

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 258**

51 Int. Cl.:

C07D 513/04	(2006.01)	A61P 19/00	(2006.01)
A61P 3/00	(2006.01)		
A61P 25/00	(2006.01)		
A61K 31/437	(2006.01)		
A61P 5/50	(2006.01)		
A61P 31/00	(2006.01)		
A61K 31/496	(2006.01)		
A61P 9/00	(2006.01)		
A61P 37/00	(2006.01)		
A61K 31/5377	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2009 E 09833859 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2376502**

54 Título: **Compuestos de tiazolopiridina moduladores de sirtuina**

30 Prioridad:

19.12.2008 US 203156 P

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

28.08.2015

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE LLC (100.0%)
Corporation Service Company, 2711 Centreville
Road, Suite 400
Wilmington, Delaware 19808, US**

72 Inventor/es:

**OALMANN, CHRISTOPHER;
DISCH, JEREMY S.;
NG, PUI YEE y
PERNI, ROBERT B.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

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

ES 2 544 258 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos de tiazolopiridina moduladores de sirtuina

Antecedentes

5 La familia de genes del regulador de información silenciada (SIR, por sus siglas en inglés) representa un grupo altamente conservado de genes presente en los genomas de organismos que abarcan desde arqueobacterias hasta eucariotas superiores. Las proteínas SIR codificadas están implicadas en diversos procesos, desde la regulación del silenciamiento de genes hasta la reparación del ADN. Las proteínas codificadas por miembros de la familia génica SIR muestran una elevada conservación de secuencia en un dominio central de 250 aminoácidos. Un gen bien caracterizado de esta familia es SIR2 de *S. cerevisiae*, que está implicado en el silenciamiento de locus HM que
10 contienen información que especifica el tipo de reproducción sexual de la levadura, efectos de la posición de telómeros y el envejecimiento celular. La proteína Sir2 de levadura pertenece a una familia de histona desacetilasas. El homólogo de Sir2, CobB, en *Salmonella typhimurium*, funciona como una ADP-ribosil transferasa dependiente de NAD (nicotinamida adenina dinucleótido).

15 La proteína Sir2 es una desacetilasa de clase III que utiliza NAD como cosustrato. A diferencia de otras desacetilasas, muchas de las cuales están implicadas en el silenciamiento de genes, la Sir2 es insensible a inhibidores de histona desacetilasa de clases I y II tales como la tricostatina A (TSA).

20 La desacetilación de acetyl-lisina por Sir2 está estrechamente acoplada a la hidrólisis de NAD, que produce nicotinamida y un nuevo compuesto de acetyl-ADP ribosa. La actividad de desacetilasa dependiente de NAD de Sir2 es esencial para aquellas de sus funciones que pueden conectar su papel biológico con el metabolismo celular de la levadura. Los homólogos de Sir2 en mamíferos poseen actividad de histona desacetilasa dependiente de NAD. La mayoría de la información sobre las funciones mediadas por Sir2 procede de estudios en levaduras.

25 Los estudios bioquímicos han demostrado que Sir2 puede desacetilar fácilmente las colas aminoterminales de histonas H3 y H4, dando como resultado la formación de 1-O-acetyl-ADP-ribosa y nicotinamida. Las cepas con copias adicionales de SIR2 presentan un mayor silenciamiento de ADN_r y una duración de vida 30% mayor. Se ha demostrado recientemente que copias adicionales del homólogo de SIR2 en *C. elegans*, sir-2.1 y el gen dSir2 de *D. melanogaster* prolongan considerablemente la duración de vida de estos organismos. Esto implica que la vía reguladora dependiente de SIR2 para el envejecimiento ha surgido tempranamente en la evolución y se ha conservado bien. Hoy en día se cree que los genes Sir2 han evolucionado para potenciar la salud y la resistencia al estrés de un organismo con el fin de aumentar sus probabilidades de sobrevivir a la adversidad.

30 En los seres humanos existen siete genes similares a Sir2 (SIRT1-SIRT7) que comparten el dominio catalítico conservado de Sir2. SIRT1 es una proteína nuclear que tiene el mayor grado de similitud de secuencia con respecto a Sir2. SIRT1 regula por desacetilación múltiples dianas celulares, entre ellas el supresor tumoral p53, el factor de señalización celular NF-κB y el factor de transcripción FOXO.

35 SIRT3 es una homóloga de SIRT1 que está conservada en procariotas y eucariotas. La proteína SIRT3 tiene como diana las crestas mitocondriales por medio de un dominio único localizado en el extremo N-terminal. SIRT3 tiene actividad de proteína desacetilasa dependiente de NAD⁺ y se expresa de manera ubicua, particularmente en tejidos metabólicamente activos. Una vez transferida a las mitocondrias, se cree que SIRT3 es escindida por una peptidasa de procesamiento de matriz mitocondrial (MPP, por sus siglas en inglés) para dar una forma activa más pequeña.

40 Desde hace más de 70 años se sabe que la restricción calórica mejora la salud y prolonga la duración de vida de los mamíferos. También se prolonga la duración de vida de la levadura, al igual que la de los metazoos, con intervenciones que se asemejen a la restricción calórica, por ejemplo la disminución de glucosa. El descubrimiento de que tanto la levadura como las moscas que carecen del gen SIR2 no viven más tiempo cuando se les somete a restricción calórica proporciona una prueba de que los genes SIR2 intervienen en los efectos beneficiosos para la salud de una dieta calórica restringida. Además, las mutaciones que reducen la actividad de la vía de PKA dependiente de cAMP (adenosina 3',5'-monofosfato) sensible a glucosa, de la levadura, prolongan la vida en células de tipo salvaje pero no en cepas sir2 mutantes, demostrando que probablemente SIR2 sea un componente clave
45 situado en la ruta aguas abajo de la restricción calórica.

Los documentos US2007/037810, WO2008/156869, WO2007/019346 y WO2009/061453 describen derivados de tiazolo[5,4-b]piridin-2-ilo como compuestos moduladores de sirtuina.

50 Compendio

En la presente memoria se proporcionan nuevos compuestos moduladores de sirtuina y métodos de uso de los mismos.

En un aspecto, la invención proporciona compuestos moduladores de sirtuina de la Fórmula Estructural (III) como se describen con detalle más adelante.

En otro aspecto, se describen métodos para usar compuestos moduladores de sirtuina, o composiciones que comprenden compuestos moduladores de sirtuina. En determinadas realizaciones, se pueden utilizar compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para una diversidad de aplicaciones terapéuticas, que incluyen, por ejemplo, aumentar la duración de la vida de una célula y tratar y/o prevenir una amplia variedad de enfermedades y trastornos que incluyen, por ejemplo, enfermedades o trastornos relacionados con el envejecimiento o el estrés, diabetes, obesidad, enfermedades neurodegenerativas, neuropatía inducida por sustancias quimioterapéuticas, neuropatía asociada con un episodio isquémico, enfermedades y/o trastornos oculares, enfermedad cardiovascular, trastornos de la coagulación sanguínea, inflamación y/o enrojecimiento, etc. También se pueden emplear compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto que se beneficiaría de una actividad mitocondrial incrementada, para potenciar el rendimiento muscular, para aumentar los niveles de ATP en el músculo o bien para tratar o prevenir lesiones del tejido muscular asociadas con hipoxia o isquemia. En otras realizaciones, se pueden emplear compuestos moduladores de sirtuina que reducen el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para una diversidad de aplicaciones terapéuticas que incluyen, por ejemplo, aumentar la sensibilidad celular al estrés, aumentar la apoptosis, tratar el cáncer, estimular el apetito y/o estimular el aumento de peso, etc. Tal como se describirá con mayor detalle más adelante, los métodos comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto modulador de sirtuina.

En ciertos aspectos, se pueden administrar los compuestos moduladores de sirtuina solos o bien en combinación con otros compuestos, entre ellos otros compuestos moduladores de sirtuina u otros agentes terapéuticos.

20 Descripción detallada

1. Definiciones

Cuando se empleen en la presente memoria, los siguientes términos y expresiones tendrán los significados expuestos a continuación. Salvo que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que una persona con pericia ordinaria en la técnica entiende normalmente.

El término "agente" se emplea en la presente memoria para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica (como un ácido nucleico, un anticuerpo, una proteína o parte de la misma, por ejemplo un péptido) o un extracto preparado a partir de materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos o células o tejidos animales (particularmente de mamíferos). La actividad de tal agente puede hacerlo adecuado como "agente terapéutico", que es una sustancia (o sustancias) biológicamente, fisiológicamente o farmacéuticamente activa que actúa local o sistémicamente en un sujeto.

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

"Diabetes" se refiere a nivel elevado de azúcar en sangre o cetoacidosis, así como a anomalías metabólicas generales crónicas que provienen de un estado prolongado de nivel elevado de azúcar en sangre o de una disminución de la tolerancia a la glucosa. "Diabetes" abarca tanto las formas del tipo I como las del tipo II (diabetes mellitus no insulino dependiente o DMNID) de la enfermedad. Los factores de riesgo para la diabetes incluyen los siguientes factores: perímetro de cintura superior a 101,6 cm (40 pulgadas) en hombres u 88,9 cm (35 pulgadas) en mujeres, tensión arterial de 17,33/11,3 kPa (130/85 mmHg) o mayor, triglicéridos por encima de 150 mg/dl, glucosa en sangre en ayunas superior a 100 mg/dl o lipoproteína de alta densidad inferior a 40 mg/dl en hombres o 50 mg/dl en mujeres.

La expresión "DE₅₀" se refiere a una medida reconocida en la técnica para la dosis eficaz. En determinadas realizaciones, DE₅₀ significa la dosis de un fármaco que produce el 50% de su respuesta o efecto máximo o, como alternativa, la dosis que produce una respuesta predeterminada en el 50% de los sujetos o preparaciones de ensayo. El término "DL₅₀" se refiere a la medida reconocida en la técnica para la dosis letal. En determinadas realizaciones, DL₅₀ significa la dosis de un fármaco que es letal para el 50% de los sujetos de ensayo. La expresión "índice terapéutico" es una expresión reconocida en la técnica que se refiere al índice terapéutico de un fármaco, definido como DL₅₀/DE₅₀.

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

La expresión "resistencia a la insulina" se refiere a un estado en el cual una cantidad normal de insulina produce una respuesta biológica inferior a lo normal en comparación con la respuesta biológica en un sujeto que no presenta resistencia a la insulina.

Un "trastorno de resistencia a la insulina", como se discute en la presente memoria, se refiere a cualquier enfermedad o afección que es causada o a la que contribuye la resistencia a la insulina. Los ejemplos incluyen:

diabetes, obesidad, síndrome metabólico, síndromes de resistencia a la insulina, síndrome X, resistencia a la insulina, tensión arterial elevada, hipertensión, colesterol elevado en sangre, dislipidemia, hiperlipidemia, enfermedad arteriosclerótica que incluye accidente cerebrovascular, arteriopatía coronaria o infarto de miocardio, hiperglucemia, hiperinsulinemia y/o hiperproinsulinemia, tolerancia disminuida a la glucosa, liberación retardada de insulina, complicaciones diabéticas, entre ellas cardiopatía coronaria, angina de pecho, insuficiencia cardíaca congestiva, accidente cerebrovascular, funciones cognitivas en demencia, retinopatía, neuropatía periférica, nefropatía, glomerulonefritis, glomerulosclerosis, síndrome nefrótico, nefrosclerosis hipertensiva, algunos tipos de cáncer (como de endometrio, de mama, de próstata y de colon) complicaciones del embarazo, deficiente salud reproductiva femenina (como irregularidades menstruales, infertilidad, ovulación irregular, síndrome de ovario poliquístico (SOPQ)), lipodistrofia, trastornos relacionados con el colesterol, como cálculos biliares, colecistitis y colelitiasis, gota, apnea del sueño obstructiva y problemas respiratorios, artrosis y pérdida ósea, por ejemplo osteoporosis en particular.

La expresión "animales de ganado" se refiere a cuadrúpedos domesticados, lo que incluye los criados para carne y diversos derivados, por ejemplo un animal bovino, incluidas vacas y otros miembros del género *Bos*, un animal porcino, incluidos cerdos domésticos y otros elementos del género *Sus*, un animal ovino, incluidas ovejas y otros elementos del género *Ovis*, cabras domésticas y otros elementos del género *Capra*; cuadrúpedos domesticados criados para tareas especializadas tales como uso como bestia de carga, por ejemplo un animal equino, incluidos caballos domésticos y otros miembros de la familia *Equidae*, género *Equus*.

El término "mamífero" es conocido en la técnica, y los mamíferos ilustrativos incluyen seres humanos, primates, animales de ganado (incluidos bovinos, porcinos, etc.), animales de compañía (por ejemplo, caninos, felinos, etc.) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas).

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

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

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

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" está reconocida en la técnica y se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, como una carga, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulado líquido o sólido, implicado en llevar o transportar cualquier composición en cuestión o sus componentes. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con la composición en cuestión y sus componentes, y no debe ser perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, como manteca de cacao y ceras para supositorio; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de ajonjolí, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, como propilenglicol; (11) polioles, como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tampón, como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) disoluciones tampón de fosfato y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

El término "prevención" está reconocido en la técnica y, cuando se emplea referido a una afección, como una recurrencia (por ejemplo, dolor) local, una enfermedad como cáncer, un síndrome complejo como insuficiencia cardíaca o cualquier otra afección médica, es bien comprendido en la técnica, e incluye la administración de una composición que reduce la frecuencia, o retarda la activación, de síntomas de una afección médica en un sujeto en comparación con un sujeto que no recibe la composición. Así, la prevención del cáncer incluye, por ejemplo, reducir el número de crecimientos cancerosos detectables en una población de pacientes que reciben un tratamiento profiláctico en comparación con una población testigo no tratada, y/o retrasar la aparición de crecimientos cancerosos detectables en una población tratada en comparación con una población testigo no tratada, por ejemplo en una cantidad estadística y/o clínicamente significativa. La prevención de una infección incluye, por ejemplo, reducir el número de diagnósticos de la infección en una población tratada en comparación con una población testigo no tratada, y/o retrasar la aparición de síntomas de la infección en una población tratada en comparación con una población testigo no tratada. La prevención del dolor incluye, por ejemplo, reducir la magnitud de, o como alternativa retrasar, sensaciones dolorosas experimentadas por sujetos de una población tratada, en comparación con una población testigo no tratada.

Las expresiones "tratamiento profiláctico" o "tratamiento terapéutico" están reconocidas en la técnica y se refieren a

la administración de un fármaco a un hospedante. Si se administra antes de la manifestación clínica de la afección indeseada (por ejemplo, enfermedad u otro estado indeseado del animal hospedante) entonces el tratamiento es profiláctico, es decir protege al huésped contra el desarrollo de la afección indeseada, mientras que si se administra después de la manifestación de la afección indeseada, el tratamiento es terapéutico (es decir, pretende disminuir, mejorar o mantener la afección indeseada existente o los efectos secundarios de la misma).

La expresión "libre de pirógenos", referida a una composición, se refiere a una composición que no contiene un pirógeno en una cantidad que conduciría a un efecto adverso (por ejemplo irritación, fiebre, inflamación, diarrea, problemas respiratorios, choque endotóxico, etc.), en un sujeto al cual se ha administrado la composición. Por ejemplo, la expresión pretende abarcar composiciones que están libres, o sustancialmente libres, de una endotoxina como, por ejemplo, un lipopolisacárido (LPS).

"Duración de vida replicativa" de una célula se refiere al número de células "hijas" producidas por una célula "madre" individual. Por otra parte, "edad cronológica" o "duración de vida cronológica" se refiere al plazo de tiempo durante el que una población de células que no se dividen siguen siendo viables cuando se ven privadas de nutrientes. "Aumentar la duración de vida de una célula" o "prolongar la duración de vida de una célula", aplicado a células u organismos, se refiere a aumentar el número de células hijas producidas por una célula; aumentar la capacidad de las células u organismos para soportar el estrés y combatir el daño, por ejemplo, al ADN, a proteínas; y/o aumentar la capacidad de las células u organismos para sobrevivir y existir en estado vivo por más tiempo bajo una situación particular, por ejemplo estrés (por ejemplo choque térmico, estrés osmótico, radiación de alta energía, estrés inducido químicamente, daño al ADN, nivel salino inadecuado, nivel de nitrógeno inadecuado o nivel de nutrientes inadecuado). La duración de vida puede aumentar al menos en aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o 60% o bien entre 20% y 70%, 30% y 60%, 40% y 60% o más, usando los métodos descritos en la presente memoria.

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

"Proteína sirtuina" se refiere a un miembro de la familia de proteínas sirtuina desacetilasa, o preferiblemente a la familia sir2, que incluye Sir2 de levadura (nº de acceso en GenBank P53685), Sir-2.1 de *C. elegans* (nº de acceso en GenBank NP_501912) y SIRT1 humana (nºs de acceso en GenBank NM_012238 y NP_036370 (ó AF083106)) y proteínas SIRT2 (nºs de acceso en GenBank NM_012237, NM_030593, NP_036369, NP_085096 y AF083107). Otros elementos de la familia incluyen los cuatro genes similares a Sir2 de levadura adicionales denominados "genes *HST*" (homólogos de Sir dos, por sus siglas en inglés) HST1, HST2, HST3 y HST4, y los otros cinco homólogos humanos hSIRT3, hSIRT4, hSIRT5, hSIRT6 y hSIRT7 (Brachmann *et al.* (1995) Genes Dev. 9:2888 y Frye *et al.* (1999) BBRC 260:273). Las sirtuinas preferidas son las que comparten más similitudes con SIRT1, es decir hSIRT1, y/o Sir2 que con SIRT2, como los miembros que tienen al menos parte de la secuencia N-terminal presente en SIRT1 y ausente en SIRT2, tal como lo tiene SIRT3.

"Proteína SIRT1" se refiere a un miembro de la familia sir2 de sirtuina desacetilasas. En una realización, una proteína SIRT1 incluye Sir2 de levadura (nº de acceso en GenBank P53685), Sir-2.1 de *C. elegans* (nº de acceso en GenBank NP_501912), SIRT1 humana (nº de acceso en GenBank NM_012238 ó NP_036370 (ó AF083106)), y sus equivalentes y fragmentos. En otra realización, una proteína SIRT1 incluye un polipéptido que comprende una secuencia de, o que consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos expuesta en los nºs de acceso en GenBank NP_036370, NP_501912, NP_085096, NP_036369 ó P53685. Las proteínas SIRT1 incluyen polipéptidos que comprenden toda o una parte de la secuencia de aminoácidos expuesta en los nºs de acceso en GenBank NP_036370, NP_501912, NP_085096, NP_036369 ó P53685; la secuencia de aminoácidos expuesta en los nºs de acceso en GenBank NP_036370, NP_501912, NP_085096, NP_036369 ó P53685 con de 1 a aproximadamente 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 75 o más sustituciones de aminoácido conservadoras; una secuencia de aminoácidos que es al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a los nºs de acceso en GenBank NP_036370, NP_501912, NP_085096, NP_036369 ó P53685, y sus fragmentos funcionales. Los polipéptidos también incluyen homólogos (por ejemplo ortólogos y parálogos), variantes o fragmentos de los nºs de acceso en GenBank NP_036370, NP_501912, NP_085096, NP_036369 ó P53685.

Tal como se emplean en la presente memoria, las expresiones "proteína SIRT2", "proteína SIRT3", "proteína SIRT4", "proteína SIRT5", "proteína SIRT6" y "proteína SIRT7" se refieren a otras proteínas sirtuina desacetilasas de mamífero, por ejemplo humanas, que son homólogas a la proteína SIRT1, particularmente en el dominio catalítico conservado de aproximadamente 275 aminoácidos. Por ejemplo, "proteína SIRT3" se refiere a un miembro de la familia de proteínas sirtuina desacetilasas que es homólogo a una proteína SIRT1. En una realización, una proteína SIRT3 incluye proteínas SIRT3 humana (nº de acceso en GenBank AAH01042, NP_036371 o NP_001017524) y SIRT3 de ratón (nº de acceso en GenBank NP_071878) y sus equivalentes y fragmentos. En otra realización, una proteína SIRT3 incluye un polipéptido que comprende una secuencia que consiste en, o que consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos expuesta en los nºs de acceso en GenBank AAH01042, NP_036371,

NP_001017524 ó NP_071878. Las proteínas SIRT3 incluyen polipéptidos que comprenden toda o una parte de la secuencia de aminoácidos expuesta en los n°s de acceso en GenBank AAH01042, NP_036371, NP_001017524 ó NP_071878; la secuencia de aminoácidos expuesta en los n°s de acceso en GenBank AAH01042, NP_036371, NP_001017524 ó NP_071878 con de 1 a aproximadamente 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 75 o más sustituciones de aminoácido conservadoras; una secuencia de aminoácidos que es al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a los n°s de acceso en GenBank AAH01042, NP_036371, NP_001017524 ó NP_071878, y sus fragmentos funcionales. Los polipéptidos también incluyen homólogos (por ejemplo ortólogos y parálogos), variantes o fragmentos de los n°s de acceso en GenBank AAH01042, NP_036371, NP_001017524 ó NP_071878. En una realización, una proteína SIRT3 incluye un fragmento de proteína SIRT3 que es producido por escisión con una peptidasa de procesamiento de matriz mitocondrial (MPP) y/o una peptidasa intermediaria mitocondrial (MIP, por sus siglas en inglés).

Las expresiones "administración sistémica", "administrado sistémicamente", "administración periférica" y "administrado periféricamente" están reconocidas en la técnica y se refieren a la administración de una composición en cuestión, sustancia terapéutica u otro material que no sea directamente al sistema nervioso central, de modo que entre en el sistema del paciente y, por tanto, sea sometido a metabolismo y otros procesos similares.

El término "tautómero", tal como se usa en la presente memoria, está reconocido en la técnica y se refiere a la migración formal de un átomo de hidrógeno, es decir, un protón, acompañada de un cambio de un enlace simple y un enlace doble adyacente. Cuando se emplea en la presente memoria para describir un compuesto o género de compuestos, tautómero incluye cualquier porción de un compuesto o bien el compuesto completo, como un sustituyente sencillo de un compuesto, sustituyentes múltiples de un compuesto o, por ejemplo, el compuesto completo. Por ejemplo, el tautómero de un compuesto que incluye un anillo de piridina sustituido con hidroxilo (A) es un compuesto que incluye el anillo sustituido con ceto-enol (B):



La expresión "agente terapéutico" está reconocida en la técnica y se refiere a cualquier resto químico que es una sustancia biológica, fisiológica o farmacológicamente activa que actúa local o sistémicamente en un sujeto. La expresión también significa cualquier sustancia destinada al uso en el diagnóstico, la cura, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedad o en la mejoría del deseable desarrollo y/o condiciones físicas o mentales en un animal o un ser humano.

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

"Tratar" una afección o enfermedad se refiere a curar y también a aliviar al menos un síntoma de la afección o enfermedad.

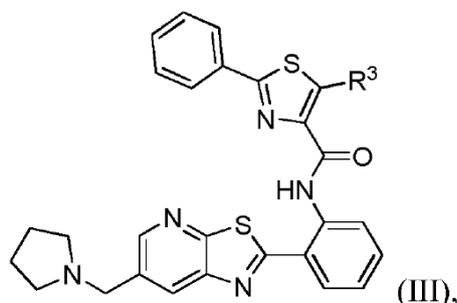
La expresión "deterioro de la visión" se refiere a disminución de la visión, que con frecuencia es sólo parcialmente reversible o irreversible tras el tratamiento (por ejemplo, cirugía). El deterioro de la visión particularmente grave se denomina "ceguera" o "pérdida de la visión", que se refiere a una pérdida total de visión, a una visión peor que 20/200 que no se puede mejorar con lentes correctoras, o a un campo de visión inferior a 20 grados de diámetro (10 grados de radio).

45 2. Moduladores de Sirtuina

En un aspecto, la invención proporciona nuevos compuestos moduladores de sirtuina para tratar y/o prevenir una amplia variedad de enfermedades y trastornos que incluyen, por ejemplo, enfermedades o trastornos relacionados con el envejecimiento o el estrés, diabetes, obesidad, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades y/o trastornos oculares, enfermedad cardiovascular, trastornos de la coagulación sanguínea, inflamación, cáncer y/o enrojecimiento, etc. Los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden utilizarse también para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto que se beneficiaría de una actividad mitocondrial aumentada, para potenciar el rendimiento muscular, para aumentar los niveles musculares de ATP, o para tratar o prevenir lesiones del tejido muscular asociadas con hipoxia o isquemia. Otros compuestos

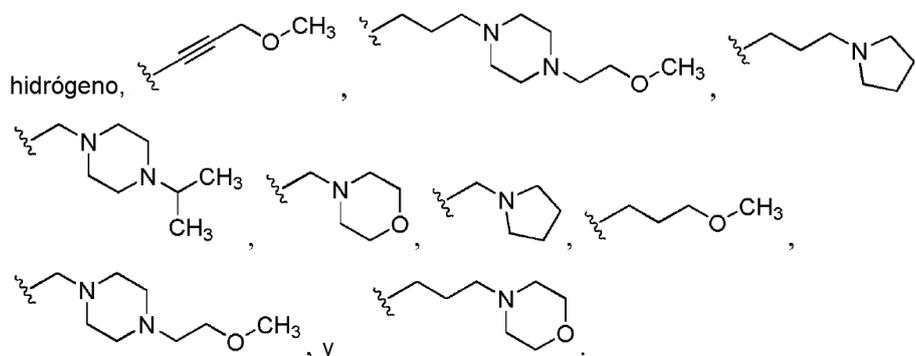
descritos en la presente memoria pueden ser adecuados para uso en una composición farmacéutica y/o uno o más métodos descritos en la presente memoria.

En una realización, los compuestos moduladores de sirtuina de la invención están representados por la Fórmula Estructural (III):

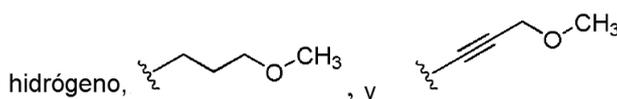


5

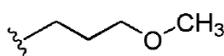
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en donde R³ se selecciona de:



En determinadas realizaciones de la Fórmula Estructural (III), R³ se selecciona de



10 En una realización más específica de la Fórmula Estructural (III), R³ es



En determinados aspectos, el compuesto de la estructura (III) es una base libre.

Los compuestos de la invención, incluidos los nuevos compuestos de la invención, pueden usarse también en los métodos descritos en la presente memoria.

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

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

Los compuestos descritos en la presente memoria también incluyen variantes parciales y totalmente deuteradas. En determinadas realizaciones, se pueden utilizar variantes deuteradas para estudios cinéticos. Una persona con pericia ordinaria en la técnica puede seleccionar los sitios en los que estén presentes tales átomos de deuterio.

25 También se incluyen en la presente invención sales, particularmente sales farmacéuticamente aceptables, de los compuestos moduladores de sirtuina descritos en la presente memoria. Los compuestos de la presente invención

que poseen un grupo funcional suficientemente ácido, suficientemente básico, o ambos grupos funcionales, pueden reaccionar con cualquiera de varias bases inorgánicas y ácidos inorgánicos y orgánicos para formar una sal. Como alternativa, los compuestos que estén inherentemente cargados, como los que tienen un nitrógeno cuaternario, pueden formar una sal con un contraión adecuado (por ejemplo, un haluro tal como bromuro, cloruro o fluoruro, particularmente bromuro).

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

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

Los compuestos moduladores de sirtuina antes definidos pueden sintetizarse utilizando técnicas convencionales. Ventajosamente, estos compuestos se sintetizan convenientemente a partir de materiales de partida fácilmente disponibles.

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

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

Los compuestos moduladores de sirtuina descritos en la presente memoria pueden tener también una o más de las siguientes características: el compuesto puede ser esencialmente no tóxico para una célula o sujeto; el compuesto modulador de sirtuina puede ser una molécula orgánica o una molécula pequeña de 2.000 uma o menos, 1.000 uma o menos; un compuesto puede tener una semivida en condiciones atmosféricas normales de al menos aproximadamente 30 días, 60 días, 120 días, 6 meses o 1 año; el compuesto puede tener una semivida en disolución de al menos aproximadamente 30 días, 60 días, 120 días, 6 meses o 1 año; un compuesto modulador de sirtuina puede ser más estable en solución que el resveratrol en al menos un factor de aproximadamente 50%, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 30 veces, 50 veces o 100 veces; un compuesto modulador de sirtuina puede promover la desacetilación del factor de reparación de ADN Ku70; un compuesto modulador de sirtuina puede promover la desacetilación de RelA/p65; un compuesto puede aumentar las velocidades de recambio generales y potenciar la sensibilidad de las células a la apoptosis inducida por TNF.

En determinadas realizaciones, un compuesto modulador de sirtuina no tiene ninguna capacidad sustancial de inhibir una histona desacetilasa (HDAC) de clase I, una HDAC de clase II o HDAC de clases I y II, a concentraciones (por ejemplo, *in vivo*) eficaces para modular la actividad de desacetilasa de la sirtuina. Por ejemplo, en realizaciones preferidas el compuesto modulador de sirtuina es un compuesto activador de sirtuina y se elige que tenga una CE_{50} para activar la actividad de desacetilasa de sirtuina que sea por lo menos 5 veces menor que la CE_{50} para la inhibición de una HDAC I y/o HDAC II, e incluso más preferiblemente al menos 10 veces, 100 veces o incluso 1.000 veces menor. Los métodos para ensayar la actividad de HDAC I y/o HDAC II son bien conocidos en la técnica y en el mercado se pueden adquirir kits para realizar dichos ensayos. Véanse, por ejemplo, Bio Vision, Inc. (Mountain View, CA; sitio web en biovision.com) y Thomas Scientific (Swedesboro, NJ; sitio web en tomassci.com).

En determinadas realizaciones, un compuesto modulador de sirtuina no tiene ninguna capacidad sustancial de modular homólogos de sirtuina. En una realización, un activador de una proteína sirtuina humana puede no tener ninguna capacidad sustancial de activar una proteína sirtuina de eucariotas inferiores, particularmente de levaduras o patógenos humanos, a concentraciones (por ejemplo, *in vivo*) eficaces para activar la actividad de desacetilasa de sirtuina humana. Por ejemplo, se puede elegir un compuesto activador de sirtuina que tenga una CE_{50} para activar una actividad de desacetilasa de sirtuina humana, como SIRT1 y/o SIRT3, que sea al menos 5 veces menor que la CE_{50} para activar una sirtuina de levadura, como sir2 (como de *Candida*, *S. cerevisiae*, etc.), e incluso más preferiblemente al menos 10 veces, 100 veces o incluso 1.000 veces menor. En otra realización, un inhibidor de una

proteína sirtuina de eucariotas inferiores, particularmente de levaduras o patógenos humanos, no tiene ninguna capacidad sustancial de inhibir una proteína sirtuina de seres humanos a concentraciones (por ejemplo, *in vivo*) eficaces para inhibir la actividad de desacetilasa de una proteína sirtuina de un eucariota inferior. Por ejemplo, se puede elegir un compuesto inhibidor de sirtuina que tenga una CI_{50} para inhibir una actividad de desacetilasa de sirtuina humana, como SIRT1 y/o SIRT3, que sea al menos 5 veces menor que la CI_{50} para inhibir una sirtuina de levadura, como sir2 (como de *Candida*, *S. cerevisiae*, etc.), e incluso más preferiblemente al menos 10 veces, 100 veces o incluso 1.000 veces menor.

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

En otras realizaciones, un modulador de SIRT1 no tiene ninguna capacidad sustancial para modular otros homólogos de proteína sirtuina, como por ejemplo una o más de SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 o SIRT7 humanas, a concentraciones (por ejemplo, *in vivo*) eficaces para modular la actividad de desacetilasa de SIRT1 humana. Por ejemplo, se puede elegir un compuesto modulador de sirtuina que tenga una DE_{50} para modular la actividad de desacetilasa de SIRT1 humana que sea al menos 5 veces menor que la DE_{50} para modular una o más de SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 o SIRT7 humanas, e incluso más preferiblemente al menos 10 veces, 100 veces o incluso 1.000 veces menor. En una realización, un modulador de SIRT1 no tiene ninguna capacidad sustancial de modular una proteína SIRT3.

En otras realizaciones, un modulador de SIRT3 no tiene ninguna capacidad sustancial para modular otros homólogos de proteína sirtuina, como por ejemplo una o más de SIRT1, SIRT2, SIRT4, SIRT5, SIRT6 o SIRT7 humanas, a concentraciones (por ejemplo, *in vivo*) eficaces para modular la actividad de desacetilasa de SIRT3 humana. Por ejemplo, se puede elegir un compuesto modulador de sirtuina que tenga una DE_{50} para modular la actividad de desacetilasa de SIRT3 humana que sea al menos 5 veces menor que la DE_{50} para modular una o más de SIRT1, SIRT2, SIRT4, SIRT5, SIRT6 o SIRT7 humanas, e incluso más preferiblemente al menos 10 veces, 100 veces o incluso 1.000 veces menor. En una realización, un modulador de SIRT3 no tiene ninguna capacidad sustancial para modular una proteína SIRT1.

En determinadas realizaciones, un compuesto modulador de sirtuina puede tener una afinidad de unión hacia una proteína sirtuina de aproximadamente $10^{-9}M$, $10^{-10}M$, $10^{-11}M$, $10^{-12}M$ o inferior. Un compuesto modulador de sirtuina puede reducir (activador) o incrementar (inhibidor) la K_m aparente de una proteína sirtuina hacia su sustrato o NAD^+ (u otro cofactor) en un factor de al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 50 ó 100. En determinadas realizaciones, los valores de K_m se determinan usando el ensayo de espectrometría de masas descrito en la presente memoria. Los compuestos activadores preferidos reducen la K_m de una sirtuina hacia su sustrato o cofactor en un grado mayor que el causado por resveratrol a una concentración similar, o bien reducen la K_m de una sirtuina hacia su sustrato o cofactor en cuantía similar a la causada por resveratrol a una concentración menor. Un compuesto modulador de sirtuina puede aumentar la V_{max} de una proteína sirtuina en un factor de al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 50 ó 100. Un compuesto modulador de sirtuina puede tener una DE_{50} para modular la actividad de desacetilasa de una proteína SIRT1 y/o SIRT3 menor que aproximadamente 1 nM, menor que aproximadamente 10 nM, menor que aproximadamente 100 nM, menor que aproximadamente 1 μM , menor que aproximadamente 10 μM , menor que aproximadamente 100 μM , o de aproximadamente 1-10 nM, de aproximadamente 10-100 nM, de aproximadamente 0,1-1 μM , de aproximadamente 1-10 μM o de aproximadamente 10-100 μM . Un compuesto modulador de sirtuina puede modular la actividad de desacetilasa de una proteína SIRT1 y/o SIRT3 en un factor de al menos aproximadamente 5, 10, 20, 30, 50 ó 100, medido en un ensayo celular o en un ensayo basado en células. Un compuesto activador de sirtuina puede causar al menos aproximadamente 10%, 30%, 50%, 80%, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces o 100 veces mayor inducción de la actividad de desacetilasa de una proteína sirtuina en comparación con la misma concentración de resveratrol. Un compuesto modulador de sirtuina puede tener una DE_{50} para modular SIRT5 que sea al menos aproximadamente 10 veces, 20 veces, 30 veces o 50 veces mayor que para modular SIRT1 y/o SIRT3.

3. Usos ilustrativos

Se describen métodos para modular el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina y métodos de uso de los mismos.

En determinadas realizaciones, se describen métodos para usar compuestos moduladores de sirtuina en donde los compuestos moduladores de sirtuina activan una proteína sirtuina, por ejemplo aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina. Los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden ser útiles para una diversidad de aplicaciones terapéuticas que incluyen, por ejemplo, aumentar la duración de vida de una célula, y tratar y/o prevenir una amplia variedad de enfermedades y trastornos que incluyen, por ejemplo, enfermedades o trastornos relacionados con el envejecimiento o el estrés, diabetes, obesidad, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad cardiovascular, trastornos de la coagulación sanguínea, inflamación, cáncer y/o enrojecimiento, etc. Los métodos comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto modulador de sirtuina, por ejemplo un compuesto activador de

sirtuina.

Sin desear limitarse por la teoría, se cree que los activadores de la presente invención pueden interactuar con una sirtuina en el mismo sitio dentro de la proteína sirtuina (por ejemplo, sitio activo o sitio que afecta a la Km o Vmax del sitio activo). Se cree que esta es la razón por la cual ciertas clases de activadores e inhibidores de sirtuina pueden tener una sustancial similitud estructural.

En determinadas realizaciones, los compuestos moduladores de sirtuina descritos en la presente memoria pueden tomarse solos o bien combinados con otros compuestos. En una realización, se puede administrar una mezcla de dos o más compuestos moduladores de sirtuina a un sujeto que los necesite. En otra realización, se puede administrar un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina con uno o más de los siguientes compuestos: resveratrol, buteína, fisetina, piceatanol o quercetina. En una realización ilustrativa, se puede administrar un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina en combinación con ácido nicotínico. En otra realización, se puede administrar un compuesto modulador de sirtuina que disminuya el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede administrarse con uno o más de los siguientes compuestos: nicotinamida (NAM), suramina; NF023 (un antagonista de proteína G); NF279 (un antagonista de receptor purinérgico); Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico); (-)-epigallocatequina (hidroxi en las posiciones 3,5,7,3',4',5'); galato de (-)-epigallocatequina (hidroxi en las posiciones 5,7,3',4',5' y éster de galato en 3); cloruro de cianidina (cloruro de 3,5,7,3',4',5'-pentahidroxiflavilio); cloruro de delfinidina (cloruro de 3,5,7,3',4',5'-hexahidroxiflavilio); miricetina (canabiscetina; 3,5,7,3',4',5'-hexahidroxiflavona); 3,7,3',4',5'-pentahidroxiflavona; gosipetina (3,5,7,8,3',4'-hexahidroxiflavona), sirtinol y esplitomicina. En otra realización más, se pueden administrar uno o más compuestos moduladores de sirtuina con uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento o prevención de diversas enfermedades, incluidas por ejemplo cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad cardiovascular, coagulación sanguínea, inflamación, enrojecimiento, obesidad, envejecimiento, estrés, etc. En diversas realizaciones, las terapias combinadas que comprenden un compuesto modulador de sirtuina pueden referirse a (1) composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos moduladores de sirtuina combinados con uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, uno o más agentes terapéuticos descritos en la presente memoria); y (2) coadministración de uno o más compuestos moduladores de sirtuina con uno o más agentes terapéuticos en donde el compuesto modulador de sirtuina y el agente terapéutico no han sido formulados en la misma composición (pero pueden estar presentes dentro del mismo kit o paquete, como un envase en blíster u otro envase de múltiples cámaras; recipientes conectados, obturados por separado (por ejemplo, bolsas de lámina), que pueden ser separados por el usuario; o un kit donde el compuesto o compuestos moduladores de sirtuina y otro u otros agentes terapéuticos estén en recipientes separados). Cuando se usan formulaciones separadas, el compuesto modulador de sirtuina se puede administrar simultáneamente, intermitentemente, escalonadamente, antes de, después de, o sus combinaciones, con respecto a la administración de otro agente terapéutico.

En determinadas realizaciones, los métodos para reducir, prevenir o tratar enfermedades o trastornos usando un compuesto modulador de sirtuina pueden comprender también aumentar el nivel de proteína de una sirtuina, tal como SIRT1, SIRT2 y/o SIRT3 humanas, u homólogas suyas. Se puede lograr el aumento de los niveles de proteína introduciendo en una célula una o más copias de un ácido nucleico que codifique una sirtuina. Por ejemplo, se puede aumentar el nivel de una sirtuina en una célula de mamífero introduciendo en la célula de mamífero un ácido nucleico que codifique la sirtuina, por ejemplo aumentar el nivel de SIRT1 introduciendo un ácido nucleico que codifique la secuencia de aminoácidos expuesta en el n° de acceso en GenBank NP_036370 y/o aumentar el nivel de SIRT3 introduciendo un ácido nucleico que codifique la secuencia de aminoácidos expuesta en el n° de acceso en GenBank AAH01042.

Un ácido nucleico al que se introduce en una célula para aumentar el nivel de proteína de una sirtuina puede codificar una proteína que sea al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de una sirtuina, por ejemplo proteína SIRT1 y/o SIRT3. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifique la proteína puede ser al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntico a un ácido nucleico que codifique una proteína SIRT1 (por ejemplo, el n° de acceso en GenBank NM_012238) y/o SIRT3 (por ejemplo, el n° de acceso en GenBank BC001042). El ácido nucleico puede ser también un ácido nucleico que se hibrida, preferiblemente en condiciones de hibridación rigurosas, a un ácido nucleico que codifica una sirtuina de tipo salvaje, por ejemplo proteína SIRT1 y/o SIRT3. Las condiciones de hibridación rigurosas pueden incluir hibridación y un lavado en 0,2 x SSC a 65 °C. Cuando se usa un ácido nucleico que codifica una proteína que es diferente de una proteína sirtuina de tipo salvaje, tal como una proteína que es un fragmento de una sirtuina de tipo salvaje, la proteína es preferiblemente biológicamente activa, por ejemplo es capaz de desacetilación. Sólo es necesario expresar en una célula una parte de la sirtuina que sea biológicamente activa. Por ejemplo, una proteína que difiere de SIRT1 de tipo salvaje con n° de acceso en GenBank NP_036370, contiene preferiblemente su estructura de núcleo. A veces se denomina estructura de núcleo a los aminoácidos 62-293 del n° de acceso en GenBank NP_036370, que están codificados por los nucleótidos 237 a 932 del n° de acceso en GenBank NM_012238, que abarca la unión a NAD y también los dominios de unión a sustrato. También se puede denominar dominio de núcleo de SIRT1 a aproximadamente los aminoácidos 261 a 447 del n° de acceso en GenBank NP_036370, que están codificados por los nucleótidos 834 a 1.394 del n° de acceso en GenBank NM_012238; o a aproximadamente los aminoácidos 242 a 493 del n° de acceso en GenBank NP_036370, que están codificados por los nucleótidos 777 a 1.532 del n° de acceso en GenBank NM_012238; o a aproximadamente los aminoácidos 254 a 495 del n° de acceso

en GenBank NP_036370, que están codificados por los nucleótidos 813 a 1.538 del nº de acceso en GenBank NM_012238. Por métodos conocidos en la técnica se puede determinar si una proteína conserva una función biológica, por ejemplo capacidad de desacetilación.

5 En determinadas realizaciones, los métodos para reducir, prevenir o tratar enfermedades o trastornos usando un compuesto modulador de sirtuina pueden comprender también reducir el nivel de proteína de una sirtuina, tal como SIRT1, SIRT2 y/o SIRT3 humanas, u homólogas suyas. Se puede lograr la reducción de un nivel de proteína sirtuina por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede expresar en la célula un ARNip (en inglés, siRNA), un ácido nucleico antisentido, o una ribozima dirigida a la sirtuina. También se puede usar un mutante de sirtuina negativo dominante, por ejemplo un mutante que no sea capaz de desacetilación. Por ejemplo, se puede usar el mutante H363Y de SIRT1 descrito, por ejemplo, en Luo *et al.* (2001) Cell 107:137. Como alternativa, se pueden usar agentes que inhiban la transcripción.

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

15 Envejecimiento/estrés

En una realización se describe un método que prolonga la duración de vida de una célula, prolonga la capacidad proliferativa de una célula, retarda el envejecimiento de una célula, promueve la supervivencia de una célula, retarda la senescencia celular en una célula, imita los efectos de la restricción calórica, aumenta la resistencia de una célula al estrés o previene la apoptosis de una célula, poniendo en contacto la célula con un compuesto modulador de sirtuina de la invención que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina. En una realización ilustrativa, los métodos comprenden poner en contacto la célula con un compuesto activador de sirtuina.

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

En una realización, se pueden tratar con un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina células que se pretenda conservar durante largos periodos de tiempo. Las células pueden estar en suspensión (por ejemplo células sanguíneas, suero, medio de crecimiento biológico, etc.) o en tejidos u órganos. Por ejemplo, la sangre extraída de un individuo para fines de transfusión puede ser tratada con un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina con el fin de conservar las células sanguíneas durante periodos de tiempo más prolongados. Además, también se puede conservar sangre que se vaya a usar con fines forenses empleando un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina. Otras células que se pueden tratar para prolongar su duración de vida o para protegerlas contra la apoptosis incluyen células para consumo, por ejemplo, células de mamíferos no humanos (como carne) o células vegetales (como verduras).

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

En otra realización, se pueden emplear compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para tratar células útiles para trasplante o terapia celular que incluyen, por ejemplo, injertos de tejido sólido, trasplantes de órganos, suspensiones celulares, células madre, células de médula ósea, etc. Las células o el tejido pueden ser un autoinjerto, un aloinjerto, un isoinjerto o un xenoinjerto. Se pueden tratar las células o el tejido con el compuesto modulador de sirtuina antes de la administración/implante, concurrentemente con la administración/implante y/o después de la administración/implante en un sujeto. Se pueden tratar las células o el tejido antes de la extracción de las células del individuo donante, *ex vivo* después de la extracción de las células o el tejido del individuo donante o después del implante en el receptor. Por ejemplo, se puede tratar sistémicamente al individuo donante o recipiente con un compuesto modulador de sirtuina o bien se puede tratar localmente un subconjunto de células/tejido con un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina. En determinadas realizaciones, se pueden tratar las células o el tejido (o bien los individuos donante/receptor) además con otro agente terapéutico útil para prolongar la supervivencia del injerto, como por ejemplo un agente inmunosupresor, una citocina, un factor angiogénico, etc.

55 En otras realizaciones más, se pueden tratar células con un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina *in vivo*, por ejemplo para aumentar su duración de vida o prevenir la apoptosis. Por ejemplo, se puede proteger del envejecimiento la piel (por ejemplo, del desarrollo de arrugas, pérdida de elasticidad, etc.) tratando la piel o células epiteliales con un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el

5 nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina. En una realización ilustrativa, se pone en contacto la piel con una composición farmacéutica o cosmética que comprenda un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina. Las dolencias cutáneas o afecciones cutáneas ilustrativas que se pueden tratar según los métodos descritos en la presente memoria incluyen trastornos o enfermedades asociados con, o provocados por: inflamación, daño solar o envejecimiento natural. Por ejemplo, las composiciones tienen utilidad en la prevención o tratamiento de dermatitis por contacto (incluidas la dermatitis irritante por contacto y la dermatitis alérgica por contacto), dermatitis atópica (también conocida como eccema alérgico), queratosis actínica, trastornos de queratinización (incluido el eccema), enfermedades de epidermólisis bullosa (incluido el pénfigo), dermatitis exfoliante, dermatitis seborreica, eritemas (incluidos el eritema multiforme y el eritema nodoso), daño causado por el sol u otras fuentes de luz, lupus eritematoso discoide, dermatomiositis, psoriasis, cáncer de piel y los efectos del envejecimiento natural. En otra realización, se pueden emplear compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para el tratamiento de heridas y/o quemaduras con el fin de promover la cicatrización, incluyendo, por ejemplo, quemaduras de primer, segundo o tercer grado y/o quemaduras térmicas, químicas o eléctricas. Las formulaciones se pueden administrar tópicamente a la piel o al tejido mucoso.

15 También se pueden emplear formulaciones tópicas que comprenden uno o más compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina como composiciones preventivas, por ejemplo quimiopreventivas. Cuando se usan en un método quimiopreventivo, se trata la piel susceptible antes de la aparición de cualquier afección visible en un individuo particular.

20 Los compuestos moduladores de sirtuina se pueden suministrar a un sujeto por vía local o sistémica. En una realización, se suministra un compuesto modulador de sirtuina por vía local a un tejido u órgano de un sujeto mediante inyección, formulación tópica, etc.

25 En otra realización, se puede emplear un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para tratar o prevenir una enfermedad o afección inducida o exacerbada por la senectud celular en un sujeto; métodos para disminuir el índice de senescencia en un sujeto, por ejemplo, después del inicio de la senectud; métodos para prolongar la duración de vida de un sujeto; métodos para tratar o prevenir una enfermedad o afección relacionada con la duración de vida; métodos para tratar o prevenir una enfermedad o afección relacionada con la capacidad proliferativa de las células y métodos para tratar o prevenir una enfermedad o afección resultante de daño o muerte celular. En determinadas realizaciones, el método no actúa disminuyendo la incidencia de enfermedades que acortan la vida de un sujeto. En determinadas realizaciones, un método no actúa reduciendo la mortalidad causada por una enfermedad, tal como cáncer.

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

40 Se pueden administrar a un sujeto compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina con el fin de prevenir el envejecimiento y las consecuencias o enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como accidente cerebrovascular, cardiopatía, insuficiencia cardíaca, artritis, hipertensión arterial y enfermedad de Alzheimer. Otras afecciones que se pueden tratar incluyen trastornos oculares, por ejemplo asociados con el envejecimiento del ojo, como cataratas, glaucoma y degeneración macular. También se pueden administrar a sujetos compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina con el fin de tratar enfermedades, por ejemplo, enfermedades crónicas, asociadas con la muerte celular, para proteger a las células de la muerte celular. Las enfermedades ilustrativas incluyen las asociadas con muerte celular neural, disfunción neuronal o muerte o disfunción celular muscular, como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica y distrofia muscular; sida; hepatitis fulminante; enfermedades asociadas a degeneración del cerebro, como enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, retinitis pigmentosa y degeneración cerebelar; mielodisplasia como anemia aplásica; enfermedades isquémicas como infarto de miocardio y accidente cerebrovascular; enfermedades hepáticas como hepatitis alcohólica, hepatitis B y hepatitis C; enfermedades de las articulaciones tales como artrosis, aterosclerosis, alopecia, daño de la piel debido a la luz UV; liquen plano; atrofia cutánea; cataratas y rechazo de injerto. La muerte celular también puede ser causada por cirugía, farmacoterapia, exposición química o exposición a radiación.

55 También se pueden administrar compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina a un sujeto que padezca una enfermedad aguda, por ejemplo, lesión de un órgano o tejido, por ejemplo un sujeto que padezca accidente cerebrovascular o infarto de miocardio o un sujeto que padezca una lesión de la médula espinal. También se pueden emplear compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina con el fin de reparar un hígado alcohólico.

Enfermedad cardiovascular

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

sirtuina.

Las enfermedades cardiovasculares que pueden ser tratadas o prevenidas usando los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina incluyen cardiomiopatía o miocarditis; como cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía metabólica, cardiomiopatía alcohólica, cardiomiopatía inducida por fármacos, cardiomiopatía isquémica y cardiomiopatía hipertensiva. También se pueden tratar o prevenir usando compuestos y métodos descritos en la presente memoria trastornos ateromatosos de los vasos sanguíneos principales (enfermedad macrovascular) como la aorta, las arterias coronarias, las arterias carótidas, las arterias cerebrovasculares, las arterias renales, las arterias ilíacas, las arterias femorales y las arterias poplíteas. Otras vasculopatías que se pueden tratar o prevenir incluyen las relacionadas con la agregación plaquetaria, las arteriolas retinianas, las arteriolas glomerulares, los vasos nerviosos, arteriolas cardíacas y lechos capilares asociados del ojo, el riñón, el corazón y los sistemas nerviosos central y periférico. También se pueden emplear los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para aumentar los niveles de HDL en plasma de un individuo.

Otros trastornos más que pueden tratarse con compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina incluyen restenosis, por ejemplo posterior a una intervención coronaria, y trastornos relacionados con un nivel anormal de colesterol de alta densidad y de baja densidad.

En una realización, se puede administrar un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina como parte de una terapia combinada con otro agente cardiovascular. En una realización, se puede administrar un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina como parte de una terapia combinada con un agente antiarrítmico. En otra realización, se puede administrar un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina como parte de una terapia combinada con otro agente cardiovascular.

Muerte celular/cáncer

Se pueden administrar compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina a sujetos que han recibido recientemente, o es probable que reciban, una dosis de radiación o toxina. En una realización, la dosis de radiación o toxina es recibida como parte de un procedimiento médico o relacionado con el trabajo, por ejemplo administrado como una medida profiláctica. En otra realización, la exposición a radiación o toxina es recibida no intencionalmente. En tal caso, preferiblemente se administra el compuesto lo antes posible después de la exposición, para inhibir la apoptosis y el desarrollo subsiguiente del síndrome de radiación agudo.

También se pueden emplear compuestos moduladores de sirtuina para tratar y/o prevenir cáncer. En determinadas realizaciones, se pueden emplear compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina con el fin de tratar y/o prevenir cáncer. Se ha asociado la restricción calórica a una reducción en la incidencia de trastornos relacionados con la edad, entre ellos cáncer. Por consiguiente, un aumento en el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede ser útil para tratar y/o prevenir la incidencia de trastornos relacionados con la edad, como por ejemplo cáncer. Son cánceres ilustrativos que se pueden tratar empleando un compuesto modulador de sirtuina los del cerebro y riñón; cánceres dependientes de hormonas incluidos los cánceres de mama, de próstata, testicular y de ovario; linfomas y leucemias. En cánceres asociados con tumores sólidos, se puede administrar directamente al tumor un compuesto modulador. El cáncer de células sanguíneas, por ejemplo leucemia, puede tratarse administrando un compuesto modulador al torrente sanguíneo o a la médula ósea. También se puede tratar el crecimiento celular benigno, por ejemplo las verrugas. Otras enfermedades que se pueden tratar incluyen enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo lupus eritematoso sistémico, esclerodermia y artritis, en los cuales deben eliminarse células autoinmunitarias. También se pueden tratar infecciones víricas como herpes, VIH, adenovirus y trastornos malignos y benignos asociados con HTLV-1 mediante la administración de compuestos moduladores de sirtuina. Como alternativa, se pueden obtener células de un sujeto, tratarlas *ex vivo* para separar o eliminar determinadas células indeseables, por ejemplo células cancerosas, y administrarlas de nuevo al mismo sujeto o a uno diferente.

Se pueden coadministrar agentes quimioterapéuticos con compuestos moduladores descritos en la presente memoria por tener actividad anticancerosa, por ejemplo compuestos que inducen apoptosis, compuestos que reducen la duración de vida o compuestos que hacen a las células sensibles al estrés. Se pueden emplear agentes quimioterapéuticos por sí mismos con un compuesto modulador de sirtuina descrito en la presente memoria por inducir muerte celular o reducir la duración de vida o aumentar la sensibilidad al estrés y/o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. Además de con los agentes quimioterapéuticos convencionales, los compuestos moduladores de sirtuina descritos en la presente memoria también se pueden emplear con ARN antisentido, ARNi u otros polinucleótidos con el fin de inhibir la expresión de los componentes celulares que contribuyen a una proliferación celular indeseada.

Las terapias combinadas que comprenden compuestos moduladores de sirtuina y un agente quimioterapéutico convencional puede resultar ventajosas frente a terapias combinadas conocidas en la técnica, ya que la combinación permite que el agente quimioterapéutico convencional ejerza mayor efecto en una dosis menor. En una realización preferida, la dosis eficaz (DE_{50}) para un agente quimioterapéutico convencional o combinación de agentes

quimioterapéuticos convencionales, cuando se usan en combinación con un compuesto modulador de sirtuina, es al menos 2 veces menor que la DE₅₀ para el agente quimioterapéutico solo, e incluso más preferiblemente 5 veces, 10 veces o incluso 25 veces menor. Por el contrario, el índice terapéutico (IT) para dicho agente quimioterapéutico o combinación de dichos agentes quimioterapéuticos cuando se usan en combinación con un compuesto modulador de sirtuina descrito en la presente memoria puede ser al menos 2 veces mayor que el IT de un régimen quimioterapéutico convencional solo, e incluso más preferiblemente 5 veces, 10 veces o incluso 25 veces mayor.

Enfermedades/trastornos neuronales

En determinados aspectos, se pueden emplear compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para tratar pacientes que padezcan enfermedades neurodegenerativas y lesión traumática o mecánica del sistema nervioso central (SNC), médula espinal o sistema nervioso periférico (SNP). La enfermedad neurodegenerativa implica típicamente disminuciones en la masa y volumen del cerebro humano, que pueden deberse a la atrofia y/o muerte de células cerebrales, mucho más considerables que las de una persona saludable, donde se pueden atribuir al envejecimiento. Las enfermedades neurodegenerativas pueden evolucionar gradualmente, después de un largo periodo de funcionamiento normal del cerebro, debido a una degeneración progresiva (por ejemplo, disfunción y muerte de células nerviosas) en regiones específicas del cerebro. Como alternativa, las enfermedades neurodegenerativas pueden tener un inicio rápido, como el asociado a trauma o toxinas. El inicio real de la degeneración del cerebro puede preceder en muchos años a la manifestación clínica. los ejemplos de enfermedades neurodegenerativas incluyen, sin limitación, enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Huntington (EH), esclerosis lateral amiotrófica (ELA; enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad de cuerpos de Lewy difusos, corea-acantocitosis, esclerosis lateral primaria, enfermedades oculares (neuritis ocular), neuropatías inducidas por quimioterapia (por ejemplo por vincristina, paclitaxel, bortezomib), neuropatías inducidas por diabetes y ataxia de Friedreich. Se pueden emplear compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para tratar estos trastornos y otros como se describirá a continuación.

La EA es un trastorno del SNC que produce pérdida de la memoria, conducta inusual, cambios de personalidad y un declive en las habilidades de razonamiento. Estas pérdidas están relacionadas con la muerte de tipos específicos de células cerebrales y la degradación de conexiones mutuas y de redes de soporte (por ejemplo las células gliales). Los síntomas más tempranos incluyen pérdida de la memoria reciente, confusión mental y cambios en la personalidad. La EP es un trastorno del SNC que produce movimientos corporales descontrolados, rigidez, temblores y discinesia, y que está asociado con la muerte de células cerebrales en una zona del cerebro que produce dopamina. La ELA (enfermedad neuronal motora) es un trastorno del SNC que ataca a las neuronas motoras, componentes del SNC que conectan el cerebro con los músculos esqueléticos.

La EH es otra enfermedad neurodegenerativa que provoca movimientos descontrolados, pérdida de facultades intelectuales y alteraciones emocionales. La enfermedad de Tay-Sachs y la enfermedad de Sandhoff son enfermedades de almacenamiento de glucolípidos donde se acumulan en el sistema nervioso gangliósido GM2 y sustratos glucolípidicos relacionados para β -hexosaminidasa y desencadenan una neurodegeneración aguda.

Es bien sabido que la apoptosis cumple una función en la patogénesis del sida en el sistema inmune. Sin embargo, el VIH-1 también induce enfermedad neurológica, que puede tratarse con compuestos moduladores de sirtuina de la invención.

La pérdida neuronal también es un aspecto notorio de las enfermedades por priones, como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en seres humanos, EEB (enfermedad de las vacas locas) en el ganado vacuno, enfermedad de Scrapie en ovejas y cabras, y encefalopatía esponjiforme felina (EEF) en gatos. Compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden ser útiles para tratar o prevenir la pérdida neuronal debida a estas enfermedades por priones.

En otra realización, se puede emplear un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para tratar o prevenir cualquier enfermedad o trastorno que implique axonopatía. La axonopatía distal es un tipo de neuropatía periférica que proviene de alguna alteración metabólica o tóxica de neuronas del sistema nervioso periférico (SNP). Es la respuesta más común de los nervios a perturbaciones metabólicas o tóxicas, y como tal puede ser causada por enfermedades metabólicas tales como diabetes, insuficiencia renal, síndromes de deficiencia como malnutrición y alcoholismo, o los efectos de toxinas o fármacos. Quienes padecen axonopatías distales usualmente presentan perturbaciones sensomotoras "en guante y calcetín" simétricas. También se pierden o disminuyen en las áreas afectadas reflejos de tendones profundos y funciones del sistema nervioso autónomo (SNA).

Las neuropatías diabéticas son trastornos neuropáticos que están asociados con la diabetes mellitus. Las afecciones relativamente frecuentes que pueden estar asociadas con la neuropatía diabética incluyen parálisis del tercer nervio; mononeuropatía, mononeuritis múltiple; amiotrofia diabética; polineuropatía dolorosa; neuropatía autónoma y neuropatía toracoabdominal.

Neuropatía periférica es el término médico para la lesión de nervios del sistema nervioso periférico, que puede ser

provocada ya sea por enfermedades del nervio o por efectos secundarios de enfermedades sistémicas. Las causas principales de neuropatía periférica incluyen convulsiones, deficiencias nutricionales y VIH, aunque la diabetes es la causa más probable.

5 En una realización ilustrativa, se puede emplear un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para tratar o prevenir la esclerosis múltiple (EM), incluidas la EM recurrente y la EM monosintomática, y otras afecciones desmielinizantes, como por ejemplo polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC) o síntomas asociados con las mismas.

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

15 Compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden ser útiles también para prevenir, tratar y aliviar síntomas de diversos trastornos del SNP. La expresión "neuropatía periférica" abarca una amplia gama de trastornos en los cuales se han dañado los nervios fuera del cerebro y de la espina dorsal, esto es, los nervios periféricos. La neuropatía periférica también puede denominarse neuritis periférica o, si están implicados muchos nervios, se pueden usar los términos polineuropatía o polineuritis.

Las enfermedades del SNP tratables con compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina incluyen: diabetes, lepra, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, síndrome de Guillain-Barré y neuropatías del plexo braquial (enfermedades de las raíces cervical y primera torácica, troncos nerviosos, cuerdas y componentes de los nervios periféricos del plexo braquial.

20 En otra realización, se puede emplear un compuesto activador de sirtuina para tratar o prevenir una enfermedad por poliglutamina. Las enfermedades por poliglutamina ilustrativas incluyen atrofia muscular espinobulbar (enfermedad de Kennedy), enfermedad de Huntington (EH), atrofia dentatorrubral-palidolusiana (síndrome de Haw River), ataxia espinocerebelar de tipo 1, ataxia espinocerebelar de tipo 2, ataxia espinocerebelar de tipo 3 (enfermedad de Machado-Joseph), ataxia espinocerebelar de tipo 6, ataxia espinocerebelar de tipo 7 y ataxia espinocerebelar de tipo 17.

25 En determinadas realizaciones se describe un método para tratar una célula del sistema nervioso central con el fin de prevenir el daño en respuesta a una disminución en el flujo sanguíneo a la célula. Típicamente, la intensidad del daño que pueda prevenirse dependerá en gran medida del grado de reducción en el flujo sanguíneo a la célula y de la duración de la reducción. En una realización, se puede prevenir la muerte celular apoptótica o necrótica. Incluso en otra realización, se puede prevenir el daño en el cual intervenga isquemia, como edema citotóxico o anoxemia del tejido del sistema nervioso central. En cada realización, la célula del sistema nervioso central puede ser una célula espinal o una célula cerebral.

35 Otro aspecto abarca administrar un compuesto activador de sirtuina a un sujeto para tratar un cuadro isquémico del sistema nervioso central. Con los compuestos activadores de sirtuina descritos en la presente memoria se pueden tratar una serie de cuadros isquémicos del sistema nervioso central. En una realización, el cuadro isquémico es un accidente cerebrovascular que produce cualquier tipo de daño isquémico al sistema nervioso central, como muerte celular apoptótica o necrótica, edema citotóxico o anoxia del tejido del sistema nervioso central. El accidente cerebrovascular puede afectar a cualquier zona del cerebro o bien puede ser causada por cualquier etiología conocida por originar comúnmente un accidente cerebrovascular. En una alternativa de esta realización, el accidente cerebrovascular es un accidente cerebrovascular del tronco encefálico. En otra alternativa de esta realización, el accidente cerebrovascular es accidente cerebrovascular del cerebelo. En otra realización más, el accidente cerebrovascular es un accidente cerebrovascular embólico. Incluso en otra alternativa, el accidente cerebrovascular puede ser un accidente cerebrovascular hemorrágico. En una realización adicional, el accidente cerebrovascular es un accidente cerebrovascular trombótico.

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

50 En una realización, un régimen de fármacos combinados puede incluir fármacos o compuestos para el tratamiento o prevención de trastornos neurodegenerativos o afecciones secundarias asociados con estas afecciones. Por tanto, un régimen de fármacos combinados puede incluir uno o más activadores de sirtuina y uno o más agentes anti-neurodegeneración.

Trastornos de la coagulación sanguínea

55 En otros aspectos, se pueden emplear compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para tratar o prevenir trastornos de la coagulación sanguínea (o trastornos hemostáticos). Tal como se usan indistintamente en la presente memoria, el término "hemostasis" y la expresión "coagulación sanguínea" se refieren al control del sangrado, incluidas las propiedades fisiológicas de vasoconstricción y coagulación. La coagulación sanguínea ayuda a mantener la integridad de la circulación en los mamíferos después

de una lesión, inflamación, enfermedad, defecto congénito, disfunción u otra alteración. Además, la formación de coágulos sanguíneos no sólo limita el sangrado en caso de una lesión (hemostasis), sino que puede conducir a un daño orgánico grave y a la muerte en el contexto de enfermedades ateroscleróticas por oclusión de una arteria o vena importante. La trombosis es, así, la formación de un coágulo sanguíneo en el momento y lugar equivocados.

- 5 Por consiguiente, se describen tratamientos anticoagulantes y antitrombóticos que apuntan a inhibir la formación de coágulos sanguíneos con el fin de prevenir o tratar trastornos de la coagulación sanguínea, como infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, pérdida de una extremidad por arteriopatía periférica o embolia pulmonar.

10 Tal como se usan indistintamente en la presente memoria, "modular o modulación de la hemostasis" y "regular o regulación de la hemostasis" incluyen la inducción (por ejemplo estimulación o aumento) de la hemostasis y también la inhibición (por ejemplo, reducción o disminución) de la hemostasis.

15 En un aspecto, se describe un método para reducir o inhibir la hemostasis en un sujeto administrando un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina. Las composiciones y métodos descritos en la presente memoria son útiles para el tratamiento o la prevención de trastornos trombóticos. Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "trastorno trombótico" incluye cualquier trastorno o afección caracterizado por excesiva o indeseada coagulación o actividad hemostática, o un estado hipercoagulable. Los trastornos trombóticos incluyen enfermedades o trastornos que implican adhesión plaquetaria y formación de trombos, y pueden manifestarse como una propensión acrecentada a formar trombosis, por ejemplo un mayor número de trombosis, trombosis a una edad temprana, una tendencia familiar a la trombosis, y trombosis en sitios inusuales.

20 En otra realización, un régimen de fármacos combinados puede incluir fármacos o compuestos para el tratamiento o la prevención de trastornos de la coagulación sanguínea o de afecciones secundarias asociadas con estas afecciones. Por tanto, un régimen de fármacos combinados puede incluir uno o más compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina y uno o más agentes anticoagulantes o antitrombóticos.

25 Control del peso

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

40 En otras realizaciones más, se pueden administrar compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina a sujetos que padezcan una diversidad de otras enfermedades y afecciones que se pueden tratar o prevenir promoviendo el adelgazamiento en el sujeto. Dichas enfermedades incluyen, por ejemplo, hipertensión arterial, hipertensión, colesterol en sangre elevado, dislipidemia, diabetes de tipo 2, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, cardiopatía coronaria, angina de pecho, insuficiencia cardíaca congestiva, accidente cerebrovascular, cálculos biliares, colecistitis y coledolitiasis, gota, artrosis, apnea obstructiva del sueño y problemas respiratorios, algunos tipos de cáncer (como de endometrio, de mama, de próstata y de colon), complicaciones del embarazo, mala salud reproductiva femenina (como irregularidades menstruales, infertilidad, ovulación irregular), problemas de control de la vejiga (como incontinencia de esfuerzo); nefrolitiasis por ácido úrico; trastornos psicológicos (como depresión, trastornos de la alimentación, imagen corporal distorsionada y baja autoestima). Finalmente, los pacientes con sida pueden desarrollar lipodistrofia o resistencia a la insulina en respuesta a las terapias combinadas contra el sida.

50 En otra realización, se pueden emplear compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para inhibir la adipogénesis o diferenciación de células grasas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Dichos métodos pueden usarse para tratar o prevenir la obesidad.

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

En una realización ilustrativa, se pueden administrar compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína en forma de una terapia combinada para tratar o prevenir el aumento de peso o la

obesidad. Por ejemplo, se pueden administrar uno o más compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina en combinación con uno o más agentes antiobesidad.

5 En otra realización, se pueden administrar compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina con el fin de reducir el aumento de peso inducido por fármacos. Por ejemplo, se puede administrar un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina en forma de una terapia combinada con medicamentos que puedan estimular el apetito o provocar aumento de peso, en particular, aumento de peso debido a factores distintos de la retención de líquido.

Trastornos metabólicos/diabetes

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

15 En una realización ilustrativa, se pueden administrar compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina en forma de una terapia combinada para tratar o prevenir un trastorno metabólico. Por ejemplo, se pueden administrar uno más compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina en combinación con uno o más agentes antidiabéticos.

Enfermedades inflamatorias

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

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

35 Además, se pueden emplear compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para tratar enfermedades autoinmunitarias y/o inflamación asociada con enfermedades autoinmunitarias tales como artritis, incluidas artritis reumatoide, artritis psoriásica y espondilitis anquilosante, así como enfermedades autoinmunitarias de órgano-tejido (por ejemplo, síndrome de Raynaud), colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, mucositis oral, esclerodermia, miastenia grave, rechazo de trasplante, choque por endotoxinas, sepsis, psoriasis, eccema, dermatitis, esclerosis múltiple, tiroiditis autoinmunitaria, uveítis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Addison, enfermedad poliglandular autoinmunitaria (también conocida como síndrome poliglandular autoinmunitario) y enfermedad de Graves.

45 En determinadas realizaciones, se pueden tomar uno o más compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina solos o en combinación con otros compuestos útiles para el tratamiento o prevención de inflamación.

Enrojecimiento

50 En otro aspecto, se pueden emplear compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para reducir la incidencia o gravedad del enrojecimiento y/o sofocos que sean síntomas de un trastorno. Por ejemplo, el método en cuestión incluye el uso de compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina, solos o en combinación con otros agentes, para reducir la incidencia o gravedad del enrojecimiento y/o sofocos en pacientes con cáncer. En otras realizaciones, el método proporciona el uso de compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para reducir la incidencia o gravedad del enrojecimiento y/o sofocos en mujeres menopáusicas y posmenopáusicas.

55 En otro aspecto, se pueden emplear compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina como terapia para reducir la incidencia o gravedad del enrojecimiento y/o sofocos que sean efectos secundarios de otra terapia con fármacos, por ejemplo, enrojecimiento inducido por fármacos. En

determinadas realizaciones, un método para tratar y/o prevenir el enrojecimiento inducido por fármacos comprende administrar a un paciente que lo necesite una formulación que comprende al menos un compuesto inductor de enrojecimiento y al menos un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina. En otras realizaciones, un método para tratar el enrojecimiento inducido por fármacos comprende administrar por separado uno o más compuestos que inducen enrojecimiento y uno o más compuestos moduladores de sirtuina, por ejemplo, donde el compuesto modulador de sirtuina y el agente inductor de enrojecimiento no se han formulado en la misma composición. Cuando se usan formulaciones separadas, el compuesto modulador de sirtuina puede administrarse (1) al mismo tiempo que la administración del agente inductor de enrojecimiento, (2) intermitentemente con el agente inductor de enrojecimiento, (3) escalonadamente con respecto a la administración del agente inductor de enrojecimiento, (4) antes de la administración del agente inductor de enrojecimiento, (5) subsiguiente a la administración del agente inductor de enrojecimiento y (6) varias de sus combinaciones. Los agentes inductores de enrojecimiento incluyen, por ejemplo, niacina, raloxifeno, antidepresivos, antipsicóticos, quimioterapéuticos, bloqueadores del canal de calcio y antibióticos.

En una realización, se pueden usar compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para reducir los efectos secundarios de enrojecimiento por un vasodilatador o un agente antilipémico (incluidos agentes antiolesterolémicos y agentes lipotrópicos). En una realización ilustrativa, se puede usar un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para reducir el enrojecimiento asociado a la administración de niacina.

En otra realización, se describe un método para tratar y/o prevenir hiperlipidemia con efectos secundarios de enrojecimiento reducidos. En otra realización representativa, el método implica el uso de compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para reducir los efectos secundarios de enrojecimiento del raloxifeno. En otra realización representativa, el método implica el uso de compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para reducir los efectos secundarios de enrojecimiento por antidepresivos o agentes antipsicóticos. Por ejemplo, se pueden emplear compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina conjuntamente (administrados por separado o juntos) con un inhibidor de la recaptación de serotonina o un antagonista de receptor 5HT₂.

En determinadas realizaciones, se pueden emplear compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina como parte de un tratamiento con un inhibidor de la recaptación de serotonina (IRS) para reducir el enrojecimiento. Incluso en otra realización representativa, se pueden emplear compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para reducir los efectos secundarios de enrojecimiento por agentes quimioterapéuticos, tales como ciclofosfamida y tamoxifeno.

En otra realización, se pueden emplear compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para reducir los efectos secundarios de enrojecimiento por bloqueadores de los canales de calcio, como la amlodipina.

En otra realización, se pueden emplear compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para reducir los efectos secundarios de enrojecimiento por antibióticos. Por ejemplo, se pueden emplear compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina, combinados con levofloxacina.

40 Trastornos oculares

En un aspecto se describe un método para inhibir, reducir o tratar de otro modo el deterioro de la visión, administrando a un paciente una dosis terapéutica de modulador de sirtuina seleccionado de un compuesto descrito en la presente memoria o una sal, profármaco o derivado metabólico farmacéuticamente aceptable del mismo.

En determinados aspectos, el deterioro de la visión es causado por daño al nervio óptico o al sistema nervioso central. En realizaciones particulares, el daño al nervio óptico es causado por alta presión intraocular, como la creada por glaucoma. En otras realizaciones particulares, el daño al nervio óptico es causado por hinchazón del nervio, que a menudo se asocia con una infección o una respuesta inmunitaria (por ejemplo, autoinmunitaria) tal como ocurre en la neuritis óptica.

En determinados aspectos, el deterioro de la visión es causado por daño retiniano. En realizaciones particulares, el daño retiniano es causado por alteraciones en el flujo sanguíneo hacia el ojo (por ejemplo, arterioesclerosis, vasculitis). En realizaciones particulares, el daño retiniano es causado por deterioro de la mácula (por ejemplo, degeneración macular exudativa o no exudativa).

Las enfermedades retinianas ilustrativas incluyen degeneración macular exudativa relacionada con la edad, degeneración macular no exudativa relacionada con la edad, prótesis retiniana electrónica (PRE) y degeneración macular relacionada con la edad y trasplante de PRE, epitelio patía pigmentaria placoide multifocal aguda, necrosis retiniana aguda, enfermedad de Best, oclusión de la rama arterial de la retina, oclusión de la rama venosa de la retina, retinopatías autoinmunitarias asociadas a cáncer y relacionadas, oclusión de la arteria retiniana central, oclusión de la vena retiniana central, coriorretinopatía serosa central, enfermedad de Eales, membrana epimacular,

- degeneración de la retina, macroaneurisma, edema macular diabético, edema macular de Irvine-Gass, orificio macular, membranas neovasculares subretinianas, neurorretinitis subaguda unilateral difusa, edema macular cistoide no pseudofáquico, síndrome de presunta histoplasmosis ocular, desprendimiento de retina exudativo, desprendimiento de retina posoperatorio, desprendimiento de retina proliferativo, desprendimiento de retina regmatógeno, desprendimiento de retina traccional, retinitis pigmentosa, retinitis por CMV, retinoblastoma, retinopatía del prematuro, retinopatía "en perdigonada", retinopatía diabética de fondo, retinopatía diabética proliferativa, retinopatía por hemoglobinopatías, retinopatía de Purtscher, retinopatía de Valsalva, retinosquiasis juvenil, retinosquiasis senil, síndrome de Terson y síndrome de manchas blancas.
- Otras enfermedades ilustrativas incluyen infecciones bacterianas oculares (por ejemplo conjuntivitis, queratitis, tuberculosis, sífilis, gonorrea), infecciones víricas (por ejemplo virus del herpes simple ocular, virus zoster de la varicela, retinitis por citomegalovirus, virus de inmunodeficiencia humana (VIH)) y también necrosis retiniana externa progresiva secundaria a VIH u otras enfermedades oculares asociadas a inmunodeficiencia o al VIH. Además, las enfermedades oculares incluyen infecciones fúngicas (p. ej., coroiditis por *Candida*, histoplasmosis), infecciones por protozoos (p. ej., toxoplasmosis) y otras como toxocariasis ocular y sarcoidosis
- En un aspecto se describe un método para inhibir, reducir o tratar el deterioro de la visión en un sujeto que se somete a tratamiento con un fármaco quimioterapéutico (por ejemplo, un fármaco neurotóxico, un fármaco que eleva la presión intraocular tal como un esteroide), administrando al sujeto que necesite de dicho tratamiento una dosis terapéutica de un modulador de sirtuina descrito en la presente memoria.
- Otro aspecto es un método para inhibir, reducir o tratar el deterioro de la visión en un sujeto que se somete a cirugía, incluidas cirugía ocular u otras cirugías realizadas en la posición prona tales como cirugía de la médula espinal, administrando al sujeto que necesite dicho tratamiento una dosis terapéutica de un modulador de sirtuina descrito en la presente memoria. Las cirugías oculares incluyen cataratas, iridotomía y reemplazo de cristalino.
- Otro aspecto es el tratamiento, incluidos la inhibición y el tratamiento profiláctico, de trastornos oculares relacionados con la edad, incluidas cataratas, ojo seco, degeneración macular asociada a la edad (DMAE), daño retiniano y similares, administrando al sujeto que necesite dicho tratamiento una dosis terapéutica de un modulador de sirtuina descrito en la presente memoria.
- Otro aspecto es la prevención o tratamiento de daño al ojo causado por estrés, agresión química o radiación, administrando al sujeto que necesite dicho tratamiento una dosis terapéutica de un modulador de sirtuina descrito en la presente memoria. El daño por radiación o electromagnético al ojo puede incluir el causado por tubos de rayos catódicos (CRT, por sus siglas en inglés) o exposición a la luz solar o UV.
- En una realización, un régimen combinado de fármacos puede incluir fármacos o compuestos para el tratamiento o prevención de trastornos oculares o afecciones secundarias asociadas con estas afecciones. Por tanto, un régimen combinado de fármacos puede incluir uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento de un trastorno ocular.
- En una realización, se puede administrar un modulador de sirtuina conjuntamente con una terapia para reducir la presión intraocular. En otra realización, se puede administrar un modulador de sirtuina conjuntamente con una terapia para tratar y/o prevenir el glaucoma. En otra realización más, se puede administrar un modulador de sirtuina conjuntamente con una terapia para tratar y/o prevenir la neuritis óptica. En una realización, se puede administrar un modulador de sirtuina conjuntamente con una terapia para tratar y/o prevenir la retinopatía por CMV. En otra realización, se puede administrar un modulador de sirtuina conjuntamente con una terapia para tratar y/o prevenir la esclerosis múltiple.
- Enfermedades y trastornos asociados con mitocondrias**
- En determinadas realizaciones, se describen métodos para tratar enfermedades o trastornos que se beneficiarían de una actividad mitocondrial acrecentada. Los métodos implican administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto activador de sirtuina. Actividad mitocondrial acrecentada se refiere a aumentar la actividad de las mitocondrias mientras se mantiene el número total de mitocondrias (por ejemplo, la masa mitocondrial), aumentar el número de mitocondrias aumentando así la actividad mitocondrial (por ejemplo, estimulando la biogénesis mitocondrial), o sus combinaciones. En determinadas realizaciones, las enfermedades y trastornos que se beneficiarían de la actividad mitocondrial acrecentada incluyen enfermedades o trastornos asociados con disfunción mitocondrial.
- En determinadas realizaciones, los métodos para tratar enfermedades o trastornos que se beneficiarían de una actividad mitocondrial acrecentada pueden comprender identificar un sujeto que padezca una disfunción mitocondrial. Los métodos para el diagnóstico de una disfunción mitocondrial pueden implicar análisis genéticos moleculares, patológicos y/o bioquímicos. Las enfermedades y trastornos asociados con la disfunción mitocondrial incluyen enfermedades y trastornos en los cuales los déficits en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial contribuyen al desarrollo de fisiopatologías de dichas enfermedades o trastornos en un mamífero. Las enfermedades o trastornos que se beneficiarían de una actividad mitocondrial acrecentada en general incluyen, por ejemplo, enfermedades en las cuales la lesión oxidativa mediada por radicales libres lleva a la degeneración de tejido, enfermedades en las cuales las células experimentan inapropiadamente apoptosis y enfermedades en las cuales las

células dejan de experimentar apoptosis.

5 En determinadas realizaciones, se describen métodos para tratar una enfermedad o trastorno que se beneficiaría de una actividad mitocondrial acrecentada que implican administrar a un sujeto que lo necesite uno o más compuestos activadores de sirtuina en combinación con otro agente terapéutico tal como, por ejemplo, un agente útil para tratar disfunción mitocondrial o un agente útil para reducir un síntoma asociado con una enfermedad o trastorno que implique disfunción mitocondrial.

10 El realizaciones ilustrativas, se describen métodos para tratar enfermedades o trastornos que se beneficiarían de una actividad mitocondrial acrecentada administrando a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto activador de sirtuina. Las enfermedades o trastornos ilustrativos incluyen, por ejemplo, trastornos neuromusculares (por ejemplo ataxia de Friedreich, distrofia muscular, esclerosis múltiple, etc.), trastornos de inestabilidad neuronal (por ejemplo, trastornos de convulsiones, migrañas, etc.), retraso del desarrollo, trastornos neurodegenerativos (por ejemplo enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, etc.), isquemia, acidosis tubular renal, neurodegeneración asociada a la edad y deterioro cognitivo, fatiga por quimioterapia, menopausia o irregularidades del ciclo menstrual o la ovulación asociadas a la edad o inducidas por quimioterapia, miopatías mitocondriales, daño mitocondrial (por ejemplo acumulación de calcio, excitotoxicidad, exposición a óxido nítrico, hipoxia, etc.) y desregulación mitocondrial.

20 Distrofia muscular se refiere a una familia de enfermedades que implican deterioro de la estructura y la función neuromuscular, que originan a menudo atrofia del músculo esquelético y disfunción del miocardio, como la distrofia muscular de Duchenne. En determinadas realizaciones, se pueden usar compuestos activadores de sirtuina para reducir el índice de deterioro de las capacidades funcionales musculares y para mejorar el estado funcional muscular en pacientes con distrofia muscular.

25 En determinadas realizaciones, compuestos moduladores de sirtuina pueden ser útiles para el tratamiento de miopatías mitocondriales. Las miopatías mitocondriales abarcan desde debilidad leve y de progreso lento de los músculos extraoculares hasta miopatías infantiles graves y fatales y encefalomiopatías multisistémicas. Se han definido algunos síndromes, con cierta superposición entre ellos. Los síndromes establecidos que afectan a los músculos incluyen oftalmoplejía externa progresiva, síndrome de Kearns-Sayre (con oftalmoplejía, retinopatía pigmentaria, defectos de conducción cardíaca, ataxia cerebelar y sordera sensorineural), síndrome SEMALACV (MELAS, en inglés) (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios de tipo accidente cerebrovascular), síndrome EMFRR (MERFF, en inglés) (epilepsia mioclónica y fibras rojas rasgadas), debilidad de distribución de extremidades-cintura y miopatía infantil (benigna o grave y fatal).

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

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

Desempeño muscular

40 En otras realizaciones, se describen métodos para mejorar el desempeño muscular administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto activador de sirtuina. Por ejemplo, pueden ser útiles compuestos activadores de sirtuina para mejorar la resistencia física (por ejemplo la capacidad de realizar una tarea física tal como ejercicio, trabajo física, actividades deportivas, etc.), inhibir o retardar las fatigas físicas, mejorar los niveles de oxígeno en la sangre, incrementar la energía en individuos sanos, incrementar la capacidad de trabajo y la resistencia, reducir la fatiga muscular, reducir el estrés, mejorar la función cardíaca y cardiovascular, mejorar la capacidad sexual, aumentar los niveles de ATP musculares y/o reducir el ácido láctico en la sangre. En determinadas realizaciones, los métodos implican administrar una cantidad de un compuesto activador de sirtuina que aumente la actividad mitocondrial, aumentar la biogénesis mitocondrial y/o aumentar la masa mitocondrial.

50 El desempeño deportivo se refiere a la capacidad de desempeño de los músculos de un atleta cuando participa en actividades deportivas. El desempeño, fuerza, velocidad y resistencia deportivos acrecentados se miden por un aumento en la fuerza de contracción muscular, un aumento en la amplitud de la contracción muscular y un acortamiento del tiempo de reacción muscular entre la estimulación y la contracción. Atleta se refiere a un individuo que participa en deportes a cualquier nivel y que busca lograr un nivel mejorado de fuerza, velocidad y resistencia en su desempeño, como por ejemplo fisicoculturistas, ciclistas, corredores de distancias largas, corredores de distancias cortas, etc. Un desempeño deportivo acrecentado se manifiesta por la capacidad de superar la fatiga muscular, la capacidad de mantener la actividad durante periodos de tiempo más largos y por tener un ejercicio más eficaz.

55 En el campo del desempeño muscular de un atleta, es deseable crear condiciones que permitan la competencia o el entrenamiento a niveles más altos de resistencia durante un período de tiempo prolongado.

Se contempla que los métodos de la presente invención también serán efectivos en el tratamiento de afecciones

patológicas relacionadas con los músculos, incluidas sarcopenia aguda, por ejemplo atrofia muscular y/o caquexia asociada a quemaduras, reposo en cama, inmovilización de extremidades o cirugía mayor torácica, abdominal y/u ortopédica.

5 En determinadas realizaciones, la invención proporciona nuevas composiciones dietéticas que comprenden moduladores de sirtuina, un método para su preparación y un método para usar las composiciones con el fin de mejorar el desempeño deportivo. Por consiguiente, se proporcionan composiciones, alimentos y bebidas terapéuticos que tienen acciones de mejorar la resistencia física y/o inhibir fatigas físicas en las personas implicadas en ejercicios que, en una definición amplia, incluyen deportes que requieren resistencia y trabajos que requieren esfuerzos musculares repetidos. Dichas composiciones dietéticas pueden comprender adicionalmente electrolitos, 10 cafeína, vitaminas, hidratos de carbono, etc.

Otros usos

15 Se pueden emplear compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para tratar o prevenir infecciones víricas (como infecciones por virus de la gripe, del herpes o del papiloma) o como agentes antifúngicos. En determinadas realizaciones, se pueden administrar compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina como parte de una terapia combinada de fármacos con otro agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades víricas. En otra realización, se pueden administrar compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina como parte de una terapia combinada de fármacos con otro agente antifúngico.

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

25 También se pueden usar compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para aumentar la duración de vida, la resistencia al estrés y la resistencia a la apoptosis en plantas. En una realización, se aplica un compuesto a plantas, por ejemplo sobre una base periódica, o a hongos. En otra realización, las plantas están genéticamente modificadas para producir un compuesto. En otra realización, se tratan las plantas y frutas con un compuesto antes de la cosecha y el envío, con el fin aumentar la resistencia al daño durante el transporte. También se pueden poner en contacto semillas de plantas con compuestos descritos en la presente memoria, por ejemplo para conservarlas. 30

En otras realizaciones, se pueden usar compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para modular la duración de vida en células de levadura. Las situaciones en las cuales puede ser deseable prolongar la duración de vida de células de levadura incluyen cualquier proceso en el que se use levadura, por ejemplo la elaboración de cerveza, yogurt y artículos de panadería, por ejemplo pan. El uso de la levadura con una duración de vida prolongada puede generar menos uso de levadura o hacer que la levadura sea activa durante periodos más largos de tiempo. Las células de levadura u otras de mamíferos usadas para producir proteínas de manera recombinante también pueden tratarse como se describe en la presente memoria. 35

También se pueden usar compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para aumentar la duración de vida, la resistencia al estrés y la resistencia a la apoptosis en insectos. En esta realización, se aplicarían los compuestos a insectos útiles, por ejemplo abejas y otros insectos que están implicados en la polinización de las plantas. En una realización específica, se aplicaría un compuesto a abejas implicadas en la producción de miel. En general, los métodos descritos en la presente memoria pueden aplicarse a cualquier organismo, por ejemplo eucariota, que pueda tener importancia comercial. Por ejemplo, pueden aplicarse a peces (acuicultura) y aves (por ejemplo, pollos y aves de corral). 40 45

También se pueden usar dosis más altas de compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina como pesticida, al interferir con la regulación de genes silenciados y la regulación de la apoptosis durante el desarrollo. En esta realización, se puede aplicar un compuesto a plantas empleando un método conocido en la técnica que asegure que el compuesto esté biodisponible para las larvas de insecto, y no para las plantas. 50

Al menos en vista de la conexión entre la reproducción y la longevidad, se pueden aplicar compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para modificar la reproducción de organismos tales como insectos, animales y microorganismos.

4. Ensayos

55 Se han descrito diversos tipos de ensayos para determinar la actividad de sirtuina. Por ejemplo, se puede determinar la actividad de sirtuina utilizando un ensayo basado en fluorescencia tal como el ensayo comercialmente disponible de Biomol, por ejemplo los SIRT1 Fluorimetric Drug Discovery Kit (AK-555), SIRT2 Fluorimetric Drug Discovery Kit

(AK-556) o SIRT3 Fluorimetric Drug Discovery Kit (AK-557) (Biomol International, Plymouth Meeting, PA). Otros ensayos para sirtuina adecuados incluyen un ensayo de liberación de nicotinamida (Kaeberlein *et al.*, J. Biol. Chem. 280(17): 17038 (2005)), un ensayo FRET (Marcotte *et al.*, Anal. Biochem. 332: 90 (2004)), y un ensayo de unión a resina C¹⁴ NAD boro (McDonagh *et al.*, Methods 36: 346 (2005)). Otros ensayos de sirtuina adecuados incluyen radioinmunoensayos (RIA), ensayos de proximidad de centelleo, ensayos basados en HPLC y ensayos de gen informador (por ejemplo, para dianas de factor de transcripción).

Un ensayo ilustrativo para determinar la actividad de sirtuina es un ensayo de polarización de fluorescencia. Se describen ensayos de polarización de fluorescencia en la presente memoria y también se describen en la publicación PCT n° WO 2006/094239. En otras realizaciones, se puede determinar la actividad de sirtuina utilizando un ensayo basado en espectrometría de masas. Se describen ejemplos de ensayos basados en espectrometría de masas en la presente memoria y también se describen en la publicación PCT n° WO 2007/064902. También se pueden utilizar ensayos basados en células para determinar la actividad de sirtuina. Se describen ejemplos de ensayos basados en células para determinar la actividad de sirtuina en las publicaciones PCT n°s WO 2007/064902 y WO 2008/060400.

Otros métodos más contemplados en la presente memoria incluyen métodos de cribado para identificar compuestos o agentes que modulen sirtuinas. Un agente puede ser un ácido nucleico, tal como un aptámero. Se pueden llevar a cabo los ensayos en un formato basado en células o bien en uno exento de células. Por ejemplo, un ensayo puede comprender incubar (o poner en contacto) una sirtuina con un agente de prueba en condiciones en las cuales una sirtuina pueda ser modulada por un agente conocido que modula la sirtuina, y observar o determinar el nivel de modulación de la sirtuina en presencia del agente de prueba en comparación con la ausencia del agente de prueba. Se puede determinar el nivel de modulación de una sirtuina determinando su capacidad de desacetilar un sustrato. Los sustratos ilustrativos son péptidos acetilados que se pueden obtener de BIOMOL (Plymouth Meeting, PA). Los sustratos preferidos incluyen péptidos de p53, como los que comprenden un K382 acetilado. Un sustrato particularmente preferido es Fluor de Lys-SIRT1 (BIOMOL), es decir, el péptido Arg-His-Lys-Lys acetilado. Otros sustratos son péptidos de histonas H3 y H4 humanas o un aminoácido acetilado. Los sustratos pueden ser fluorogénicos. La sirtuina puede ser SIRT1, Sir2, SIRT2, SIRT3 o una parte de éstas. Por ejemplo, se puede obtener SIRT1 recombinante de BIOMOL. Se puede llevar a cabo la reacción durante aproximadamente 30 minutos y detenerla, por ejemplo con nicotinamida. Se puede utilizar el kit de ensayo de actividad fluorescente de HDAC/descubrimiento de fármacos (AK-500, BIOMOL Research Laboratories) para determinar el nivel de acetilación. Se describen ensayos similares en Bitterman *et al.* (2002) J. Biol. Chem. 277:45099. Se puede comparar el nivel de modulación de la sirtuina en un ensayo con el nivel de modulación de la sirtuina en presencia de (por separado o simultáneamente) uno o más compuestos descritos en la presente memoria, que pueden servir como testigos positivos o negativos. Las sirtuinas para uso en los ensayos pueden ser proteínas sirtuina de longitud completa o partes de las mismas. Dado que se ha demostrado en la presente memoria que los compuestos activadores parecen interactuar con el extremo N-terminal de SIRT1, las proteínas para uso en los ensayos incluyen partes N-terminales de sirtuinas, por ejemplo aproximadamente los aminoácidos 1-176 ó 1-255 de SIRT1; aproximadamente los aminoácidos 1-174 ó 1-252 de Sir2.

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

Los métodos para identificar un agente que module, por ejemplo estimule, sirtuinas *in vivo* puede comprender (i) poner en contacto una célula con un agente de prueba y un sustrato que sea capaz de entrar en una célula en presencia de un inhibidor de HDAC de clase I y de clase II en condiciones adecuadas para que la sirtuina desacetile el sustrato en ausencia del agente de prueba; y (ii) determinar el nivel de acetilación del sustrato, en donde un bajo nivel de acetilación del sustrato en presencia del agente de prueba, en comparación con la ausencia del agente de prueba, indica que el agente de prueba estimula la desacetilación por la sirtuina, mientras que un nivel mayor de acetilación del sustrato en presencia del agente de prueba, en comparación con la ausencia del agente de prueba, indica que el agente de prueba inhibe la desacetilación por la sirtuina. Un sustrato preferido es un péptido acetilado, que preferiblemente es también fluorogénico, como se describe con más detalle en la presente memoria. El método puede comprender además lisar las células para determinar el nivel de acetilación del sustrato. Se pueden añadir sustratos a las células en una concentración que abarca de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 10 mM, preferiblemente de aproximadamente 10 μ M a 1 mM, incluso más preferiblemente de aproximadamente 100 μ M a 1 mM, como aproximadamente 200 μ M. Un sustrato preferido es una lisina acetilada, por ejemplo ϵ -acetil lisina (Fluor de Lys, FdL) o Fluor de Lys-SIRT1. Un inhibidor preferido de HDAC de clase I y de clase II es tricostatina A (TSA), que puede emplearse a concentraciones que abarcan de aproximadamente 0,01 a 100 μ M, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 10 μ M, como 1 μ M. La incubación de células con el compuesto de prueba y el sustrato puede llevarse a cabo durante aproximadamente 10 minutos hasta 5 horas, preferiblemente durante aproximadamente 1-3 horas. Dado que la TSA inhibe todas las HDAC de clase I y de clase II y que ciertos sustratos, por ejemplo Fluor de Lys, son sustratos mediocres para SIRT2 y aún peores sustratos para SIRT3-7, se puede

utilizar este ensayo para identificar moduladores de SIRT1 *in vivo*.

5. Composiciones farmacéuticas

Los compuestos moduladores de sirtuina descritos en la presente memoria pueden formularse de una manera convencional utilizando uno o más vehículos o excipientes fisiológica o farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, se pueden formular compuestos moduladores de sirtuina y sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables para administración, por ejemplo, mediante inyección (por ejemplo SC, IM, IP), inhalación o insuflación (ya sea a través de la boca o la nariz) o administración oral, bucal, sublingual, transdérmica, nasal, parenteral o rectal. En una realización, se puede administrar un compuesto modulador de sirtuina localmente, en el sitio donde estén presentes las células diana, es decir, en un tejido, órgano o fluido específico (por ejemplo sangre, fluido cerebroespinal, etc.).

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

Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden adoptar la forma de, por ejemplo, comprimidos, pastillas o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo almidón de patata o almidón-glicolato de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo laurilsulfato de sodio). Los comprimidos se pueden revestir por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden adoptar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o bien se pueden presentar en forma de un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado, antes del uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes suspensionantes (por ejemplo jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados) y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o de propilo, o ácido sórbico). Las preparaciones pueden contener también sales tamponadoras, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes según sea adecuado. Se pueden formular convenientemente preparaciones para administración oral para proporcionar una liberación controlada del compuesto activo.

Para la administración por inhalación (por ejemplo, administración pulmonar), se pueden suministrar convenientemente los compuestos moduladores de sirtuina en forma de una presentación en spray de aerosol desde envases a presión o desde un nebulizador, utilizando un propulsor adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la unidad de dosificación puede establecerse al proporcionar una válvula que suministre una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina, para uso en un inhalador o insuflador, se pueden formular para que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Se pueden formular compuestos moduladores de sirtuina para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en formas de dosificación comunitarias, por ejemplo en ampollas, o bien en recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes suspensionantes, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para constituirlo con un vehículo adecuado, por ejemplo agua estéril libre de pirógenos, antes del uso.

También se pueden formular compuestos moduladores de sirtuina en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, que contengan, por ejemplo, bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas en lo que antecede, también se pueden formular compuestos moduladores de sirtuina en forma de una preparación de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo subcutánea o intramuscular) o bien por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, se pueden formular compuestos moduladores de sirtuina con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o bien como derivados escasamente solubles, por ejemplo en forma de una sal escasamente soluble. Las fórmulas de liberación controlada también incluyen parches.

En determinadas realizaciones, los compuestos descritos en la presente pueden formularse para administración al sistema nervioso central (SNC) (revisado en Begley, *Pharmacology & Therapeutics* 104: 29-45 (2004)). Los planteamientos convencionales para administración de fármacos al SNC incluyen: estrategias neuroquirúrgicas (por ejemplo inyección intracerebral o infusión intracerebroventricular); manipulación molecular del agente (por ejemplo, producción de una proteína de fusión quimérica que comprenda un péptido de transporte que tiene afinidad por una molécula superficial de células endoteliales en combinación con un agente que es por sí mismo incapaz de cruzar la BHE) en un intento de explotar una de las rutas de transporte endógenas de la BHE; estrategias farmacológicas diseñadas para aumentar la solubilidad en lípidos de un agente (por ejemplo, la conjugación de agentes solubles en agua a vehículos lipídicos o de colesterol); y la interrupción transitoria de la integridad de la BHE por ruptura hiperosmótica (resultante de la infusión de una solución de manitol dentro de la arteria carótida o del uso de un agente biológicamente activo tal como un péptido de angiotensina).

Los liposomas son otro sistema de administración de fármacos que es fácilmente inyectable. Por consiguiente, también se pueden administrar los compuestos activos en forma de un sistema de administración liposómico. Una persona experta en la técnica conoce bien los liposomas. Los liposomas pueden estar formados por una diversidad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas. Los liposomas útiles para los métodos de la presente invención abarcan todos los tipos de liposomas, incluidos sin limitación vesículas unilaminares pequeñas, vesículas unilaminares grandes y vesículas multilaminares.

Otro modo de producir una formulación, en particular una solución, de un modulador de sirtuina tal como resveratrol o un derivado del mismo, es a través del uso de ciclodextrina. Se entiende por ciclodextrina la α -, β - o γ -ciclodextrina. Se describen con detalle ciclodextrinas en Pitha *et al.*, patente de EE.UU. n° 4.727.064, que se incorpora en la presente memoria por referencia. Las ciclodextrinas son oligómeros cíclicos de glucosa; estos compuestos forman complejos de inclusión con cualquier fármaco cuya molécula pueda encajar dentro de las cavidades buscadoras de lipófilos de la molécula de ciclodextrina.

Las formas de dosificación de rápida desintegración o disolución son útiles para la absorción, en particular absorción bucal y sublingual, rápida de agentes farmacéuticamente activos. Las formas de dosificación de rápida fusión son beneficiosas para pacientes, tales como pacientes de edad avanzada y pediátricos, que tengan dificultad para deglutir las formas de dosificación sólidas típicas, como comprimidos oblongos y comprimidos. Además, las formas de dosificación de rápida fusión sortean los inconvenientes asociados con, por ejemplo, las formas de dosificación masticables, en donde el plazo de tiempo durante el cual permanece en la boca del paciente un agente activo influye de manera importante en determinar la cantidad enmascaramiento del sabor y el grado con que puede quejarse el paciente de la amargura del agente activo en la garganta.

Las composiciones farmacéuticas (incluidas las preparaciones cosméticas) pueden comprender de aproximadamente 0,00001 a 100%, por ejemplo de 0,001 a 10% o de 0,1% a 5% en peso de uno o más compuestos moduladores de sirtuina descritos en la presente memoria. En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende: (i) de 0,05 a 1.000 mg de los compuestos de la invención, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y (ii) de 0,1 a 2 gramos de uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En una realización, se incorpora un compuesto modulador de sirtuina descrito en la presente memoria en una formulación tópica que contiene un vehículo tópico que es generalmente adecuado para la administración tópica de fármacos y que comprende cualquier material de este tipo conocido en la técnica. El vehículo tópico puede seleccionarse para proporcionar la composición en la forma deseada, por ejemplo como una pomada, loción, crema, microemulsión, gel, aceite, solución o similar, y puede estar compuesto de un material tanto de origen natural como sintético. Es preferible que el vehículo seleccionado no afecte adversamente al agente activo o a otros componentes de la formulación tópica. Los ejemplos de vehículos tópicos adecuados para uso en la presente invención incluyen agua, alcoholes y otros disolventes orgánicos no tóxicos, glicerina, aceite mineral, silicona, vaselina, lanolina, ácidos grasos, aceites vegetales, parabenos, ceras y similares.

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

Se pueden incorporar compuestos moduladores de sirtuina en pomadas, que generalmente son preparaciones semisólidas que se basan típicamente en vaselina u otros derivados del petróleo. La base específica de pomada a usar, como apreciarán los expertos en la técnica, es una que proporcione óptima administración del fármaco y, preferiblemente, proporcione también otras características deseadas, por ejemplo emolencia o similares. Al igual que en otros vehículos, una base de pomada debe ser inerte, estable, no irritante y no sensibilizante.

Se pueden incorporar compuestos moduladores de sirtuina en lociones, que generalmente son preparaciones para aplicar sin fricción a la superficie de la piel, y son típicamente preparaciones líquidas o semilíquidas en las cuales están presentes partículas sólidas, incluido el agente activo, en una base de agua o alcohol. Las lociones son usualmente suspensiones de sólidos, y pueden comprender una emulsión aceitosa líquida del tipo de aceite en agua.

Se pueden incorporar compuestos moduladores de sirtuina en cremas, que generalmente son emulsiones líquidas viscosas o semisólidas, ya sea de aceite en agua o de agua en aceite. Las bases de crema son lavables con agua, y

- 5 contienen una fase oleosa, un emulsionante y una fase acuosa. La fase oleosa comprende generalmente vaselina y un alcohol graso tal como alcohol cetílico o estearílico; usualmente, aunque no necesariamente, la fase acuosa excede en volumen a la fase oleosa, y generalmente contiene un humectante. El emulsionante en una formulación de crema, tal como se explica en Remington's, *supra*, es generalmente un tensioactivo no iónico, aniónico, catiónico o anfótero.
- Se pueden incorporar compuestos moduladores de sirtuina en microemulsiones, que generalmente son dispersiones termodinámicamente estables e isotrópicamente transparentes de dos líquidos inmiscibles, tales como aceite y agua, estabilizados por una película interfacial de moléculas de tensioactivo (Enciclopedia of Pharmaceutical Technology (New York: Marcel Dekker, 1992), volumen 9).
- 10 Se pueden incorporar compuestos moduladores de sirtuina en formulaciones en gel, que generalmente son sistemas semisólidos que consisten, o bien en suspensiones formadas por pequeñas partículas inorgánicas (sistemas bifásicos), o bien en moléculas orgánicas de mayor tamaño distribuidas de manera sustancialmente uniforme en el seno de un líquido vehiculante (geles monofásicos). Si bien los geles emplean por lo común líquidos vehiculantes acuosos, también se pueden emplear como líquido vehiculante alcoholes y aceites.
- 15 También pueden incluirse en las formulaciones otros agentes activos, por ejemplo otros agentes antiinflamatorios, analgésicos, agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos, antibióticos, vitaminas, antioxidantes y agentes bloqueadores solares comúnmente encontrados en formulaciones de protección solar, incluidos sin limitación antranilatos, benzofenonas (en particular benzofenona-3), derivados de alcanfor, cinamatos (por ejemplo, metoxicinamato de octilo), dibenzoilmetanos (por ejemplo, butilmetoxidibenzoilmetano), ácido p-aminobenzoico (PABA) y derivados de los mismos, y salicilatos (por ejemplo, salicilato de octilo).
- 20 En determinadas formulaciones tópicas, el agente activo está presente en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,25% en peso a 75% en peso de la formulación, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,25% en peso a 30% en peso de la formulación, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,5% en peso a 15% en peso de la formulación, y lo más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1.0% en peso a 10% en peso de la formulación.
- 25 Las afecciones oculares pueden tratarse o prevenirse mediante, por ejemplo, inyección sistémica, tópica o intraocular de un compuesto modulador de sirtuina, o mediante inserción de un dispositivo de liberación sostenida que libere un compuesto modulador de sirtuina. Se puede suministrar un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable, de manera que se mantenga en contacto el compuesto con la superficie ocular por un período de tiempo suficiente para permitir que el compuesto penetre en la córnea y las regiones internas del ojo, como por ejemplo la cámara anterior, cámara posterior, cuerpo vítreo, humor acuoso, humor vítreo, córnea, iris/surco ciliar, cristalino, coroides/retina y esclerótica. El vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, una pomada, un aceite vegetal o un material encapsulante. Como alternativa, se pueden inyectar los compuestos de la invención directamente en los humores vítreo y acuoso. En otra alternativa, se pueden administrar sistémicamente los compuestos, por ejemplo mediante infusión o inyección intravenosa, para el tratamiento del ojo.
- 30 Se pueden conservar compuestos moduladores de sirtuina descritos en la presente memoria en un entorno exento de oxígeno. Por ejemplo, se puede preparar resveratrol o análogo del mismo en una cápsula estanca al aire para administración oral, tal como Capsugel de Pfizer, Inc.
- 40 Se pueden administrar células, por ejemplo tratadas *ex vivo* con un compuesto modulador de sirtuina, de acuerdo con métodos para administrar un injerto a un sujeto, lo cual puede ir acompañado, por ejemplo, de la administración de un fármaco inmunosupresor, por ejemplo ciclosporina A. En cuanto a principios generales en la formulación de medicinas, se remite al lector a Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, compilado por G. Morstyn y W. Sheridan, Cambridge University Press, 1996; y Hematopoietic Stem Cell Therapy, E. D. Ball, J. Lister y P. Law, Churchill Livingstone, 2000.
- 45 Se pueden determinar la toxicidad y la eficacia terapéutica de compuestos moduladores de sirtuina mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales. La DL_{50} es la dosis letal para 50% de la población. La DE_{50} es la dosis terapéuticamente eficaz en 50% de la población. El cociente de dosis entre los efectos tóxicos y los terapéuticos (DL_{50}/DE_{50}) es el índice terapéutico. Se prefieren compuestos moduladores de sirtuina que manifiestan grandes índices terapéuticos. Aunque se pueden usar compuestos moduladores de sirtuina que manifiesten efectos secundarios tóxicos, debe prestarse atención a diseñar un sistema de administración que dirija dichos compuestos al sitio de tejido afectado, con el fin de minimizar el daño potencial a células no infectadas y, así, reducir los efectos secundarios.
- 50 Se pueden emplear los datos obtenidos de los ensayos con cultivo celular y estudios en animales para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosis de dichos compuestos puede situarse dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyan la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo, dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos en cultivos
- 55

celulares. Se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración plasmática circulante que incluya la CI_{50} (es decir, la concentración del compuesto de prueba que consigue la inhibición mitad de la máxima de los síntomas) según lo determinado en cultivos celulares. Se puede emplear esta información para determinar de manera más precisa las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de altas prestaciones.

6. Kits

También se proporcionan en la presente memoria kits, por ejemplo kits para fines terapéuticos o kits para modular la duración de vida de las células o para modular la apoptosis. Un kit puede comprender uno o más compuestos moduladores de sirtuina, por ejemplo en dosis previamente medidas. Un kit puede comprender opcionalmente dispositivos para poner en contacto células con los compuestos, e instrucciones de uso. Los dispositivos incluyen jeringas, estents y otros dispositivos para introducir un compuesto modulador de sirtuina en un sujeto (por ejemplo, el vaso sanguíneo de un sujeto) o aplicarlo a la piel de un sujeto.

En otra realización más, la invención proporciona una composición material que comprende un modulador de sirtuina de esta invención y otro agente terapéutico (los mismos usados en las terapias combinadas y composiciones combinadas) en formas farmacéuticas separadas, pero asociadas entre sí. La expresión "asociadas entre sí", tal como se usa en la presente memoria, significa que se envasan juntas las formas farmacéuticas o bien se unen entre sí de alguna forma, de modo que sea fácilmente visible que está previsto que las formas farmacéuticas separadas se comercialicen y se administren como parte del mismo régimen. Preferiblemente, se envasan juntos el agente y el modulador de sirtuina en un envase de tipo blíster u otro envase multicámara, o bien como recipientes conectados, obturados por separado (tales como bolsas de lámina o similares) que el usuario puede separar (por ejemplo desgarrando por líneas de corte entre los dos envases).

Incluso en otra realización, la invención proporciona un kit que comprende, en recipientes separados, a) un modulador de sirtuina de esta invención y b) otro agente terapéutico tal como los descritos en otro lugar en esta memoria descriptiva.

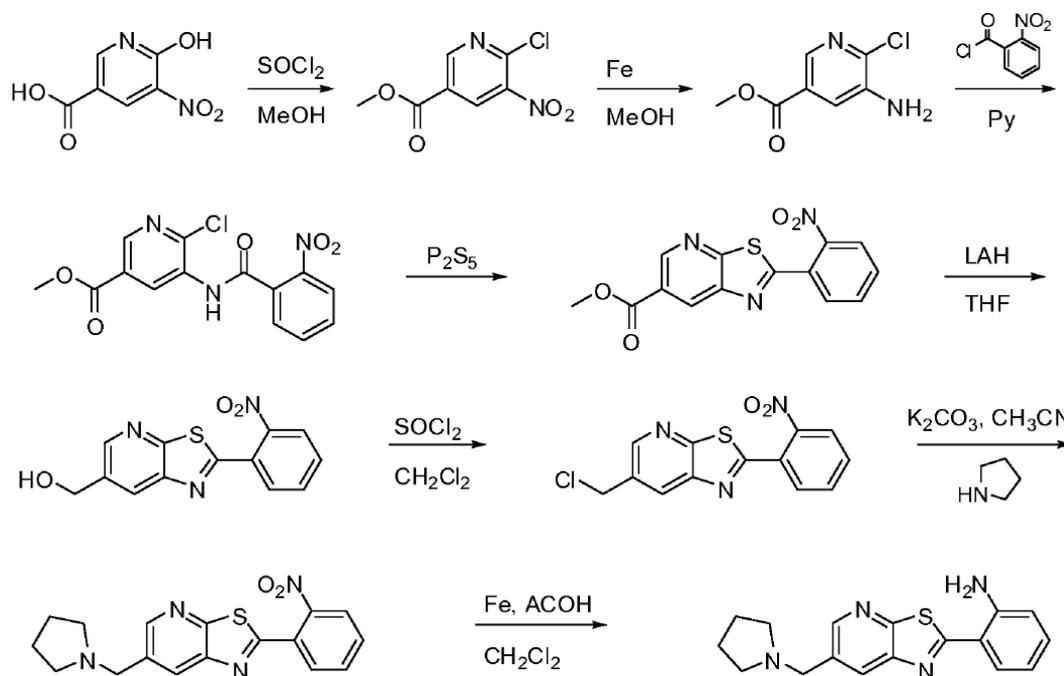
La práctica de los presentes métodos empleará, salvo que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de la pericia en la técnica. Dichas técnicas se explican por completo en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2ª ed., compilado por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); *DNA Cloning*, volúmenes I y II (compilado por D. N. Glover, 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (compilado por M. J. Gait, 1984); Mullis *et al.*, patente de EE.UU. nº 4.683.195; *Nucleic Acid Hybridization* (compilado por B. D. Hames y S. J. Higgins, 1984); *Transcription and Translation* (compilado por B. D. Hames y S. J. Higgins, 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); el tratado *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (compilado por J. H. Miller y M. P. Calos, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods In Enzymology*, volúmenes 154 y 155 (compilado por Wu *et al.*), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (compilado por Mayer y Walker, Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, volúmenes I-IV (compilado por D. M. Weir y C. C. Blackwell, 1986); *Manipulating the Mouse Embryo* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

Ejemplos

Una vez descrita en general la invención, será más fácilmente entendida con referencia a los siguientes ejemplos que se incluyen meramente con fines de ilustración de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención, y no se pretende que limiten en modo alguno la invención.

Ejemplo 1. Preparación de compuestos moduladores de sirtuina y precursores de los mismos

Preparación de 2-(6-(pirrolidin-1-ilmetil)tiазоло[5,4-*b*]piridin-2-il)anilina:

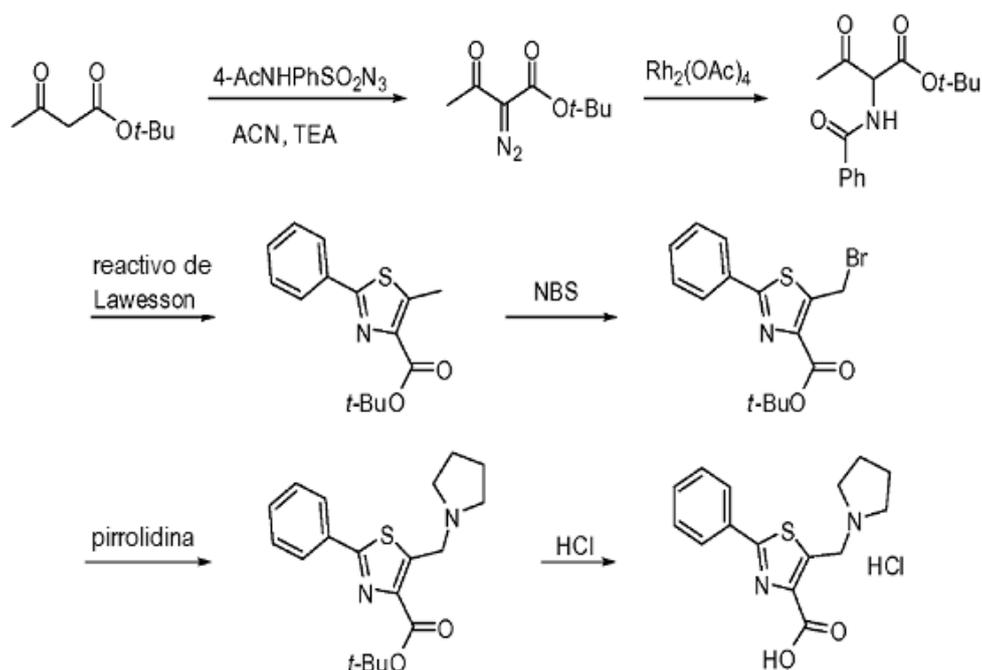


- 5 Se añadió DMF (0,15 equiv.) a una disolución de ácido 6-hidroxi-5-nitronicotínico (1 equiv.) en SOCl_2 (4,7 equiv.). Se calentó a reflujo la mezcla durante 8 horas y después se concentró en vacío. Se tomó en CH_2Cl_2 el residuo, se enfrió a -40°C , y se añadió MeOH (1,4 equiv.) mientras se mantenía la temperatura interna por debajo de -30°C . Se añadió NaHCO_3 acuoso (1 equiv.) y se dejó calentar la mezcla hasta la temperatura ambiente. Se separó la fase orgánica, y se concentró en vacío. Se cristalizó en EtOH el residuo crudo para proporcionar 6-cloro-5-nitronicotinato de metilo (90% de rendimiento).
- 10 Se calentó a 75°C durante 2 horas una suspensión de 6-cloro-5-nitronicotinato de metilo (1 equiv.), hierro en polvo (5,2 equiv.) y NH_4Cl_3 (5,3 equiv.) en MeOH. Se hizo pasar en caliente la mezcla a través de una torta de Celite, y se concentró en vacío para proporcionar 5-amino-6-cloronicotinato de metilo (56% de rendimiento).
- 15 Se añadió piridina (1,1 equiv.) a una disolución de 5-amino-6-cloronicotinato de metilo (1 equiv.) y cloruro de 2-nitrobenzoílo (1,2 equiv.) en CH_2Cl_2 . Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 10 horas y se concentró en vacío. Se añadió H_2O y se recuperó por filtración el sólido resultante, se enjuagó con CH_2Cl_2 y se secó para proporcionar 6-cloro-5-(2-nitrobenzamido)nicotinato de metilo (73% de rendimiento).
- 20 Se calentó a 130°C durante 2 horas una mezcla de 6-cloro-5-(2-nitrobenzamido)nicotinato de metilo (1 equiv.), P_2S_5 (2,1 equiv.) y piridina (7,6 equiv.) en p-xileno. Se decantó el líquido transparente y se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente. Se recuperó por filtración el precipitado resultante y se secó para proporcionar 2-(2-nitrofenil)tiазоло[5,4-*b*]piridin-6-carboxilato de metilo (57% de rendimiento).
- 25 Se añadió una disolución de 2-(2-nitrofenil)tiазоло[5,4-*b*]piridin-6-carboxilato de metilo (1 equiv.) en THF, en el transcurso de 8 horas, a una mezcla hidruro de litio y aluminio (LAH) (4,4 equiv.) en THF, manteniendo la temperatura interna en -55°C . Se agitó la mezcla de reacción durante 4 horas más a -60°C . Se añadió acetona (18 equiv.) seguida de Na_2SO_3 acuoso saturado. Se eliminaron por filtración los sólidos resultantes, y se enjuagaron con THF. Se concentraron en vacío las fracciones orgánicas combinadas y se cristalizó en CH_2Cl_2 el residuo crudo para proporcionar (2-(2-nitrofenil)tiазоло[5,4-*b*]piridin-6-il)metanol (50% de rendimiento).
- 30 Se añadió lentamente cloruro de tionilo (3,1 moles, 227 mL) a una suspensión, a temperatura ambiente, de (2-(2-nitrofenil)tiазоло[5,4-*b*]piridin-6-il)metanol (0,62 moles, 180 g) en CH_2Cl_2 (1,8 L). Se añadió DMF (5 mL) y la reacción se volvió homogénea. Se agitó la reacción durante 1 hora, y después se concentró bajo presión reducida. Se disolvió en CH_2Cl_2 (150 mL) el producto crudo, y se concentró bajo presión reducida. Se lavó con hexano (200 mL x 3) el producto crudo, y se secó en vacío durante 16 horas para proporcionar 6-(clorometil)-2-(2-nitrofenil)tiазоло[5,4-*b*]piridina en forma de un sólido de color bronce (180 g, 94% de rendimiento).
- Se añadió pirrolidina (2,8 moles, 203 g) y K_2CO_3 (2,8 moles, 395 g) a una suspensión de 6-(clorometil)-2-(2-nitrofenil)tiазоло[5,4-*b*]piridina (0,52 moles, 175 g) en CH_3CN (1,7 L). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura

ambiente durante 16 horas. Se añadió H₂O (1 L) y se agitó la mezcla durante 30 minutos. Se eliminó en vacío el CH₃CN y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 1,5 L) la mezcla resultante. Se lavaron con salmuera las fracciones orgánicas combinadas, se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron en vacío para proporcionar 2-(2-nitrofenil)-6-(pirrolidin-1-ilmetil)tiazol[5,4-b]piridina como un aceite oscuro (150 g, 76% de rendimiento).

- 5 Se añadió hierro en polvo (55 mmol, 3,1 g) a una disolución de 2-(2-nitrofenil)-6-(pirrolidin-1-ilmetil)tiazol[5,4-b]piridina (11,1 mmol, 3,8 g) en CH₂Cl₂ (100 mL), seguido de ácido acético (10 mL). Se calentó a reflujo durante 3 horas la mezcla de reacción y después se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió en porciones Na₂CO₃ (14 g). Se hizo pasar la mezcla a través de una torta de Celite y se enjuagó con CH₂Cl₂. Se lavaron con Na₂CO₃ (3 x 20 mL) los filtrados combinados, se secaron (MgSO₄) y se concentraron bajo presión reducida para proporcionar 2-(6-(pirrolidin-1-ilmetil)tiazol[5,4-b]piridin-2-il)anilina (3,4 g, 98% de rendimiento) en forma de un sólido amarillo.

Preparación de hidrocloreto de ácido 2-fenil-5-(pirrolidin-1-ilmetil)tiazol-4-carboxílico



- 15 Se añadió 4-acetamidobencenosulfonilazida (1,5 mL) a una solución de 3-oxobutanoato de *tert*.-butilo (1,86 g, 10,12 mmol) y TEA (3,85 mL) en CH₃CN (60 mL). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante una noche, se concentró y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida ("flash", en inglés) para proporcionar 2-diazo-3-oxobutanoato de *tert*.-butilo en forma de un líquido amarillo (1,3 g, 77% de rendimiento).

- 20 Se añadió una disolución de 2-diazo-3-oxobutanoato de *tert*.-butilo (13,1 g, 71,7 mmol) en 1,2-dicloroetano, en el transcurso de 12 horas, a una disolución a reflujo de benzamida (6,16 g, 50,8 mmol) y tetraacetato de dirrodio (786 mg, 1,78 mmol) en 1,2-dicloroetano (75 mL). Se evaporó en vacío la mezcla y se purificó por cromatografía ultrarrápida para proporcionar 2-benzamido-3-oxobutanoato de *tert*.-butilo en forma de un sólido blanco (6,97 g, 51% de rendimiento).

- 25 Se calentó a reflujo durante 6 horas una disolución de 2-benzamido-3-oxobutanoato de *tert*.-butilo (842 mg, 3,04 mmol) y 2,4-disulfuro de 2,4-bis(4-metoxifenil)-1,3,2,4-ditiadifosfetano (reactivo de Lawesson) (1,88 g, 6,07 mmol) en THF (20 mL). Se evaporó en vacío la mezcla y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida para proporcionar 5-metil-2-feniltiazol-4-carboxilato de *tert*.-butilo en forma de un sólido amarillo (520 mg, 62% de rendimiento).

- 30 Se calentó a reflujo durante 16 horas una disolución de 5-metil-2-feniltiazol-4-carboxilato de *tert*.-butilo (1,0 g, 3,64 mmol), N-bromosuccinimida (NBS) (0,65 g, 3,64 mmol) y peróxido de benzoilo (BPO) (5,5 mg, 0,023 mmol) en CCl₄ (30 mL). Se concentró en vacío la mezcla de reacción y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida para proporcionar 5-(bromometil)-2-feniltiazol-4-carboxilato de *tert*.-butilo en forma de un sólido de color amarillo claro (0,96 g, 75% de rendimiento).

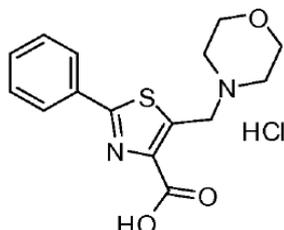
Se añadió pirrolidina (0,5 mL) a una disolución de 5-(bromometil)-2-feniltiazol-4-carboxilato de *tert*.-butilo (1,029 g, 2,90 mmol) y diisopropiletilamina (DIPEA) (1,5 mL) en CH₂Cl₂ (10 mL). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos, se concentró en vacío y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida para proporcionar 2-fenil-5-(pirrolidin-1-ilmetil)tiazol-4-carboxilato de *tert*.-butilo en forma de un sólido amarillo (920 mg, 98% de

rendimiento).

Se añadió HCl concentrado (2,8 mL, 33,9 mmol) a una disolución de 2-fenil-5-(pirrolidin-1-ilmetil)tiazol-4-carboxilato de *tert.*-butilo (2,1 g, 6,1 mmol) en THF (30 mL). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante una noche y se concentró en vacío para proporcionar hidrocloreto de 2-fenil-5-(pirrolidin-1-ilmetil)tiazol-4-carboxilato (1,5 g, 82% de rendimiento).

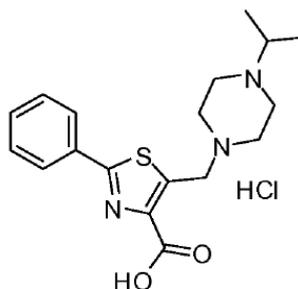
5

Preparación de hidrocloreto de ácido 5-(morfolinometil)-2-feniltiazol-4-carboxílico:



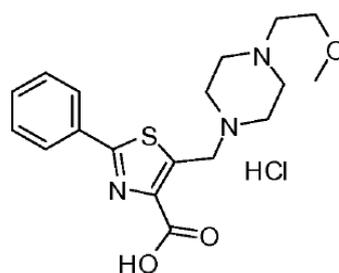
Se preparó el compuesto del título por el procedimiento descrito para el ácido 2-fenil-5-(pirrolidin-1-ilmetil)tiazol-4-carboxílico, reemplazando pirrolidina por morfolina, con 52% de rendimiento.

10 Preparación de hidrocloreto de ácido 5-((4-isopropilpiperazin-1-il)metil)-2-feniltiazol-4-carboxílico:



Se preparó el compuesto del título por el procedimiento descrito para el ácido 2-fenil-5-(pirrolidin-1-ilmetil)tiazol-4-carboxílico, reemplazando pirrolidina por 4-(*i*-propil)piperazina, con 80% de rendimiento.

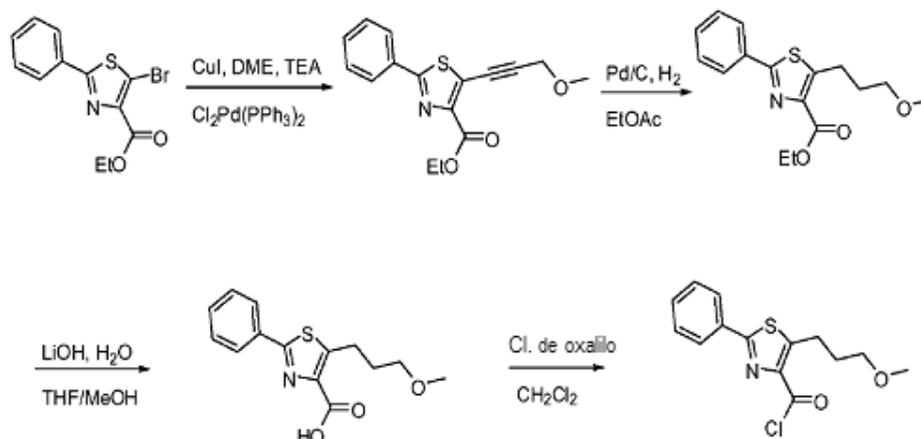
Preparación de hidrocloreto de ácido 5-((4-(2-metoxietil)piperazin-1-il)metil)-2-feniltiazol-4-carboxílico:



15

Se preparó el compuesto del título por el procedimiento descrito para el ácido 2-fenil-5-(pirrolidin-1-ilmetil)tiazol-4-carboxílico, reemplazando pirrolidina por morfolina, con 49% de rendimiento.

Preparación de cloruro de 5-(3-metoxipropil)-2-feniltiazol-4-carbonilo:



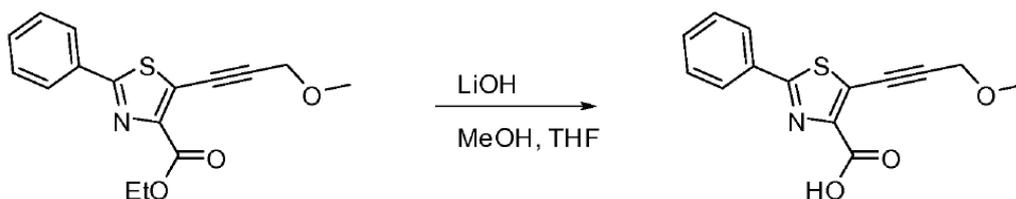
Se hizo burbujear nitrógeno a través de una disolución de 5-bromo-2-feniltiazol-4-carboxilato de etilo (13,1 g, 41,9 mmol) y éter metilpropargílico (7,1 mL, 83,9 mmol) en dimetoxietano (DME) (200 mL). Se añadieron diclorobis(trifenilfosfina)paladio(II) (1,47 g, 2,2 mmol), yoduro de cobre(I) (0,2 g, 1,1 mmol) y TEA (29 mL, 210 mmol), y se calentó a reflujo la mezcla de reacción durante 16 horas. Se enfrió hasta la temperatura ambiente la mezcla de reacción, se vertió en H₂O (200 mL) y se extrajo con EtOAc (2 x 200 mL). Se lavaron con salmuera las fracciones orgánicas combinadas, se secaron (MgSO₄), y se concentraron. Se purificó mediante MPLC el producto crudo, eluyendo con pentano/EtOAc (gradiente de 0-50%), para proporcionar 5-(3-metoxiprop-1-inil)-2-feniltiazol-4-carboxilato de etilo en forma de un sólido de color bronce (11 g, 88% de rendimiento).

Se disolvió 5-(3-metoxiprop-1-inil)-2-feniltiazol-4-carboxilato de etilo (26,1 g, 86,6 mmol) en EtOAc (350 mL) y se hidrogenó bajo presión de globo durante cuatro días hasta que la LCMS indicó la reducción completa de la insaturación. En el día tres se eliminó el catalizador por filtración, se añadió catalizador fresco y se sometió nuevamente la mezcla a hidrogenación con presión de globo. Se eliminó el catalizador por filtración a través de una torta de Celite. Se enjuagó con EtOAc la torta del filtro y se concentró hasta sequedad el filtrado. Se purificó por MPLC el producto crudo, eluyendo con pentano/EtOAc, para proporcionar 5-(3-metoxipropil)-2-feniltiazol-4-carboxilato de etilo (23,2 g, 88% de rendimiento).

Se disolvió 5-(3-metoxipropil)-2-feniltiazol-4-carboxilato de etilo (26,3 g, 76,1 mmol) en THF/MeOH (1:1, 300 mL) y se añadió una disolución de LiOH (3,6 g, 152 mmol) en H₂O (75 mL). Se agitó la reacción durante ~ 5 horas y se ajustó el pH a ~ 3 mediante la adición de HCl 3N. Se vertió la mezcla en salmuera y se extrajo con EtOAc. Se lavaron con salmuera las fracciones orgánicas combinadas, se secaron (MgSO₄) y se concentraron para proporcionar ácido 5-(3-metoxipropil)-2-feniltiazol-4-carboxílico (21 g, 99% de rendimiento) en forma de un sólido de color bronce.

Se añadió lentamente cloruro de oxalilo (67,2 mmol, 5,9 mL), a temperatura ambiente, a una disolución de 5-(3-metoxipropil)-2-feniltiazol-4-carboxilato (22,4 mmol, 6,2 g) en CH₂Cl₂ (100 mL). Se añadieron 3 gotas de DMF y la reacción se volvió homogénea en el transcurso de ~ 20 minutos. Se agitó la reacción durante 3 horas, y después se concentró bajo presión reducida. Se disolvió en CH₂Cl₂ (150 mL) el producto crudo, y se concentró bajo presión reducida. Se disolvió en EtOAc (150 mL) el producto crudo, se lavó con salmuera (2 x 100 mL), se secó (MgSO₄), y se concentró bajo presión reducida para proporcionar cloruro de 5-(3-metoxipropil)-2-feniltiazol-4-carbonilo en forma de un sólido de color bronce (6,6 g, 99% de rendimiento).

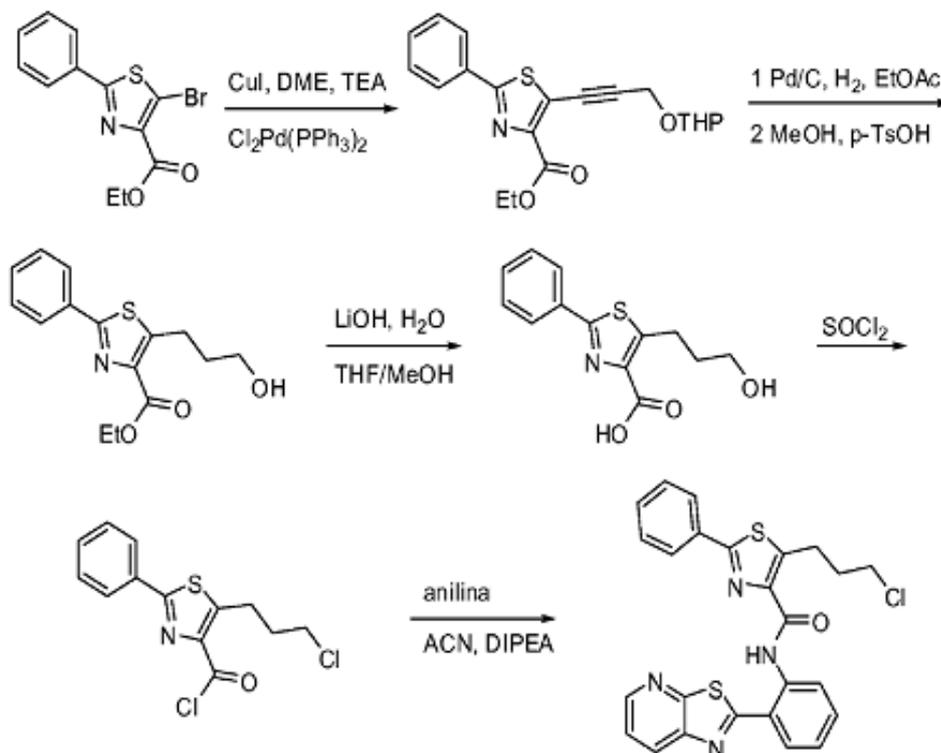
Preparación de ácido 5-(3-metoxiprop-1-inil)-2-feniltiazol-4-carboxílico:



Se disolvió 5-(3-metoxiprop-1-inil)-2-feniltiazol-4-carboxilato de etilo (701 mg, 2,3 mmol) en THF/MeOH (1:1, 40 mL) y se añadió una disolución de LiOH (167 mg, 7,0 mmol) en H₂O (10 mL). Se agitó la reacción durante ~ 16 horas y se ajustó el pH a ~ 3 mediante la adición de HCl 3N. Se vertió la mezcla en salmuera y se extrajo con EtOAc. Se lavaron con salmuera las fracciones orgánicas combinadas, se secaron (MgSO₄) y se concentraron para proporcionar ácido 5-(3-metoxiprop-1-inil)-2-feniltiazol-4-carboxílico (636 mg, 99% de rendimiento) en forma de un

sólido de color bronce.

Método de referencia: Preparación de 5-(3-cloropropil)-2-fenil-N-(2-(tiazolo[5,4-b]piridin-2-il)fenil)tiazol-4-carboxamida:



- 5 Se hizo burbujear nitrógeno a través de una disolución de 5-bromo-2-feniltiazol-4-carboxilato de etilo (3,6 g, 11,5 mmol) y 2-(prop-2-iniloxtetrahidro-2H-pirano) (3,3 mL, 23,1 mmol) en THF (30 mL). Se añadieron diclorobis(trifenilfosfina)paladio(II) (405 mg, 0,6 mmol), yoduro de cobre(I) (55 mg, 0,3 mmol) y trietilamina (TEA) (8 mL, 57,7 mmol) y se calentó la mezcla de reacción a 100°C durante 30 minutos en un reactor de microondas. Se vertió en H₂O la mezcla de reacción y se extrajo con EtOAc. Se lavaron con salmuera las fracciones orgánicas combinadas, se secaron (MgSO₄) y se concentraron. Se purificó mediante MPLC el producto crudo, eluyendo con pentano/EtOAc (gradiente de 0-50%) para proporcionar 2-fenil-5-(3-(tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)prop-1-inil)tiazol-4-carboxilato de etilo (3,8 g, 88% de rendimiento).

- 15 Se disolvió 2-fenil-5-(3-(tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)prop-1-inil)tiazol-4-carboxilato de etilo (3,8 g, 10,1 mmol) en MeOH/THF (1:1, 60 mL) y se hidrogenó bajo presión de globo durante cuatro días hasta que la LCMS indicó la reducción completa de la insaturación. En el día tres se eliminó el catalizador por filtración, se añadió catalizador fresco y se sometió nuevamente la mezcla a hidrogenación con presión de globo. Se eliminó el catalizador por filtración a través de una torta de Celite. Se enjuagó con EtOAc la torta del filtro y se concentró hasta sequedad el filtrado. Se disolvió en MeOH el producto crudo. Se añadió ácido p-toluenosulfónico (p-TsOH) (0,15 equiv.) y se agitó la mezcla de reacción durante 16 horas y después se concentró hasta sequedad. Se tomó en EtOAc el residuo crudo, se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado y con salmuera, se secó y se concentró. Se purificó mediante MPLC el producto crudo, eluyendo con pentano/EtOAc (gradiente de 0-100%) para proporcionar una mezcla (1,9 g) de ésteres etílico y metílico del producto esperado.

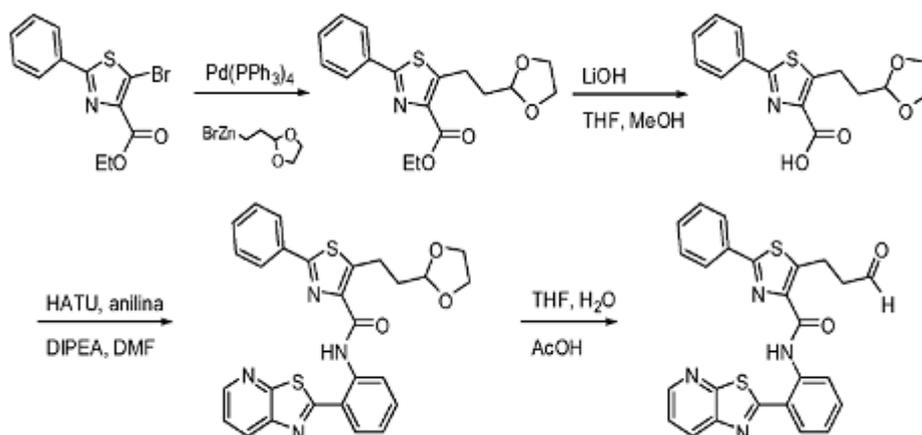
- 25 Se disolvió en THF/MeOH (1:1, 30 mL) la mezcla de producto de más arriba (1,9 g) y se añadió una disolución de LiOH (313 mg, 13 mmol) en H₂O (15 mL). Se agitó la reacción durante ~ 5 h y se ajustó el pH a ~ 3 mediante la adición de HCl 3N. Se vertió en salmuera la mezcla y se extrajo con EtOAc. Se lavaron con salmuera las fracciones orgánicas combinadas, se secaron (MgSO₄) y se concentraron para proporcionar ácido 5-(3-hidroxipropil)-2-feniltiazol-4-carboxílico (1,7 g).

- 30 Se calentó a reflujo durante 16 horas una mezcla de ácido 5-(3-hidroxipropil)-2-feniltiazol-4-carboxílico (850 mg, 3,2 mmol) y LiCl (3,2 mmol) en cloruro de tionilo (10 mL), y después se concentró hasta sequedad. Se disolvió en EtOAc el producto crudo, se lavó con salmuera, se secó (MgSO₄) y se concentró bajo presión reducida para proporcionar cloruro de 5-(3-cloropropil)-2-feniltiazol-4-carbonilo (906 mg, 99% de rendimiento).

Se agitó durante 16 horas una suspensión de cloruro de 5-(3-cloropropil)-2-feniltiazol-4-carbonilo (906 mg, 3,2 mmol), DIPEA (1,1 mL, 6,4 mmol) y 2-(tiazolo[5,4-b]piridin-2-il)anilina (585 mg, 2,6 mmol) en CH₃CN (12 mL). Se

recuperó por filtración el precipitado resultante, se enjuagó con CH₃CN y se secó. Se purificó mediante MPLC el producto crudo, eluyendo con DCM/MeOH (gradiente de 0-5%) para proporcionar 5-(3-cloropropil)-2-fenil-N-(2-(tiazolo[5,4-b]piridin-2-il)fenil)tiazol-4-carboxamida (316 mg, 26% de rendimiento).

Método de referencia: Preparación de 5-(3-oxopropil)-2-fenil-N-(2-(tiazolo[5,4-b]piridin-2-il)fenil)tiazol-4-carboxamida:



5

Se añadió una disolución de bromuro de (2-(1,3-dioxolan-2-il)etil)cinc(II) (35 mL, 17,3 mmol) en THF a una disolución desgasificada de 5-bromo-2-feniltiazol-4-carboxilato de etilo (3,6 g, 11,5 mmol) y tetraquitrifenilfosfina-paladio (666 mg, 0,58 mmol) en THF (20 mL). Se calentó a reflujo la mezcla de reacción durante 16 horas y después se vertió en NaHCO₃ acuoso saturado. Se extrajo con EtOAc la mezcla, se lavó con salmuera, se secó (MgSO₄) y se concentró. Se purificó mediante MPLC el producto crudo, eluyendo con pentano/EtOAc (gradiente de 0-100%) para proporcionar 5-(2-(1,3-dioxolan-2-il)etil)-2-feniltiazol-4-carboxilato de etilo (2,0 g, 52% de rendimiento).

10

Se disolvió 5-(2-(1,3-dioxolan-2-il)etil)-2-feniltiazol-4-carboxilato de etilo (2,6 g, 7,9 mmol) en MeOH/THF (1:1, 60 mL) y se añadió una disolución de LiOH (378 mg, 15,7 mmol) en H₂O (15 mL). Se agitó la reacción durante ~ 5 h y se ajustó el pH a ~ 3 mediante la adición de HCl 3N. Se vertió en salmuera la mezcla, y se extrajo con EtOAc. Se lavaron con salmuera las fracciones orgánicas combinadas, se secaron (MgSO₄) y se concentraron. Se cristalizó en EtOAc el producto crudo para proporcionar ácido 5-(2-(1,3-dioxolan-2-il)etil)-2-feniltiazol-4-carboxílico (1,8 g, 75% de rendimiento).

15

Se añadió hexafluorofosfato metanamino de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU) (669 mg, 1,8 mmol) a una disolución de ácido 5-(2-(1,3-dioxolan-2-il)etil)-2-feniltiazol-4-carboxílico (504 mg, 1,7 mmol), DIPEA (613 µL, 3,5 mmol) y 2-(tiazolo[5,4-b]piridin-2-il)anilina (250 mg, 1,1 mmol) en DMF (7 mL). Se agitó la mezcla de reacción durante 16 horas, se vertió en NaHCO₃ acuoso saturado, y se extrajo con EtOAc. Se lavaron con salmuera las fracciones orgánicas, se secaron y se concentraron. Se cristalizó en EtOH el producto crudo para proporcionar 5-(2-(1,3-dioxolan-2-il)etil)-2-fenil-N-(2-(tiazolo[5,4-b]piridin-2-il)fenil)tiazol-4-carboxamida (372 mg, 66% de rendimiento).

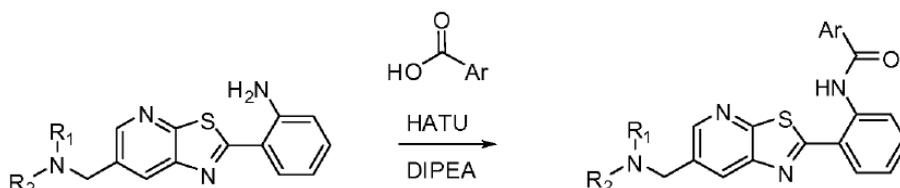
20

Se disolvió 5-(2-(1,3-dioxolan-2-il)etil)-2-fenil-N-(2-(tiazolo[5,4-b]piridin-2-il)fenil)tiazol-4-carboxamida (250 mg, 0,5 mmol) en una mezcla de THF (4 mL), AcOH (8 mL) y H₂O (0,5 mL), se calentó a reflujo durante 16 horas, y después se concentró hasta sequedad. Se disolvió en EtOAc el residuo, se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado, se secó (MgSO₄) y se concentró bajo presión reducida. Se purificó mediante MPLC el producto crudo, eluyendo con CH₂Cl₂/MeOH (gradiente de 0-5%) para proporcionar 5-(3-oxopropil)-2-fenil-N-(2-(tiazolo[5,4-b]piridin-2-il)fenil)tiazol-4-carboxamida (200 mg, 87% de rendimiento).

25

30

Método general A para la síntesis de amidas:



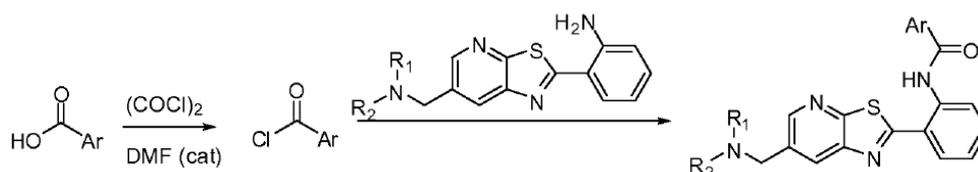
Se agitó a temperatura ambiente una mezcla de anilina (1 equiv.), ácido carboxílico (de 1 a 1,5 equiv.), HATU (1,5 equiv.) y DIPEA (2,0 equiv.) en un disolvente adecuado (es decir DMF) durante 18 horas. Se añadió agua a la mezcla de reacción para precipitar el producto.

35

Tratamiento 1: Si el producto precipita se recupera por filtración, se lava con agua, se tritura en caliente con metanol o etanol y se seca en vacío para proporcionar la amida deseada. Posteriormente se purificaron mediante cromatografía los productos para mejorar la pureza en caso necesario.

5 Tratamiento 2: Si la solución resultante no era homogénea, se extrajo el producto con un disolvente orgánico (CH_2Cl_2 o EtOAc) se lavó con NaHCO_3 acuoso y salmuera, se secó con Na_2SO_4 y se concentró. Después se purificó mediante cromatografía el producto crudo, en caso necesario.

Método general B para la síntesis de amidas:

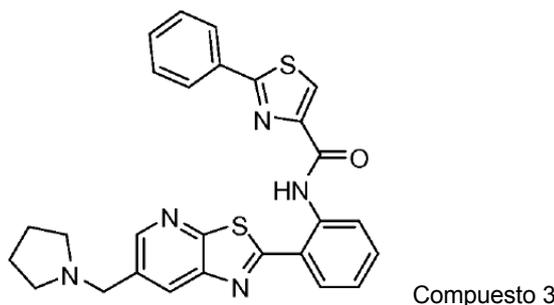


10 Se suspendió en CH_2Cl_2 el ácido carboxílico deseado (1,2-1,5 equiv.) y se trató con cloruro de oxalilo (6 equiv.) y DMF (catalítica) durante 1,5 a 18 horas para obtener una solución transparente. Se concentró la disolución hasta sequedad y se añadió una suspensión de la anilina deseada (1,0 equiv.) en piridina y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante hasta 18 horas o bien se calentó en microondas (160°C, 10 minutos). Si el producto había precipitado de la disolución, se recuperó por filtración, se coevaporó con metanol y se purificó mediante cromatografía. Si no había precipitado de la disolución, se puede concentrar hasta sequedad, triturar y después purificar mediante cromatografía.

15

También se prepararon los cloruros de ácido suspendiendo en SOCl_2 el ácido apropiado y calentando a reflujo durante varias horas. Se eliminó bajo presión reducida el exceso de SOCl_2 , y se lavó con tolueno el residuo. Se secó bajo vacío el cloruro de ácido resultante y se utilizó sin purificación adicional.

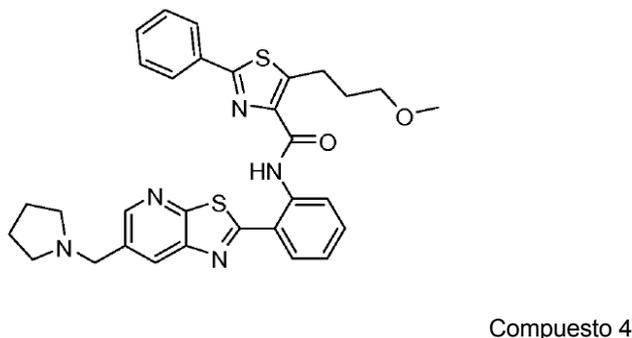
Preparación de 2-fenil-N-(2-(6-(pirrolidin-1-ilmetil)tiazol[5,4-b]piridin-2-il)fenil)tiazol-4-carboxamida:



Se preparó el compuesto del título según con el método general A de síntesis de amidas, utilizando 2-(6-(pirrolidin-1-ilmetil)tiazol[5,4-b]piridin-2-il)anilina y ácido 2-feniltiazol-4-carboxílico. Se aisló el producto por precipitación mediante la adición de agua, se trituroó con metanol caliente, se disolvió en CH_2Cl_2 , se lavó con NaHCO_3 diluido, se concentró y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de 0 a 10% de metanol en CH_2Cl_2). EM: calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{OS}_2$: 497,13. Hallado $(\text{M}+\text{H})^+$ $m/z = 498$.

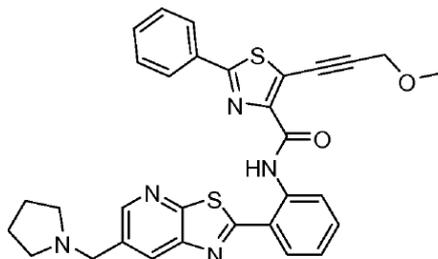
25

Preparación de 5-(3-metoxipropil)-2-fenil-N-(2-(6-(pirrolidin-1-ilmetil)tiazol[5,4-b]piridin-2-il)fenil)tiazol-4-carboxamida:



5 Se añadió cloruro de 5-(3-metoxipropil)-2-feniltiazol-4-carbonilo (19,7 g, 66,6 mmol) a una suspensión de 2-(6-(pirrolidin-1-ilmetil)tiazolo[5,4-b]piridin-2-il)anilina (18,8 g, 60,5 mmol) en acetonitrilo (300 mL). Se añadió DIPEA (24 mL, 136,3 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. Se recuperó por filtración el precipitado resultante, y se enjuagó con acetonitrilo. Se disolvió en CH_2Cl_2 (200 mL) el producto crudo, se hizo pasar a través de un filtro fritado y se secó en vacío para proporcionar el producto en forma de un sólido de color bronce (27 g). La recristalización en EtOAc (300 mL) proporcionó el compuesto del título en forma de un sólido blanco (25 g, 72% de rendimiento). EM: Calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}_2$: 569,19. Hallado $(\text{M}+\text{H})^+$ m/z = 570.

Preparación de 5-(3-metoxiprop-1-inil)-2-fenil-N-(2-(6-(pirrolidin-1-ilmetil)tiazolo[5,4-b]piridin-2-il)fenil)tiazol-4-carboxamida:

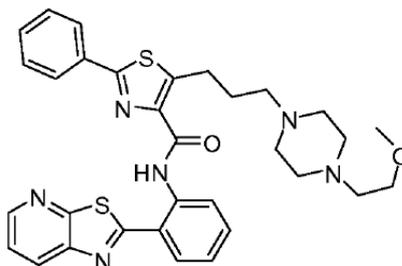


10

Compuesto 5

15 Se preparó el compuesto del título según el método general A de síntesis de amidas, utilizando 2-(6-(pirrolidin-1-ilmetil)tiazolo[5,4-b]piridin-2-il)anilina y ácido 5-(3-metoxiprop-1-inil)-2-feniltiazol-4-carboxílico. Se aisló el producto utilizando el tratamiento 2 y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de 0 a 10% de metanol en CH_2Cl_2) seguido por recristalización en MeOH para proporcionar el compuesto del título (111 mg, 30% de rendimiento). EM: Calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}_2$: 565,16. Hallado $(\text{M}+\text{H})^+$ m/z = 566.

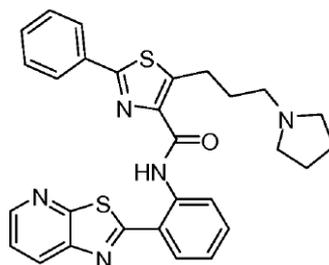
Método de referencia: Preparación de 5-(3-(4-(2-metoxietil)piperazin-1-il)propil)-2-fenil-N-(2-(tiazolo[5,4-b]piridin-2-il)fenil)tiazol-4-carboxamida:



20 Se calentó a 70°C durante 16 horas una disolución de 5-(3-cloropropil)-2-fenil-N-(2-(tiazolo[5,4-b]piridin-2-il)fenil)tiazol-4-carboxamida (316 mg, 0,67 mmol) y 1-(2-metoxietil)-piperazina (964 mg, 6,7 mmol) en DMSO (12 mL). Se calentó la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente y se vertió en H_2O . Se recuperó por filtración el sólido resultante fue recolectado y se enjuagó con H_2O . Se purificó mediante MPLC el producto crudo, eluyendo con DCM/MeOH + 1% de TEA (gradiente de 0-10%) para proporcionar el compuesto del título (374 mg, 96% de rendimiento). EM: Calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$: 598,22. Hallado $(\text{M}+\text{H})^+$ m/z = 599.

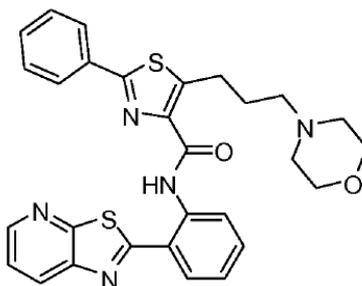
25

Método de referencia: Preparación de 2-fenil-5-(3-(pirrolidin-1-il)propil)-N-(2-(tiazolo[5,4-b]piridin-2-il)fenil)tiazol-4-carboxamida:



- 5 Se añadió pirrolidina (88 μ L, 1,06 mmol) a una disolución de 5-(3-oxopropil)-2-fenil-N-(2-(tiazolo[5,4-b]piridin-2-il)fenil)tiazol-4-carboxamida (250 mg, 0,53 mmol) y AcOH (127 mg, 2,1 mmol) en dicloroetano (DCE) (10 mL). Se agitó la mezcla de reacción durante 1 hora. Se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (449 mg, 2,1 mmol) y se continuó la agitación durante 16 horas. Se vertió la mezcla de reacción en NaHCO_3 acuoso saturado y se extrajo con DCM. Se lavaron con salmuera las fracciones orgánicas combinadas, se secaron (MgSO_4) y se concentraron. Se purificó mediante MPLC el producto crudo, eluyendo con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} + 1\%$ de TEA (gradiente de 0-10%), para
10 proporcionar el compuesto del título (87 mg, 31% de rendimiento). EM: Calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{OS}_2$: 525,17. Hallado $(\text{M}+\text{H})^+$ m/z = 526.

Método de referencia: Preparación de 5-(3-morfolinopropil)-2-fenil-N-(2-(tiazolo[5,4-b]piridin-2-il)fenil)tiazol-4-carboxamida:



- 15 Se preparó el compuesto del título según el procedimiento descrito para 2-fenil-5-(3-(pirrolidin-1-il)propil)-N-(2-(tiazolo[5,4-b]piridin-2-il)fenil)tiazol-4-carboxamida reemplazando pirrolidina por morfolina (128 mg, 45% de rendimiento). EM: Calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}_2$: 541,16. Hallado $(\text{M}+\text{H})^+$ m/z = 542.

Ejemplo 2. Actividad Biológica

- 20 Se utilizó un ensayo basado en espectrometría de masas para identificar moduladores de actividad de SIRT1. El ensayo basado en espectrometría de masas utiliza un péptido de 20 residuos de aminoácido como sigue: Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG-K(5TMR)-EE-NH₂ (SEQ ID NO: 1) en donde K(Ac) es un resto de lisina acetilado y Nle es una norleucina. El péptido está marcado con el fluoróforo 5TMR (excitación 540 nm/emisión 580 nm) en el extremo C-terminal. La secuencia del sustrato peptídico se basa en p53 con varias modificaciones. Además, se reemplazó por norleucina el resto de metionina naturalmente presente en la secuencia porque la
25 metionina puede ser susceptible de oxidación durante la síntesis y purificación.

- El ensayo de espectrometría de masas se lleva a cabo de la manera siguiente: se incuban sustrato peptídico 0,5 μ M y βNAD^+ 120 μ M con SIRT1 10 nM durante 25 minutos a 25°C en un tampón de reacción (Tris-acetato 50 mM, pH 8, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, MgCl_2 1 mM, DTT 5 mM, BSA al 0,05%). Se pueden añadir compuestos de prueba a la reacción como se ha descrito antes. Se clona el gen SirT1 en un vector que contiene promotor T7 y se transforma en BL21(DE3). Después de la incubación durante 25 minutos con SIRT1, se añaden 10 μ L de ácido fórmico al 10% para detener la reacción. Se tapan herméticamente las reacciones y se congelan para posterior análisis mediante espectrometría de masa. La determinación de la masa del péptido sustrato permite la determinación precisa del grado de acetilación (es decir, el material de partida) en comparación con el péptido desacetilado (el producto).
30

- Se realiza un control de la inhibición de actividad de sirtuina añadiendo 1 μ L de nicotinamida 500 mM como control negativo al comienzo de la reacción (permite, por ejemplo, la determinación de la inhibición máxima de sirtuina). Se
35

realiza un control de la activación de actividad de sirtuina empleando 10 nM de proteína sirtuina, con 1 μ L de DMSO en lugar del compuesto, para determinar la cantidad de desacetilación del sustrato en un punto temporal dado dentro del intervalo lineal del ensayo. Este punto temporal es el mismo que el empleado para los compuestos de prueba y, dentro del intervalo lineal, el punto final representa un cambio en la velocidad.

- 5 Para el ensayo anterior, se expresó y purificó proteína SIRT1 de la manera siguiente. Se clonó el gen SirT1 en un vector que contenía promotor T7 y se transformó en BL21(DE3). Se expresó la proteína por inducción con IPTG 1 mM como una proteína de fusión marcada con His en posición N-terminal a 18°C durante una noche, y se cosechó a 30.000 x g. Se lisaron las células con lisozima en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, Tris[2-carboxietil]fosfina (TCEP) 2 mM, ZnCl₂ 10 μ M, NaCl 200 mM) y se trataron además con sonicación durante 10 minutos para conseguir una lisis completa. Se purificó la proteína sobre una columna Ni-NTA (Amersham) y se combinaron las fracciones que contenían proteína pura, se concentraron y se eluyeron sobre una columna de separación por tamaño (Sephadex S200 26/60 global). Se recogió el pico que contenía la proteína soluble y se eluyó en una columna de intercambio iónico (MonoQ). La elución en gradiente (NaCl 200 mM - 500 mM) proporcionó proteína pura. Se concentró esta proteína y se dializó frente a tampón de diálisis (Tris-HCl 20 mM, TCEP 2 mM) durante una noche. Se repartió en alícuotas la proteína y se congeló a -80°C hasta uso posterior.

Empleando el ensayo antes descrito se identificaron los compuestos moduladores de sirtuina que activaban SIRT1, y se indican a continuación en la Tabla 1. Los valores de CE_{1,5} para los compuestos activadores se representan con A (CE_{1,5} \leq 1 μ M), B (CE_{1,5} > 1 y \leq 10 μ M) ó C (CE_{1,5} > 10 μ M). El máximo múltiplo de activación, en porcentaje, se representa con A (múltiplo de activación \geq 300%), B (múltiplo de activación \geq 150% y < 300%) ó C (múltiplo de activación < 150%).

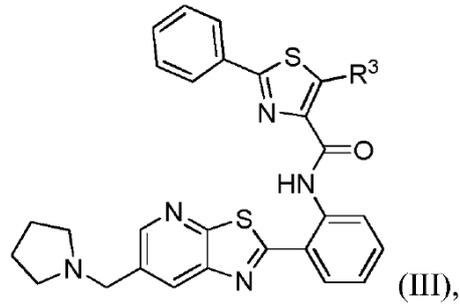
Tabla 1

Compuesto n°	[M+H] ⁺	Estructura	CE _{1,5} (nM)	Múltiplo de activ.
3	498		A	B
4	570		A	B
5	566		A	B

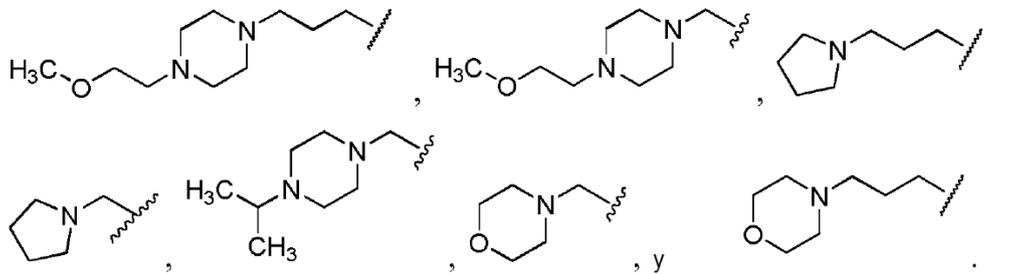
En otra realización de la invención, el compuesto se selecciona de cualquiera de los compuestos 3, 4 y 5 de la Tabla 1.

REIVINDICACIONES

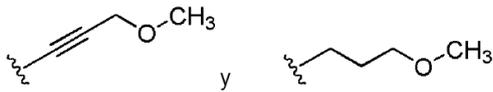
1. Un compuesto representado por la Fórmula Estructural (III):



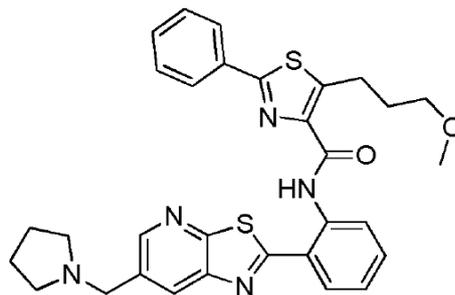
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:
 5 R³ se selecciona de hidrógeno, metoxipropilo, metoxiprop-1-inilo,



2. El compuesto según la reivindicación 1, en donde R³ se selecciona de hidrógeno,

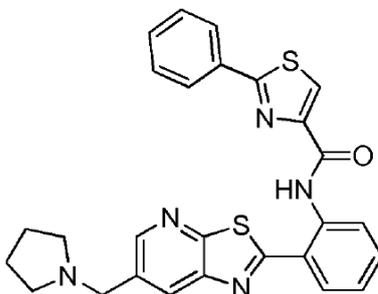


10 3. Un compuesto según la reivindicación 1 que es 5-(3-metoxipropil)-2-fenil-N-(2-(6-(pirrolidin-1-ilmetil)tiazol[5,4-b]piridin-2-il)fenil)tiazol-4-carboxamida:



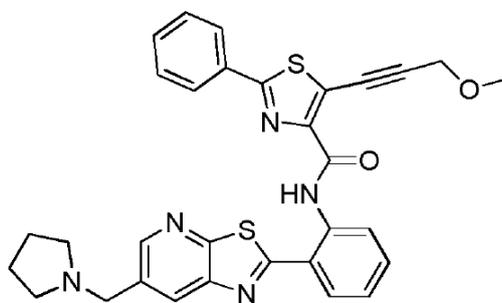
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Un compuesto según la reivindicación 1 que es 2-fenil-N-(2-(6-(pirrolidin-1-ilmetil)tiazol[5,4-b]piridin-2-il)fenil)tiazol-4-carboxamida:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Un compuesto según la reivindicación 1 que es 5-(3-metoxiprop-1-in-1-il)-2-fenil-N-(2-(6-(pirrolidin-1-ilmetil)tiazol[5,4-b]piridin-2-il)fenil)tiazol-4-carboxamida:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. La composición según la reivindicación 6, en donde la composición farmacéutica está libre de pirógenos.

8. La composición según la reivindicación 7, que comprende además un agente activo adicional.

9. La composición según la reivindicación 8, en donde el agente activo adicional se selecciona entre: agentes antiinflamatorios, analgésicos, agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos, antibióticos, vitaminas, antioxidantes y agentes bloqueadores solares.

10. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para uso como una sustancia terapéutica activa.

11. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para uso en el tratamiento de un paciente que padece o es susceptible a resistencia a la insulina, un síndrome metabólico, diabetes o sus complicaciones, o para aumentar la resistencia a la insulina en un paciente.

12. El compuesto para uso según la reivindicación 11, en donde el sujeto es un ser humano.

13. El compuesto para uso según la reivindicación 11, que comprende además administrar un agente activo adicional.

14. El compuesto para uso según la reivindicación 13, en donde el agente activo adicional se selecciona entre: agentes antiinflamatorios, analgésicos, agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos, antibióticos, vitaminas, antioxidantes y agentes bloqueadores solares.