Espinobulbar (SBMA o Enfermedad de Kennedy), Atrofia Dentato-rubro-pálido-luisiana (DRPLA), Ataxia Espinocerebelosa de tipo 1 (SCA 1), Ataxia Espinocerebelosa de tipo 2 (SCA 2), Enfermedad de Machado-Joseph (MJD; SCA 3), Ataxia Espinocerebelosa de tipo 6 (SCA 6), Ataxia Espinocerebelosa de tipo 7 (SCA 7) y Ataxia Espinocerebelosa de tipo 12 (SCA 12).
- 15
- 20 4. Un compuesto de fórmula (XI) para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho trastorno es Enfermedad de Huntington.
5. Un compuesto de fórmula (XI) para su uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho compuesto es amida del ácido 6-cloro-2,3,4,9-tetrahidro-1H-carbazol-1-carboxílico.
- 25

Número de Compuesto	SirT1	SirT2	SirT3	HDAC	NADasa	Selectividad		
						SirT2/ SirT1	SirT3/ SirT1	
8	0,038	3,96	27,6	>50	>50	104	726	
4	0,357	5,99	>50	>50	>50	17	>140	
5	0,639	14,44	>50	>50	>50	23	>78	
15	>50	>50						
16	>50	>50						

Figura 1

FIGURA 2



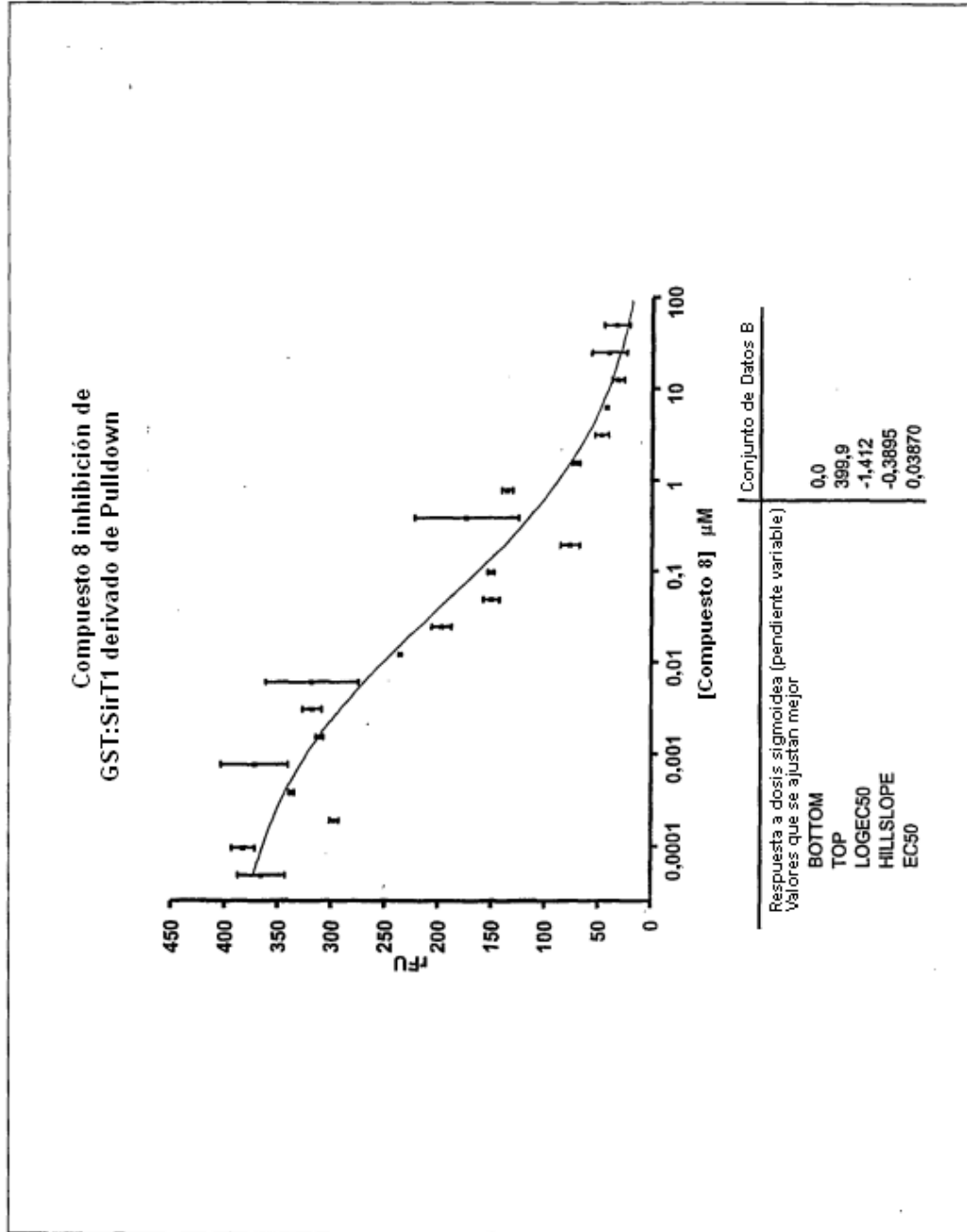


FIGURA 3A

Figura 3B

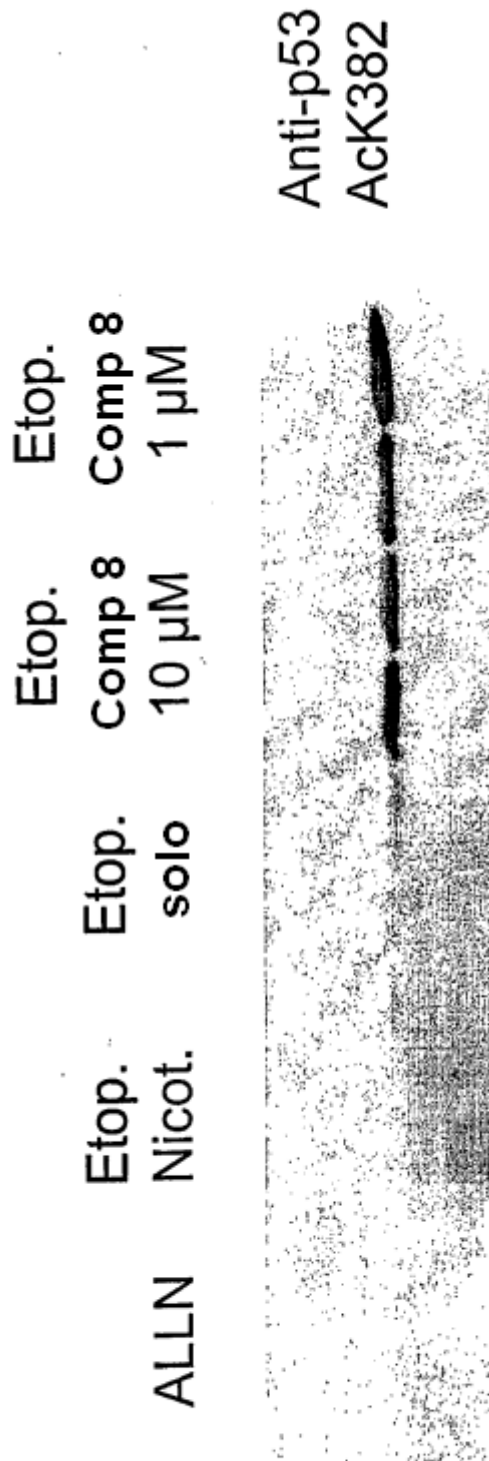


FIGURA 4

Efectos del Comp 8 1,0 μ M y enantiómeros en la acetilación de p53 en presencia de etopósido

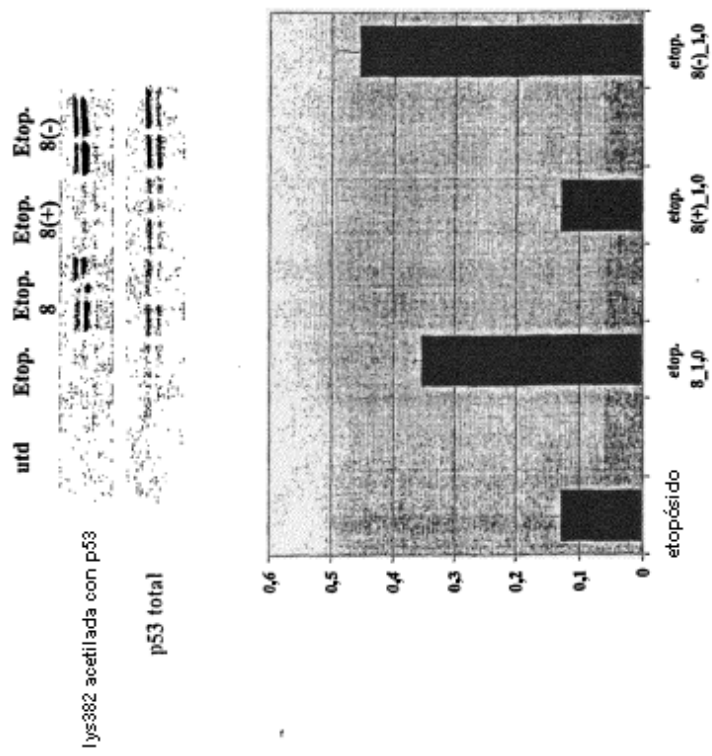
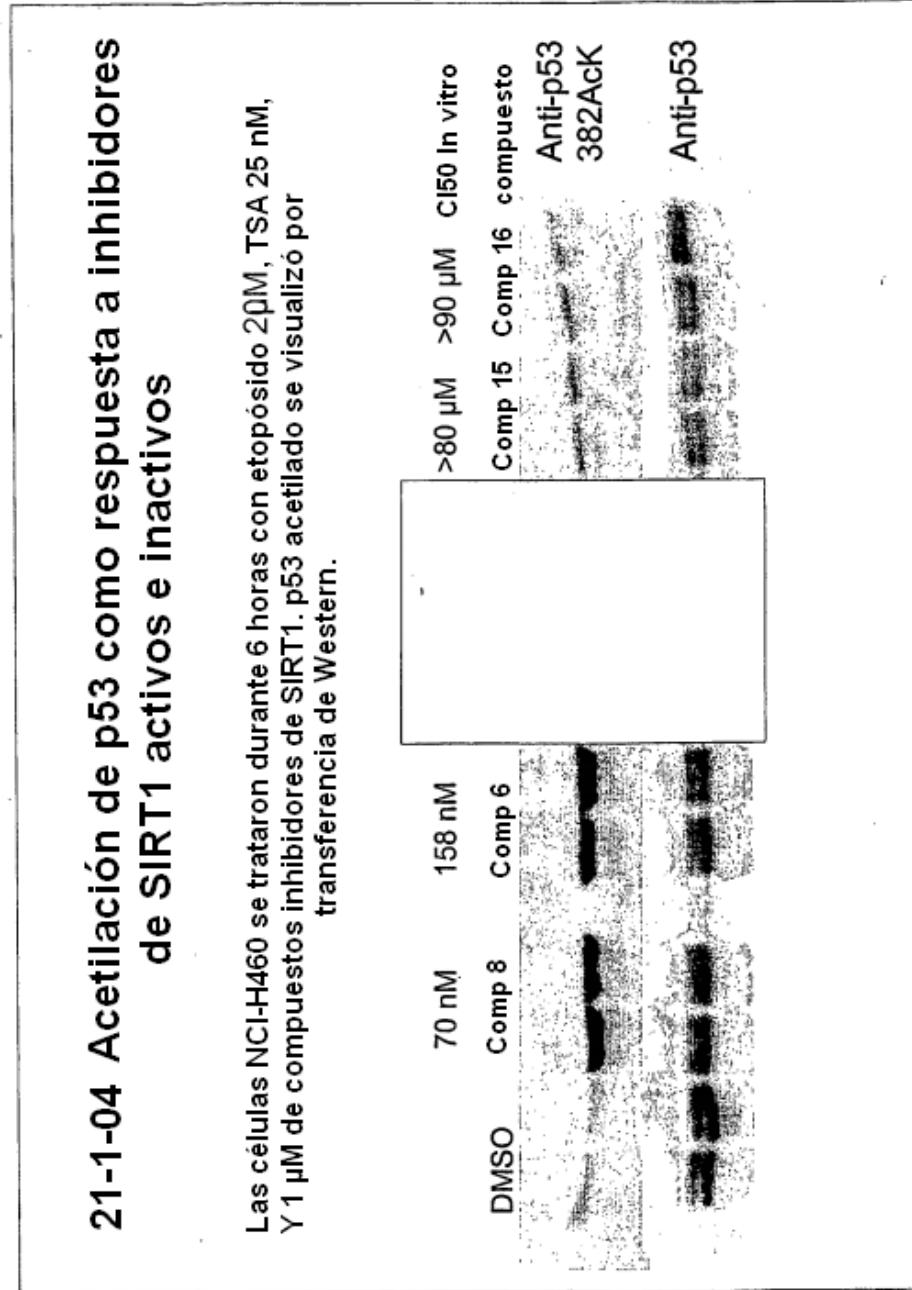
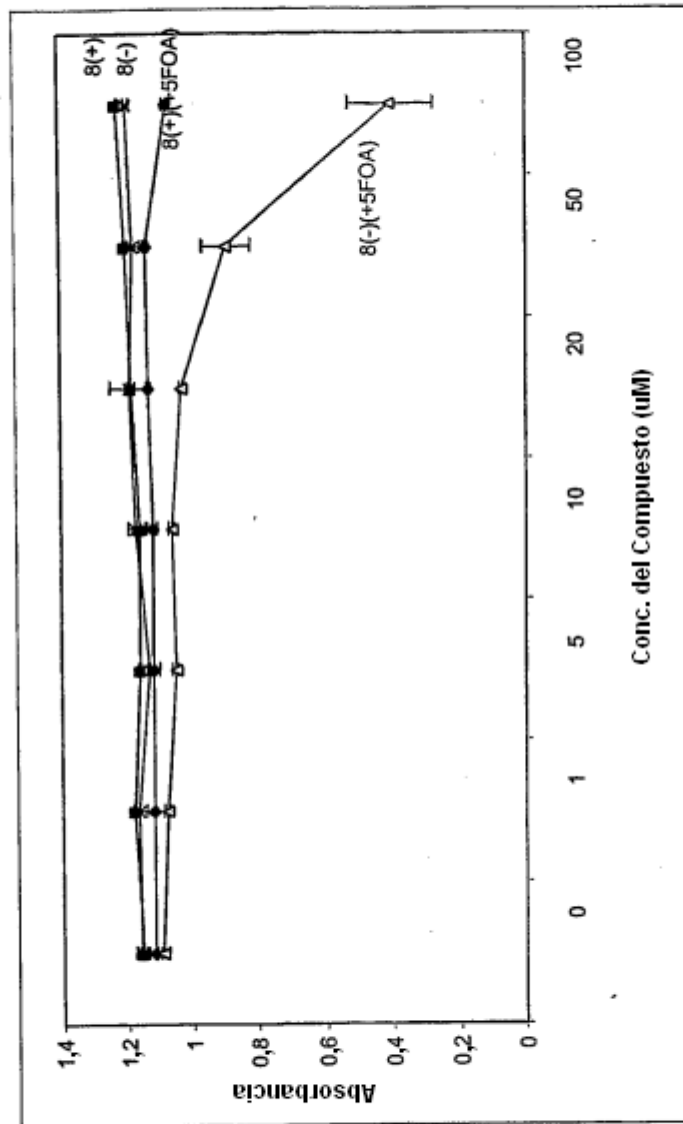


Figura 5



Comp 8(+), 8(-) - efecto en el crecimiento de levadura URA3-telomerasa.



Handwritten mark

FIGURA 6

FIGURA 7

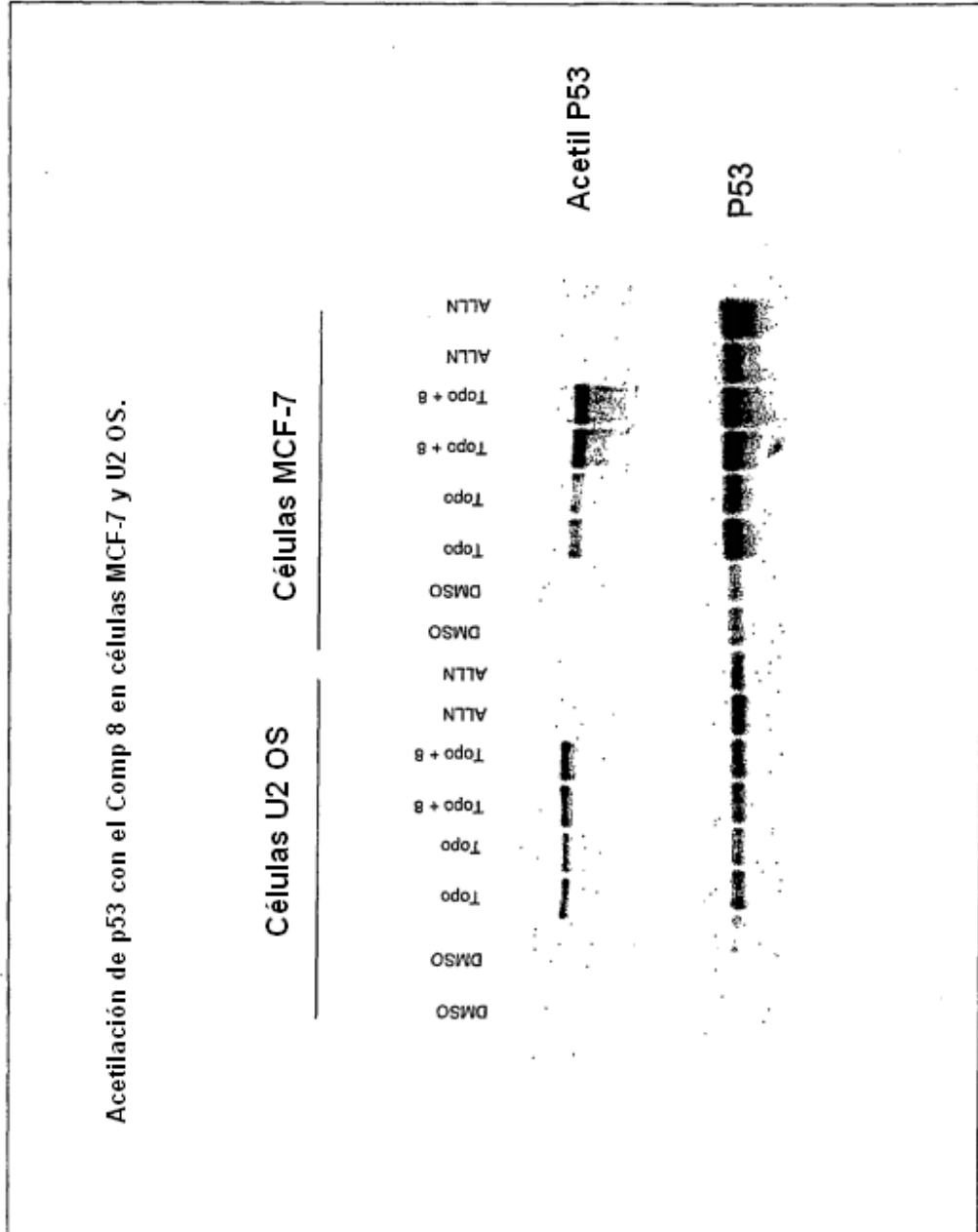
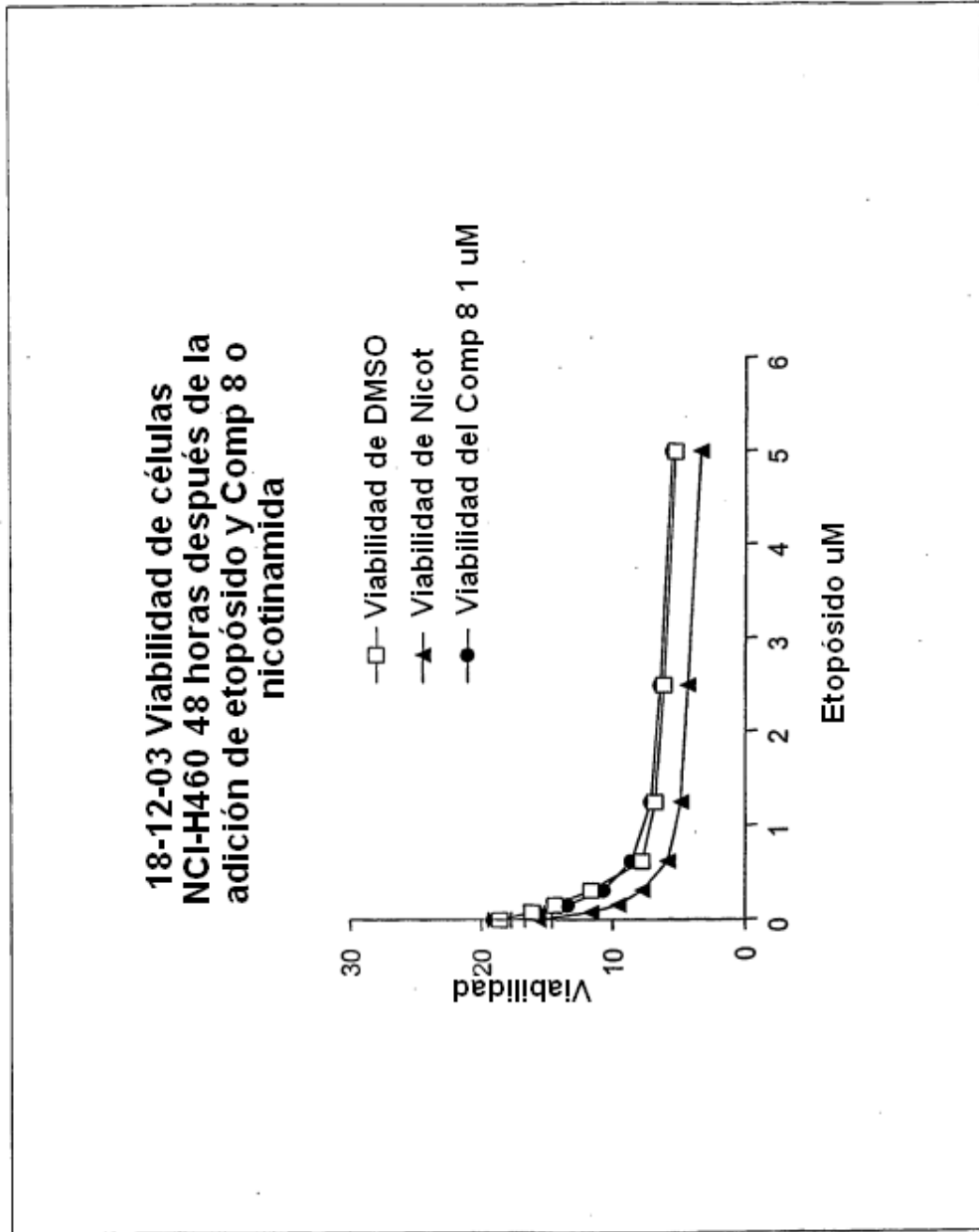


Figura 8



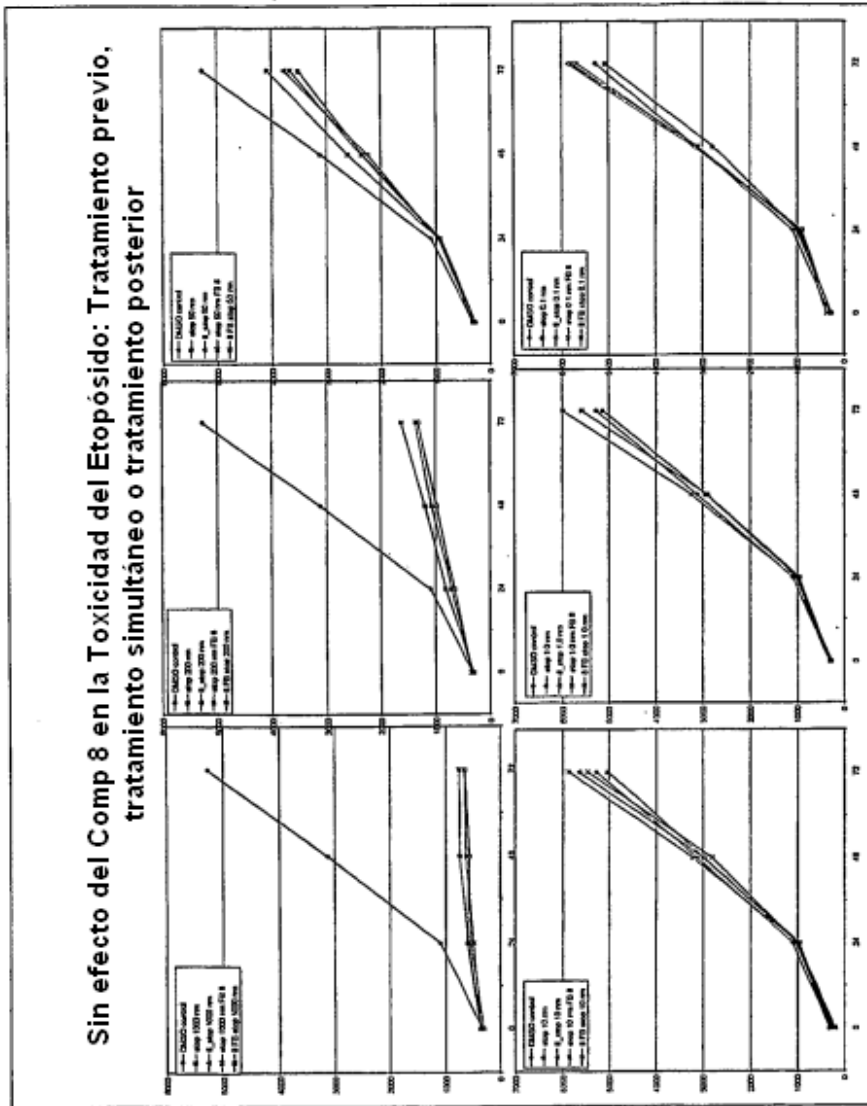


Figura 9

Figura 10



527 suprime la inducción de p27

