

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 372**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2006 E 10187871 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 2362226**

54 Título: **Método de diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas basado en la medición de los niveles o de la actividad de SIRT1**

30 Prioridad:

07.03.2005 US 74374

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

31.05.2016

73 Titular/es:

**PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE (50.0%)
17 Quincy Street
Cambridge, MA 02138, US y
BIOMOL INTERNATIONAL L.P. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SINCLAIR, DAVID;
 TSAI, LI-HUEI;
 NGUYEN, MINH;
 HOWITZ, KONRAD;
 ZIPKIN, ROBERT y
 BITTERMAN, KEVIN J.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 572 372 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

Método de diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas basado en la medición de los niveles o de la actividad de SIRT1

5 En la actualidad existe una buena evidencia de organismos modelo que se puede regular el ritmo de envejecimiento¹. Se han identificado genes reguladores de la longevidad en muchos eucariotas, incluyendo roedores, moscas, gusanos nematodos e incluso organismos unicelulares tales como levadura de panadería (revisado en^{2,3}). Estos genes parecen ser parte de una vía de longevidad conservada evolutivamente que se desarrolló para fomentar la supervivencia en respuesta al deterioro de las condiciones del medio ambiente^{1,4}. La levadura *S. cerevisiae* ha demostrado ser un modelo particularmente útil para estudiar las vías de células autónomas de regulación de la longevidad². En este organismo, el tiempo de vida de replicación se define como el número de células hijas que una célula madre individual produce antes de morir. La prolongación del tiempo de vida de levaduras se rige por *PNC1*, un gen que responde a la restricción calórica (CR) y al estrés que agota nicotinamida, un potente inhibidor de la proteína Sir2 de longevidad. Se requieren tanto *PNC1* como *SIR2* para la prolongación del tiempo de vida por CR o estrés leve^{5,6} y copias adicionales de estos genes prolongan el tiempo de vida de 30-70%⁵⁻⁷.
10 Basándose en estos resultados, los autores de la invención han propuesto que CR puede conferir beneficios para la salud en una diversidad de especies, ya que es un estrés leve el que induce una respuesta de defensa del organismo mediada por sirtuin⁶.

Sir2, una histona deacetilasa (HDAC), es el miembro fundador de la familia de las sirtuinas deacetilasas, que se caracteriza por un requisito de NAD⁺ como co-sustrato⁸⁻¹³. *SIR2* fue originalmente identificada como un gen necesario para la formación de heterocromatina transcripcionalmente silenciosa en loci de tipo apareante en levaduras¹⁴. Estudios posteriores han demostrado que Sir2 suprime la recombinación entre secuencias repetitivas de ADN en los genes de ARN ribosómico (ADNr)¹⁵⁻¹⁷. Sir2 también ha sido implicado en la división de las proteínas carboniladas en células madre de levadura durante la germinación¹⁸. Estudios realizados en *C. elegans*, células de mamíferos y el parásito unicelular *Leishmania* indican que están conservadas las funciones de supervivencia y de longevidad de las sirtuinas¹⁹⁻²². En *C. elegans* copias adicionales de sir-2.1 prolongan el tiempo de vida en un 50% a través de la vía de señalización de insulina/IGF-1, la misma vía que recientemente ha demostrado que regula el tiempo de vida en roedores²³⁻²⁵.

Sumario

30 Por lo tanto, se proporciona un método para determinar si un sujeto tiene una enfermedad neurodegenerativa, que comprende:

- i) obtener una muestra biológica de un sujeto; y
- ii) determinar el nivel o la actividad de una proteína sirtuina en la muestra biológica,

en el que un nivel o actividad elevado de la proteína sirtuina en la muestra biológica del sujeto con relación a un nivel de control indica que el sujeto tiene una enfermedad neurodegenerativa, en donde la proteína sirtuina es SIRT1.

35 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los efectos del resveratrol sobre la cinética de SIRT1 humana recombinante. a, Dosis-respuesta de resveratrol de la tasa catalítica de SIRT1 a NAD⁺ 25 μM, péptido acetilado p53-382 25 μM. Las tasas iniciales relativas son la media de dos determinaciones, cada una derivada de las pendientes de gráficas de fluorescencia (unidades arbitrarias de fluorescencia, AFU) frente al tiempo con datos obtenidos a los 0, 5, 10 y 20 min. de la desacetilación. b, Tasa inicial de SIRT1 a NAD⁺ 3 mM como una función de la concentración de péptido acetilado p53-382 en presencia (Δ) o ausencia (v) de resveratrol 100 μM. Las líneas representan ajustes por mínimos cuadrados no lineales a la ecuación de Michaelis-Menten. Constantes cinéticas: K_m (control, v) = 64 μM, K_m (+ resveratrol, Δ) = 1,8 μM; V_{max} (control, v) = 1107 AFU/min, V_{max} (+ resveratrol, Δ) = 926 AFU/min. c, Tasa inicial de SIRT1 a péptido acetilado p53-382 1 mM como una función de la concentración de NAD⁺, en presencia (Δ) o ausencia (v) de resveratrol 100 μM. Las líneas representan ajustes por mínimos cuadrados no lineales a la ecuación de Michaelis-Menten. Constantes cinéticas: K_m (control, v) = 558 μM, K_m (+ resveratrol, Δ) = 101 μM; V_{max} (control, v) = 1863 AFU/min, V_{max} (+ resveratrol, Δ) = 1749 AFU/min. d, Efectos de resveratrol sobre la inhibición de nicotinamida de SIRT1. Las constantes cinéticas se muestran en relación con las del control (sin nicotinamida, sin resveratrol) y representan la media de dos determinaciones. Las barras de error son los errores estándar de la media. El sustrato variable en cada uno de los experimentos (N = NAD⁺, P = péptido acetilado p53), la presencia/ausencia de nicotinamida (+/-) y la concentración de resveratrol (μM) se indican debajo de cada par de barras K_m-V_{max}.

La Figura 2 muestra los efectos de polifenoles sobre el tiempo de vida de Sir2 y *S. cerevisiae*. a, Tasa de desacetilación inicial de GST-Sir2 recombinante como una función de la concentración de resveratrol. Las tasas se determinaron a las concentraciones de resveratrol indicadas, ya sea con el sustrato lisina acetilada 'Fluor de Lys' (FdL) 100 μ M más NAD⁺ 3 mM (Δ) o con sustrato de péptido acetilado p53-382 200 μ M más NAD⁺ 200 μ M (v). b, Los análisis del tiempo de vida se determinaron mediante células de levadura individuales micro-manipulantes tal como se describe³⁷ en medio completo de glucosa al 2% con 10 μ M de cada uno de los compuestos, a menos que se indique lo contrario. El tiempo de vida medio para el tipo salvaje, 22,9 generaciones, quercetina, 23,4; piceatannol 24,0. c, Tiempo de vida medio para el tipo salvaje, 22,9 generaciones; fisetina, 30,0; buteina, 35,5; resveratrol, 36,8. d, Tiempo de vida medio para tipo salvaje no tratado, 21,0 generaciones; crecimiento sobre resveratrol, 10 μ M, 35,7; 100 μ M, 29,4; 500 μ M, 29,3.

La Figura 3 muestra que el resveratrol prolonga el tiempo de vida mediante la imitación de CR y la supresión de la recombinación de ADNr. Los tiempos de vida de levaduras se determinaron como en la Fig. 2. a, Tiempo de vida para el tipo salvaje (wt) no tratado, 19,0 generaciones; tipo salvaje + resveratrol (wt + R) 37,8; restringido en glucosa + resveratrol (CR + R), 39,9. b, Tiempo de vida medio para *sir2 Δ* de tipo salvaje, 9,9; *sir2 Δ* + resveratrol, 10,0; *pnc1 Δ* , 19,2; *pnc1 Δ* + resveratrol, 33,1. c, Resveratrol suprime la frecuencia de la recombinación de ADN ribosomal en presencia y ausencia de nicotinamida (NAM). Las frecuencias se determinaron por la pérdida del gen marcador *ADE2* del locus de ADNr (*RDN1*). d, Resveratrol no suprime la recombinación de ADNr en una cepa *sir2*. e, Resveratrol y otros activadores de sirtuinas no aumentan significativamente el silenciamiento de ADNr comparado con una cepa *2xSIR2*. Células pre-tratadas (*RDN1::URA3*) se recolectaron y se esparcieron en forma de diluciones en serie décuplas en SC o SC con ácido 5-fluororótico (5-FOA). En este ensayo, el silenciamiento incrementado de ADNr resulta en una supervivencia incrementada en el medio 5-FOA. f, Cuantificación del efecto del resveratrol sobre el silenciamiento de ADNr por recuento de número de células supervivientes en FOA/sembradas totales.

La Figura 4 muestra que el resveratrol y otros polifenoles estimulan la actividad de *SIRT1* en células humanas. a, Método para ensayar la actividad de deacetilasa intracelular con un sustrato fluorogénico, permeable a las células, FdL ('Fluor de Lys', BIOMOL). Se añade FdL (200 μ M) a los medios de crecimiento y las células se incuban durante 1-3 horas para permitir que FdL penetre en las células y el producto lisina-desacetilado (deAc-FDL) se acumule intracelularmente. Las células se lisan con detergente en presencia de TSA 1 μ M, nicotinamida 1 mM. La adición del Developer (BIOMOL) no permeable a las células libera un fluoróforo, específicamente de deAc-FdL. b, polifenoles activadores de SIRT1 pueden estimular células TSA-insensibles, la desacetilación de FdL por parte de células HeLa S3. Las células se cultivaron de forma adherente en DMEM/FCS al 10% y se trataron durante 1 hora con FdL 200 μ M, TSA 1 μ M y vehículo (DMSO final al 0,5%, Control) o 500 μ M del compuesto indicado. A continuación se determinó la acumulación intracelular de deAc-FdL tal como se describe brevemente en a. Se representa el nivel intracelular de deAc-FdL para cada uno de los compuestos (media de seis repeticiones) frente a las relaciones de la tasa de control obtenida en el rastreo de polifenol de SIRT1 *in vitro* (véase la Tabla 1, Tablas Suplementarias 1 y 3). c, Células de osteosarcoma U2OS cultivadas a \geq 90% de confluencia en DMEM/FCS al 10% fueron expuestas a 0 ó 10 grays de irradiación gamma (IR). Lisados de células enteras se prepararon 4 horas post-irradiación y se sondearon por transferencia Western con anticuerpos indicados. d, Células U2OS cultivadas como anteriormente fueron pre-tratadas con las cantidades indicadas de resveratrol o un blanco de DMSO al 0,5% durante 4 horas, después de lo cual las células fueron expuestas a 0 ó 50 J/cm² de radiación UV. Los lisados se prepararon y analizaron mediante transferencia Western como en c. e, Células embrionarias de riñón humano (HEK 293) que expresan proteína SIRT1 de tipo salvaje o SIRT1-H363Y (SIRT1-HY) dominante negativa se cultivaron como anteriormente, fueron pre-tratadas con las cantidades indicadas de resveratrol o un blanco de DMSO al 0,5% durante 4 horas y fueron expuestas a 50 J/cm² de radiación UV como antes. Los lisados se prepararon y analizaron como antes.

La Figura 5 muestra que la actividad de desacetilación intracelular puede ser medida con un, HDAC fluorogénico, permeable a las células, y el sustrato sirtuina. Se cultivaron células HeLa S3 hasta la confluencia en DMEM/FCS al 10% y después se incubaron con medio reciente que contiene FdL 200 μ M durante los tiempos indicados, 37°C. El nivel intracelular y medio de sustrato desacetilado (deAc-FDL) se determinaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit de ensayo HDAC, BIOMOL). Todos los puntos de datos representan la media de dos determinaciones. a, Relación de la concentración de concentraciones intracelular ([deAc-FdL]_i) a media ([deAc-FdL]_o) en presencia (Δ) o ausencia (v) de tricostatina A 1 μ M (TSA). b, Acumulación total de sustrato desacetilado (deAc-FDL) en presencia (Δ) o ausencia (v) de TSA 1 μ M. c, Acumulación intracelular de sustrato desacetilado (deAc-FDL) en presencia (Δ) o ausencia (v) de TSA 1 μ M.

La Figura 6 muestra preferencias del sitio de desacetilación de SIRT1 recombinante. Las tasas iniciales de desacetilación se determinaron para una serie de sustratos peptídicos fluorogénicos acetilados basados en tramos cortos de la secuencia de histona humana H3, H4 y de p53 (véase la clave al nombre del sustrato y una secuencia

de péptidos de una sola letra debajo del gráfico de barras). SIRT1 humana recombinante (1 µg, BIOMOL) se incubó durante 10 min, 37°C, con 25 µM del sustrato de péptido fluorogénico acetilado indicado y NAD⁺ 500 µM. Las reacciones se detuvieron por la adición de nicotinamida 1 mM y se determinó la señal fluorescente dependiente de la desacetilación.

5 La Figura 7 es un gráfico que representa la actividad de SIRT2 como una función de la concentración de resveratrol.

La Figura 8 muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de hSIRT2, hSIRT1 y Sir 2 de *S. cerevisiae*.

La Figura 9A muestra las respuestas a la dosis de resveratrol y BML-230 de la tasa catalítica de SIRT1. Los puntos representan la media de tres determinaciones y las barras de errores son los errores estándar de la media.

10 La Figura 9B muestra la relación de tasas de SIRT1 activada con BML-230 a activada con resveratrol como una función de la concentración de activador (las relaciones se calcularon a partir de datos de la Figura 9A).

La Figura 10 muestra el efecto de STACs polifenólicos sobre sirtuinas de metazoos. a, Esquema de polipéptidos de Sir2 humana, levadura, *C. elegans* y *D. melanogaster* alineados para mostrar regiones conservadas. Se indican los aminoácidos que forman el lugar de unión a NAD⁺ (gris) y la muesca de unión al sustrato (negro). Los porcentajes se refieren a la homología con SIRT1. b, Efecto de STACs polifenólicos (500 µM) sobre la actividad deacetilasa dependiente de NAD⁺ e insensible a tricostatina A (TSA) en células S2 de *Drosophila*. c, Estimulación múltiple de SIR-2.1 recombinante mediante STACs (10 µM). d, Estimulación múltiple de dSir2 recombinante mediante STACs (10 µM). Los valores son la media de al menos tres determinaciones (+/- error estándar). e, Activación dependiente de la dosis de SIR-2.1 de *C. elegans* por parte de resveratrol. Las tasas se determinaron utilizando un sustrato fluorogénico de lisina acetilada (Fluor de Lys). f, Activación dependiente de la dosis de dSir2 de *Drosophila* por parte de resveratrol. g, Tasa inicial de SIR-2.1 a Fluor de Lys 10 µM como una función de la concentración de NAD⁺, en presencia o ausencia de resveratrol 100 µM. AFU, unidades de fluorescencia arbitrarias.

La Figura 11 muestra la supervivencia de *C. elegans* sobre el resveratrol. a, Supervivencia de *C. elegans* N2 adulta de tipo salvaje tratada con resveratrol 100 µM alimentada con OP50 *E. coli* matada por calor. El tiempo de vida medio con relación al control (triángulos, n = 47) se incrementó en un 14,5% (test Log-Rank, P < 0,0001) por resveratrol 100 µM (cuadrados, n = 46). b, Supervivencia de mutantes *sir-2.1* tratados con resveratrol alimentada con OP50 matada por calor. El tiempo de vida adulta de animales *sir-2.1* no difiere significativamente de los controles N2 (Log-Rank, P = 0,68) y el efecto sobre el tiempo de vida útil de resveratrol 100 µM sobre animales mutantes *sir-2.1* no era estadísticamente significativo (prolongación de 5,2%, Log-Rank P = 0,058; n = 60 control, 58 tratados). c, Supervivencia de *C. elegans* adulta de tipo salvaje N2 sobre resveratrol 100 µM alimentada con OP50 viva (prolongación de 12,6%, P < 0,0001; n = 47 control, 67 tratados). d, Supervivencia de mutantes *sir-2.1* sobre resveratrol 100 µM alimentada con OP50 viva (prolongación de 3,3%, P = 0,81; n = 57 control, 51 tratados) e, Fecundidad de hermafroditas adultos tratados con resveratrol 100 µM. Controles: 106 huevos/5 gusanos/5 horas (s.d 10,0); tratados con resveratrol: 99 huevos/5 gusanos/5 horas (s.d. 13,0). f, Tasas de alimentación de larvas L4 y hermafroditas adultos tratados con resveratrol 100 µM. L4 en el OP50 viva: control 310±10,2 bombeos/min, resveratrol 315±9,8; Adulto en OP50 muerta: Control 228±26,2, resveratrol 283 ± 31,9; Adulto sobre OP50 viva: control 383±16,0, resveratrol 383±22,7.

La Figura 12 muestra la supervivencia de *D. melanogaster* hembra de tipo salvaje con adultos alimentados con resveratrol o fisetina. a, Canton-S en medios SY al 15%. b, Canton-S en medios SY al 5% con resveratrol a dos concentraciones. c, Cepa *yw* en medios CSY al 3%. d, Cepa *yw* en medios CSY al 2% con resveratrol a dos concentraciones. e, Cepa *yw* en medios CSY al 3% con resveratrol 100 µM o fisetina. f, Cepa *yw* en medios CSY al 2% con resveratrol 100 µM o fisetina. Las estadísticas de la tabla de vida para esta figura, para machos y para ensayos adicionales están en la Tabla 20. g, Fecundidad media diaria por hembra (s.e.) estimada a lo largo de intervalos de 5 días de Canton-S en medios SY al 15% con resveratrol 0 ó 10 µM. h, Proporción (s.e.) de hembras *yw* que se alimentan con una dieta con y sin resveratrol en el ensayo de llenado de cultivo. i, Masa corporal media (s.e.) de machos y hembras Canton-S que se alimentan con una dieta sin y con resveratrol (10 µM).

La Figura 13 muestra la supervivencia de adultos de *D. melanogaster* con alelos mutantes de *dSir2* cuando son alimentados con resveratrol (100 µM). Las hembras (a) y los machos (b) con genotipo de pérdida de función *dSir2^{4,5}/dSir2^{5,26}*. Las hembras (c) y los machos (d) con el genotipo hipomórfico fuerte *dSir2¹⁷/dSir2^{KG00871}*.

- La Figura 14 muestra las tasas de mortalidad de adultos control y tratados con resveratrol. La mortalidad se estimó como $\ln(-\ln(p_x))$, en donde p_x es la probabilidad de supervivencia el día x a $x+1$. a, *C. elegans* de tipo salvaje N2 en OP50 *E. coli* matada por calor. b *C. elegans* de tipo salvaje N2 en OP50 *E. coli* viva. En a y b la mortalidad se representa solamente en días con la mortalidad observada. c, Hembras de *D. melanogaster* de tipo salvaje del Ensayo 1 a dosis efectivas de resveratrol en una dieta SY al 15%. d, Machos de *D. melanogaster* de tipo salvaje del Ensayo 1 a dosis efectivas de resveratrol en una dieta SY al 15%. En c y d la mortalidad se suaviza a partir de una media de 3 días de procesamiento de p_x .
- 5
- La Figura 15 muestra la estimulación de la tasa catalítica de SIRT 1 por parte de polifenoles vegetales 100 μM (Tabla 1).
- 10 La Figura 16 muestra el efecto de estilbenos y chalconas 100 μM sobre la tasa catalítica de SIRT 1 (Tabla Suplementaria 1).
- La Figura 17 muestra el efecto de flavonas 100 μM sobre la tasa catalítica de SIRT 1 (Tabla Suplementaria 2).
- La Figura 18 muestra el efecto de flavonas 100 μM sobre la tasa catalítica de SIRT 1 (Tabla Suplementaria 3).
- 15 La Figura 19 muestra el efecto de isoflavonas, flavonas y antocianidinas 100 μM sobre la tasa catalítica de SIRT 1 (Tabla Suplementaria 4).
- La Figura 20 muestra el efecto de catequinas (Flavan-3-oles) 100 μM sobre la tasa catalítica de SIRT 1 (Tabla Suplementaria 5).
- La Figura 21 muestra el efecto de compuestos protectores de radicales libres 100 μM sobre la tasa catalítica de SIRT 1 (Tabla Suplementaria 6).
- 20 La Figura 22 muestra el efecto de compuestos misceláneos 100 μM sobre la tasa catalítica de SIRT 1 (Tabla Suplementaria 7).
- La Figura 23 muestra el efecto de diversos moduladores 100 μM sobre la tasa catalítica de SIRT 1 (Tabla Suplementaria 8).
- 25 La Figura 24 muestra el efecto de nuevos análogos de resveratrol 100 μM sobre la tasa catalítica de SIRT 1 (Tabla 9).
- La Figura 25 muestra el efecto de nuevos análogos de resveratrol 100 μM sobre la tasa catalítica de SIRT 1 (Tabla 10).
- La Figura 26 muestra el efecto de nuevos análogos de resveratrol 100 μM sobre la tasa catalítica de SIRT 1 (Tabla 11).
- 30 La Figura 27 muestra el efecto de nuevos análogos de resveratrol 100 μM sobre la tasa catalítica de SIRT 1 (Tabla 12).
- La Figura 28 muestra el efecto de nuevos análogos de resveratrol 100 μM sobre la tasa catalítica de SIRT 1 (Tabla 13).
- La Figura 29 muestra compuestos intermedios sintéticos de la síntesis de análogos de resveratrol (Tabla 14).
- 35 La Figura 30 muestra compuestos intermedios sintéticos de la síntesis de análogos de resveratrol (Tabla 15).
- La Figura 31 muestra compuestos intermedios sintéticos de la síntesis de análogos de resveratrol (Tabla 16).
- La Figura 32 muestra compuestos intermedios sintéticos de la síntesis de análogos de resveratrol (Tabla 17).

La Figura 33 muestra compuestos intermedios sintéticos de la síntesis de análogos de resveratrol (Tabla 18).

La Figura 34 muestra el efecto de resveratrol sobre *Drosophila melanogaster* (Tabla 20).

Las Figuras 35A-G muestran activadores de sirtuinas y la activación múltiple de SIRT1 (Tabla 21).

La Figura 36 muestra activadores de sirtuinas y la activación múltiple de SIRT1 (Tabla 22).

5 La Figura 37 muestra la regulación al alza de SIRT1 en modelos de ratones que muestran neurodegeneración progresiva y grave. (A) es una inmunotransferencia que muestra la regulación al alza de SIRT1 en ratones p25 transgénicos (Tg) durante la neurodegeneración progresiva (después de 2-12 semanas de inducción). (B) es un gráfico que muestra la cuantificación de los niveles de SIRT1 en ratones p25 Tg. ** P (T <= t) dos colas: 0,004. (C) es un gráfico que muestra niveles de ARNm de miembros de la familia de Sirtuina en ratones p25 Tg revelados por matrices. ** P (T <= t) dos colas: 0,003. (D) es una inmunotransferencia que muestra el aumento progresivo de SIRT1 en SOD1G37R mutante (pista 29) que alcanza un pico en la etapa de la neurodegeneración masiva (10-12 meses). (E) es un gráfico que muestra la cuantificación de los niveles de SIRT1 en ratones SOD1G37R. ** P (T <= t) dos colas: 0,005. *** P (T <= t) dos colas: 0,002. (F) en una inmunotransferencia que muestra el tratamiento de neuronas corticales primarias con bajas concentraciones de ionomicina (1 μ m) y peróxido de hidrógeno (25 μ m) induce la rápida regulación al alza de SIRT asociada con la generación de p25. Tiempo expresado en minutos.

La Figura 38 proporciona una transferencia Western y un gráfico que muestra los niveles de SIRT1 en prosencéfalos de ratones PDAPP-V717F. No hay un aumento de SIRT1 en los cerebros de ratones PDAPP-V717F.

La Figura 39 muestra que neuronas primarias tratadas con resveratrol están protegidas contra cualquiera toxicidad de SOD1 p25 o mutante. (A) es una serie de imágenes de inmunofluorescencia que no muestran toxicidad observada en neuronas transfectadas con GFP tratadas con resveratrol durante 48 horas (50 a 500 nm). Para todos los experimentos (A a E), neuronas de rata primarias fueron transfectadas en DIV1 con plásmidos y se añadió resveratrol al medio a las 2-3 horas después de la transfección. La caracterización de la integridad neuronal se realizó 24 a 48 horas después de la transfección. Barra: 40 μ m. (B) muestra imágenes confocales representativas de neuronas moribundas y sanas transfectadas con p25-GFP y tratadas con DMSO (control) o resveratrol (250 nm) durante 24 horas, respectivamente. Barra: 20 μ m. (C) es un gráfico que muestra la cuantificación de neuronas que expresan p25-GFP supervivientes después del tratamiento con DMSO (control) o 250 nm de resveratrol durante 24 horas, expresada en % (49 +/- 2% frente a 72 +/- 8%; ** P (T <= t) dos colas: 0,01). (D) muestra imágenes confocales representativas de neuronas transfectadas con SOD1G93A-FLAG y tratadas con DMSO (control) o 500 nm de resveratrol durante 48 horas. Barra: 25 μ m. (E) es un gráfico que muestra la cuantificación de neuronas supervivientes que expresan SOD1G93A-FLAG después de tratamiento con control (DMSO) o resveratrol (500 nm) durante 48 horas expresada en%. (28 +/- 3% frente a 41 +/- 3%; ** P (T <= t) dos colas: 0,01).

La Figura 40 muestra que la sobre-expresión de SIRT1 protege frente a la toxicidad de SOD1 p25 o mutante. (A) es una serie de imágenes de inmunofluorescencia de neuronas primarias transfectadas con p 25-GFP y los efectos de la sobre-expresión de la actividad desacetilasa con SIRT1 o que carece de SIRT1 (H363Y) en la toxicidad p25 GFP. Las flechas apuntan a neuronas con la expresión ectópica de SIRT1. Barra: 20 μ m. p25-GFP se muestra en verde y SIRT1 en rojo. (B) es un gráfico que muestra la cuantificación de neuronas supervivientes que expresan p25-GFP con o sin la expresión ectópica de SIRT1 o H363Y. ** P (T <= t) dos colas: 0,001. No significativa (NS); P (T <= t) dos colas: 0,27. (C) es una inmunotransferencia que muestra niveles sin cambios de p25-GFP después de la expresión de SIRT1 o H363Y. h: humano; m: ratón. Comparación de células HEK y CAD para la expresión de SIRT1. (D) es una serie de imágenes de inmunofluorescencia que muestran neuronas primarias transfectadas con hSOD1 de tipo salvaje o hSOD1G93A mutante y los efectos de la sobreexpresión de SIRT1 o H363Y sobre la toxicidad de SOD1G93A. Las flechas apuntan a los agregados de SOD1 tal como se detectó con el Ab (anticuerpo) FLAG. WTSOD1 no es tóxico. Barra: 25 μ m. hSOD1 está en rojo; FLAG está en verde; DAPI en azul. (E) es un gráfico que muestra la cuantificación de neuronas supervivientes que expresan SOD193A y WT SOD1 con o sin la expresión ectópica de SIRT1 o H363Y. ** P (T <= t) dos colas: 0,001. No significativa (NS); P (T <= t) dos colas: 0,33.

La Figura 41 es una serie de imágenes de inmunofluorescencia que muestran los efectos de la sobreexpresión de SIRT1 sobre neuronas que expresan p25-GFP. Procesos neuronales intactos y morfología nuclear en neuronas primarias co-transfectadas con p25-GFP y SIRT1 (flecha blanca). No se observó protección en las neuronas transfectadas individualmente con p25 (puntas de flecha blancas). Barra: 10 μ m.

La Figura 42 es una serie de imágenes de inmunofluorescencia que muestran la localización subcelular de SIRT1 en neuronas del SNC. SIRT1 se localizan en el núcleo y los cuerpos celulares de neuronas motoras espinales en ratones de tipo salvaje (WT) y SOD1G93A. Barra: 15 μm .

5 La Figura 43 muestra la regulación al alza de SIRT1 en la corteza prefrontal de muestras AD post mortem. (A) es una inmunotransferencia y un gráfico que muestra los niveles de SIRT1 en la corteza prefrontal post-mortem de control (n = 9) y pacientes AD (n = 11) puntuados por gráfico (media + / error estándar). Dos conjuntos de muestras se procesaron de forma independiente. P (T <= t) dos colas: 0,004. (B) es una serie de imágenes confocales de neuronas SIRT1-positivas de la corteza prefrontal de control n° 1 y pacientes con AD n° 1 y 2 en el 1^{er} conjunto. Barras: 120 μm y 40 μm . (C) muestra la ausencia de correlación entre los niveles de neuronas que expresan SIRT1
10 y la proximidad con placas β -amiloides (estrellas). Las flechas blancas apuntan a neuronas que expresan SIRT1 distantes de una placa β -amiloide teñida con Abs 4G8. Las puntas de flecha blancas apuntan a las neuronas que expresan SIRT1 en estrecha proximidad de las placas β -amiloides. Se utilizaron muestras de AD 1 y 2. Barra: 20 μm .

15 La Figura 44 muestra que resveratrol previene la neurodegeneración en ratones p25 transgénicos. (A) es un diagrama esquemático que muestra el diseño experimental para la inyección ventricular intracerebral (ICV) de resveratrol (Resv) o Vehículo (Veh) en ratones p25 transgénicos (n = 5 para el vehículo; n = 9 para resveratrol). (B) es una inmunotransferencia que muestra la regulación a la baja de Bax, caspasa-3 activada y GFAP, marcadores de apoptosis y astrogliosis, en el hipocampo de ratones p25 transgénicos tratados con resveratrol (n = 3) en comparación con los animales p25 a los que se inyectó vehículo (n = 2) según lo revelado por transferencias
20 Western. Se utilizan actina y FAK para controles de carga. (C) es un par de imágenes de inmunofluorescencia que muestran una reducción de células que expresan GFAP en CA1 de ratones p25 transgénicos tratadas con resveratrol (n = 3) en comparación con animales p25 a los que se inyectó vehículo (n = 2) según lo revelado por la tinción de inmunofluorescencia. (D) es una serie de imágenes que muestran que la tinción de inmunofluorescencia reveló una activación de caspasa-3 reducida y un alto número de células que expresan p25-GFP en CA1 de ratones
25 p25 transgénicos (n = 2) a los que se inyectó resveratrol frente al vehículo (n = 2). (E) es un par de imágenes que muestran la conservación de la integridad de los procesos neuronales en ratones p25 tratados con resveratrol (n = 4) pero no en ratones p25 a los que se inyectó vehículo (n = 3) tal como se visualiza mediante microscopía confocal. Barra: 15 μm . (F) es un par de gráficos que muestran ratones p25 inducidos de dos semanas a los que se inyectó icv ya sea resveratrol (n = 9) o vehículo (n = 5) 2-3 veces/semana durante 3 semanas. Subsiguientemente ratones p25
30 tratados con resveratrol y vehículo y ratones de tipo salvaje (n = 12) fueron sometidos a un acondicionamiento de miedo contextual. Izquierda: ratones p25 tratados con vehículo exhibían un comportamiento de congelación reducido durante la prueba de memoria, en comparación con miembros de la camada de tipo salvaje ($t_{(1,15)} = 3,028$; P = 0,006). Sin embargo, cuando se compara con el grupo de vehículo, ratones p25 tratados con resveratrol mostraron un comportamiento significativamente mejorado durante la prueba de memoria ($t_{(1,12)} = 2,675$; P = 0,0202) que era indistinguible de los miembros de la camada de tipo salvaje. Derecha: Resveratrol no tuvo efecto alguno sobre la
35 respuesta de escape al choque eléctrico de la pata durante el procedimiento de formación, lo que sugiere un aprendizaje asociativo conservado en ratones p25 tratados con resveratrol. P <0,05; ES, choque eléctrico de la pata.

La Figura 45 muestra la acetilación de p53, un sustrato de SIRT1, en ratones p25 transgénicos invertida por resveratrol. (A) es una inmunotransferencia que muestra una regulación al alza de p53 en ratones p25 transgénicos
40 (n = 4) detectada por inmunoprecipitación, seguida de transferencia Western. (B) es una inmunotransferencia que muestra la acetilación de p53 en lisina 382 en ratones p25 transgénicos (n = 3) detectada por inmunoprecipitación, seguida de transferencia Western. (C) es una inmunotransferencia y un gráfico que muestra la inactivación eficaz de p53 por parte de ARNi en la línea celular transfectada con p53. La inactivación de p53 en neuronas del hipocampo primarias que expresan p25 rescata la neurotoxicidad de p25 en un 25%. ** P (T <= t) dos colas: 0,001. (D) es una
45 inmunotransferencia que muestra una acetilación reducida de p53 en la lisina 382 y la regulación a la baja de p53 en ratones p25 transgénicos (n = 3) tratados con resveratrol.

La Figura 46 muestra que la expresión de SIRT1 previene la neurodegeneración en ratones p25 transgénicos. (A) es una serie de imágenes confocales del prosencéfalo del lado derecho de ratón p25 transgénico 807 al que se inyectó un lentivirus de control. Un bajo número de neuronas del hipocampo CA1 en ratones p25 transgénicos caudal al sitio
50 de la inyección son GFP-positivas. La flecha blanca indica el lado de la inyección. Barra: 200 μm . (B) es una serie de imágenes confocales del prosencéfalo del lado izquierdo de ratones p25 transgénicos 807 a los que se inyectó un lentivirus de SIRT1. Numerosas neuronas del hipocampo CA1 en ratones p25 transgénicos caudal al sitio de la inyección son GFP-positivas. La flecha blanca indica el lado de la inyección. (C) y (D) son imágenes confocales de neuronas GFP-positivas del hipocampo CA1 en ratones control y p25 a los que se inyectó SIRT1 806. Barra: 100
55 μm . (E) y (F) son imágenes confocales de gran aumento de neuronas GFP-positivas en ratones control y p25 a los que se inyectó SIRT1 807. La integridad neuronal en ratones p25 a los que se inyectó SIRT1 está mejor conservada

que en el lado inyectado control contralateral. Barra: 15 μm (G) - (I) son imágenes de neuronas GFP-positivas que expresan SIRT1 según lo revela la co-tinción con anticuerpo HA. Barra: 15 μm .

La Figura 47 muestra los efectos de resveratrol sobre la neurodegeneración en el hipocampo y CA3 de ratones p25. (A) es un gráfico que muestra la cuantificación de la regulación a la baja de Bax, caspasa-3 activada y GFAP, marcadores de apoptosis y astrogliosis, en el hipocampo de ratones p25 transgénicos tratados con resveratrol (n = 3) en comparación con animales p25 a los que se inyectó vehículo (n = 2). (B) es un par de imágenes que muestran el número reducido de neuronas que expresan caspasa-3 en el CA3 de ratones p25 tratados con resveratrol en comparación con ratones a los que se inyectó vehículo (flechas negras). Barra: 10 μm .

Descripción detallada

10 Definiciones

Tal como se utiliza en esta memoria, los siguientes términos y frases tendrán el significado que se detalla a continuación. A menos que se defina lo contrario, todos los términos y expresiones técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que el que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica.

15 Las formas en singular "un", "una" y "el", "la" incluyen la referencia en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

"Activar una proteína sirtuina" se refiere a la acción de producir una proteína sirtuina activada, es decir, una proteína sirtuina que es capaz de realizar al menos una de sus actividades biológicas al menos en cierta medida, por ejemplo, con un aumento de la actividad de al menos aproximadamente 10%, 50%, 2 veces o más. Las actividades biológicas de proteínas sirtuinas incluyen desacetilación, p. ej., de histonas y p53; prolongar el tiempo de vida; aumentar la estabilidad genómica; silenciar la transcripción; y controlar la segregación de proteínas oxidadas entre las células madre e hijas.

25 Un "compuesto activador" o un "compuesto activador de sirtuina" se refiere a un compuesto que activa una proteína sirtuina o estimula o aumenta al menos una de sus actividades. Compuestos activadores pueden tener una fórmula seleccionada del grupo de fórmulas **1-25**, **30** y **32-65**.

30 El término "agente" se utiliza en esta memoria para designar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica (tal como un ácido nucleico, un anticuerpo, una proteína o porción de la misma, p. ej., un péptido), o un extracto hecho de materiales biológicos tales como bacterias, vegetales, hongos o células o tejidos animales (particularmente de mamífero). La actividad de agentes de este tipo puede hacerles adecuados como un "agente terapéutico", que es una sustancia (o sustancias) biológica, fisiológica o farmacológicamente activa que actúa de forma local o sistémica en un sujeto.

35 Una "forma que se produce de forma natural", cuando se refiere a un compuesto, significa un compuesto que está en una forma, p. ej., una composición, en la que se puede encontrar de forma natural. Por ejemplo, ya que el resveratrol se puede encontrar en el vino tinto, está presente en el vino tinto en una forma que se produce de forma natural. Un compuesto no está en una forma que se produce de forma natural si, p. ej., el compuesto se ha purificado y separado de al menos algunas de las otras moléculas que se encuentran con el compuesto en la naturaleza.

"Inhibir una proteína sirtuina" se refiere a la acción de reducir al menos una de las actividades biológicas de una proteína sirtuina al menos en cierta medida, p. ej., al menos aproximadamente 10%, 50%, 2 veces o más.

40 Un "compuesto inhibitorio" o "compuesto inhibidor" o "compuesto inhibidor de sirtuina" se refiere a un compuesto que inhibe una proteína sirtuina. Compuestos inhibidores pueden tener una fórmula seleccionada del grupo de fórmulas **26-29**, **31** y **66-68**.

45 Un "compuesto que se produce de forma natural" se refiere a un compuesto que se puede encontrar en la naturaleza, es decir, un compuesto que no ha sido diseñado por el hombre. Un compuesto que se produce de forma natural puede haber sido hecho por el hombre o por la naturaleza. Por ejemplo, resveratrol es un compuesto que se

produce de forma natural. Un "compuesto que no se produce de forma natural" es un compuesto que no se sabe que exista en la naturaleza o que se produzca en la naturaleza.

5 "Tiempo de vida replicativo" de una célula se refiere al número de células hijas producidas por una "célula madre" individual. "Envejecimiento cronológico" o "tiempo de vida cronológico", por otra parte, se refiere al tiempo que una población de células que no se dividen sigue siendo viable cuando se le priva de nutrientes. "Aumentar el tiempo de vida de una célula" o "prolongar el tiempo de vida de una célula", tal como se aplica 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 de hacer frente a estreses y combatir daños, p. ej., al ADN, proteínas; y/o aumentar la capacidad de las células u organismos de sobrevivir y existir en un estado vivo durante más tiempo bajo una condición particular, p. 10 ej., el estrés. El tiempo de vida se puede incrementar en al menos aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60% o entre 20% y 70%, 30% y 60%, 40% y 60% o más, utilizando métodos descritos en esta memoria.

15 "Miembros de la familia de proteínas sirtuina deacetilasa", "miembros de la familia Sir2"; "miembros de la familia de proteínas Sir2"; o "proteínas sirtuinas" incluye la levadura Sir2, Sir-2.1 y las proteínas SIRT1 y SIRT2 humanas. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la sirtuina humana, SIRT1 (homólogo 2 de regulación de la información de tipo apareamiento silencios), se recogen como SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente (correspondientes a números de Acceso a GenBank NM_012238 y NP_036370, respectivamente). El homólogo de ratón de SIRT1 es Sirt2 α . Sirt2 humana corresponde a los números de Acceso a GenBank NM_012237 y NP_036369 (para la variante 1; SEQ ID NOs: 3 y 4, respectivamente) y NM_030593 y NP_085096 (para la variante 2; SEQ ID NOs: 5 y 6, respectivamente). Otros miembros de la familia incluyen los cuatro genes de tipo Sir2 de levadura adicionales denominados "genes *HST*" (siglas inglesas de homólogos de *Sir dos*) HST1, HST2, HST3 y HST4, y los otros cinco homólogos humanos hSIRT3 (correspondiente a los números de Acceso a GenBank NM_012239 y NP_036371; SEQ ID NOs: 7 y 8, respectivamente), hSIRT4 (correspondiente a los números de Acceso a GenBank NM_012240 y NP_036372; SEQ ID NOs: 9 y 10, respectivamente), hSIRT5 (correspondiente a los números de Acceso a GenBank NM_012241 y NP_036373 para la variante 1 (SEQ ID NOs : 11 y 12, respectivamente) y NM_031244 y NP_112534 para la variante 2 (SEQ ID NOs: 13 y 14, respectivamente)), hSIRT6 (correspondiente a los números de Acceso a GenBank NM_016539 y NP_057623; SEQ ID NOs: 15 y 16, respectivamente) y hSIRT7 (correspondiente a los números de Acceso a GenBank NM_016538 y NP_057622; SEQ ID NOs: 17 y 18, respectivamente) (Brachmann et al (1995) genes Dev 9: 2888 y Frye et al (1999) BBRC 260: 273). Sirtuinas preferidas son las que comparten más similitudes con SIRT1, es decir, hSIRT1, y/o Sir2 que con SIRT2 20 tales como los miembros que tienen al menos parte de la secuencia N-terminal presente en SIRT1 y ausente en SIRT2 tal como la tiene SIRT3. 25 30

35 "Porción biológicamente activa de una sirtuina" se refiere a una porción de una proteína sirtuina que tiene una actividad biológica tal como la capacidad para desacetilar. Las porciones biológicamente activas de sirtuinas pueden comprender el dominio del núcleo de sirtuinas. Por ejemplo, los aminoácidos 62-293 de SIRT1 con la SEQ ID NO: 2, que son codificados por los nucleótidos 237 a 932 de la SEQ ID NO: 1, abarcan el dominio de unión a NAD⁺ y el dominio de unión a sustrato. Por lo tanto, a esta región se la alude a veces como el dominio del núcleo. Otras porciones biológicamente activas de SIRT1, a las que también se alude a veces como dominios de núcleo, incluyen aproximadamente los aminoácidos 261 a 447 de la SEQ ID NO: 2, que son codificados por los nucleótidos 834 a 1394 de SEQ ID NO: 1; aproximadamente los aminoácidos 242 a 493 de la SEQ ID NO: 2, que son codificados por los nucleótidos 777 a 1532 de la SEQ ID NO: 1; o aproximadamente los aminoácidos 254 a 495 de la SEQ ID NO: 2, que son codificados por los nucleótidos 813 a 1538 de la SEQ ID NO: 1. 40

El término "comprenden" y la expresión "que comprenden" se utilizan en el sentido inclusivo, abierto, lo que significa que pueden estar incluidos elementos adicionales.

45 Un "activador directo" de una sirtuina es una molécula que activa una sirtuina mediante la unión a la misma. Un "inhibidor directo" de una sirtuina es una molécula que inhibe una sirtuina mediante la unión a la misma.

El término "incluyendo" se utiliza para dar a entender "incluyendo, pero no limitado a". "Incluyendo" e "incluyendo pero no limitado a" se utilizan indistintamente.

50 "Trastorno neurodegenerativo" o "enfermedad neurodegenerativa" o "neuropatología" se refiere a una amplia gama de enfermedades y/o trastornos del sistema nervioso central y periférico, tales como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer (AD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), atrofia por desnervación, otosclerosis, apoplejía, demencia, esclerosis múltiple, enfermedad de Huntington, encefalopatía asociada con la enfermedad de la

inmunodeficiencia adquirida (SIDA), y otras enfermedades asociadas con la toxicidad celular neuronal y la muerte celular.

5 La expresión "por ciento idéntica" se refiere a la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos. La identidad puede en cada caso determinarse comparando una posición en cada una de las secuencias que puede estar alineada para fines de comparación. Cuando una posición equivalente en las secuencias comparadas está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son idénticas en esa posición; cuando el sitio equivalente está ocupado por el mismo o por un residuo aminoácido similar (p. ej., similar de naturaleza estérica y/o electrónica), entonces a las moléculas se las puede aludir como homólogas (similares) en esa posición. La expresión como un porcentaje de homología, similitud o identidad se refiere a una función del número de aminoácidos idénticos o similares en las posiciones compartidas por las secuencias comparadas. La expresión como un porcentaje de homología, similitud o identidad se refiere a una función del número de aminoácidos idénticos o similares en las posiciones compartidas por las secuencias comparadas. Se pueden utilizar diversos algoritmos y/o programas de alineamiento, incluyendo FASTA, BLAST o ENTREZ. FASTA y BLAST están disponibles como parte del paquete de análisis de secuencias GCG (Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), y se pueden utilizar, p. ej., con configuraciones por defecto. ENTREZ está disponible a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica, Biblioteca Nacional de Medicina, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md. En una realización, el porcentaje de identidad de dos secuencias se puede determinar mediante el programa GCG con un peso de hueco de 1, p. ej., cada uno de los huecos de aminoácido se pesa como si fuera un desapareamiento de un solo aminoácido o nucleótido entre las dos secuencias.

20 Otras técnicas para el alineamiento se describen en *Methods in Enzymology*, vol. 266: *Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis* (1996), comp. Doolittle, Academic Press, Inc., una división de Harcourt Brace & Co., San Diego, California, EE.UU. Preferiblemente, se utiliza un programa de alineamiento que permite huecos en la secuencia para alinear las secuencias. El Smith-Waterman es un tipo de algoritmo que permite huecos en alineamientos de la secuencia. Véase *Meth. Mol. Biol.* 70: 173-187 (1997). También se puede utilizar el programa GAP que utiliza el método de alineamiento de Needleman y Wunsch para alinear secuencias. Una estrategia de búsqueda alternativa utiliza el software MPSRCH, que se ejecuta en un ordenador MASPAR. MPSRCH utiliza un algoritmo de Smith-Waterman para anotar secuencias en un ordenador masivamente paralelo. Este enfoque mejora la capacidad de recoger emparejamientos relacionados de manera alejada, y es especialmente tolerante con los pequeños huecos y errores de las secuencias de nucleótidos. Se pueden utilizar secuencias de aminoácidos codificadas por ácidos nucleicos para rastrear bases de datos tanto de proteínas como de ADN.

El término "cis" está reconocido en la técnica y se refiere a la disposición de dos átomos o grupos en torno a un doble enlace de manera que los átomos o grupos están en el mismo lado del doble enlace. Configuraciones cis se etiquetan a menudo como configuraciones (Z).

35 El término "trans" está reconocido en la técnica y se refiere a la disposición de dos átomos o grupos en torno a un doble enlace de manera que los átomos o grupos están en lados opuestos de un doble enlace. Configuraciones trans se etiquetan a menudo como configuraciones (E).

40 La expresión "enlace covalente" está reconocida en la técnica y se refiere a un enlace entre dos átomos en donde los electrones son atraídos electrostáticamente a ambos núcleos de los dos átomos, y el efecto neto de la densidad de electrones incrementada entre los núcleos contrarresta el rechace internuclear. La expresión enlace covalente incluye enlaces coordinados cuando el enlace es con un ión metálico.

45 La expresión "agente terapéutico" está reconocida en la técnica y se refiere a cualquier resto químico que sea una sustancia biológica, fisiológica o farmacológicamente activa que actúa de forma local o sistémica en un sujeto. Por lo tanto, la expresión significa cualquier sustancia destinada para uso en el diagnóstico, curación, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades o en la mejora del desarrollo y/o de las condiciones físicas o mentales deseables en un animal o ser humano.

50 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 en seres humanos provocado por una sustancia farmacológicamente activa. La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de una sustancia que produce un efecto local o sistémico deseado en una relación beneficio/riesgo razonable, aplicable a cualquier tratamiento. La cantidad terapéuticamente eficaz de dicha sustancia variará dependiendo de la condición del sujeto y de la enfermedad que se esté tratando, del peso y de la edad del sujeto, de la gravedad de la condición de la enfermedad, de la forma de administración y similares, que puede ser fácilmente determinada por una persona de

experiencia ordinaria en la técnica. Por ejemplo, determinadas composiciones descritas en esta memoria pueden administrarse en una cantidad suficiente para producir una relación beneficio/riesgo razonable, aplicable a tal tratamiento.

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

La expresión "compuesto meso" está reconocida en la técnica y se refiere a un compuesto químico que tiene al menos dos centros quirales, pero que es aquiral debido a un plano o punto de simetría.

10 El término "quiral" está reconocido en la técnica y se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superposición de su imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que son superponibles a su imagen especular. Una "molécula proquiral" es una molécula que tiene el potencial de convertirse en una molécula quiral en un proceso particular.

15 El término "estereoisómeros" está reconocido en la técnica y se refiere a compuestos que tienen una constitución química idéntica, pero difieren con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio. En particular, "enantiómeros" se refieren a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares no superponibles entre sí. "Diastereómeros", por otro lado, se refiere a estereoisómeros con dos o más centros de disimetría y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí.

Además, un "procedimiento estereoselectivo" es uno que produce un estereoisómero particular de un producto de reacción con preferencia a otros posibles estereoisómeros de ese producto. Un "proceso enantioselectivo" es uno que favorece la producción de uno de los dos posibles enantiómeros de un producto de reacción.

20 El término "regioisómeros" está reconocido en la técnica y se refiere a compuestos que tienen la misma fórmula molecular, pero que difieren en la conectividad de los átomos. Por consiguiente, un "proceso regioselectiva" es uno que favorece la producción de un regioisómero particular frente a los demás, p. ej., la reacción produce un aumento estadísticamente significativo en el rendimiento de un determinado regioisómero.

25 El término "epímeros" está reconocido en la técnica y se refiere a moléculas con constitución química idéntica y que contienen más de un estereocentro, pero que difieren en la configuración en sólo uno de estos estereocentros.

30 El término "ED₅₀" está reconocido en la técnica. En determinadas realizaciones, ED₅₀ significa la dosis de un fármaco que produce el 50% de su máxima respuesta o efecto o, alternativamente, la dosis que produce una respuesta predeterminada en el 50% de los sujetos o preparados de ensayo. El término "LD₅₀" está reconocido en la técnica. En determinadas realizaciones, LD₅₀ significa la dosis de un fármaco que es letal en 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 LD₅₀/ED₅₀.

La expresión "relación estructura-actividad" o "(SAR)" está reconocida en la técnica y se refiere a la forma en la que la alteración de la estructura molecular de un fármaco u otro compuesto altera su actividad biológica, p. ej., su interacción con un receptor, una enzima, ácido nucleico u otra diana y similares.

35 El término "alifático" está reconocido en la técnica y se refiere a un alcano, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico. En determinadas realizaciones, los grupos alifáticos en los presentes compuestos son lineales o ramificados y tienen de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono.

40 El término "alquilo" está reconocido en la técnica, e incluye grupos alifáticos saturados, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal, grupos alquilo de cadena ramificada, grupos cicloalquilo (alicíclicos), grupos cicloalquilo sustituidos con alquilo y grupos alquilo sustituidos con cicloalquilo. En determinadas realizaciones, un alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada tiene aproximadamente 30 o menos átomos de carbono en su cadena principal (p. ej., C₁-C₃₀ para la cadena lineal, C₃-C₃₀ para la cadena ramificada) y, alternativamente, aproximadamente 20 o menos. Del mismo modo, los cicloalquilos tienen de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono en su estructura de anillo y, alternativamente, aproximadamente 5, 6 ó 7 carbonos en la estructura de anillo. El término "alquilo" también se define para incluir alquilos halosustituidos.

45

El término "aralquilo" está reconocido en la técnica y se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo arilo (p. ej., un grupo aromático o heteroaromático).

Los términos "alquenilo" y "alquinilo" están reconocidos en la técnica y se refieren a grupos alifáticos insaturados análogos en longitud y posible sustitución a los alquilos descritos anteriormente, pero que contienen al menos un doble o triple enlace, respectivamente.

A menos que se especifique de otro modo el número de carbonos, "alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo, tal como se define anteriormente, pero que tiene de uno a aproximadamente diez carbonos, de forma alternativa de uno a aproximadamente seis átomos de carbono en su estructura de la cadena principal. Del mismo modo, "alquenilo inferior" y "alquinilo inferior" tienen longitudes de cadena similares.

El término "heteroátomo" está reconocido en la técnica y se refiere a un átomo de cualquier elemento distinto de carbono o hidrógeno. Heteroátomos ilustrativos incluyen boro, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre y selenio.

El término "arilo" está reconocido en la técnica y se refiere a grupos aromáticos de un solo anillo de 5, 6 y 7 miembros que pueden incluir de cero a cuatro heteroátomos, por ejemplo, benceno, naftaleno, antraceno, pireno, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, triazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina, y similares. A los grupos arilo que tienen heteroátomos en la estructura del anillo también se les puede aludir como "heterociclos de arilo" o "compuestos heteroaromáticos". El anillo aromático puede estar sustituido en una o más posiciones del anillo con sustituyentes tales como los descritos anteriormente, por ejemplo, halógeno, azida, alquilo, aralquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, hidroxilo, alcoxilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, éter, alquiltio, sulfonilo, sulfonamido, cetona, aldehído, éster, heterociclilo, restos aromáticos o heteroaromáticos, $-CF_3$, $-CN$, o similares. El término "arilo" también incluye sistemas de anillo policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes (los anillos son "anillos fusionados"), en donde al menos uno de los anillos es aromático, p. ej., los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos y/o heterociclicos.

Los términos orto, meta y para están reconocidos en la técnica y se refieren a bencenos 1,2-, 1,3- y 1,4-disustituidos, respectivamente. Por ejemplo, los nombres 1,2-dimetilbenceno y orto-dimetilbenceno son sinónimos.

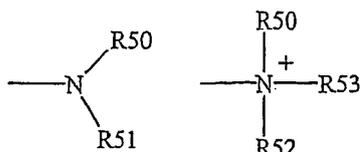
El término "heterociclilo" o la expresión "grupo heterocíclico" están reconocidos en la técnica y se refieren a estructuras de anillo de 3 a aproximadamente 10 miembros, alternativamente anillos de 3 a aproximadamente 7 miembros, cuyas estructuras de anillo incluyen uno a cuatro heteroátomos. Los heterociclos también pueden ser policiclos. Grupos heterociclilo incluyen, por ejemplo, tiofeno, tiantreno, furano, pirano, isobenzofurano, cromeno, xanteno, fenoxanteno, pirrol, imidazol, pirazol, isotiazol, isoxazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, indolizina, isoindol, indol, indazol, purina, quinolizina, isoquinolina, quinolina, ftalazina, naftiridina, quinoxalina, quinazolina, cinolina, pteridina, carbazol, carbolina, fenantridina, acridina, pirimidina, fenantrolina, fenazina, fenarsazina, fenotiazina, furazan, fenoxazina, pirrolidina, oxolano, tiolano, oxazol, piperidina, piperazina, morfolina, lactonas, lactamas tales como azetidionas y pirrolidinonas, sultamas, sultonas, y similares. El anillo heterocíclico puede estar sustituido en una o más posiciones con sustituyentes como los descritos anteriormente tal como, por ejemplo, halógeno, alquilo, aralquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, hidroxilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, éter, alquiltio, sulfonilo, cetona, aldehído, éster, un heterociclilo, un resto aromático o heteroaromático, $-CF_3$, $-CN$, o similares.

El término "policiclilo" o la expresión "grupo policíclico" están reconocidos en la técnica y se refieren a dos o más anillos (p. ej., cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos y/o heterociclicos), en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes, p. ej., los anillos son "anillos condensados". Anillos que están unidos a través de átomos no adyacentes se denominan anillos "puenteados". Cada uno de los anillos del policiclo puede estar sustituido con sustituyentes tales como los descritos anteriormente tales como, por ejemplo, halógeno, alquilo, aralquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, hidroxilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, éter, alquiltio, sulfonilo, cetona, aldehído, éster, un heterociclilo, un resto aromático o heteroaromático, $-CF_3$, $-CN$, o similares.

El término "carbociclo" está reconocido en la técnica y se refiere a un anillo aromático o no aromático, en el que cada uno de los átomos del anillo es carbono.

5 El término "nitro" está reconocido en la técnica y se refiere a $-\text{NO}_2$; el término "halógeno" está reconocido en la técnica y se refiere a $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$ o $-\text{I}$; el término "sulfhidrilo" está reconocido en la técnica y se refiere a $-\text{SH}$; el término "hidroxilo" significa $-\text{OH}$; y el término "sulfonilo" está reconocido en la técnica y se refiere a $-\text{SO}_2^-$. "Haluro" designa el anión correspondiente de los halógenos, y "pseudohaluro" tiene la definición recogida en 560 de "Advanced Inorganic Chemistry" por Cotton y Wilkinson.

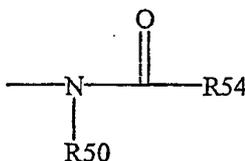
Los términos "amina" y "amino" están reconocidos en la técnica y se refieren a aminas tanto no sustituidas como sustituidas, p. ej., un resto que puede ser representado por las fórmulas generales:



10 en donde R50, R51 y R52 representan cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo, $-(\text{CH}_2)_m-\text{R61}$, o R50 y R51, tomados junto con el átomo de N al que están unidos, completan un heterociclo que tiene de 4 a 8 átomos en la estructura del anillo; R61 representa un grupo arilo, un cicloalquilo, un cicloalquenilo, un heterociclo o un policiclo; y m es cero o un número entero en el intervalo de 1 a 8. En determinadas realizaciones, sólo uno de R50 o R51 puede ser un carbonilo, p. ej., R50, R51 y el nitrógeno juntos no forman una imida. En otras realizaciones, R50 y R51 (y opcionalmente R52) representan cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo, o $-(\text{CH}_2)_m-\text{R61}$. Por lo tanto, el término "alquilamina" incluye un grupo amina, tal como se define anteriormente, que tiene un alquilo sustituido o no sustituido unido a él, es decir, al menos uno de R50 y R51 es un grupo alquilo.

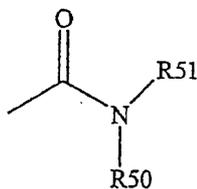
15

El término "acilamina" está reconocido en la técnica y se refiere a un resto que puede ser representado por la fórmula general:



20 en donde R50 es como se define anteriormente, y R54 representa un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo o $-(\text{CH}_2)_m-\text{R61}$, siendo m y R61 como se definen anteriormente.

El término "amido" está reconocido en la técnica como un carbonilo amino-sustituido e incluye un resto que puede ser representado por la fórmula general:

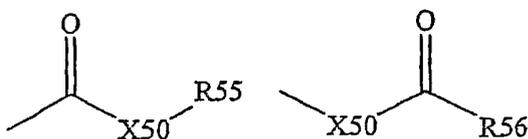


25 en donde R50 y R51 son como se definen anteriormente. Determinadas realizaciones de amidas pueden no incluir imidas que pueden ser inestables.

El término "alquiltio" se refiere a un grupo alquilo, tal como se define anteriormente, que tiene un radical de azufre unido al mismo. En determinadas realizaciones, el resto "alquiltio" está representado por uno de $-\text{S}$ -alquilo, $-\text{S}$ -

alqueniilo, -S-alqueniilo y $-S-(CH_2)_m-R61$, en donde m y R61 se definen anteriormente. Grupos alquiltio representativos incluyen metiltio, etiltio y similares.

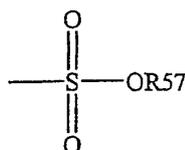
El término "carbonilo" está reconocido en la técnica e incluye restos tales como pueden ser representados por las fórmulas generales:



5 en donde X50 es un enlace o representa un oxígeno o un azufre, y R55 y R56 representan un hidrógeno, un alquilo, un alqueniilo, $-(CH_2)_m-R61$ o una sal farmacéuticamente aceptable, R56 representa un hidrógeno, un alquilo, un alqueniilo o $-(CH_2)_m-R61$, siendo m y R61 como se definen anteriormente. En los casos en los que X50 es un oxígeno y R55 o R56 no es hidrógeno, la fórmula representa un "éster". En los casos en los que X50 es un oxígeno y R55 es como se ha definido anteriormente, al resto se le alude en esta memoria como un grupo carboxilo, y particularmente cuando R55 es un hidrógeno, la fórmula representa un "ácido carboxílico". En los casos en los que X50 es un oxígeno y R56 es hidrógeno, la fórmula representa un "formiato". En general, en los casos en los que el átomo de oxígeno de la fórmula anterior está reemplazado por azufre, la fórmula representa un grupo "tiolcarbonilo". En los casos en los que X50 es un azufre y R55 o R56 no es hidrógeno, la fórmula representa un "tioléster". En los casos en los que X50 es un azufre y R55 es hidrógeno, la fórmula representa un "ácido tiolcarboxílico". En los casos en los que X50 es un azufre y R56 es hidrógeno, la fórmula representa un "tiolformiato". Por otra parte, en los casos en los que X50 es un enlace, y R55 no es hidrógeno, la fórmula anterior representa un grupo "cetona". En los casos en los que X50 es un enlace, y R55 es hidrógeno, la fórmula anterior representa un grupo "aldehído".

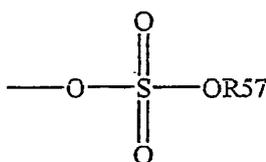
20 Los términos "alcoxilo" o "alcoxi" están reconocidos en la técnica y se refieren a un grupo alquilo tal como se define anteriormente, que tiene un radical oxígeno unido al mismo. Grupos alcoxilo representativos incluyen metoxi, etoxi, propiloxi, terc.-butoxi y similares. Un "éter" son dos hidrocarburos unidos covalentemente por un oxígeno. Por consiguiente, el sustituyente de un alquilo que hace que alquilo sea un éter o se asemeja a un alcoxilo, tal como se puede representar por uno de $-O$ -alquilo, $-O$ -alqueniilo, $-O$ -alquiniilo, $-O-(CH_2)_m-R61$, siendo m y R61 como se describen anteriormente.

25 El término "sulfonato" está reconocido en la técnica y se refiere a un resto que puede estar representado por la fórmula general:



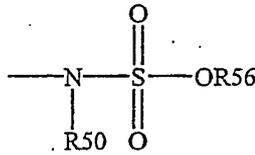
en la que R57 es un par de electrones, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, o arilo.

30 El término "sulfato" está reconocido en la técnica e incluye un resto que puede ser representado por la fórmula general:



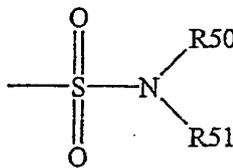
en el que R57 es como se definió anteriormente.

El término "sulfonamido" está reconocido en la técnica e incluye un resto que puede ser representado por la fórmula general:



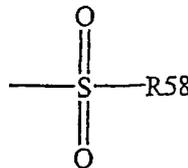
en el que R50 y R56 son como se definen anteriormente.

- 5 El término "sulfamoilo" está reconocido en la técnica y se refiere a un resto que puede ser representado por la fórmula general:



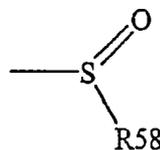
en el que R50 y R51 son como se definen anteriormente.

- 10 El término "sulfonilo" está reconocido en la técnica y se refiere a un resto que puede ser representado por la fórmula general:



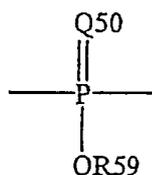
en el que R58 es uno de los siguientes: hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo o heteroarilo.

- 15 El término "sulfóxido" está reconocido en la técnica y se refiere a un resto que puede ser representado por la fórmula general:

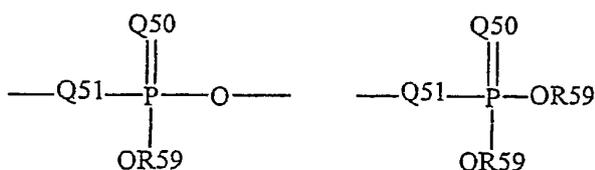


en el que R58 se define anteriormente.

El término "fosforilo" está reconocido en la técnica y puede, en general, ser representado por la fórmula:

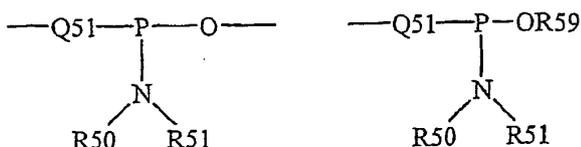


en la que Q50 representa S u O, y R59 representa hidrógeno, un alquilo inferior o un arilo. Cuando se utiliza para sustituir, p. ej., un alquilo, el grupo fosforilo del fosforilalquilo puede estar representado por las fórmulas generales:



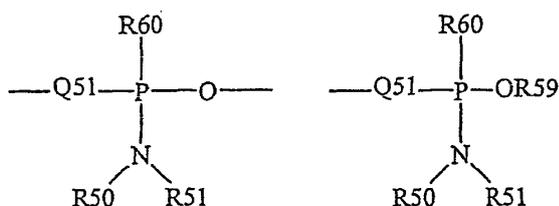
- 5 en donde Q50 y R59, cada uno independientemente, se definen anteriormente, y Q51 representa O, S o N. Cuando Q50 es S, el resto fosforilo es un "fosfortioato".

El término "fosforamidita" está reconocido en la técnica y puede ser representado en las fórmulas generales:



en donde Q51, R50, R51 y R59 son como se definen anteriormente.

- 10 El término "fosfonamidito" está reconocido en la técnica y puede ser representado en las fórmulas generales:



en donde Q51, R50, R51 y R59 se definen como antes, y R60 representa un grupo alquilo inferior o un arilo.

- 15 Sustituciones análogas pueden hacerse a grupos alqueno y alquino para producir, por ejemplo, aminoalquenos, aminoalquinos, amidoalquenos, amidoalquinos, iminoalquenos, iminoalquinos, tioalquenos, tioalquinos, alquenos o alquinos carbonilo-sustituidos.

La definición de cada una de las expresiones, p. ej., alquilo, m, n, y similares, cuando se produce más de una vez en cualquier estructura, pretende ser independiente de su definición en la misma estructura en otro lugar.

- 20 El término "selenoalquilo" está reconocido en la técnica y se refiere a un grupo alquilo que tiene un grupo seleno sustituido unido al mismo. "Selenoéteres" a modo de ejemplo que pueden estar sustituidos en el alquilo se seleccionan de uno de -Se-alquilo, -Se-alqueno, -Se-alquino, y - Se-(CH₂)_m-R61, estando m y R61 definidos anteriormente.

Los términos triflilo, tosilo, mesilo y nonaflilo están reconocidos en la técnica y se refieren a trifluorometanosulfonilo, *p*-toluenosulfonilo, metanosulfonilo y grupos nonafluorobutanosulfonilo, respectivamente. Los términos triflato, tosilato, mesilato y nonaflato están reconocidos en la técnica y se refieren a grupos funcionales trifluorometanosulfonato éster, *p*-toluensulfonato éster, metanosulfonato éster y nonafluorobutanesulfonato éster y moléculas que contienen dichos grupos, respectivamente.

Las abreviaturas Me, Et, Ph, Tf, Nf, Ts, y Ms representan metilo, etilo, fenilo, trifluorometanosulfonilo, nonafluorobutanesulfonilo, *p*-toluenosulfonilo y metanosulfonilo, respectivamente. Una lista más completa de las abreviaturas utilizadas por los químicos orgánicos de experiencia ordinaria en la técnica aparece en el primer número de cada volumen del Journal of Organic Chemistry; esta lista se presenta típicamente en una tabla titulada Standard List of Abbreviations.

Determinados compuestos contenidos en las composiciones descritas en esta memoria pueden existir en formas geométricas o estereoisoméricas particulares. Además, los compuestos también pueden ser ópticamente activos. Se contemplan en esta memoria todos estos compuestos, incluyendo isómeros *cis*- y *trans*, enantiómeros *R* y *S*, diastereómeros, isómeros (D), isómeros (L), las mezclas racémicas de los mismos, y otras mezclas de los mismos. Átomos de carbono asimétricos adicionales pueden estar presentes en un sustituyente tal como un grupo alquilo. Todos estos isómeros, así como mezclas de los mismos, quedan abarcados en esta memoria.

Por ejemplo, si se desea un enantiómero particular de un compuesto, éste se puede preparar mediante síntesis asimétrica, o por derivación con un auxiliar quiral, en donde se separa la mezcla diastereómera resultante y el grupo auxiliar se escinde para proporcionar los enantiómeros puros deseados. Alternativamente, en los casos en los que la molécula contiene un grupo funcional básico, tal como amino, o un grupo funcional de carácter ácido tal como carboxilo, se forman sales diastereoméricas con un ácido o base ópticamente activo apropiado, seguido de la resolución de los diastereómeros así formados por cristalización fraccionada o medios cromatográficos bien conocidos en la técnica, y subsiguiente recuperación de los enantiómeros puros.

Se entenderá que "sustitución" o "sustituido con" incluye la condición implícita de que tal sustitución está de acuerdo con la valencia permitida del átomo sustituido y el sustituyente, y que los resultados de sustitución en un compuesto estable, p. ej., que no sufre forma espontánea una transformación tal como por transposición, ciclación, eliminación u otra reacción.

El término "sustituido" también se contempla para incluir todos los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos. En un aspecto amplio, los sustituyentes permisibles incluyen sustituyentes de compuestos orgánicos acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos. Sustituyentes ilustrativos incluyen, por ejemplo, los descritos anteriormente en esta memoria. Los sustituyentes permisibles pueden ser uno o más y el mismo o diferentes compuestos orgánicos apropiados. Heteroátomos tales como nitrógeno pueden tener sustituyentes hidrógeno y/o cualesquiera sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos descritos en esta memoria que satisfagan las valencias de los heteroátomos. Los compuestos no pretenden estar limitados de modo alguno por los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos.

Los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla Periódica de los Elementos, versión C AS, Handbook of Chemistry and Physics, 67ª Ed., 1986-1987, contraportada.

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

La expresión "grupo protector de hidroxilo" está reconocida en la técnica y se refiere a aquellos grupos destinados a proteger un grupo hidroxilo frente a reacciones indeseables durante los procedimientos sintéticos, e incluye, por ejemplo, bencilo u otros grupos ésteres o éteres adecuados, conocidos en la técnica.

La expresión "grupo protector de carboxilo" está reconocida en la técnica y se refiere a aquellos grupos destinados a proteger un grupo ácido carboxílico, tal como el extremo C de un aminoácido o péptido o un sustituyente de anillo de carácter ácido o hidroxilo azepina, frente a reacciones indeseables durante procedimientos sintéticos e incluye

ejemplos de grupos protectores para grupos carboxilo implican, por ejemplo, éster bencílico, éster ciclohexílico, éster 4-nitrobencílico, éster t-butílico, éster 4-piridilmetílico y similares.

5 La expresión "grupo de bloqueo de amino" está reconocida en la técnica y se refiere a un grupo que evitará que un grupo amino participe en una reacción llevada a cabo en algún otro grupo funcional, pero que puede separarse de la amina cuando se desee. Tales grupos se comentan en el Cap. 7 de Greene y Wuts, antes citado, y por Barton, *Protective Groups in Organic Chemistry* Cap. 2 (McOmie, comp., Plenum Press, Nueva York, 1973). Ejemplos de grupos adecuados incluyen grupos protectores de acilo tales como, para ilustrar, formilo, dansilo, acetilo, benzoilo, trifluoroacetilo, succinilo, metoxisuccinilo, bencilo y bencilo sustituido tal como 3,4-dimetoxibencilo, o-nitrobencilo, y trifenilmetilo; los de la fórmula $-\text{COOR}$, en que R incluye grupos tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, 2,2,2-tricloroetilo, 1-metil-1-feniletilo, isobutilo, t-butilo, t-amilo, vinilo, alilo, fenilo, bencilo, p-nitrobencilo, o-nitrobencilo y 2,4-diclorobencilo; grupos acilo y acilo sustituido tales como formilo, acetilo, cloroacetilo, dicloroacetilo, tricloroacetilo, trifluoroacetilo, benzoilo y p-metoxibenzoilo; y otros grupos tales como metanosulfonilo, p-toluenosulfonilo, p-bromobenzenosulfonilo, p-nitrofeniletilo y p-toluenosulfonil-aminocarbonilo. Grupos de bloqueo amino preferidos son bencilo ($-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), acilo $[\text{C}(\text{O})\text{R}_1]$ o SIR_1 , en que R_1 es alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$, halometilo, o 2-halo-sustituido-(alcoxi $\text{C}_2\text{-C}_4$), grupos protectores de uretano aromáticos tales como, por ejemplo, carbonilbenciloxi (Cbz); y grupos protectores de uretano alifáticos tales como t-butiloxicarbonilo (Boc) o 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc).

La definición de cada una de las expresiones, p. ej., alquilo inferior, m, n, p y similares, cuando se produce más de una vez en cualquier estructura, pretende ser independiente de su definición en la misma estructura en otro lugar.

20 La expresión "grupo eliminador de electrones" está reconocida en la técnica, y se refiere a la tendencia de un sustituyente para atraer electrones de valencia de átomos vecinos, es decir, el sustituyente es electronegativo con respecto a los átomos vecinos. Una cuantificación del nivel de capacidad eliminadora de electrones viene dada por la constante sigma (σ) de Hammett. Esta constante bien conocida se describe en muchas referencias, por ejemplo, March, *Advanced Organic Chemistry* 251-59 (McGraw Hill Book Company: Nueva York, 1977). Los valores constantes de Hammett son generalmente negativos para los grupos donantes de electrones ($\sigma(\text{P}) = -0,66$ para NH_2) y positivos para los grupos eliminadores de electrones ($\sigma(\text{p}) = 0,78$ para un grupo nitro), $\sigma(\text{P})$ que indica sustitución para. Grupos eliminadores de electrones a modo de ejemplo incluyen nitro, acilo, formilo, sulfonilo, trifluorometilo, ciano, cloruro, y similares. Grupos donantes de electrones a modo de ejemplo incluyen amino, metoxi, y similares.

30 La expresión "molécula pequeña" está reconocida en la técnica y se refiere a una composición que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 2000 amu, o menos de aproximadamente 1000 amu, e incluso menos de aproximadamente 500 amu. Moléculas pequeñas pueden ser, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos peptídicos, peptidomiméticos, hidratos de carbono, lípidos u otras moléculas orgánicas (que contienen carbono) o inorgánicas. Muchas compañías farmacéuticas tienen bancos extensos de mezclas químicas y/o biológicas, a menudo de hongos, bacterias, o extractos de algas, que pueden ser rastreadas con cualquiera de los ensayos descritos en esta memoria. La expresión "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula pequeña que a menudo se identifica como un compuesto orgánico o medicinal, y no incluye moléculas que son exclusivamente ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos.

40 El término "modulación" está reconocido en la técnica y se refiere a la regulación al alza (es decir, la activación o estimulación), la regulación a la baja (es decir, la inhibición o supresión) de una respuesta, o las dos en combinación o por separado.

El término "tratar" está reconocido en la técnica y se refiere a la curación, así como mejorar al menos un síntoma de alguna afección o enfermedad o la prevención de que empeore una afección o enfermedad.

45 La expresión tratamiento "profiláctico" o "terapéutico" está reconocida en la técnica y se refiere a la administración de un fármaco a un huésped. Si se administra antes de la manifestación clínica de la afección indeseada (p. ej., enfermedad u otro estado no deseado del animal huésped) entonces el tratamiento es profiláctico, es decir, protege al huésped frente al desarrollo de la afección no deseada, mientras que si se administra después de la manifestación de la afección no deseada, el tratamiento es terapéutico (es decir, se pretende disminuir, mejorar o mantener la afección existente o los efectos secundarios indeseados de la misma).

50 Un "paciente", "sujeto" o "huésped" a ser tratadas mediante el método objeto puede significar un animal humano o no humano.

El término "mamífero" es conocido en la técnica, y mamíferos a modo de ejemplo incluyen seres humanos, primates, bovinos, porcinos, caninos, felinos y roedores (p. ej., ratones y ratas).

5 El término "biodisponibilidad", cuando se refiere a un compuesto, está reconocido en la técnica y se refiere a una forma de un compuesto que permite, o una parte de la cantidad de compuesto administrado, a ser absorbido por, incorporado en, o estar de otra manera fisiológicamente disponible para un sujeto o paciente al que se administra.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" está reconocida en la técnica y se refiere a las sales por adición de ácidos relativamente no tóxicas, inorgánicas y orgánicas de compuestos, incluyendo, por ejemplo, las contenidas en composiciones descritas en esta memoria.

10 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" está reconocida en la técnica y se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante líquido o sólido, implicado en portar o transportar cualquier composición objeto o componente de la misma desde un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada uno de los soportes 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 soportes farmacéuticamente
15 aceptables incluyen: (1) azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones tales como almidón de maíz y fécula de patata; (3) celulosa, y sus derivados tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles tales como propilenglicol; (11)
20 polioles tales como glicerol, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tampón tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua apirógena; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tampón fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

25 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 objeto, material terapéutico u otro material que no penetre directamente en el sistema nervioso central, de manera que penetre en el sistema del paciente y, por tanto, esté sujeto al metabolismo y otros procesos similares.

30 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, normalmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intraesternal e inyección e infusión.

Métodos y composiciones a modo de ejemplo

35 Se proporcionan en esta memoria métodos de diagnóstico, p. ej., métodos para determinar si un sujeto tiene muerte celular neuronal o un trastorno neurodegenerativo. El método comprende determinar el nivel o la actividad de la proteína SIRT1. El método de diagnóstico comprende (i) obtener una muestra biológica de un sujeto y (ii) determinar el nivel o la actividad de una proteína sirtuina en la muestra biológica, en el que un nivel o actividad más alto de la sirtuina en la muestra biológica del sujeto con relación a un control indica que el sujeto tiene o es propenso a desarrollar una enfermedad neurodegenerativa. La muestra biológica puede ser una muestra de células, p. ej., una
40 muestra de sangre, una muestra de la médula espinal o una muestra de cerebro. Métodos para determinar el nivel de una proteína sirtuina son conocidos en la técnica y pueden implicar el uso de un anticuerpo que se une a la proteína sirtuina. Métodos para determinar la actividad de una proteína sirtuina también son conocidos en la técnica, y pueden implicar la determinación de su eficacia de desacetilación. Un control en el ensayo de diagnóstico puede ser un valor correspondiente al nivel o actividad de una proteína sirtuina en un individuo que no tiene o no es probable que desarrolle una enfermedad neurodegenerativa. Un control puede ser también un valor correspondiente a la media del nivel o actividad de una proteína sirtuina en dos o más individuos que no tienen o que no son propensos a desarrollar una enfermedad neurodegenerativa. Un valor de control puede ser una media de al menos
45 5, 10, 50 ó 100 individuos. Un nivel o actividad alto de una sirtuina en una muestra biológica de un sujeto respecto a un control pueden incluir niveles que son al menos aproximadamente 50%, 2, 3, 5, 10, 30, 50 o más veces mayores
50 en el sujeto que en el control.

"Un método para diagnosticar" incluye cualquier inmunoensayo tales como los ensayos que utilizan biotina y avidina o estreptavidina, ELISAs, RIAs, transferencias Western e inmunoprecipitación. Métodos de diagnóstico pueden utilizar un anticuerpo que se une específicamente a una sirtuina. Otros ensayos de diagnóstico comprenden el uso de ácidos nucleicos, p. ej., para determinar el nivel de ARN tal como ARNm, o para determinar la presencia de una mutación en un gen sirtuina. El agente que se utiliza en un ensayo de diagnóstico, p. ej., un anticuerpo o un ácido nucleico, se puede marcar y/o enlazar, covalentemente o no, a una superficie sólida.

Un método de diagnóstico puede comprender determinar el nivel o la actividad de una sirtuina una o varias veces, p. ej., varias veces dentro de un período de tiempo determinado. Por ejemplo, un método de diagnóstico puede comprender obtener una primera muestra biológica de un sujeto, y obtener una segunda muestra biológica varias horas o días (p. ej., 1, 2, 3 ó 7 días) o semanas (p. ej., 1, 2, 3 ó 4 semanas) o meses (p. ej., 1, 2, 3, 6, 10 o más meses) o años más tarde. Un cambio en el nivel de proteína o actividad de una sirtuina dentro de las dos muestras puede ser indicativo de que una enfermedad, p. ej., una enfermedad neurodegenerativa, se está desarrollando en el sujeto. Un aumento en el nivel de proteína o actividad de una sirtuina con el tiempo en un sujeto puede indicar que el sujeto está desarrollando una enfermedad. Una disminución en el nivel de proteína o actividad de una sirtuina con el tiempo en un sujeto puede indicar que la enfermedad o al menos uno o más de sus síntomas se está tratando o previniendo con eficacia.

Un diagnóstico de una enfermedad también puede comprender el seguimiento de otra característica de la enfermedad, p. ej., la presencia o ausencia o el nivel de un marcador de la enfermedad. Por ejemplo, el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer tal como se describe en esta memoria puede combinarse con la detección de placas β -amiloides.

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

35 Ejemplos

Ejemplo 1: Activadores de moléculas pequeñas de SIRT1

Para identificar compuestos que modulan la actividad de SIRT1, los autores de la invención rastrearon un cierto número de bancos de moléculas pequeñas utilizando un ensayo de desacetilación fluorescente en placas de 96 pocillos²⁶. El sustrato utilizado en el ensayo era un péptido fluorogénico basado en la secuencia que abarca el sitio de acetilación p53-K382, una diana conocida de SIRT1 *in vivo*^{20,21,27}. Este sustrato se prefirió frente a una diversidad de otros sustratos peptídicos fluorogénicos que se basaban en otras dianas de HDAC conocidas (Fig. 5). Los bancos de moléculas pequeñas incluían análogos de nicotinamida, ϵ -acetil lisina, NAD⁺, nucleótidos, análogos de nucleótidos y ligandos purinérgicos. A partir del rastreo inicial, se encontraron varios inhibidores de sirtuina (Tabla Suplementaria 7). Sin embargo, el resultado más sorprendente fue la identificación de dos compuestos, quercetina y piceatannol, que estimularon la actividad de SIRT1 cinco y ocho veces, respectivamente (Tabla 1). Tanto quercetina como piceatannol han sido identificados previamente como inhibidores de proteína quinasa^{28,29}.

La comparación de las estructuras de los dos compuestos activadores sugirió una posible relación estructural-actividad. Piceatannol comprende dos grupos fenilo en posición trans uno con otro a través de un resto etileno de enlace. Las estructuras de anillo de trans-estilbeno de piceatannol son superponibles en los anillos A y B flavonoides de quercetina, alineándose el oxígeno del éter y el carbono-2 del anillo C con los carbonos de etileno en piceatannol (véanse las estructuras, Tabla 1). Además, las posiciones 5, 7, 3' y 4' de los grupos hidroxilo en la quercetina se pueden alinear, respectivamente, con los hidroxilos 3, 5, 3' y 4' de piceatannol.

Teniendo en cuenta los efectos de la mejora de la longevidad demostrados de la actividad de sirtuina en *S. cerevisiae*⁷ y *C. elegans*¹⁹, era naturalmente interesante explorar más a fondo la relación estructura-actividad entre los compuestos que estimulan SIRT1. Tanto quercetina como piceatannol son polifenoles, miembros de un grupo grande y diverso de metabolitos secundarios de plantas que incluye flavonas, estilbenos, flavanonas, isoflavonas, catequinas (flavan-3-oles), chalconas, taninos y antocianidinas^{30,31}. Polifenoles notables con respecto a los posibles efectos potenciadores de la longevidad incluyen resveratrol, un estilbeno que se encuentra en el vino tinto y galato de epigalocatequina (EGCG) del té verde. Ambos han sido sugeridos sobre la base de las investigaciones epidemiológicas y mecánicas para ejercer efectos quimiopreventivos del cáncer y cardioprotectores³⁰⁻³². Por lo tanto, los autores de la invención han realizado un rastreo secundario que abarca resveratrol, EGCG y representantes adicionales de un cierto número de las clases de polifenoles enumeradas anteriormente. El rastreo hizo hincapié en flavonas debido al gran número de variantes de la posición de hidroxilo disponibles en este grupo³¹. Los resultados de este rastreo se resumen en las Tablas Suplementarias 1 - 6. En las tablas, una "relación a la tasa de control" por encima de 1 indica que un compuesto con una tasa de este tipo es un activador de la sirtuina testada, y un número por debajo de 1 indica que un compuesto es un inhibidor.

Se encontraron activadores de SIRT1 potentes adicionales entre los estilbenos, las chalconas y flavonas (Tabla 1, Tablas Suplementarias 1 y 2). Las seis flavonas más activas tenían 3' y 4' hidroxilos (Tabla Suplementaria 2), aunque hay que señalar que el compuesto más activo en general, resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno), era más activo que piceatannol, que difiere sólo por su 3'-hidroxilo adicional (Tabla 1). La importancia del 4'-hidroxilo para la actividad se subraya por el hecho de que cada una de las 12 flavonas más estimulantes comparten este rasgo (Tablas Suplementarias 1 y 2).

Muchos, pero no todos los compuestos más activos incluyen hidroxilos en las dos posiciones meta (p. ej., flavonas 5,7-dihidroxiladas) del anillo (anillo A), trans con respecto al patrón a 4' o 3', 4' (anillo B, véase la Tabla 1, Tablas Suplementarias 1 y 2). Una orientación potencialmente coplanar de los anillos fenilo trans puede ser importante para la actividad, ya que las catequinas y flavanonas, que carecen del doble enlace 2,3, tienen una actividad débil a pesar de tener patrones de hidroxilación equivalentes a diversas flavonas estimulantes (compárense las Tablas Suplementarias 2 y 3 con 4 y 5). La ausencia de actividad en la isoflavona genisteína, aunque hidroxilada de una manera equivalente a los compuestos estimulantes apigenina y resveratrol (véanse las Tablas Suplementarias 1, 2 y 4), es consistente con la idea de que el posicionamiento trans y la separación de los anillos hidroxilados contribuye fuertemente a la actividad.

Los efectos biológicos de los polifenoles se atribuyen con frecuencia a la actividad antioxidante, quelante de iones metálicos y/o de neutralización de radicales libres^{30,32}. Los autores de la invención consideraron la posibilidad de que la aparente estimulación de polifenol de SIRT1 podría simplemente representar la reparación de daño oxidativo y/o inducido por iones metálicos, incurrido durante la preparación de la proteína recombinante. Dos características de sus resultados argumentan en contra de ser este el caso. En primer lugar, una diversidad de compuestos protectores de radicales libres, incluyendo antioxidantes, quelantes y neutralizadores de radicales, no logró estimular SIRT1 (véase la Tabla Suplementaria 6). En segundo lugar, entre los diversos polifenoles de capacidad antioxidante equivalente los autores de la invención observaron una diversa actividad estimulante de SIRT1 (p. ej., compárense resveratrol, quercetina y las epicatequinas en las Tablas Suplementarias 1, 2 y 5 y véase³³).

Ejemplo 2: Efectos de resveratrol sobre la cinética de SIRT1

Se realizaron investigaciones cinéticas enzimáticas detalladas utilizando el activador más potente, resveratrol. Experimentos de dosis-respuesta realizados bajo las condiciones de los ensayos de rastreo de polifenol (NAD^+ 25 μM , péptido acetilado p53-382 25 μM) demostraron que el efecto de activación duplicó la tasa a $\sim 11 \mu\text{M}$ y se saturó esencialmente en resveratrol 100 μM (Fig. 1a). Las tasas iniciales de enzimas, en presencia o ausencia de resveratrol 100 μM , se determinaron ya sea como una función de la concentración de acetil-péptido con alta NAD^+ (NAD^+ 3 mM, Fig. 1b) o como una función de la concentración de NAD^+ con alta acetil-péptido (péptido acetilado p53-382 1 mM, Fig. 1c). Aunque resveratrol no tuvo efecto significativo alguno sobre las dos determinaciones de V_{max} (Figs. 1b, 1c), tenía efectos pronunciados sobre las dos K_{m} s aparentes. Su efecto sobre la K_{m} del péptido acetilado fue particularmente sorprendente, ascendiendo a una disminución de 35 veces (Fig. 1b). Resveratrol también bajó la K_{m} para NAD^+ más de 5 veces (Fig. 1c). Dado que el resveratrol actúa sólo sobre K_{m} , pudo ser clasificado como un efector alostérico del tipo 'sistema K'³⁴. Esto puede implicar que sólo se ha alterado la afinidad de unión al sustrato de la enzima, en lugar de una etapa catalítica limitante de la tasa.

El análisis cinético previo de SIRT1 y Sir2²⁶ y el análisis genético de la función de Sir2 en la levadura prolongación del tiempo de vida^{6,35} realizado por los autores de la invención han implicado nicotinamida (un producto de la

reacción de sirtuina) como un inhibidor fisiológicamente importante de la actividad de sirtuina. Por lo tanto, se ensayaron los efectos del resveratrol sobre la inhibición de nicotinamida. En experimentos similares a los de las Figs. 1b y 1c, se determinaron las constantes cinéticas en presencia de nicotinamida 50 μM ya sea mediante la variación de la concentración de NAD^+ o la del péptido acetilado p53-382 (Fig. 1d). La nicotinamida, en contraste con resveratrol, afecta a la V_{max} de SIRT1 (obsérvese que 30% y 36% de V_{max} disminuye en ausencia de resveratrol, Fig. 1d y véase la ref.²⁶). En presencia de nicotinamida 50 μM , el resveratrol parece tener efectos complejos, dependientes de la concentración sobre la cinética de SIRT1 (Fig. 1d). La K_m aparente para NAD^+ y el sustrato acetilado parece ser elevada en realidad por resveratrol 5 μM , cuando está presente nicotinamida. A 20 y 100 μM , en presencia de nicotinamida 50 μM , el resveratrol disminuye la K_m , tanto para NAD^+ como para el péptido acetilado, sin invertir la disminución de V_{max} inducida por nicotinamida. Se ha propuesto que las sirtuinas pueden unir nicotinamida en un segundo sitio, conocido como "el bolsillo C", distinto del sitio "B" que interactúa con el resto nicotinamida de NAD^+ ²⁶. A la vista de esta complejidad potencial, probablemente será necesarios estudios cinéticos adicionales, suplementados con información estructural/cristalográfica, para dilucidar plenamente la interacción entre los efectos de nicotinamida y polifenoles.

15 **Ejemplo 3: Compuestos activantes extienden el tiempo de vida de levaduras**

Para investigar si estos compuestos podrían estimular las sirtuinas *in vivo*, los autores de la invención utilizaron *S. cerevisiae*, un organismo en el que los reguladores de aguas arriba y las dianas de aguas abajo de Sir2 son relativamente bien conocidos. Un estudio de dosis-respuesta de resveratrol de las tasas de desacetilación de Sir2 (Fig. 2a) revela de hecho que el resveratrol estimula Sir2 *in vitro*, siendo la concentración óptima de activador de 2- 5 μM . Los niveles de activación fueron algo inferiores a los de SIRT1, y a diferencia de SIRT1, se observó una inhibición a concentraciones mayores que $\sim 100 \mu\text{M}$.

Resveratrol y otros cuatro potentes activadores de sirtuina, representantes de los estilbeno, flavona y las familias de chalconas, se testaron para determinar su efecto sobre el tiempo de vida de la levadura. Debido al posible impedimento por la pared celular o de la membrana plasmática de la levadura y de la sospechada lenta oxidación del compuesto en el medio, los autores de la invención optaron por utilizar una concentración (10 μM) ligeramente superior a la concentración óptima de resveratrol *in vitro*. Tal como se muestra en la Fig. 2b, quercetina y piceatannol no tenían efecto significativo alguno sobre el tiempo de vida. Por el contrario, buteina, fisetina y resveratrol aumentaron el tiempo de vida medio en un 31, 55 y 70%, respectivamente, y los tres incrementaron significativamente el tiempo de vida máximo (Fig. 2c). Concentraciones de resveratrol mayores que 10 μM no proporcionaron beneficio añadido alguno al tiempo de vida y no había un efecto duradero del compuesto sobre el tiempo de vida de células jóvenes pre-tratadas (Fig. 2d y datos no mostrados).

Para posteriores experimentos genéticos en levaduras los autores de la invención se centraron en resveratrol, porque era el activador de SIRT1 más potente y proporcionaba la mayor prolongación del tiempo de vida. La restricción de glucosa, una forma de CR en levaduras, resultó en ninguna prolongación significativa de las células tratadas con resveratrol de larga vida (Fig. 3a), Indicando que el resveratrol probablemente actúa a través de la misma vía que CR. En consonancia con esto, el resveratrol no tuvo efecto alguno sobre el tiempo de vida de un mutante *sir2* nulo (Fig. 3b). Dado que se informa que resveratrol tiene propiedades fungicidas a altas concentraciones³⁶, y que un estrés leve puede prolongar el tiempo de vida de levaduras mediante la activación de *PNC1*⁶, era plausible que resveratrol prolongaba el tiempo de vida mediante la inducción de *PNC1*, en lugar de actuar directamente sobre Sir2. Sin embargo, resveratrol prolongaba el tiempo de vida de un mutante *PNC1* nulo casi tan bien como lo hizo las células de tipo salvaje (Fig. 3b). En conjunto, estos datos demuestran que resveratrol actúa aguas debajo de *PNC1* y requiere *SIR2* para su efecto. Por lo tanto, la explicación más simple para estas observaciones es que resveratrol aumenta el tiempo de vida al estimular directamente la actividad de Sir2.

Una de las principales causas del envejecimiento de levaduras se cree que se deriva de la inestabilidad inherente del locus repetitivo de $\text{ADNr}^{2,5,37-39}$. La recombinación homóloga entre repeticiones de ADNr puede generar una forma circular extracromosómico de ADNr (ERC) que se replica hasta que alcance niveles tóxicos en las células viejas. Se cree que Sir2 prolonga el tiempo de vida mediante la supresión de la recombinación en la barrera de la bifurcación de replicación de ADNr^{40} . En consonancia con la prolongación del tiempo de vida observado para resveratrol, este compuesto reducía la frecuencia de recombinación ADNr en $\sim 60\%$ (Fig. 3c), de una manera dependiente de *SIR2* (Fig.3d). En presencia del inhibidor de Sir2 nicotinamida, la recombinación también se redujo por parte de resveratrol (Fig. 3c), de acuerdo con los datos cinéticos (véase la Fig. 1d). Curiosamente, los autores de la invención han encontrado que resveratrol y otros activadores de sirtuina tenían sólo efectos menores sobre el silenciamiento de ADNr (Figs. 3e y f). Se está trabajando para dilucidar cómo estos diversos compuestos pueden afectar diferencialmente a la estabilidad y el silenciamiento de ADNr .

Otra medida del tiempo de vida en *S. cerevisiae* es el tiempo que las células pueden sobrevivir en un estado metabólicamente activo, pero privado de nutrientes. El envejecimiento bajo estas condiciones (es decir, el envejecimiento cronológico) se debe principalmente al daño oxidativo⁴¹. Resveratrol (10 μ M o 100 μ M) no pudo prolongar el tiempo de vida cronológico (no mostrado), indicando que el efecto estimulante por sirtuina de resveratrol puede ser más relevante *in vivo* que su actividad antioxidante^{30,31}.

Ejemplo 4: Efectos de activadores en células humanas

Para testar si estos compuestos podrían estimular SIRT1 humana *in vivo*, los autores de la invención emplearon primero un ensayo de deacetilasa celular que habían desarrollado. Un esquema del proceso de ensayo se representa en la Fig.4a. Las células se incuban con medio que contiene el sustrato ϵ -acetil-lisina fluorogénico, 'Fluor de Lys' (FdL). Este sustrato, neutro cuando es acetilado, se carga positivamente tras la desacetilación y se acumula dentro de las células (véase la Fig. 6a). La lisis de las células y la adición del reactivo 'Developer' no permeable a las células libera un fluoróforo específicamente de esas moléculas de sustrato que han sido desacetilizadas (Fig. 4a y véase Métodos). Con células HeLa en crecimiento adherente, el 5-10% de la señal producida en este ensayo es insensible a tricostatina A (TSA) 1 μ M, un potente inhibidor de HDACs de clase I y II, pero no a sirtuinas (clase III)⁴²(Figs. 6b y 6c).

Se ensayó una selección de polifenoles estimulantes y no estimulantes de SIRT1 en cuanto a sus efectos sobre esta señal insensible a TSA (Fig. 4b). Señales de desacetilación celulares en presencia de cada uno de los compuestos (eje y, Fig. 4b) se representaron frente a sus estimulaciones múltiples de SIRT1 *in vitro* (eje x, Fig. 4b, datos de las Tablas Suplementarias 1-3). Para la mayoría de los compuestos, la actividad *in vitro* correspondía más o menos a la señal celular. Los compuestos con poca o ninguna actividad *in vitro* se agruparon en torno al control negativo (Grupo A, Fig. 4b). Otra agrupación de fuertes activadores *in vitro* está claramente distanciada del grupo de baja actividad en ambas dimensiones (Grupo B, Fig. 4b). Un caso aparte notable era buteina, un potente activador de SIRT1 *in vitro*, que no tuvo efecto alguno sobre la señal celular. Con las asignaciones para la posible variación entre estos compuestos en las propiedades no relacionadas con la estimulación directa de sirtuina tales como permeabilidad de las células y tasas de metabolismo, estos datos son consistentes con la idea de que determinados polifenoles pueden activar sirtuinas nativas *in vivo*.

Una diana conocida de SIRT1 *in vivo* es lisina 382 de p53. La desacetilación de este residuo por parte de SIRT1 disminuye la actividad y la semivida de p53^{20,21,27}. Para seguir el estado de acetilación de K382 los autores de la invención generaron un anticuerpo policlonal de conejo que reconoce la forma acetilada de K382 (Ac-K382) en transferencias Western de lisados de células enteras. Como control los autores de la invención demostraron que la señal fue específicamente detectada en extractos de células expuestas a la radiación ionizante (Fig. 4c), pero no en extractos de células que carecen de p53 o en los que la arginina ha sido sustituida por lisina 382 (datos no mostrados). Células de osteosarcoma U2OS fueron pre-tratadas durante 4 horas con resveratrol (0,5 y 50 μ M) y fueron expuestas a radiación UV. Los autores de la invención observaron consistentemente una acusada disminución en el nivel de Ac-K382 en presencia de resveratrol 0,5 μ M, en comparación con las células no tratadas (Fig. 4d). A concentraciones más altas de resveratrol (> 50 μ M) el efecto se invirtió (Fig.4d y datos no mostrados), consistente con los informes previos de la actividad incrementada de p53 a tales concentraciones⁴³. La capacidad de bajas concentraciones de resveratrol de fomentar la desacetilación de p53 estaba disminuida en células que expresan un alelo *SIRT1* dominante negativo (H363Y) (Fig. 4e), demostrando que SIRT1 es necesaria para este efecto. Esta dosis-respuesta bifásica de resveratrol podría explicar la dicotomía en la bibliografía sobre los efectos de resveratrol sobre la supervivencia de células^{30,43,44}.

Por lo tanto, los autores de la invención han descubierto la primera clase conocida de activadores de sirtuinas de moléculas pequeñas, todos los cuales son polifenoles vegetales. Estos compuestos pueden estimular drásticamente la actividad de sirtuina *in vitro* y fomentar efectos consistentes con una actividad incrementada de sirtuina *in vivo*. En células humanas, resveratrol fomenta la desacetilación de p53 mediada por SIRT1 de K382. En levaduras, el efecto de resveratrol sobre el tiempo de vida es tan grande como cualquier manipulación genética fomentadora de longevidad⁶ y se ha relacionado de manera convincente con la activación directa de Sir2. La correlación entre el tiempo de vida y la recombinación de ADN_r, pero no el silenciamiento, se suma al cuerpo de evidencia de que el envejecimiento de levaduras es debido a la inestabilidad del ADN^{2,5,37-39} no a la desregulación génica⁴⁵.

¿Cómo se puede explicar la activación de las sirtuinas de levaduras y humanas por tantos metabolitos vegetales? Las sirtuinas se han encontrado en diversos eucariotas, incluyendo hongos, protozoos, metazoos y plantas^{46,47}, y probablemente evolucionaron en una fase temprana en la historia de la vida¹. Se sabe que las plantas producen una diversidad de polifenoles, incluyendo resveratrol, en respuesta a estreses tales como deshidratación, privación de

5 nutrientes, radiación UV y agentes patógenos^{48,49}. Por lo tanto es plausible que estos compuestos puedan ser sintetizados para regular una respuesta de estrés de la planta mediada por sirtuina. Esto sería consistente con la relación recientemente descubierta entre el estrés ambiental y la actividad de Sir2 en levaduras⁶. Tal vez estos compuestos tengan actividad estimulante sobre las sirtuinas de hongos y animales, porque imitan a un activador endógeno, como es el caso de los opiáceos/endorfinas, cannabinoles/endocannabinoides y diversos polifenoles con actividad similar a estrógenos^{30,31}. Alternativamente, las sirtuinas de animales y hongos pueden haber conservado o desarrollado una capacidad de responder a estos metabolitos de las plantas, ya que son un indicador útil de un entorno deteriorante y/o del suministro de alimentos.

Ejemplo 5: Materiales y Métodos para los Ejemplos 1-4

10 Bancos de compuestos y ensayos de desacetilación

Se prepararon SIRT1 recombinante marcado con His₆ y Sir2 recombinante marcado con GST como se ha descrito previamente²⁶. Se utilizaron de 0,1 a 1 µg de SIRT1 y 1,5 µg de Sir2 por cada ensayo de desacetilación (en 50 µl de reacción total) tal como se describió previamente²⁶. Ensayos de SIRT1 y algunos de los de Sir2 empleaban el sustrato p53-382 acetilada ("Fluor de Lys-SIRT1", BIOMOL) en lugar de FdL.

15 Se utilizaron bancos de compuestos temáticos (BIOMOL) para el rastreo primario y secundario. La mayoría de los compuestos de polifenol se disolvieron a 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) el día del ensayo. Para los compuestos solubles en agua y los controles negativos se añadió DMSO al 1% v/v al ensayo. Los resultados del ensayo de fluorescencia *in vitro* se leyeron en microplacas de 96 pocillos blancas de ½ volumen (Corning Costar 3693) con un lector de placas de fluorescencia CytoFluor™II (PerSeptive Biosystems, Ex. 360 nm, Em. 460 nm, ganancia = 85).
 20 Se cultivaron Células HeLa y los ensayos de desacetilación celular se realizaron y se leyeron como antes, pero en microplacas de 96 pocillos de volumen completo (Corning Costar 3595). A menos que se indique lo contrario, todas las mediciones de tasa iniciales eran medias de tres o más repeticiones, obtenidas con tiempos de incubación individuales, punto en el que se había desacetilado el 5% o menos del sustrato inicialmente presente. El cálculo de los incrementos netos de fluorescencia incluyeron la resta de un valor en blanco, que en el caso de Sir2 fue obtenido omitiendo la enzima de la reacción y en el caso de SIRT1 añadiendo un inhibidor (suramina 200 µM o nicotinamida 1 mM) a la reacción antes del sustrato acetilado. Un cierto número de los polifenoles inactivaron parcialmente la fluorescencia producida en el ensayo y se obtuvieron factores de corrección mediante la determinación del aumento de la fluorescencia debido a un pico de 3 µM de un patrón desacetilado de FdL (BIOMOL, número de catálogo KI - 142). Todas las barras de errores representan el error estándar de la media.

30 Medios y Cepas

Todas las cepas de levadura se cultivaron a 30°C en extracto de levadura/bactopeptona completo, medio (YPD) de glucosa al 2,0% (p/v), excepto cuando se indique lo contrario. La restricción calórica fue inducida en glucosa al 0,5%. Medio sintético completo (SC) consistía en base de nitrógeno de levadura al 1,67%, glucosa al 2%, 40 mg/litro de cada uno de marcadores auxotróficos. *SIR2* se integró en una copia extra y se alteró como se describe⁵.
 35 Otras cepas se describen en otro lugar²⁶. Para los ensayos de desacetilación celular se utilizaron células HeLa S3. Células de osteosarcoma U2OS y de riñón embrionario humano (HEK 293) se cultivaron de forma adherente en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero de ternera fetal (FCS) al 10% con glutamina al 1,0% y penicilina/estreptomina al 1,0%. HEK 293 que sobre-expresan H363Y SIRT1 dominante negativo fue un regalo de R. Frye (U. de Pittsburgh).

40 Determinaciones del tiempo de vida

Se realizaron mediciones del tiempo de vida con PSY316AT *MATα* tal como se ha descrito previamente³⁵. Todos los compuestos para los análisis del tiempo de vida se disolvieron en etanol al 95% y las placas se secaron y utilizaron dentro de las 24 horas. Antes del análisis del tiempo de vida, las células se pre-incubaron en sus respectivos medios durante al menos 15 horas. Después de la transferencia a una nueva placa, las células se equilibraron en el medio durante un mínimo de 4 horas antes de su micro-manipulación. Se examinaron al menos 30 células por experimento y cada uno de los experimentos se realizó al menos dos veces. La significación estadística de las diferencias del tiempo de vida se determinó utilizando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon. Se establece que las diferencias son significativas cuando la confianza es mayor que 95%.

Ensayos de silenciamiento y recombinación

Los ensayos de silenciamiento de ADN ribosomal utilizando los informadores *URA3* se realizaron como se ha descrito previamente²⁶. Las frecuencias de recombinación de ADN ribosomal se determinaron mediante siembra de células W303AR³⁷ en medio YPD con baja adenina/histidina y contando la fracción de colonias sectorizadas medio-rojas utilizando el software Bio-Rad Quantity One como se ha descrito previamente³⁵. Se analizaron al menos 6000 células por experimento y todos los experimentos se realizaron por triplicado. Todas las cepas se pre-cultivaron durante 15 horas con el compuesto relevante antes de la siembra.

Proteínas y análisis Western

Sir2-GST recombinante se expresó y purificó a partir de *E. coli* como se describió previamente, excepto que los lisados se prepararon utilizando tratamiento con ultrasonidos²⁶. SIRT1 recombinante de *E. coli* se preparó como se ha descrito previamente²⁶. Se generó antisuero policlonal contra p53-Ack382 utilizando un antígeno péptido acetilado tal como se describió previamente²⁰, con las siguientes modificaciones. El anticuerpo anti-Ac-K382 se purificó por afinidad utilizando péptidos p53-K382 no acetilados y se almacenó en PBS a -70°C y reconocía un péptido p53 acetilado pero no uno no acetilado. Hibridaciones Western utilizando anticuerpo anti-K382 acetilado o anti-actina (Chemicon) se realizaron a una dilución 1:1000 de anticuerpo. Las hibridaciones con anticuerpo policlonal p53 (Santa Cruz Biotech) utilizaron una dilución 1:500 de anticuerpo. Se prepararon extractos de células enteras lisando las células en tampón que contenía NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, glicerol al 10%, NP40 al 1%, DTT 1 mM y cóctel de anti-proteasa (Roche).

Referencias para los Ejemplos 1-4 y Antecedentes

1. Kenyon, C. *Cell* 105, 165-168 (2001).
2. Sinclair, D. A. *Mech Ageing Dev* 123, 857-67 (2002).
3. Hekimi, S. y Guarente *Science* 299, 1351-4 (2003).
4. Guarente, L. y Kenyon, C. *Nature* 408, 255-62. (2000).
5. Lin et al. *Science* 289, 2126-8. (2000).
6. Anderson et al. *Nature* 423, 181-5 (2003).
7. Kaeberlein et al. *Genes Dev* 13, 2570-80. (1999).
8. Landry et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 5807-11. (2000).
9. Imai et al. *Nature* 403, 795-800 (2000).
10. Smith et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 6658-63. (2000).
11. Tanner et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 14178-82. (2000).
12. Tanny et al. *Cell* 99, 735-45. (1999).
13. Tanny et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 415-20. (2001).
14. Laurenson et al. *Microbiol Rev* 56, 543-60. (1992).
15. Smith et al. *Genes Dev* 11, 241-54. (1997).
16. Bryk, M. et al. *Genes Dev* 11,255-69. (1997).
17. Gottlieb et al. *Cell* 56, 771-6. (1989).
18. Aguilaniu et al. *Science* (2003).
19. Tissenbaum et al. *Nature* 410, 227-30. (2001).
20. Vaziri et al. *Cell* 107, 149-59. (2001).
21. Luo et al. *Cell* 107, 137-48. (2001).
22. Vergnes et al. *Gene* 296, 139-50 (2002).
23. Holzenberger et al. *Nature* 421, 182-7 (2003).
24. Shimokawa et al. *Faseb J* 17, 1108-9 (2003).
25. Tatar et al. *Science* 299, 1346-51 (2003).
26. Bitterman et al. *J Biol Chem* 277, 45099-107. (2002).
27. Langley et al. *EMBO J* 21, 2383-2396 (2002).
28. Glossmann et al. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 317, 100-2 (1981).
29. Oliver et al. *J Biol Chem* 269, 29697-703 (1994).
30. Ferguson et al. *Mutat Res* 475, 89-111 (2001).
31. Middleton et al. *Pharmacol Rev* 52, 673-751 (2000).
32. Jang et al. *Science* 275, 218-20 (1997).
33. Stojanovic et al. *Arch Biochem Biophys* 391, 79-89 (2001).
34. Monod et al. *J. Mol. Biol.* 12, 88-118 (1965).
35. Anderson et al. *J Biol Chem* 277, 18881-90. (2002).
36. Pont et al. *J Phytopathol* 130, 1-8 (1990).
37. Sinclair et al. *Cell* 91, 1033-42. (1997).
38. Defossez et al. *Mol Cell* 3, 447-55 (1999).

39. Park et al. *Mol Cell Biol* 19, 3848-56 (1999).
 40. Benguria et al. *Nucleic Acids Res* 31, 893-8 (2003).
 41. Longo et al. *Science* 299, 1342-6 (2003).
 42. Denu et al. *Trends Biochem Sci* 28, 41-8 (2003).
 5 43. Dong et al. *Mutat Res* 523-524, 145-50 (2003).
 44. Nicolini et al. *Neurosci Lett* 302, 41-4 (2001).
 45. Jazwinski, S. M. et al. *Ann N Y Acad Sci* 908, 21-30 (2000).
 46. Pandey et al. *Nucleic Acids Res* 30, 5036-55 (2002).
 47. Frye, R. A. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 793-8. (2000).
 10 48. Soleas et al. *Clin Biochem* 30, 91-113 (1997).
 49. Coronado et al. *Plant Physiol* 108, 533-542 (1995).
 50. Masoro, E. *J.Exp Gerontol* 35, 299-305. (2000).

Ejemplo 6: Localización del dominio de activación de sirtuinas a su extremo N

- 15 Sir2 de levadura y SIRT1 humana son muy homólogas y difieren de SIRT2 humana por la adición de un dominio N-terminal que está ausente en SIRT2. El efecto de resveratrol se sometió a ensayo en SIRT2 recombinante humana de la siguiente manera. SIRT2 recombinante humana se incubó a una concentración de 1,25 µg/pocillo con 25 µM de Fluor de Lys-SIRT2 (BIOMOL cat. nº KI-179) y 25µM de NAD⁺ durante 20 minutos a 37°C, tal como se describe anteriormente. Los resultados, que se muestran en la Figura 7, indican que, en contraste con SIRT1,
 20 concentraciones crecientes de resveratrol disminuyen la actividad de SIRT2. Por lo tanto, en base a la diferencia en la estructura de SIRT1 y SIRT2, es decir, la ausencia de un dominio N-terminal (véase la Fig. 8), se cree que es necesario el dominio N-terminal de SIRT1 y Sir2 para la activación por parte de los compuestos descritos en esta memoria. En particular, es probable que los compuestos activadores descritos en esta memoria interactúen con la porción N-terminal de sirtuinas. La parte N-terminal de SIRT1, que es necesaria para la acción de los compuestos,
 25 es de aproximadamente el aminoácido 1 a aproximadamente el aminoácido 176, y la de Sir2 es de aproximadamente el aminoácido 1 a aproximadamente el aminoácido 175.

Ejemplo 7: Resveratrol prolonga el tiempo de vida de *C. elegans*

- 50 gusanos de *C. elegans* (cepa N2) se cultivaron en presencia o ausencia de resveratrol 100 µM durante 17 días. El día 17, sólo 5 gusanos en el grupo de control sin resveratrol estaban vivos, mientras que 17 gusanos estaban
 30 vivos en el grupo tratado con resveratrol. Por lo tanto, la presencia de resveratrol en el medio de crecimiento de *C. elegans* prolonga el tiempo de vida.

Ejemplo 8: Identificación de activadores adicionales de sirtuinas

Utilizando el ensayo de rastreo descrito en el Ejemplo 1, se han identificado cinco activadores más de sirtuinas. Éstos se recogen en la Tabla Suplementaria 8.

35 Ejemplo 9: Identificación de inhibidores de sirtuinas

Utilizando el ensayo de rastreo descrito en el Ejemplo 1, se identificaron más inhibidores. Éstos se recogen en la Tabla Suplementaria 8 anexa, y corresponden a los compuestos que tienen una tasa de relación a control de menos de 1.

Ejemplo 10: Identificación de activadores e inhibidores adicionales de sirtuinas

- 40 Se identificaron activadores e inhibidores adicionales de sirtuinas, y se enumeran en las Tablas 9-13. En estas Tablas, "SE" representa el error típico de la media y N es el número de réplicas utilizadas para calcular la tasa de relación a control y el error típico.

- Todas las mediciones de la tasa SIRT1 utilizadas en el cálculo de "Tasa de Relación a Control" se obtuvieron con NAD⁺ 25 µM y sustrato de péptido acetilado p53-382 25 µM se realizaron como se ha descrito anteriormente y en
 45 K.T. Howitz et al. *Nature* (2003) 425:191. Todos los datos de relación se calcularon a partir de experimentos en los que la desacetilación total en la reacción de control era de péptido 0,25-1,25 µM o 1-5% de la concentración inicial de péptido acetilado.

5 Determinaciones de estabilidad ($T_{1/2}$) derivadas de mediciones de la tasa SIRT1 realizadas de una manera similar a la descrita anteriormente, excepto que se utilizó sustrato de péptido acetilado p53-382 5 μM en lugar de 25 μM . La estimulación múltiple (relación a control) obtenida con un compuesto diluido a partir de una disolución madre envejecida se comparó con una dilución idéntica de una solución madre recién preparada a partir del compuesto sólido. " $t_{1/2}$ " se define como el tiempo requerido para la estimulación múltiple por parte de SIRT1 del compuesto de la disolución envejecida hasta que decaiga a la mitad de la obtenida a partir de una disolución recién preparada. Se prepararon materiales de etanol de resveratrol, BML-212 y BML-221 a 2,5 mM y los compuestos se ensayaron a una concentración final de 50 μM . El material agua de resveratrol fue de 100 μM y el ensayo se realizó a 10 μM . Los materiales se envejecieron por almacenamiento a temperatura ambiente, en viales de vidrio, bajo una atmósfera de nitrógeno.

El efecto de algunos de estos compuestos sobre el tiempo de vida se determinó en levaduras y *C. elegans* tal como se describió anteriormente. Los resultados se exponen a continuación en la Tabla 19:

Compuesto	% de cambio en el tiempo de vida replicativo en levadura con relación a organismos no tratados (10 μM) ^a	% de cambio en el tiempo de vida en <i>C. elegans</i> con relación a organismos no tratados (100-500 μM) ^b
sin tratar	100%	100%
Resveratrol 3,5,4'-trihidroxi <i>trans</i> -estilbeno	170 - 180%	110%
Pinosilvina 3,5-dihidroxi- <i>trans</i> -estilbeno	114%	ND
BML-212 3,5-dihidroxi-4'-fluoro- <i>trans</i> -estilbeno	98%	ND
BML-217 3,5-dihidroxi-4'-cloro- <i>trans</i> -estilbeno	90%	ND
BML-221 3,4'-dihidroxi-5-acetoxi- <i>trans</i> -estilbeno	165%	> 100% (en curso)
BML-233 3,5-dihidroxi-4'-metoxi- <i>trans</i> -estilbeno	ND	70% (10) 50% (500)

a. Tiempos de vida replicativos realizados utilizando medio completo de levadura (YPD) estándar con glucosa al 2% (p/v) bajo condiciones estándar.

b. Los ensayos del tiempo de vida realizados en gusanos N2 utilizando *E. coli* como alimento en condiciones estándar.

ND. No determinado.

Los resultados indican que resveratrol prolonga significativamente el tiempo de vida en levaduras y en *C. elegans*. Ya que BML-233 ha demostrado ser un fuerte activador de las sirtuinas (véase arriba), los resultados obtenidos en *C. elegans* pueden indicar que el compuesto es tóxico para las células.

Sin querer estar limitado a estructuras particulares, parece que existen las siguientes relaciones estructura/actividad. Resultados de activación de SIRT1 de varios de estos nuevos análogos confirmaron la importancia de la planaridad, o al menos el potencial de planaridad, entre y dentro de los dos anillos de la compuestos activos. La reducción del doble enlace de la función de etileno entre los dos anillos suprime esencialmente la actividad (compárese Resveratrol, Tabla A y Dihidro-resveratrol, Tabla E). La sustitución de un resto fenilo con un grupo ciclohexilo es casi tan perjudicial para estimular la actividad de SIRT1 (compárese Pinosilvina, Tabla 9 y BML-224, Tabla 12). Se cree que los enlaces amida tienen parcialmente un carácter de doble enlace. Sin embargo, la sustitución de la función de etileno con una carboxamida abolió la actividad (compárese Pinosilvina, Tabla 9, con BML-219, Tabla 13). Es posible que este efecto pueda ser debido, en parte, a la posición que el oxígeno de carbonilo debe asumir en la conformación que sitúa a los dos anillos en posición *trans* uno con otro. Si es así, podría esperarse que un compuesto, en el que las posiciones del nitrógeno de la amida y carbonilo están invertidas, tenga una mayor actividad.

En doce de los análogos 4'-hidroxilo del resveratrol fue reemplazado por diversas funcionalidades (véanse Las Tablas 9 y 10, BML-221 en la Tabla 11, BML-222 en la Tabla 12). Aunque ninguno de los reemplazos intentados condujo a aumentos sustanciales en la actividad estimulante de SIRT1, este parámetro era, en general, notoriamente tolerante a las sustituciones en esta posición. Pequeños grupos (H- en Pinosilvina, Cl- en BML-217, -CH₃ en BML-228) hicieron lo mínimo para disminuir la actividad. Existe una cierta evidencia de una preferencia en el

sitio de unión/activación de estilbeno de la enzima para funciones no ramificadas (etilo en BML-225, azido en BML-232, -SCH₃ en BML-230) e hidrofóbicas (compárese isopropilo en BML-231 con acetoxi en BML-221, acetamida en BML-222). La estabilidad en disolución con relación a resveratrol se incrementó fuertemente por una de las dos sustituciones 4' (acetoxi, BML-221) testada para ello hasta el momento.

5 Resveratrol es actualmente uno de los activadores más potentes de SIRT1 conocidos. La colección de análogos descritos anteriormente, en particular el grupo que implica sustituciones en la posición 4', puede servir para informar del diseño de nuevos ligandos de SIRT1 con propiedades farmacológicas mejoradas. Un parámetro que puede ser de interés a este respecto es la estabilidad. Un análogo 4'-sustituido, BML-221, exhibe una amplia mejora en la estabilidad en disolución con relación a resveratrol y aunque disminuida en la capacidad de activación de SIRT1 *in vitro*, conserva gran parte de la actividad biológica de resveratrol (véanse datos del tiempo de vida). Se piensa que el 4'-hidroxilo de resveratrol es de importancia primordial para la reactividad de neutralización de radicales libres de resveratrol (S. Stojanovic *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 2001 391 79). La mayor parte de los análogos 4'-sustituidos todavía tienen que ser sometidos a ensayo en cuanto a la estabilidad en disolución, pero si la inestabilidad de resveratrol en disolución se debe a la reactividad redox, sería de esperar que muchos de los otros análogos exhibieran también una estabilidad mejorada.

Los resultados obtenidos con análogos 4'-sustituidos pueden indicar vías prometedoras a explorar mientras se busca aumentar la afinidad de unión de SIRT1. Por ejemplo, la eficacia del compuesto 4'-etilo (BML-225) podría indicar la presencia de un bolsillo de unión estrecha, hidrófobo en el sitio de SIRT1 correspondiente al extremo 4' de resveratrol. Se planean varias nuevas series de análogos 4'-sustituidos, comprendiendo el más simple grupos alifáticos de cadena lineal de diversas longitudes.

Ejemplo 11: Análisis de dosis-respuesta de desacetilación de SIRT1 por parte de resveratrol y BML-230

Tasas iniciales de SIRT1 como una función de la concentración de activador se determinaron a 25 µM de cada uno de NAD⁺ y péptido acetilado p53-382, con incubaciones de 20 minutos. Los gráficos de dosis-respuestas de SIRT1 a BML-230 y resveratrol demuestran que la actividad estimulada por BML-230 supera a la estimulada por resveratrol en todas las concentraciones testadas (Figura 9a). Esto podría ser debido a una mayor afinidad de unión de SIRT1 para BML-230, una mayor actividad del complejo SIRT1/BML-230 o alguna combinación de los dos. Un gráfico de la relación de las tasas de enzima estimulada con BML-230 a la de la enzima estimulada con resveratrol sugiere que la afinidad de unión incrementada contribuye a la mejora de la actividad de BML-230 (Figura 9b). Un modelo simple de dos estados del proceso de unión y activación asume que la tasa observada (*v*) es la suma de las contribuciones fraccionadas de las enzimas sin ligando y con ligando, en donde *v*₀ es la tasa no estimulada, *v*₁ es la tasa de la enzima con ligando-1 unido (*L*₁) y *K*_{L1} es la constante de disociación del complejo enzima/ligando-1:

$$v = v_0(1 - [L_1]/(K_{L1} + [L_1])) + v_1(-[L_1]/(K_{L1} + [L_1]))$$

Una ecuación similar se puede preparar para el ligando-2 y la relación (*R*) de las dos tasas calculadas, una ecuación que incluirá, dadas las condiciones de la Figura 9, la sustitución $[L] = [L_1] = [L_2]$. Se puede demostrar que si las dos constantes de disociación de ligando eran iguales ($K_{L1} = K_{L2} = K_L$), esta relación sería:

$$R = (v_0K_L + v_1[L]) / (v_0K_L + v_2[L])$$

Si $K_{L1} \neq K_{L2}$, esta relación sería en cambio:

$$R = (v_1[L]^2 + (v_0K_{L1} + v_1K_{L2})[L] + v_0K_{L1}K_{L2}) / (v_2[L]^2 + (v_0K_{L2} + v_2K_{L1})[L] + v_0K_{L1}K_{L2})$$

En el primer caso, la representación de *R* frente a $[L]$ sería una hipérbola simple que se aproxima monotónicamente a v_1/v_2 a medida que $[L]$ aumenta. En el segundo caso, como en la Fig. 9b, la gráfica pasaría a través de un máximo antes de acercarse a v_1/v_2 a valores $[L]$ más altos. Los datos de Fig. 9b implicarían que v_1/v_2 (tasa para SIRT1/BML-230 pura dividida por SIRT1/resveratrol pura) no es más que ~1.4 (*R* a 500 µM) y que el complejo SIRT1/BML-230 de hecho tiene una constante de disociación más baja que SLRT1/resveratrol ($K_{L1} < K_{L2}$).

Una de las dificultades en el uso de resveratrol como un agente farmacológico son las concentraciones séricas relativamente bajas de la forma aglicona que puede ser alcanzadas y mantenidas cuando se administra por vía oral

($\ll 1 \mu\text{M}$; véase, por ejemplo, D.M. Goldberg *et al Clin. Biochem.* 2003 36 79). El aumento de la afinidad de unión de SIRT1 de derivados sintéticos mejorará este aspecto del fármaco. Como se ha establecido anteriormente, varias sustituciones del resveratrol 4'-hidroxilo, p. ej., el H- de pinosilvina o Cl- de BML-217, no disminuyeron significativamente el efecto activador de SIRT1. Los resultados obtenidos con BML-230 indican que será posible aumentar en realidad la afinidad de unión SIRT1/activador mediante modificaciones en ese sitio. El 4'-tiometilo de BML-230, por tanto, representa un nuevo punto de partida en la búsqueda de mejoras adicionales en la afinidad de unión de SIRT1 por parte de la síntesis de derivados relacionados (p. ej., 4 'tioetilo, etc.).

Ejemplo 12: Tasas de supervivencia

293 humanas se cultivaron hasta la fase exponencial bajo condiciones estándar y se sometieron a una dosis de compuesto (50 micromolar) durante 96 horas. El número de células vivas en cada instante se contaron utilizando un contador Coulter.

Tabla 24: Estadísticas de supervivencia de las células 293:

Tiempo (h)	Resveratrol	Tio-Metilo	Etilo	Metilo	Isopropilo
		<u>BML-230</u>	<u>BML-225</u>	<u>BML-228</u>	<u>BML-231</u>
0	100%	100%	100%	100%	100%
48	5%	55%	5%	46%	0%
96	0%	57%	8%	32%	0%

Los resultados indican que tiometilo (BML-230) era el menos tóxico en células 293.

Ejemplo 13: Activadores de sirtuinas imitan la restricción calórica y retrasan el envejecimiento en metazoos

La restricción calórica (CR) prolonga el tiempo de vida en numerosas especies. En la levadura en germinación *S. cerevisiae*, este efecto requiere Sir2¹, un miembro de la familia de las sirtuinas de desacetilasas NAD⁺-dependientes de^{2,3}. Compuestos activadores de sirtuina (STACs) pueden fomentar la supervivencia de células humanas y prolongan el tiempo de vida replicativo de levaduras⁴. Aquí, los autores de la invención demuestran que resveratrol y otros STACs activan sirtuinas de *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* y prolongan el tiempo de vida de estos animales hasta un 29% sin reducir la fecundidad. La prolongación del tiempo de vida depende de Sir2 funcional y no se observa cuando se restringen nutrientes. En conjunto, estos datos indican que los STACs ralentizan el envejecimiento de metazoos mediante mecanismos relacionados con la CR.

Las proteínas tipo Sir2 (sirtuinas) son una familia de desacetilasas NAD⁺-dependientes conservadas de *E. coli* a seres humanos⁵⁻⁹ (Fig. 10 a) que juegan papeles importantes en el silenciamiento de genes, la reparación del ADN, la recombinación de ADN_r y el envejecimiento en organismos modelo^{2,10-12}. Cuando la dieta se restringe (restricción calórica, CR), el tiempo de vida se prolonga en diversas especies, sugiriendo que existe un mecanismo conservado para la regulación de nutrientes del envejecimiento¹³⁻¹⁷. En la levadura en germinación, copias extra de este gen prolongan el tiempo de vida en un 30%, aparentemente imitando la CR^{1,18}. Recientemente, los autores de la invención han descrito un grupo de compuestos (STACs) que estimulan la actividad catalítica de sirtuinas de levaduras y humanas, y prolongan el tiempo de vida replicativo de células de levadura hasta un 60%⁴.

Para establecer si los STACs podrían activar sirtuinas de animales multicelulares, los autores de la invención han desarrollado un ensayo de desacetilación basado en células para células S2 de *D. melanogaster*. Varias clases de STACs polifenólicos, incluyendo chalconas, flavonas y estilbenos, aumentó la tasa de desacetilación de una manera NAD⁺-dependiente (Fig.10b). Para determinar si esta actividad se debía a la estimulación directa de un homólogo Sir2, purificaron SIR-2.1 recombinante de *C. elegans* y dSir2 de *D. melanogaster* y determinaron el efecto de diversos STACs sobre la actividad enzimática *in vitro* (Fig. 10c, d). De una manera dependiente de la dosis, resveratrol estimulaba la desacetilación hasta 2,5 veces para SIR-2.1 (Fig. 10e) y 2,4 veces para dSir2 (Fig. 10f). Como ya se observó previamente con enzimas de levaduras y Sir2 humanas, el resveratrol redujo la K_m de SIR-2.1 para el co-sustrato NAD⁺ (Fig. 10g).

Debido a que resveratrol puede prolongar significativamente el tiempo de vida replicativo en levaduras⁴, los autores de la invención se preguntaron si los STACs también podrían prolongar el tiempo de vida en los metazoos *C.*

elegans y *D. melanogaster*. Gusanos de tipo salvaje fueron transferidos a placas que contenían 0 ó 100 μM de resveratrol poco después de alcanzar la edad adulta. El tiempo de vida se prolongó de forma reproducible hasta un 15%, utilizando *E.coli* matada por calor o viva como suministro de alimentos (Fig. 11a, c, respectivamente) y la mortalidad se redujo en todas las edades adultas (Fig. 14). Para testar si la prolongación del tiempo de vida depende de SIR-2.1 funcional, construyeron un mutante *sir-2.1* nulo. El tiempo de vida de esta cepa no era apreciablemente más corto que el control N2 de tipo salvaje y adultos tratados con resveratrol no exhibían una prolongación significativa del tiempo de vida con respecto a gusanos no tratados (Fig. 11b, d). No hubo disminución en la fecundidad asociada con el tratamiento con resveratrol (Fig. 11e). Para descartar la posibilidad de que el resveratrol estuviera provocando que los animales comieran menos, induciendo con ello un efecto CR indirectamente, los autores de la invención midieron las tasas de alimentación de gusanos tanto larvas L4 como adultos con o sin resveratrol y no encontraron diferencias (Fig. 11f).

También sometieron a ensayo si los STACs podrían prolongar el tiempo de vida de *D. melanogaster* utilizando la cepa de tipo salvaje estándar de laboratorio Canton-S y condiciones normales de cultivo de la mosca (viales), y una cepa de tipo salvaje marcada *yw* y condiciones de cultivo demográficas (jaulas) (Tabla 20). A través de ensayos independientes en machos y hembras, el tiempo de vida se prolongó hasta un 23% con fisetina y hasta un 29% con resveratrol (Fig. 12a, c, e). La longevidad incrementada se asoció con una mortalidad reducida antes del día 40 (Fig. 14). Una dieta restringida aumentaba el tiempo de vida en un 40% en hembras y en un 14% en machos (promediados entre los ensayos), y bajo estas condiciones ni resveratrol ni fisetina incrementaron adicionalmente la longevidad (Fig. 12b, d, f), sugiriendo que resveratrol prolonga el tiempo de vida a través de un mecanismo relacionado con la CR.

Sorprendentemente, mientras que las manipulaciones de la dieta que prolongan la longevidad de *D. melanogaster* reducen típicamente la fecundidad^{19,20}, dosis prolongadoras de la longevidad aumentaron modestamente la producción de huevos (resveratrol 10 μM : 69,8 huevos/5 días, s.e. = 2,2; control: 59,9 huevos/5 días, s.e. = 2,2; $t = 3,17$, $P = 0,0017$), particularmente en los primeros días de la vida adulta (Fig. 12g). El aumento en la producción de huevos sugiere que el efecto prolongador del tiempo de vida de resveratrol en *D. melanogaster* no se debió a una CR inducida por aversión a la comida o la falta de apetito. Consistente con esto, no se observó una disminución en la ingesta de alimentos con moscas alimentadas con resveratrol (Fig. 12h). Además, las moscas alimentadas con resveratrol mantenían un peso normal (Fig. 12i), excepto durante los días 3 cuando hembras alimentadas con resveratrol estaban poniendo significativamente más huevos que las hembras alimentadas con control.

Para determinar si resveratrol prolonga el tiempo de vida de las moscas de una manera dependiente de Sir2, los autores de la invención analizaron una serie alélica *dSir2* con cantidades crecientes de *dSir2*. Se sometieron a ensayo los hijos adultos a partir de cruces entre alelos derivados independientemente de *dSir2*. Resveratrol no logró prolongar el tiempo de vida de las moscas que carecen completamente de *dSir2* funcional (*dSir2*^{4,5}/*dSir2*^{5,26}) (Fig. 13a, b) o en moscas en las que *dSir2* está seriamente disminuida (*dSir2*¹⁷/*dSir2*^{KG00871}) (Fig. 13c, d). Resveratrol aumentaba la longevidad de una pequeña pero estadísticamente significativa cantidad de moscas homocigotas para un alelo *dSir2* hipomórfico (*dSir2*^{KG0087}/*dSir2*^{KG0087}) (Tabla 20, Ensayo 6) y aumentaba el tiempo de vida hasta un 17% en moscas con una copia del alelo hipomórfico y una copia de un *dSir2* de tipo salvaje (Canton-S/*dSir2*^{KG0087}) (Tabla 20, Ensayo 7). Estos datos demuestran que la capacidad de resveratrol de prolongar el tiempo de vida de la mosca requiere Sir2 funcional.

Los autores de la invención han informado anteriormente que los STACs prolongan el tiempo de vida de las células de levadura en replicación mediante la imitación de la CR⁴. En levadura, el envejecimiento cronológico y reproductivo son inseparables en la medida del tiempo de vida replicativo. Aquí los autores de la invención demuestran que los STACs pueden prolongar el tiempo de vida en *C.elegans* y *D. melanogaster*, ambas de las cuales están compuestas principalmente por células que no se dividen (post-mitóticas) como adultos, y cuyo envejecimiento somático y reproductivo son medidas independientes de la senescencia. En ambas especies, resveratrol aumenta el tiempo de vida de una manera dependiente de Sir2 y, al menos para la mosca, esta acción parece funcionar a través de una vía común para CR.

La observación de los autores de la invención de que resveratrol puede aumentar la longevidad y sin un coste aparente de reproducción está en contra de los conceptos prevalecientes de la evolución de la senescencia. Sin embargo, los STACs todavía pueden implicar compensaciones bajo algunas condiciones ambientales^{21,22} o en el contexto de la selección actuando sobre la red de rasgos que determinan la aptitud^{23,24}. Las plantas sintetizan STACs tales como resveratrol en respuesta al estrés y la limitación de nutrientes²⁵, posiblemente para activar sus propias vías de sirtuinas⁴. Estas moléculas pueden activar sirtuinas animales, porque sirven como mecanismos de defensa de las plantas contra consumidores o porque son ancestralmente ortólogos a activadores endógenos dentro de los metazoos. Alternativamente, los animales pueden utilizar moléculas de estrés de las plantas como una señal

para prepararse para una disminución de su entorno o el suministro de alimentos⁴. La comprensión del significado adaptativo, la función endógena y el origen evolutivo de los activadores de sirtuinas dará lugar a perspectivas adicionales sobre los mecanismos subyacentes de la regulación de la longevidad y a la ayuda en el desarrollo de intervenciones que proporcionan los beneficios para la salud de CR.

5 **Ejemplo 14: Materiales y métodos para el Ejemplo 14**

Purificación de sirtuína

SIR-2.1 recombinante marcado con His₆ y dSir2 se purificaron de células *plysS* de *E. coli* BL21 (DE3) que albergan plásmidos ya sea pET28a-sir-2.1 o pRSETc-dSir2. Las células se cultivaron en medio LB que contiene kanamicina (50 µg/ml) para pET28a-sir-2.1 o ampicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (25 µg/ml) para pRSETc-dSir2 a 30°C (dSir2) o 37°C (SIR-2.1) a una DO₆₀₀ de 0,6-0,8. Después de la adición de IPTG (1 mM), los matraces se cambiaron a 16°C durante 20 h. Los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón PBS frío que contenía NaCl 300 mM, DTT 0,5 mM, PMSF 0,5 mM y comprimidos de inhibidor de proteasa libres de EDTA y se lisaron mediante tratamiento con ultrasonidos. Perlas de Ni²⁺-NTA se añadieron al extracto clarificado y después de 1-3 horas se cargaron en una columna, se lavaron con tampón (Tris.Cl 50 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, imidazol 30 mM) y luego se eluyeron con el mismo tampón que contenía imidazol 600 mM.

Ensayos de desacetilación

De 0,1 a 1 µg de SIR-2.1 y 1 µg de dSir2 se utilizaron por ensayo de desacetilación tal como se describe previamente con modificaciones (SIR-2.1: NAD⁺ 200 µM, Fluor de Lys, FdL 10 µM; dSir2: NAD⁺ 25 µM, FdL 10 µM)²⁶. Los STACs se disolvieron a 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) el día del ensayo. Los resultados del ensayo de fluorescencia *in vitro* se leyeron en microplacas de 96 pocillos (Corning Costar 3693) con un contador Wallac Victor Multilabel (Perkin Elmer, excitación a 360 nm, emisión a 450 nm). Células de *Drosophila* S2 se hicieron crecer en medio de Schneider con suero de ternera fetal a 23-28°C, se sembraron a razón de 9x10⁴ células/pocillo, se cultivan durante la noche y luego se expusieron a TSA 1 µM, polifenoles 500 µM y FdL 200 µM durante 2 h. La desacetilación de FdL con lisado de células enteras se determinó como se describe⁴. A menos que se indique lo contrario, todas las mediciones de tasa iniciales eran medias de tres o más réplicas obtenidas con tiempos de incubación individuales, punto en el que se desacetiló 5% o menos del sustrato inicialmente presente.

Ensayos de medios, cepas, tiempos de vida y de alimentación de *C. elegans*

Bristol N2 (*Caenorhabditis* Genetics Center) se utilizó como la cepa de tipo salvaje. La cepa mutante *sir-2.1* se generó por retrocruzamiento de VC199 (*sir-2.1(ok434)*) a N2 cuatro veces. Los cultivos se desarrollaron en medios NGM estándares y se mantuvieron en la cepa OP50 de *E. coli*. Para los ensayos del tiempo de vida, animales sincronizados se transfirieron a placas de tratamiento como adultos jóvenes (2 días después de la eclosión, el día 0 del ensayo), y se transfirieron a placas recientes de tratamiento cada 2 días durante los primeros 6 a 8 días del ensayo. Las placas de tratamiento eran medios NGM estándares con el supresor reproductivo FUDR (Sigma; 100 mg/L) que contiene resveratrol o disolvente (DMSO, que no afecta al tiempo de vida) se añadieron, ya sea directamente al agar antes del vertido (para ensayos de OP50 viva) o diluidos en PBS y se añadieron a la superficie de una placa seca a la concentración final indicada (para ensayos de OP50 muerta). Para algunos ensayos del tiempo de vida, OP50 matada por calor se utilizó como una fuente de alimento. Cultivos de OP50 se calentaron a 65°C durante 30 minutos, a continuación se sedimentaron y se resuspendieron en un volumen de 1/10 en S Basal suplementado con MgSO₄ 10 mM. En todos los ensayos, los gusanos fueron controlados diariamente en cuanto a la mortalidad por sondeo suave con una punta de platino. Los ensayos se llevaron a cabo a 24°C. Para ensayar las tasas de alimentación de gusanos, gusanos en las fases indicadas se colocaron en placas de tratamiento (sin FUDR) durante 4-5 horas, y luego se filmaron durante 1 minuto utilizando una cámara Pixelink PL-662. La velocidad de fotogramas se redujo y se contó la tasa de bombeo de la faringe. Para ensayar la fecundidad, se permitió a los hermafroditas grávidos (5 por placa, desarrollados a partir de L1s sincronizados en placas normales o de tratamiento) poner sus huevos en sus respectivos medios durante 5 horas, y se contó el número total de huevos.

Ensayos de medios, cepas, tiempos de vida y de alimentación de *D. melanogaster*

Ensayos de supervivencia se realizaron de forma independiente con *D. melanogaster* adulta en dos laboratorios. En el primer laboratorio, todos los ensayos utilizaron una cepa de tipo salvaje marcada *yw*. Las larvas se criaron en

dieta de agar de harina de maíz-azúcar-levadura (CSY) estándar (harina de maíz 5%, sacarosa 10,5%, levadura SAF 2% y agar 0,7%). Adultos recientemente eclosionados se colocaron en jaulas de demografía de 1L con aproximadamente 75 machos y 75 hembras. Se utilizaron de tres a cuatro jaulas de demografía de 1L en paralelo para cada uno de los grupos de tratamiento en cada ensayo. Cada dos días, las moscas muertas se retiraron y se anotó y se reponían viales de alimentos. Los viales de alimentos contenían dieta de harina de maíz-azúcar-levadura con levadura SAF al 2% o 3% en peso. Los compuestos de ensayo en 100 µl de EtOH (o EtOH en blanco en los controles) se mezclaron en partes alícuotas fundidas de los medios de alimentos adultos para hacer una concentración final de 0, 10 ó 100 µM. Nuevas soluciones madre y medios de adultos se prepararon semanalmente. En el segundo laboratorio, los ensayos del tiempo de vida se llevaron a cabo con la cepa de tipo salvaje Canton-S, *dSir2*^{4,5} y *dSir2*^{5,26} (S. Smolik, Universidad de Oregon), *dSir2*¹⁷ (S. Astrom, Universidad de Estocolmo, Suecia) y *dSir2*^{KG00871} (Drosophila Stock Center, Bloomington, IN). Las larvas para todos los ensayos fueron criadas bajo la dieta estándar de harina de maíz-azúcar-levadura. Adultos recién eclosionados se incubaron en viales de centrifugación de plástico que contenían 5 ml de 15% de dieta de azúcar-levadura (15% SY) o dieta de 5% de azúcar-levadura (5% SY) (15% SY:15% de levadura, 15% de sacarosa,2% de agar; 5% de SY:5% de levadura, 5% de sacarosa, 2% de agar según Ref.²⁰). En todos los ensayos, ~ 20 machos con ~ 20 hembras fueron colocadas en cada uno de 10 viales/grupo de tratamiento. Cada dos días, las moscas se pasaron a nuevos viales y se contaron las moscas muertas. Resveratrol en EtOH (o EtOH solo en los controles) se añadió a los medios durante su preparación después de haber sido enfriado a 65°C y se mezcló vigorosamente. Las concentraciones de compuesto finales eran 0, 10, 100 o 200 µM. Disolución madre reciente y medios para adultos se prepararon semanalmente.

La tasa de alimentación se midió en hembras *yw* con el ensayo de llenado de cultivo²⁷. Las hembras se mantuvieron durante la noche con agua y se colocaron en una dieta de 2% de CSY que contenía colorante alimentario (Azul 1 FDA) y 0, 10 ó 100 µM de resveratrol con EtOH. La presencia de alimentos marcados con colorante en el cultivo se puntuó en grupos de 20 hembras a lo largo de cinco intervalos de 5 minutos. Para las mediciones de la masa corporal, 10 viales con 20 machos y 20 hembras cada uno de moscas CS-5 de tipo salvaje se mantuvieron en una dieta de 15% SY con EtOH o con resveratrol en EtOH (10 µM). Los machos y las hembras se pesaron diariamente.

Referencias para los Ejemplos 13 y 14:

1. Lin, S. J., Defossez, P. A. y Guarente, L. Requirement of NAD and SIR2 for lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289, 2126-8. (2000).
2. Gasser, S. C. M. The molecular biology of the SIR proteins. *Gene* 279, 1-16 (2001).
3. Hekimi, S. y Guarente, L. Genetics and the specificity of the aging process. *Science* 299, 1351-4 (2003).
4. Howitz, K. T. et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425, 191-6 (2003).
5. Landry, J. et al. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5807-11. (2000).
6. Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M. y Guarente, L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795-800 (2000).
7. Smith, J. S. et al. A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6658-63. (2000).
8. Tanner, K. G., Landry, J., Sternglanz, R. y Denu, J. M. Silent information regulator 2 family of NAD-dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14178-82. (2000).
9. Tanny, J. C., Dowd, G. J., Huang, J., Hilz, H. y Moazed, D. An enzymatic activity in the yeast Sir2 protein that is essential for gene silencing. *Cell* 99, 735-45. (1999).
10. Guarente, L. Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev* 14, 1021-6. (2000).
11. Tissenbaum, H. A. y Guarente, L. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410,227-30. (2001).
12. Rogina, B., Helfand, S. L. y Frankel, S. Longevity regulation by *Drosophila* Rpd3 deacetylase and caloric restriction. *Science* 298, 1745. (2002).
13. Jiang, J. C., Jaruga, E., Repnevskaya, M. V. & Jazwinski, S. M. An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. *Faseb J* 14, 2135-7. (2000).
14. Kenyon, C. A conserved regulatory mechanism for aging. *Cell* 105, 165-168 (2001).
15. Masoro, E. J. Caloric restriction and aging: an update. *Exp Gerontol* 35, 299-305. (2000).
16. Koubova, J. y Guarente, L. How does calorie restriction work? *Genes Dev* 17, 313-21 (2003).
17. Sinclair, D. A. Paradigms and pitfalls of yeast longevity research. *Mech Ageing Dev* 123, 857-67 (2002).
18. Kaeberlein, M., McVey, M. Y Guarente, L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* 13, 2570-80. (1999).
19. Chippindale, A. K., Leroi, Armand M., Kim, Sung B., y Rose, Michael R. Phenotypic plasticity and selection in *Drosophila* life-history evolution. *Journal of Evolutionary Biology* 6, 171-193 (1993).

20. Chapman, T. y Partridge, L. Female fitness in *Drosophila melanogaster*: an interaction between the effect of nutrition and of encounter rate with males. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 263, 755-9 (1996).
21. Walker, D. W., McColl, G., Jenkins, N. L., Harris, J. y Lithgow, G. J. Evolution of lifespan in *C. elegans*. *Nature* 405,296-7 (2000).
- 5 22. Marden, J. H., Rogina, B., Montooth, K. L. y Helfand, S. L. Conditional tradeoffs between aging and organismal performance of *Drosophila* long-lived mutant flies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3369-73 (2003).
23. Schmid-Hempel, P. On the evolutionary ecology of host-parasite interaction: addressing the question with regard to bumblebees and their parasites. *Naturwissenschaften* 88, 147-58 (2001).
- 10 24. Ebert, D. y Bull, J. J. Challenging the trade-off model for the evolution of virulence: is virulence management feasible? *Trends Microbiol* 11, 15-20 (2003).
25. Soleas, G. J., Diamandis, E. P. & Goldberg, D. M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem* 30, 91-113 (1997).
26. Bitterman, K. J., Anderson, R. M., Cohen, H. Y., Latorre-Esteves, M. & Sinclair, D. A. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem* 277, 45099-107. (2002).
- 15 27. Edgecomb, R. S., Harth, C. E. y Schneiderman, A. M. Regulation of feeding behavior in adult *Drosophila melanogaster* varies with feeding regime and nutritional state. *J Exp Biol* 197, 215-35 (1994).

Ejemplo 15: Identificación de activadores e inhibidores adicionales o sirtuinas

20 Se utilizó el siguiente protocolo de rastreo de alto rendimiento para identificar activadores e inhibidores de sirtuina de moléculas pequeñas adicionales de un banco de ICCB.

Los siguientes pocillos fueron designados para las reacciones de control: a) con enzima; DMSO en blanco, b) con enzima; con resveratrol (50 µM) de control positivo. La mezcla de reacción contiene (final): 0,5 unidades/reacción de SIRT1 deacetilasa (BIOMOL); NAD⁺ 200 µM, sustrato Fluor de Lys-SIRT1 (BIOMOL) 5 µM; tampón (Tris/Cl 25 mM, pH 8,0, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, MgCl₂ 1 mM y 1 mg/ml de BSA). Además, se hizo una mezcla de reacción que no contenía enzima, de modo que cada uno de los pocillos que recibe compuesto tiene también un correspondiente "sin control de enzima". Las reacciones se realizaron en placas de 384 pocillos negras (NUNC) en un volumen final de 25 µl/pocillo.

25

Las reacciones se iniciaron combinando enzima y sustrato en una mezcla de reacción inmediatamente antes de la división en partes alícuotas en placas (o sustrato solo para placas "sin control de enzima"). La mezcla se repartió en partes alícuotas a placas utilizando Biotek µFill (Biotek Instruments). Mezclas de control se añadieron manualmente a los pocillos designados. Se añadió un compuesto del banco a una concentración deseada mediante transferencia pin a placas tanto "con enzima" como "sin enzima". Los compuestos se añadieron al menos por triplicado (con reacción enzimática por duplicado y sin controles de enzima) a una concentración final de aproximadamente 50 µM. Las placas se incubaron a 37°C durante 30-60 minutos. Después se añadieron 25 µl de 1x Developer II (BIOMOL) más nicotinamida 2 mM a todos los pocillos para detener las reacciones. Las reacciones se dejaron durante al menos 30 minutos a 37°C para que se desarrollara la señal. Las placas se leyeron en un fluorómetro de lectura de microplacas capaz de excitación a una longitud de onda en el intervalo de 350-380 nm y la detección de la luz emitida en el intervalo de 440-460 nm. Se utilizó un tiempo de lectura de 0,1 s por pocillo.

30

35

Se utilizaron los siguientes controles positivos: resveratrol, resveratrol 4"-metil-éter (3,5-dihidroxi-4'-metoxi-trans-estilbeno, al que se alude también en esta memoria como BML-233, y se recoge en la Tabla 10), y pinosilvina, que activaba SIRT1 2,2 veces, 2,1 veces y 3.28 veces, respectivamente. Los activadores están listados en la Tabla 21 y los inhibidores están listados en la Tabla 22.

40

Ejemplo 16: SIRT1 deacetilasa protege frente a la neurodegeneración dependiente de la edad

A. Materiales y métodos

45 *Preparación de proteínas y transferencias Western*

Los ratones fueron sacrificados mediante inyección intraperitoneal de hidrato cloral. Los extractos totales de proteínas de médula espinal de ratón, prosencéfalo de ratón, hipocampo de ratón o corteza prefrontal humana se obtuvieron por homogeneización en SDS-urea β-mercaptoetanol (SDS al 0,5%, urea 8 M en tampón fosfato 7,4) o Triton X-100 (Tris-HCl 10 mM [pH 7,5], NaCl 150 mM, EDTA 1 mM [pH 8,0] y Triton al 1%). La concentración de proteína se estimó mediante el procedimiento de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Las proteínas se fraccionaron en SDS-PAGE al 7,5% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa o PVDF para el análisis de transferencia Western. Las membranas se incubaron con anticuerpos contra SIRT1 (07-131, Upstate), α-tubulina

50

(B512, Sigma), actina (MAB 1501, Chemicon), FAK (C-20, Santa Cruz Biotechnology), Bax (N-20, Santa Cruz), GFP (B-2, Santa Cruz). Las transferencias Western se revelaron por RENAISSANCE, un kit de quimioluminiscencia de transferencia Western de NEN Life Science (Boston, MA). Las cuantificaciones se corrigieron con los niveles de actina, α -tubulina y FAK y se realizaron con el programa Labscan (Image Master, software 2D v 3.10, Amersham Pharmacia Biotech).

Cultivo, transfección y tratamiento de neuronas primarias

Neuronas corticales/primarias de rata se aislaron, cultivaron y transfectaron con Lipofectamine 2000 de acuerdo con Nguyen, M.D. et al. (*Nat Cell Biol* 6, 595-608 (2004)) en una relación 3 (SIRT1 o SIRT1 H363Y o p53 ARNi): 1 (p25-GFP, WT SOD1 o SOD1G93A o GFP). El tratamiento de las neuronas corticales primarias con ionomicina (1 μ m), peróxido de hidrógeno (25 μ m) o Resveratrol (50 nm a 500 nm) se realizó de acuerdo con Lee, M.S. et al. (*Nature* 405, 360-4 (2000)).

Inmunofluorescencia de neuronas primarias y tejidos de la corteza prefrontal humana

La tinción en células se realizó de acuerdo con Nguyen, M.D. et al. (*Nat Cell Biol* 6, 595-608 (2004)) con anticuerpos contra Tubulina (Tuj1; α -tubulina, B512, Sigma Aldrich), GFP (Molecular Probes), SOD1 (Biodesign), FLAG (M2, Sigma). La tinción de tejidos de la corteza prefrontal y tejidos de la médula humanos se realizó de acuerdo con Cruz, J.C. et al. (*Neuron* 40, 471-83 (2003)) con anticuerpos contra SIRT1 (07-131, Upstate) y APP/A β (4G8).

Generación de ratones transgénicos SOD1^{G37R} y ratones transgénicos inducibles p25

Los ratones transgénicos que sobre-expresan SOD1^{G37R} (línea 29) (G37R) y p25-CK han sido generados tal como se describe previamente y se han mantenido en un fondo de C57BL6 puro (Cruz, J.C., et al., *Neuron* 40, 471-83 (2003); Nguyen, M.D. et al, *Neuron* 30, 135-47 (2001)).

Canulación e inyecciones

Cánulas dobles (Plastic 1) se implantaron siete días antes de los experimentos bajo anestesia son avertina al 1,2% (0,4 ml/ratón) tal como se describió previamente (Fischer, A., et al., *J Neurosci* 24, 1962-6 (2004)). Para la inyección de resveratrol las cánulas se colocaron en ambos ventrículos laterales del cerebro, AP - 0,5 mm, lateral 1 mm, profundidad 2 mm. Resveratrol (5 μ g/ μ l) o vehículo se inyectaron bilateralmente 2-3 veces/semana (5 μ g de resveratrol/1 μ l/ratón) utilizando un microinyector (CMA/Microdialysis) a lo largo de un período de 60 s, de modo que se inyectó un volumen de 0,5 μ l en cada lado. Resveratrol (DMSO al25%/fluido cefalorraquídeo artificial) se preparó recientemente de forma inmediata antes de cada inyección. Para la inyección de lentivirus de SIRT1 las cánulas fueron colocados en el hipocampo dorsal, AP-1,5 mm, lateral 1 mm, profundidad de 2 mm. Se inyectó lentivirus SIRT1-HA (1,5 μ l) tal como se describió anteriormente en el hipocampo izquierdo, mientras que lentivirus SIRT1-HA (1,5 μ l) se inyectó en el hipocampo derecho de ratones CK-p25 inducidos 1 semana. El número de neuronas GFP se contó 1 a 2 mm caudal al sitio de inyección. Se calculó una relación de sitio de control de neuronas/sitio SIRT1 de neuronas para cuantificar las variaciones en % de las neuronas entre ambos sitios.

Acondicionamiento al miedo

El aparato de acondicionamiento al miedo (TSE Systems) consistía en dos cajas de ensayo con luz definida y ruido de fondo que estaban conectadas a una unidad de control y un ordenador PC. Los protocolos experimentales se diseñaron y realizaron utilizando el software TSE fear conditioning. La caja 1 contenía una rejilla para aplicar la descarga eléctrica a la pata y se limpió con etanol al 70% antes de cada sesión de entrenamiento o de prueba. La segunda caja no tenía rejilla y se limpió con ácido acético al 1% antes de cada prueba. Esta caja se utilizó para analizar memorias de miedo dependientes del tono. El acondicionamiento al miedo consistía en una sola exposición al contexto (Caja 1; 3 min) seguido por una descarga en la pata (2 s, 0,7 mA, corriente constante). La congelación dependiente del contexto se midió 24 h más tarde cada 10 s a lo largo de 180 s por dos observadores de una manera ciega y se expresó como % del número total de observaciones.

Generación de ARNi

La secuencia de ARNi de p53 se seleccionó sobre la base de los criterios propuestos por Sui et al. (Sui, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5515-20 (2002)). Secuencias de la horquilla de pelo complementarias se sintetizaron comercialmente y se clonaron en pSilencer 2.0 bajo el promotor U6 (Ambion). Secuencia de p53 son pares de bases: gga gtc ttc cag tgt gat gat (SEQ ID NO: 32). Una secuencia aleatoria y sin homología con cualquier ARNm conocido se utilizó para el control de ARNi. Todas las construcciones de ARNi se ensayaron en líneas celulares y cultivos neuronales primarios.

Immunoprecipitación

Las inmunoprecipitaciones se realizaron de acuerdo con Nguyen, M.D. et al. (*Nat Cell Biol* 6, 595-608 (2004)) en 8 prosencéfalos de ratones p25 transgénicos y ratones de tipo salvaje con un anticuerpo monoclonal dirigido contra p53 (Ab-3) (Calbiochem/Oncogene). Las membranas se sondearon con un Ab de Ac-p53 hecho en la casa y un anticuerpo monoclonal de ratón p53 (pAb-240, Abcam).

B. Resultados

Una pérdida progresiva de neuronas con la edad subyace a una diversidad de trastornos neurológicos debilitantes, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (AD) y la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), sin embargo pocos tratamientos eficaces están disponibles en la actualidad. El gen *SIR2* fomenta la longevidad en una diversidad de organismos y puede ser la base de beneficios para la salud de la restricción calórica, una dieta que retrasa el envejecimiento y la neurodegeneración en mamíferos. Los autores de la invención describen en esta memoria que un homólogo humano de *SIR2*, *SIRT1*, está regulado positivamente en tejido cerebral de pacientes de Alzheimer, en modelos de ratón para AD, ALS y en neuronas primarias enfrentadas a insultos neurotóxicos. En modelos basados en células para AD/Tauopatías y ALS, *SIRT1* y resveratrol, una molécula de activación de *SIRT1*, ambos fomentan la supervivencia neuronal. En el ratón p25 transgénico, un modelo de AD/Tauopatías, el resveratrol reducía la neurodegeneración en el hipocampo y disminuía la acetilación de p53, un sustrato conocido de *SIRT1*. Dos efectores de p53 aguas abajo que median en la muerte celular, caspasa 3 y Bax, también se atenuaron. Además de ello, la inyección de lentivirus *SIRT1* en el hipocampo de ratones p25 previene una neurodegeneración masiva. Por lo tanto, *SIRT1* proporciona un vínculo molecular único entre el envejecimiento y trastornos neurodegenerativos humanos y la activación de *SIRT1* es una vía prometedor para la intervención terapéutica.

Aunque los trastornos neurodegenerativos son relativamente específicos del tipo de célula, muchos de los procesos patogénicos subyacentes son similares, incluyendo el plegamiento erróneo de proteínas, estrés oxidativo, anomalías del citoesqueleto, perturbación de la homeostasis del calcio, e inflamación, todo lo cual aumenta durante el envejecimiento (Bossy-Wetzel et al., *Nat Med* 10 Supl, S2-9 (2004); Forman, M.S. et al., *Nat Med* 10, 1055-63 (2004); Selkoe, D.J., *Nat Cell Biol* 6, 1054-61 (2004)). La existencia de mecanismos relacionados con la neurodegeneración subyacentes plantea la posibilidad de desarrollar una clase de intervenciones terapéuticas que tratan una diversidad de trastornos neurológicos mediante la activación de las propias defensas del cuerpo contra el deterioro relacionado con la edad y la muerte celular (Bossy-Wetzel et al., *Nat Med* 10 Supl, S2-9 (2004); Foreman, M. S. et al., *Nat Med* 10, 1055-63 (2004); Selkoe, D.J., *Nat Cell Biol* 6, 1054-61 (2004)). Estudios de levadura identificaron la deacetilasa Sir2 dependiente de NAD^+ conservada evolutivamente como un regulador crítico del proceso de envejecimiento (Anderson, R.M. et al., *Science* 302, 2124-6 (2003); Anderson, R.M. et al., *Nature* 423, 181-5 (2003); Cohen, H.Y. et al., *Science* 305, 390-2; Howitz, K.T. et al., *Nature* 425, 191-6 (2003); Kaerberlein, M. et al., *Genes. Dev* 13, 2570-80 (1999); Imai, S. et al., *Nature* 403, 795-800 (2000)). Una copia adicional del gen *SIR2* prolonga el tiempo de vida en levaduras y metazoos mediante un proceso aparentemente análogo a la restricción calórica (Anderson, R.M. et al., *Science* 302, 2124-6 (2003); Anderson, R.M. et al., *Nature* 423, 181-5 (2003); Lin, S.J. et al., *Science* 289, 2126-8 (2000)), una dieta que retrasa las enfermedades del envejecimiento en mamíferos, incluyendo la neurodegeneración (Cohen, H.Y. et al., *Science* 305, 390-2. (2004); Howitz, K.T. et al., *Nature* 425, 191-6 (2003); Brunet, A. et al., *Science* 303, 2011-5 (2004); Motta, M.C. et al., *Cell* 116, 551-63 (2004); Langley, E. et al., *Embo J* 21, 2383-96 (2002); Cohen, H.Y. et al., *Mol Cell* 13, 627-38 (2004); Luo, J. et al., *Cell* 107, 137-48 (2001); Vaziri, H. et al., *Cell* 107, 149-59 (2001)). Los mamíferos poseen siete homólogos Sir2 (*SIRT1-7*), cuyas funciones biológicas siguen estando mal definidas. Se cree que el gen *SIRT1* proporciona una protección celular durante momentos de estrés celular (Cohen, H.Y. et al., *Science* 305, 390-2 (2004); Brunet, A. et al., *Science* 303, 2011-5 (2004); Motta, M.C. et al., *Cell* 116, 551-63 (2004); Langley, E. et al., *Embo J* 21, 2383-96 (2002); Cohen, H.Y. et al., *Mol Cell* 13, 627-38. (2004)). En consonancia con esto, la inactivación del gen *SIRT1* en neuronas sensoriales de las raíces dorsales ganglionares de ratón cultivadas anula los efectos protectores de la síntesis incrementada de NAD^+ sobre la degeneración axonal después de axotomía aguda (Araki, T., et al., *Science* 305, 1010-3 (2004)).

Los autores de la invención hipotetizaron que los niveles de SIRT1 pueden aumentar como una respuesta protectora contra enfermedades neurodegenerativas tales como la AD en pacientes humanos, y sondearon los niveles de SIRT1 en muestras de cerebro post-mortem no dementes normales (n = 9) y cerebros post-mortem de pacientes con diferentes etapas de la AD (n = 11). Para la evaluación de los cerebros humanos, los autores de la invención utilizaron la clasificación de Braak y Braak de cambios neuronales progresivos en la AD (Braak, H. y Braak, E., *J. Neural Transm Suppl* 53, 127-40 (1998)). Utilizando el patrón de distribución característico de ovillos neurofibrilares y un hilo neuropilo, la clasificación de Braak y Braak reconoce las seis fases siguientes en el progreso de la enfermedad: I-II, transentorrinal (casos clínicamente silenciosos), III-IV, límbico (AD incipiente); V-VI, neocortical (AD completamente desarrollada) (Braak, H. y Braak, E., *J. Neural Transm Suppl* 53, 127-40 (1998)). Tal como se detectó por inmunotransferencia, las muestras de AD exhiben mayores niveles de proteína SIRT1 en comparación con los controles ($2,55 \pm 0,23$ frente a $1,36 \pm 0,27$; $P (T \leq t)$ dos colas: 0,004) (Figura 43A), aunque no se encontró correlación consistente entre los niveles de SIRT1 y las fases de Braak y Braak. La localización de SIRT1 en tejidos de la corteza prefrontal embebidos en parafina procedentes de tres individuos (control n° 1 y AD n° 1 y 2) se determinó entonces utilizando inmunofluorescencia indirecta. Consistente con los datos de inmunotransferencia, se produjo un nivel drásticamente elevado de SIRT1 en neuronas de la materia gris de la corteza prefrontal a partir de muestras de AD, mientras que las regiones de la materia blanca de todas las muestras rara vez exhiben células SIRT1-positivas (Figura 43B). Las zonas de intensa coloración SIRT1 no se confinaron a neuronas adyacentes a placas β -amiloides, un distintivo de la patología de la AD (muestras de AD n° 2 y n° 3; Fig. 1C). Colectivamente, estos resultados indican que SIRT1 está regulada positivamente en las regiones del cerebro que están degenerando.

Para corroborar estos resultados *in vivo*, los autores de la invención determinaron niveles de SIRT1 en diversos modelos de ratones para la neurodegeneración dependiente de la edad humana. Ratones que expresan un co-activador tóxica de quinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5), p25, exhiben una degeneración masiva del prosencéfalo anterior con características de AD/Tauopatías (Cruz, J.C. et al. *Neuron* 40, 471-83 (2003)), mientras que ratones transgénicos que expresan una forma mutante de superóxido dismutasa 1 (SOD1G37R), que ha sido relacionada con ALS humana, exhiben una degeneración grave de las neuronas motoras y axonal en la médula espinal (Wong, P.C. et al, *Neuron* 14, 1105-16 (1995); Gurney, M.E. et al., *Science* 264, 1772-5 (1994)).

En los prosencéfalos de ratones p25 transgénicos (n = 9) los niveles de proteína SIRT1 aumentaron tan pronto como dos semanas después de la inducción de p25 y persistieron durante el progreso de la patología a 12 semanas (Figura 37A-B). El análisis de matrices de muestras de tejido cerebral de estos ratones (n = 3) demostró que los niveles de ARNm de SIRT1 aumentaron progresivamente a medida que progresaba la enfermedad, pero los niveles de los otros miembros de la familia de Sir2, SIRT2-7, no cambiaron (Figura 37C). En la médula espinal de ratones SOD1G37R mutantes, SIRT1 estaba sólo ligeramente regulado positivamente a los 4 meses (n = 4), una fase con poca degeneración, pero los niveles de SIRT1 se expresaron altamente cuando la neurodegeneración grave fue evidente a los 10 a 12 meses (n = 8) (Nguyen, M.D. et al., *Neuron* 30, 135-47 (2001)) (Figura 37D-E). Ratones que expresan una forma mutante de la proteína precursora amiloide (APP) vinculados a la AD familiar (PDAPP-V717F, n = 7; 2-12 meses) (Games, D. et al, *Nature* 373, 523-7 (1995)) no exhiben una degeneración significativa a pesar de que muestran, de una manera dependiente de la edad, placas β -amiloides sustanciales, un distintivo de la AD (Games, D. et al., *Nature* 373, 523-7 (1995)) (Figura 38). Estos ratones no mostraron aumento significativo alguno de la SIRT1 en el prosencéfalo (Figura 38). Estos resultados indican que los niveles de SIRT1 se correlacionan con la neurodegeneración acompañada de la pérdida progresiva y grave de neuronas, pero no con una patología de la placa β -amiloide en ausencia de degeneración grave.

Dado que tanto p25 como SOD1 desencadenan alteración de la homeostasis del calcio y generan estrés oxidativo (Cruz, J.C. et al., *Curr Opin Neurobiol* 14, 390-4 (2004); Bruijn, L. I. et al., *Annu Rev Neurosci* 27, 723-49), los autores de la invención han probado si SIRT1 es inducida en las neuronas en respuesta a ionomicina ($1 \mu\text{m}$), un ionóforo de calcio, o peróxido de hidrógeno ($25 \mu\text{m}$), un generador de radicales libres. Estos estreses específicos han demostrado previamente que desencadenan el deterioro de la morfología neuronal y la formación de p25 en neuronas cultivadas (Lee, M.S. et al, *Nature* 405, 360-4 (2000); Kusakawa, G. et al., *J Biol Chem* 275, 17166-72 (2000); Nath, R. et al., *Biochem Biophys Res Commun* 274, 16-21 (2000)). El tratamiento de neuronas corticales primarias, ya sea con ionomicina o H_2O_2 rápidamente inducía la expresión de la proteína SIRT1, y los niveles incrementados duraron hasta 1 hora (Figura 37F). Por lo tanto, no sólo SIRT1 es inducida en modelos de ratón de la neurodegeneración, sino también en neuronas de cultivo primario bajo estreses neurotóxicos.

Para entender la importancia fisiológica de la activación de SIRT1 en el contexto de la neurodegeneración, los autores de la invención sometieron primero a prueba los efectos de resveratrol, un compuesto polifenólico activador de SIRT1 (STAC) (Howitz, K.T. et al., *Nature* 425, 191-6 (2003)), sobre la viabilidad de las neuronas primarias de ratón que expresan p25 o SOD1G93A mutante (Patrick, G.N. et al., *Nature* 402, 615-22 (1999)). Dosis de hasta 500

nM de resveratrol no mostraron evidencia alguna de toxicidad a neuronas primarias transfectadas con GFP (Figura 39A). La transfección con p25-GFP resultó en un alto grado de muerte celular (50% después de 24 horas) (Lee, M.S. et al., *Nature* 405, 360-4 (2000); Patrick, G. N. et al., *Nature* 402, 615-22 (1999); Zhang, J., Krishnamurthy et al., *J Neurochem* 81, 307-13 (2002); Hamdane, M. et al., *J Biol Chem* 278, 34026-34 (2003)), basado en una integridad disminuida de procesos neuronales (GFP y tinción con tubulina), cromatina condensada y morfología nuclear alterada tal como se muestra con la tinción con DAPI (Figura 39B-C). El tratamiento con resveratrol redujo en un 45% el grado de muerte celular provocada por p25 (Figura 39B-C) ($P(T \leq t)$ dos colas: 0,01). Resveratrol también proporcionaba una protección del 45% contra la toxicidad de SOD1G93A ($P(T \leq t)$ dos colas: 0,01) (Figura 39D-E). Estos resultados están en línea con un informe reciente que demuestra que en las neuronas cultivadas derivadas de ratones transgénicos que sobre-expresan una huntingtina mutante (109 Q), resveratrol suprimía los efectos neurotóxicos de la proteína mutante (Parker, J. A. et al., *Nat Genet* 37, 349-50 (2005)).

Para verificar directamente el papel protector de SIRT1 en la neurodegeneración, los autores de la invención transfectaron neuronas primarias con p25-GFP o SOD1G93A junto con cualquiera de SIRT1 o SIRT1 que carecen de actividad catalítica (H363Y). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, aproximadamente el 80% de las neuronas con p25-GFP sufrieron una degeneración (Figura 40B). La sobre-expresión de SIRT1, pero no H363Y, redujo la tasa de muerte celular del 80% al 50% (82,7 +/- 7% frente a 53,0 +/- 6,2%; $P(T \leq t)$ dos colas: 0,001; 82,7 +/- 7% frente a 78,0 +/- 5,8%; $P(T \leq t)$ dos colas: 0,27) (Figura 40A-B; Figura 41). La morfología de las neuronas que sobre-expresan p25-GFP/SIRT1 parecía normal e indistinguible de las neuronas de control transfectadas con GFP. Este efecto protector no era debido a un efecto de SIRT1 sobre la estabilidad de p25-GFP porque se detectaron niveles similares de p25-GFP en presencia o ausencia de la sobre-expresión de SIRT1 (Figura 40C).

Los autores de la invención también trataron de determinar si la sobre-expresión de SIRT1 protegía frente a la neurotoxicidad inducida por SOD1 mutante. Aproximadamente el 60% (62,3 +/- 8,9%) de las neuronas primarias transfectadas con SOD1G93A mutante, pero no SOD1 de tipo salvaje exhibía una alteración del citoesqueleto y agregados de SOD1, dos distintivos de toxicidad de SOD1 ligada a ALS (Figura 40D-E). La sobre-expresión de SIRT1, pero no de H363Y, también protegía frente a la toxicidad de SOD1G93A con una reducción de 50% de las neuronas que exhiben el fenotipo degenerativo (62,3 +/- 8,9% frente a 30,1 +/- 10,2%; $P(t \leq t)$ dos colas: 0,001; 62,3 +/- 8,9% frente a 78,0 +/- 11,0%; $P(T \leq t)$ dos colas: 0,33) (Figura 40D-E). En conjunto, estos resultados indican que los niveles incrementados de SIRT1 en las neuronas primarias confieren una potente protección contra la neurotoxicidad inducida por p25 o SOD1 mutante. La observación de que el mutante H363Y no confirió protección demuestra que se requiere la actividad deacetilasa de SIRT1 para la neuroprotección.

Para probar los efectos neuroprotectores de resveratrol *in vivo*, resveratrol (Resv) o vehículo (Veh) fueron introducidos por ICV (véase Fischer, A. et al., *J Neurosci* 24, 1962-6 (2004)) en ratones p25 inducidos durante 2 semanas, durante 3 semanas a una dosis de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ - 1 μl inyectado cada 2 a 3 días (animales tratados con Veh, n = 5; animales tratados con Resv, n = 9) (Figura 44A). Después de 5 semanas de inducción de p25, la muerte celular y la neurodegeneración eran evidentes en el hipocampo de los animales tratados con vehículo, consistente con las observaciones anteriores (Cruz, J.C. et al., *Neuron* 40, 471-83 (2003)). En contraposición, la administración de resveratrol redujo la neurodegeneración en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, tal como se reveló por los niveles inferiores de dos marcadores apoptóticos, Bax y caspasa 3 activada, y un marcador de astrogliosis, GFAP (Figura 44B-D, F; Figura 47). La inmunotinción con GFP, que marca las neuronas que expresan p25-GFP, era más robusta en el hipocampo de los animales tratados con resveratrol, lo que sugiere que las neuronas eran más capaces de tolerar y sobrevivir a la expresión de p25 (Figura 44D). A mayor aumento, las neuronas CA1 de cerebros tratados con resveratrol mostraron una mejor preservación de la morfología dendrítica (Figura 44E). Los autores de la invención han informado anteriormente que hacia las 5-6 semanas de inducción, los ratones p25 han reducido drásticamente las capacidades de aprendizaje asociativo según lo revelado por el paradigma de acondicionamiento al miedo contextual (Fischer et al., *Neuron* en prensa). En conjunto, estos resultados demuestran que resveratrol proporciona neuroprotección en un modelo animal de degeneración del SNC que muestra una pérdida neuronal masiva y patologías tau (Figura 44E-F).

Para hacerse una idea de mecanismo por el cual resveratrol confiere neuroprotección *in vivo*, los autores de la invención hipotetizaron que p53 juega un papel clave en la mediación de la neuroprotección por las siguientes razones. En primer lugar, se sabe que p25/Cdk5 fosforila p53 y regula positivamente su actividad transcripcional (Zhang, J., et al., *J Neurochem* 81, 307-13 (2002)). En segundo lugar, se encontró que los niveles de proteína p53 están significativamente incrementados en ratones transgénicos p25 (Figura 45A). En tercer lugar, este incremento viene acompañado por un aumento en el estado de acetilación de lisina 382 de p53 (Figura 45B), una modificación que se sabe estabiliza p53 y potencia su función apoptótica de p53 (Langley, E. et al., *Embo J* 21, 2383-96 (2002); Luo, J. et al., *Cell* 107, 137-48 (2001); Vaziri, H. et al., *Cell* 107, 149-59 (2001)). En cuarto lugar, lisina 382 de p53

(K382-p53) es una diana de SIRT1 bien caracterizada y la activación de SIRT1 por parte de resveratrol sería coherente con los efectos que observaron *in vivo*.

5 En primer lugar, los autores de la invención sometieron a ensayo si p53 contribuye a la muerte celular inducida por p25 mediante la co-transfección de neuronas corticales con p25-GFP junto con un vector de ARNsi control o un vector de ARNsi de p53. La inactivación de p53 proporcionó un incremento del 25% en la supervivencia celular (Figura 45C), que es similar en magnitud a lo que observaron para las neuronas tratadas con resveratrol (véase la Figura 39) y el estado de acetilación de K382-p53 también se redujo mediante el tratamiento con resveratrol (Figura 45D) (Langley, E. et al, *Embo J* 21, 2383-96 (2002); Vaziri, H. et al, *Cell* 107, 149-59 (2001)). A continuación, los autores de la invención se preguntaron si el resveratrol tenía un efecto similar *in vivo*. Tal como se muestra en la 10 Figura 45D, el estado de acetilación de K382-p53 era menor en tejido del hipocampo tratado con resveratrol de ratones p25 transgénicos con respecto al vehículo. Los niveles globales de p53 también se redujeron mediante el tratamiento con resveratrol, lo que es consistente con que la forma desacetilada sea menos estable (Luo, J. et al., *Cell* 107, 137-48 (2001)).

15 Además, para determinar el papel de SIRT1 en la neuroprotección *in vivo*, los autores de la invención introdujeron lentivirus portadores de SIRT1 marcada con HA o control en el hipocampo de ratones p25 (n = 4) mediante inyección estereotáxica tal como se describe en Métodos. Brevemente, ratones transgénicos p25 inducidos durante 2 semanas se sometieron a una única inyección de control o virus que expresa SIRT1 en cada lado del cerebro. Los ratones fueron sacrificados 3 semanas después de las inyecciones virales. La tinción con GFP de inmunofluorescencia demostró que las neuronas que expresan p25 GFP-positivas son más prominentes en las 20 regiones CA1 que recibieron el virus SIRT1 en comparación con las que recibieron el virus de control (Figura 46A-F), indicando que pueden tolerar mayores niveles de p25, como se ve en los animales tratados con resveratrol (Figura 44). En general, el lado al que se inyectó el virus SIRT1 exhibió 38% + / - 13% mayor número de neuronas que el lado al que se inyectó el virus control, y las neuronas eran morfológicamente más sanas. A mayor aumento, estaba claro que las neuronas supervivientes expresaron SIRT1 tal como se detecta por la co-inmunotinción con anticuerpos HA y GFP (Figura 46G-I). Estos resultados proporcionan una evidencia adicional de que los efectos 25 protectores del resveratrol se deben a la activación de SIRT1 y demuestran un papel neuroprotector de SIRT1 *in vivo*.

30 En conjunto, estos resultados demuestran que es posible ralentizar la neurodegeneración con resveratrol, una molécula activadora de SIRT1, y mediante la expresión de SIRT1. También se proporciona evidencia de que el efecto neuroprotector se debe, al menos en parte, a la desacetilación de K382-p53 (Figura 45). Los autores de la invención no descartan la posibilidad de que estén involucrados otros sustratos conocidos de SIRT1 tales como Ku70, una proteína que secuestra la proteína apoptótica Bax de las mitocondrias (Brunet, A. et al., *Science* 303, 2011-5 (2004); Cohen, H.Y. et al., *Mol Cell* 13, 627-38 (2004)). Resveratrol también puede estimular la desacetilación de factores de transcripción FOXO3/4, potenciando con ello la expresión de genes de moléculas anti-oxidantes y regulando positivamente la reparación del ADN (Brunet, A. et al., *Science* 303, 2011-5 (2004); Nguyen, M.D. et al., *Cell Death Differ* 9, 1294-306 (2002); Smith, P.D. et al, *Cell Cycle* 3, 289-91 (2004)). 35

40 Se cree que SIRT1 es un regulador clave de una vía conservada evolutivamente que permite a los organismos hacer frente y sobrevivir a las adversidades. Consistente con esto, Sir2 de levaduras y SIRT1 de mamífero son reguladas positivamente por diversos estreses biológicos, incluyendo la restricción calórica, la dieta que previene numerosas enfermedades del envejecimiento en mamíferos (Bordone, L. y Guarente, L., *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 298-305 (2005); Lombard, D.B. et al., *Cell* 120, 497-512 (2005); Lamming, D.W. et al., *Mol Microbiol* 53, 1003-9 (2004)). Tal como se describe en esta memoria, se demuestra por primera vez la capacidad de las moléculas activadoras de SIRT1 de prevenir enfermedades neurodegenerativas dependientes de la edad, y predecir que este tipo de moléculas demostrarán ser eficaces en una diversidad de otras enfermedades asociadas con el envejecimiento. 45 Curiosamente, el gen SIRT1 reside en un locus en el cromosoma 10 que está asociado con la AD familiar (OMPI, publicación internacional WO 2005/004815 A2). Es posible que mutaciones o polimorfismos en SIRT1 afectan a la susceptibilidad de los individuos a la neurodegeneración.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE

5 <120> TERAPÉUTICA Y DIAGNÓSTICO RELACIONADOS CON SIRTUINA PARA ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

<130> HMV-089.27

10 <140> PCT/US2006/008290
<141> 07-03-2006

<150> 10/884,022
<151> 01-07-2004

15 <150> 10/884,879
<151> 01-07-2004

20 <150> 60/532,158
<151> 23-12-2003

<150> 60/483,949
<151> 01-07-2003

25 <160> 31

<170> PatentIn Ver. 3.3

30 <210> 1
<211> 4107
<212> ADN
<213> Homo sapiens

35 <220>
<221> CDS
<222> (54)..(2294)

<400> 1

```

gtcgcagcggg agcagaggag ggcagggagg agggccagag aggcagttgg aag atg      56
                                     Met
                                     1

gcg gac gag gcg gcc ctc gcc ctt cag ccc ggc ggc tcc ccc tcg gcg      104
Ala Asp Glu Ala Ala Leu Ala Leu Gln Pro Gly Gly Ser Pro Ser Ala
                    5                      10                      15

gcg ggg gcc gac agg gag gcc gcg tcg tcc ccc gcc ggg gag ccg ctc      152
Ala Gly Ala Asp Arg Glu Ala Ala Ser Ser Pro Ala Gly Glu Pro Leu
                    20                      25                      30

cgc aag agg ccg cgg aga gat ggt ccc ggc ctc gag cgg agc ccg ggc      200
Arg Lys Arg Pro Arg Arg Asp Gly Pro Gly Leu Glu Arg Ser Pro Gly
                    35                      40                      45

gag ccc ggt ggg gcg gcc cca gag cgt gag gtg ccg gcg gcg gcc agg      248
Glu Pro Gly Gly Ala Ala Pro Glu Arg Glu Val Pro Ala Ala Ala Arg
                    50                      55                      60                      65

```

40

ES 2 572 372 T3

ggc tgc ccg ggt gcg gcg gcg gcg gcg ctg tgg cgg gag gcg gag gca	296
Gly Cys Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ala Leu Trp Arg Glu Ala Glu Ala	
70 75 80	
gag gcg gcg gcg gca ggc ggg gag caa gag gcc cag gcg act gcg gcg	344
Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Glu Gln Glu Ala Gln Ala Thr Ala Ala	
85 90 95	
gct ggg gaa gga gac aat ggg ccg ggc ctg cag ggc cca tct cgg gag	392
Ala Gly Glu Gly Asp Asn Gly Pro Gly Leu Gln Gly Pro Ser Arg Glu	
100 105 110	
cca ccg ctg gcc gac aac ttg tac gac gaa gac gac gac gag ggc	440
Pro Pro Leu Ala Asp Asn Leu Tyr Asp Glu Asp Asp Asp Glu Gly	
115 120 125	
gag gag gag gaa gag gcg gcg gcg gcg gcg att ggg tac cga gat aac	488
Glu Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ile Gly Tyr Arg Asp Asn	
130 135 140 145	
ctt ctg ttc ggt gat gaa att atc act aat ggt ttt cat tcc tgt gaa	536
Leu Leu Phe Gly Asp Glu Ile Ile Thr Asn Gly Phe His Ser Cys Glu	
150 155 160	
agt gat gag gag gat aga gcc tca cat gca agc tct agt gac tgg act	584
Ser Asp Glu Glu Asp Arg Ala Ser His Ala Ser Ser Ser Asp Trp Thr	
165 170 175	
cca agg cca cgg ata ggt cca tat act ttt gtt cag caa cat ctt atg	632
Pro Arg Pro Arg Ile Gly Pro Tyr Thr Phe Val Gln Gln His Leu Met	
180 185 190	
att ggc aca gat cct cga aca att ctt aaa gat tta ttg ccg gaa aca	680
Ile Gly Thr Asp Pro Arg Thr Ile Leu Lys Asp Leu Leu Pro Glu Thr	
195 200 205	
ata cct cca cct gag ttg gat gat atg aca ctg tgg cag att gtt att	728
Ile Pro Pro Pro Glu Leu Asp Asp Met Thr Leu Trp Gln Ile Val Ile	
210 215 220 225	
aat atc ctt tca gaa cca cca aaa agg aaa aaa aga aaa gat att aat	776
Asn Ile Leu Ser Glu Pro Pro Lys Arg Lys Lys Arg Lys Asp Ile Asn	
230 235 240	
aca att gaa gat gct gtg aaa tta ctg caa gag tgc aaa aaa att ata	824
Thr Ile Glu Asp Ala Val Lys Leu Leu Gln Glu Cys Lys Lys Ile Ile	
245 250 255	
gtt cta act gga gct ggg gtg tct gtt tca tgt gga ata cct gac ttc	872
Val Leu Thr Gly Ala Gly Val Ser Val Ser Cys Gly Ile Pro Asp Phe	
260 265 270	
agg tca agg gat ggt att tat gct cgc ctt gct gta gac ttc cca gat	920
Arg Ser Arg Asp Gly Ile Tyr Ala Arg Leu Ala Val Asp Phe Pro Asp	
275 280 285	
ctt cca gat cct caa gcg atg ttt gat att gaa tat ttc aga aaa gat	968
Leu Pro Asp Pro Gln Ala Met Phe Asp Ile Glu Tyr Phe Arg Lys Asp	
290 295 300 305	

ES 2 572 372 T3

cca aga cca ttc ttc aag ttt gca aag gaa ata tat cct gga caa ttc 1016
 Pro Arg Pro Phe Phe Lys Phe Ala Lys Glu Ile Tyr Pro Gly Gln Phe
 310 315 320

cag cca tct ctc tgt cac aaa ttc ata gcc ttg tca gat aag gaa gga 1064
 Gln Pro Ser Leu Cys His Lys Phe Ile Ala Leu Ser Asp Lys Glu Gly
 325 330 335

aaa cta ctt cgc aac tat acc cag aac ata gac acg ctg gaa cag gtt 1112
 Lys Leu Leu Arg Asn Tyr Thr Gln Asn Ile Asp Thr Leu Glu Gln Val
 340 345 350

gcg gga atc caa agg ata att cag tgt cat ggt tcc ttt gca aca gca 1160
 Ala Gly Ile Gln Arg Ile Ile Gln Cys His Gly Ser Phe Ala Thr Ala
 355 360 365

tct tgc ctg att tgt aaa tac aaa gtt gac tgt gaa gct gta cga gga 1208
 Ser Cys Leu Ile Cys Lys Tyr Lys Val Asp Cys Glu Ala Val Arg Gly
 370 375 380 385

gat att ttt aat cag gta gtt cct cga tgt cct agg tgc cca gct gat 1256
 Asp Ile Phe Asn Gln Val Val Pro Arg Cys Pro Arg Cys Pro Ala Asp
 390 395 400

gaa ccg ctt gct atc atg aaa cca gag att gtg ttt ttt ggt gaa aat 1304
 Glu Pro Leu Ala Ile Met Lys Pro Glu Ile Val Phe Phe Gly Glu Asn
 405 410 415

tta cca gaa cag ttt cat aga gcc atg aag tat gac aaa gat gaa gtt 1352
 Leu Pro Glu Gln Phe His Arg Ala Met Lys Tyr Asp Lys Asp Glu Val
 420 425 430

gac ctc ctc att gtt att ggg tct tcc ctc aaa gta aga cca gta gca 1400
 Asp Leu Leu Ile Val Ile Gly Ser Ser Leu Lys Val Arg Pro Val Ala
 435 440 445

cta att cca agt tcc ata ccc cat gaa gtg cct cag ata tta att aat 1448
 Leu Ile Pro Ser Ser Ile Pro His Glu Val Pro Gln Ile Leu Ile Asn
 450 455 460 465

aga gaa cct ttg cct cat ctg cat ttt gat gta gag ctt ctt gga gac 1496
 Arg Glu Pro Leu Pro His Leu His Phe Asp Val Glu Leu Leu Gly Asp
 470 475 480

tgt gat gtc ata att aat gaa ttg tgt cat agg tta ggt ggt gaa tat 1544
 Cys Asp Val Ile Ile Asn Glu Leu Cys His Arg Leu Gly Gly Glu Tyr
 485 490 495

gcc aaa ctt tgc tgt aac cct gta aag ctt tca gaa att act gaa aaa 1592
 Ala Lys Leu Cys Cys Asn Pro Val Lys Leu Ser Glu Ile Thr Glu Lys
 500 505 510

cct cca cga aca caa aaa gaa ttg gct tat ttg tca gag ttg cca ccc 1640
 Pro Pro Arg Thr Gln Lys Glu Leu Ala Tyr Leu Ser Glu Leu Pro Pro
 515 520 525

ES 2 572 372 T3

aca cct ctt cat gtt tca gaa gac tca agt tca cca gaa aga act tca 1688
 Thr Pro Leu His Val Ser Glu Asp Ser Ser Ser Pro Glu Arg Thr Ser
 530 535 540 545

cca cca gat tct tca gtg att gtc aca ctt tta gac caa gca gct aag 1736
 Pro Pro Asp Ser Ser Val Ile Val Thr Leu Leu Asp Gln Ala Ala Lys
 550 555 560

agt aat gat gat tta gat gtg tct gaa tca aaa ggt tgt atg gaa gaa 1784
 Ser Asn Asp Asp Leu Asp Val Ser Glu Ser Lys Gly Cys Met Glu Glu
 565 570 575

aaa cca cag gaa gta caa act tct agg aat gtt gaa agt att gct gaa 1832
 Lys Pro Gln Glu Val Gln Thr Ser Arg Asn Val Glu Ser Ile Ala Glu
 580 585 590

cag atg gaa aat ccg gat ttg aag aat gtt ggt tct agt act ggg gag 1880
 Gln Met Glu Asn Pro Asp Leu Lys Asn Val Gly Ser Ser Thr Gly Glu
 595 600 605

aaa aat gaa aga act tca gtg gct gga aca gtg aga aaa tgc tgg cct 1928
 Lys Asn Glu Arg Thr Ser Val Ala Gly Thr Val Arg Lys Cys Trp Pro
 610 615 620 625

aat aga gtg gca aag gag cag att agt agg cgg ctt gat ggt aat cag 1976
 Asn Arg Val Ala Lys Glu Gln Ile Ser Arg Arg Leu Asp Gly Asn Gln
 630 635 640

tat ctg ttt ttg cca cca aat cgt tac att ttc cat ggc gct gag gta 2024
 Tyr Leu Phe Leu Pro Pro Asn Arg Tyr Ile Phe His Gly Ala Glu Val
 645 650 655

tat tca gac tct gaa gat gac gtc tta tcc tct agt tct tgt ggc agt 2072
 Tyr Ser Asp Ser Glu Asp Asp Val Leu Ser Ser Ser Ser Cys Gly Ser
 660 665 670

aac agt gat agt ggg aca tgc cag agt cca agt tta gaa gaa ccc atg 2120
 Asn Ser Asp Ser Gly Thr Cys Gln Ser Pro Ser Leu Glu Glu Pro Met
 675 680 685

gag gat gaa agt gaa att gaa gaa ttc tac aat ggc tta gaa gat gag 2168
 Glu Asp Glu Ser Glu Ile Glu Glu Phe Tyr Asn Gly Leu Glu Asp Glu
 690 695 700 705

cct gat gtt cca gag aga gct gga gga gct gga ttt ggg act gat gga 2216
 Pro Asp Val Pro Glu Arg Ala Gly Gly Ala Gly Phe Gly Thr Asp Gly
 710 715 720

gat gat caa gag gca att aat gaa gct ata tct gtg aaa cag gaa gta 2264
 Asp Asp Gln Glu Ala Ile Asn Glu Ala Ile Ser Val Lys Gln Glu Val
 725 730 735

aca gac atg aac tat cca tca aac aaa tca tagtgtaata attgtgcagg 2314
 Thr Asp Met Asn Tyr Pro Ser Asn Lys Ser
 740 745

tacaggaatt gttccaccag cattaggaac tttagcatgt caaaatgaat gtttacttgt 2374

gaactcgata gagcaaggaa accagaaagg tgtaatatatt ataggttggg aaaatagatt 2434

ES 2 572 372 T3

gtttttcatg gataatTTTT aacttcatta tttctgtact tgtacaaaact caacactaac 2494
 tttttttttt ttaaaaaaaaa aaaggtacta agtatcttca atcagctggt ggtcaagact 2554
 aactttcttt taaaggttca tttgtatgat aaattcatat gtgtatatat aatTTTTTTT 2614
 gttttgtcta gtgagtttca acatttttaa agttttcaaa aagccatcgg aatgttaaAT 2674
 taatgtaaag ggacagctaa tctagaccaa agaatggat tttcactttt ctttgtaaca 2734
 ttgaatgggt tgaagtactc aaaatctggt acgctaaact tttgattctt taacacaatt 2794
 atttttaaac actggcattt tccaaaactg tggcagctaa ctttttaaaa tctcaaATga 2854
 catgcagtgt gagtagaagg aagtcaacaa tatgtgggga gagcactcgg ttgtctttac 2914
 ttttaaaagt aatacttggg gctaagaatt tcaggattat tgtattttacg ttcaaATgaa 2974
 gatggctttt gtacttctcg tggacatgta gtaatgtcta tattggctca taaaactaac 3034
 ctgaaaaaca aataaatgct ttggaaatgt ttcagttgct ttagaaacat tagtgcctgc 3094
 ctggatcccc ttagttttga aatatttggc attgttgttt aaatacctat cactgtggta 3154
 gagcttgcAT tgatcttttc cacaagtatt aaactgccaa aatgtgaata tgcaaagcct 3214
 ttctgaatct ataataatgg tacttctact ggggagagtg taatattttg gactgctggt 3274
 ttccattaat gaggagagca acaggccctt gattatacag ttccaaagta ataagatggt 3334
 aattgtaatt cagccagaaa gtacatgtct cccattggga ggatttgggtg ttaaatacca 3394
 aactgctagc cctagtatta tggagatgaa catgatgatg taacttghaa tagcagaata 3454
 gttaatgaat gaaactagtt cttataattt atctttattt aaaagcttag cctgccttaa 3514
 aactagagat caactttctc agctgcaaaa gcttctagtc tttcaagaag ttcatacttt 3574
 atgaaattgc acagtaagca tttatttttc agaccatttt tgaacatcac tcctaaatta 3634
 ataaagtatt cctctgttgc tttagtattt attacaataa aaagggtttg aatatagct 3694
 gttctttatg cataaaacac ccagctagga ccattactgc cagagaaaaa aatcgtattg 3754
 aatggccatt tcctactta taagatgtct caatctgaat ttatttggct aactaaaga 3814
 atgcagtata tttagttttc catttgcATg atgtttgtgt gctatagatg atattttaaa 3874
 ttgaaaagtt tgttttaaat tatttttaca gtgaagactg ttttcagctc tttttatatt 3934
 gtacatagtc ttttatghaa tttactggca tatgttttgt agactgttta atgactggat 3994
 atcttccttc aacttttgaa atacaaaacc agtgtttttt acttgtacac tgttttaaag 4054
 tctattaAAA ttgtcatttg acttttttct gttaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaa 4107

5 <210> 2
 <211> 747
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 572 372 T3

<400> 2

Met Ala Asp Glu Ala Ala Leu Ala Leu Gln Pro Gly Gly Ser Pro Ser
 1 5 10 15

Ala Ala Gly Ala Asp Arg Glu Ala Ala Ser Ser Pro Ala Gly Glu Pro
 20 25 30

Leu Arg Lys Arg Pro Arg Arg Asp Gly Pro Gly Leu Glu Arg Ser Pro
 35 40 45

Gly Glu Pro Gly Gly Ala Ala Pro Glu Arg Glu Val Pro Ala Ala Ala
 50 55 60

Arg Gly Cys Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ala Leu Trp Arg Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Glu Gln Glu Ala Gln Ala Thr Ala
 85 90 95

Ala Ala Gly Glu Gly Asp Asn Gly Pro Gly Leu Gln Gly Pro Ser Arg
 100 105 110

Glu Pro Pro Leu Ala Asp Asn Leu Tyr Asp Glu Asp Asp Asp Glu
 115 120 125

Gly Glu Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ile Gly Tyr Arg Asp
 130 135 140

Asn Leu Leu Phe Gly Asp Glu Ile Ile Thr Asn Gly Phe His Ser Cys
 145 150 155 160

Glu Ser Asp Glu Glu Asp Arg Ala Ser His Ala Ser Ser Ser Asp Trp
 165 170 175

Thr Pro Arg Pro Arg Ile Gly Pro Tyr Thr Phe Val Gln Gln His Leu
 180 185 190

Met Ile Gly Thr Asp Pro Arg Thr Ile Leu Lys Asp Leu Leu Pro Glu
 195 200 205

Thr Ile Pro Pro Pro Glu Leu Asp Asp Met Thr Leu Trp Gln Ile Val
 210 215 220

Ile Asn Ile Leu Ser Glu Pro Pro Lys Arg Lys Lys Arg Lys Asp Ile
 225 230 235 240

Asn Thr Ile Glu Asp Ala Val Lys Leu Leu Gln Glu Cys Lys Lys Ile
 245 250 255

Ile Val Leu Thr Gly Ala Gly Val Ser Val Ser Cys Gly Ile Pro Asp
 260 265 270

Phe Arg Ser Arg Asp Gly Ile Tyr Ala Arg Leu Ala Val Asp Phe Pro
 275 280 285

ES 2 572 372 T3

Asp Leu Pro Asp Pro Gln Ala Met Phe Asp Ile Glu Tyr Phe Arg Lys
 290 295 300
 Asp Pro Arg Pro Phe Phe Lys Phe Ala Lys Glu Ile Tyr Pro Gly Gln
 305 310 315 320
 Phe Gln Pro Ser Leu Cys His Lys Phe Ile Ala Leu Ser Asp Lys Glu
 325 330 335
 Gly Lys Leu Leu Arg Asn Tyr Thr Gln Asn Ile Asp Thr Leu Glu Gln
 340 345 350
 Val Ala Gly Ile Gln Arg Ile Ile Gln Cys His Gly Ser Phe Ala Thr
 355 360 365
 Ala Ser Cys Leu Ile Cys Lys Tyr Lys Val Asp Cys Glu Ala Val Arg
 370 375 380
 Gly Asp Ile Phe Asn Gln Val Val Pro Arg Cys Pro Arg Cys Pro Ala
 385 390 395 400
 Asp Glu Pro Leu Ala Ile Met Lys Pro Glu Ile Val Phe Phe Gly Glu
 405 410 415
 Asn Leu Pro Glu Gln Phe His Arg Ala Met Lys Tyr Asp Lys Asp Glu
 420 425 430
 Val Asp Leu Leu Ile Val Ile Gly Ser Ser Leu Lys Val Arg Pro Val
 435 440 445
 Ala Leu Ile Pro Ser Ser Ile Pro His Glu Val Pro Gln Ile Leu Ile
 450 455 460
 Asn Arg Glu Pro Leu Pro His Leu His Phe Asp Val Glu Leu Leu Gly
 465 470 475 480
 Asp Cys Asp Val Ile Ile Asn Glu Leu Cys His Arg Leu Gly Gly Glu
 485 490 495
 Tyr Ala Lys Leu Cys Cys Asn Pro Val Lys Leu Ser Glu Ile Thr Glu
 500 505 510
 Lys Pro Pro Arg Thr Gln Lys Glu Leu Ala Tyr Leu Ser Glu Leu Pro
 515 520 525
 Pro Thr Pro Leu His Val Ser Glu Asp Ser Ser Ser Pro Glu Arg Thr
 530 535 540
 Ser Pro Pro Asp Ser Ser Val Ile Val Thr Leu Leu Asp Gln Ala Ala
 545 550 555 560
 Lys Ser Asn Asp Asp Leu Asp Val Ser Glu Ser Lys Gly Cys Met Glu
 565 570 575
 Glu Lys Pro Gln Glu Val Gln Thr Ser Arg Asn Val Glu Ser Ile Ala
 580 585 590

ES 2 572 372 T3

Glu Gln Met Glu Asn Pro Asp Leu Lys Asn Val Gly Ser Ser Thr Gly
 595 600 605

Glu Lys Asn Glu Arg Thr Ser Val Ala Gly Thr Val Arg Lys Cys Trp
 610 615 620

Pro Asn Arg Val Ala Lys Glu Gln Ile Ser Arg Arg Leu Asp Gly Asn
 625 630 635 640

Gln Tyr Leu Phe Leu Pro Pro Asn Arg Tyr Ile Phe His Gly Ala Glu
 645 650 655

Val Tyr Ser Asp Ser Glu Asp Asp Val Leu Ser Ser Ser Ser Cys Gly
 660 665 670

Ser Asn Ser Asp Ser Gly Thr Cys Gln Ser Pro Ser Leu Glu Glu Pro
 675 680 685

Met Glu Asp Glu Ser Glu Ile Glu Glu Phe Tyr Asn Gly Leu Glu Asp
 690 695 700

Glu Pro Asp Val Pro Glu Arg Ala Gly Gly Ala Gly Phe Gly Thr Asp
 705 710 715 720

Gly Asp Asp Gln Glu Ala Ile Asn Glu Ala Ile Ser Val Lys Gln Glu
 725 730 735

Val Thr Asp Met Asn Tyr Pro Ser Asn Lys Ser
 740 745

5 <210> 3
 <211> 1963
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (201)..(1367)

<400> 3

15

gtgttgtagc aaagcgcgtc tgcggccgca atgtctgctg agagttgtag ttctgtgccc 60
 tatcacggcc actcccattt ctggtgccgt cacgggacag agcagtcggt gacaggacag 120
 agcagtcggt gacgggacac agtggttggg gacgggacag agcggtcggt gacagcctca 180
 agggcttcag caccgcgccc atg gca gag cca gac ccc tct cac cct ctg gag 233
 Met Ala Glu Pro Asp Pro Ser His Pro Leu Glu
 1 5 10

acc cag gca ggg aag gtg cag gag gct cag gac tca gat tca gac tct 281
 Thr Gln Ala Gly Lys Val Gln Glu Ala Gln Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 15 20 25

gag gga gga gcc gct ggt gga gaa gca gac atg gac ttc ctg cgg aac 329
 Glu Gly Gly Ala Ala Gly Gly Glu Ala Asp Met Asp Phe Leu Arg Asn
 30 35 40

ES 2 572 372 T3

tta ttc tcc cag acg ctc agc ctg ggc agc cag aag gag cgt ctg ctg	377
Leu Phe Ser Gln Thr Leu Ser Leu Gly Ser Gln Lys Glu Arg Leu Leu	
45 50 55	
gac gag ctg acc ttg gaa ggg gtg gcc cgg tac atg cag agc gaa cgc	425
Asp Glu Leu Thr Leu Glu Gly Val Ala Arg Tyr Met Gln Ser Glu Arg	
60 65 70 75	
tgt cgc aga gtc atc tgt ttg gtg gga gct gga atc tcc aca tcc gca	473
Cys Arg Arg Val Ile Cys Leu Val Gly Ala Gly Ile Ser Thr Ser Ala	
80 85 90	
ggc atc ccc gac ttt cgc tct cca tcc acc ggc ctc tat gac aac cta	521
Gly Ile Pro Asp Phe Arg Ser Pro Ser Thr Gly Leu Tyr Asp Asn Leu	
95 100 105	
gag aag tac cat ctt ccc tac cca gag gcc atc ttt gag atc agc tat	569
Glu Lys Tyr His Leu Pro Tyr Pro Glu Ala Ile Phe Glu Ile Ser Tyr	
110 115 120	
ttc aag aaa cat ccg gaa ccc ttc ttc gcc ctc gcc aag gaa ctc tat	617
Phe Lys Lys His Pro Glu Pro Phe Phe Ala Leu Ala Lys Glu Leu Tyr	
125 130 135	
cct ggg cag ttc aag cca acc atc tgt cac tac ttc atg cgc ctg ctg	665
Pro Gly Gln Phe Lys Pro Thr Ile Cys His Tyr Phe Met Arg Leu Leu	
140 145 150 155	
aag gac aag ggg cta ctc ctg cgc tgc tac acg cag aac ata gat acc	713
Lys Asp Lys Gly Leu Leu Leu Arg Cys Tyr Thr Gln Asn Ile Asp Thr	
160 165 170	
ctg gag cga ata gcc ggg ctg gaa cag gag gac ttg gtg gag gcg cac	761
Leu Glu Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gln Glu Asp Leu Val Glu Ala His	
175 180 185	
ggc acc ttc tac aca tca cac tgc gtc agc gcc agc tgc cgg cac gaa	809
Gly Thr Phe Tyr Thr Ser His Cys Val Ser Ala Ser Cys Arg His Glu	
190 195 200	
tac ccg cta agc tgg atg aaa gag aag atc ttc tct gag gtg acg ccc	857
Tyr Pro Leu Ser Trp Met Lys Glu Lys Ile Phe Ser Glu Val Thr Pro	
205 210 215	
aag tgt gaa gac tgt cag agc ctg gtg aag cct gat atc gtc ttt ttt	905
Lys Cys Glu Asp Cys Gln Ser Leu Val Lys Pro Asp Ile Val Phe Phe	
220 225 230 235	
ggc gag agc ctc cca gcg cgt ttc ttc tcc tgt atg cag tca gac ttc	953
Gly Glu Ser Leu Pro Ala Arg Phe Phe Ser Cys Met Gln Ser Asp Phe	
240 245 250	
ctg aag gtg gac ctc ctc ctg gtc atg ggt acc tcc ttg cag gtg cag	1001
Leu Lys Val Asp Leu Leu Leu Val Met Gly Thr Ser Leu Gln Val Gln	
255 260 265	
ccc ttt gcc tcc ctc atc agc aag gca ccc ctc tcc acc cct cgc ctg	1049
Pro Phe Ala Ser Leu Ile Ser Lys Ala Pro Leu Ser Thr Pro Arg Leu	
270 275 280	

ES 2 572 372 T3

```

ctc atc aac aag gag aaa gct ggc cag tcg gac cct ttc ctg ggg atg 1097
Leu Ile Asn Lys Glu Lys Ala Gly Gln Ser Asp Pro Phe Leu Gly Met
    285                290                295

att atg ggc ctc gga gga ggc atg gac ttt gac tcc aag aag gcc tac 1145
Ile Met Gly Leu Gly Gly Gly Met Asp Phe Asp Ser Lys Lys Ala Tyr
    300                305                310                315

agg gac gtg gcc tgg ctg ggt gaa tgc gac cag ggc tgc ctg gcc ctt 1193
Arg Asp Val Ala Trp Leu Gly Glu Cys Asp Gln Gly Cys Leu Ala Leu
                320                325                330

gct gag ctc ctt gga tgg aag aag gag ctg gag gac ctt gtc cgg agg 1241
Ala Glu Leu Leu Gly Trp Lys Lys Glu Leu Glu Asp Leu Val Arg Arg
                335                340                345

gag cac gcc agc ata gat gcc cag tcg ggg gcg ggg gtc ccc aac ccc 1289
Glu His Ala Ser Ile Asp Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Asn Pro
                350                355                360

agc act tca gct tcc ccc aag aag tcc ccg cca cct gcc aag gac gag 1337
Ser Thr Ser Ala Ser Pro Lys Lys Ser Pro Pro Pro Ala Lys Asp Glu
    365                370                375

gcc agg aca aca gag agg gag aaa ccc cag tgacagctgc atctcccagg 1387
Ala Arg Thr Thr Glu Arg Glu Lys Pro Gln
    380                385

cgggatgccg agctcctcag ggacagctga gcccacccg ggcttgccc cctcttaacc 1447
agcagttctt gtctggggag ctcagaacat ccccacatct cttacagctc cctccccaaa 1507
actgggggtcc cagcaaccct ggcccccaac cccagcaaat ctctaacacc tcttagaggc 1567
caaggcttaa acaggcatct ctaccagccc cactgtctct aaccactcct gggctaagga 1627
gtaacctccc tcctctctaa ctgccccac ggggccaggg ctaccccaga acttttaact 1687
cttccaggac agggagcttc gggccccac tctgtctcct gccccgggg gcctgtggct 1747
aagtaaacca tacctaacct accccagtgt ggggtgtgggc ctctgaatat aaccacacc 1807
cagcgtaggg ggagtctgag ccgggagggc tcccagctct ctgccttcag ctcccaaagt 1867
gggtggtggg ccccttcac gtgggacca cttcccatgc tggatgggca gaagacattg 1927
cttattggag acaaattaa aacaaaaaca actaac 1963

```

5
 <210> 4
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10
 <400> 4

Met Ala Glu Pro Asp Pro Ser His Pro Leu Glu Thr Gln Ala Gly Lys
 1 5 10 15

15

ES 2 572 372 T3

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

ES 2 572 372 T3

Trp Lys Lys Glu Leu Glu Asp Leu Val Arg Arg Glu His Ala Ser Ile
 340 345 350
 Asp Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Asn Pro Ser Thr Ser Ala Ser
 355 360 365
 Pro Lys Lys Ser Pro Pro Pro Ala Lys Asp Glu Ala Arg Thr Thr Glu
 370 375 380
 Arg Glu Lys Pro Gln
 385

<210> 5
 <211> 1931
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (257)..(1312)

<400> 5

cgaaagcgcg tctgcgccg caatgtctgc tgagagttgt agttctgtgc cctatcacgg 60
 ccaactcccat ttctggtgcc gtcacgggac agagcagtcg gtgacaggac agagcagtcg 120
 gtgacgggac acagtggttg gtgacgggac agagcggtcg gtgacagcct caagggcttc 180
 agcaccgcgc ccatggcaga gccagaccga ctgagattca gactctgagg gaggagccgc 240
 tgggtggagaa gcagac atg gac ttc ctg cgg aac tta ttc tcc cag acg ctc 292
 Met Asp Phe Leu Arg Asn Leu Phe Ser Gln Thr Leu
 1 5 10
 agc ctg ggc agc cag aag gag cgt ctg ctg gac gag ctg acc ttg gaa 340
 Ser Leu Gly Ser Gln Lys Glu Arg Leu Leu Asp Glu Leu Thr Leu Glu
 15 20 25
 ggg gtg gcc cgg tac atg cag agc gaa cgc tgt cgc aga gtc atc tgt 388
 Gly Val Ala Arg Tyr Met Gln Ser Glu Arg Cys Arg Arg Val Ile Cys
 30 35 40
 ttg gtg gga gct gga atc tcc aca tcc gca ggc atc ccc gac ttt cgc 436
 Leu Val Gly Ala Gly Ile Ser Thr Ser Ala Gly Ile Pro Asp Phe Arg
 45 50 55 60
 tct cca tcc acc ggc ctc tat gac aac cta gag aag tac cat ctt ccc 484
 Ser Pro Ser Thr Gly Leu Tyr Asp Asn Leu Glu Lys Tyr His Leu Pro
 65 70 75
 tac cca gag gcc atc ttt gag atc agc tat ttc aag aaa cat ccg gaa 532
 Tyr Pro Glu Ala Ile Phe Glu Ile Ser Tyr Phe Lys Lys His Pro Glu
 80 85 90
 ccc ttc ttc gcc ctc gcc aag gaa ctc tat cct ggg cag ttc aag cca 580
 Pro Phe Phe Ala Leu Ala Lys Glu Leu Tyr Pro Gly Gln Phe Lys Pro
 95 100 105

15

ES 2 572 372 T3

acc atc tgt cac tac ttc atg cgc ctg ctg aag gac aag ggg cta ctc	628
Thr Ile Cys His Tyr Phe Met Arg Leu Leu Lys Asp Lys Gly Leu Leu	
110 115 120	
ctg cgc tgc tac acg cag aac ata gat acc ctg gag cga ata gcc ggg	676
Leu Arg Cys Tyr Thr Gln Asn Ile Asp Thr Leu Glu Arg Ile Ala Gly	
125 130 135 140	
ctg gaa cag gag gac ttg gtg gag gcg cac ggc acc ttc tac aca tca	724
Leu Glu Gln Glu Asp Leu Val Glu Ala His Gly Thr Phe Tyr Thr Ser	
145 150 155	
cac tgc gtc agc gcc agc tgc cgg cac gaa tac ccg cta agc tgg atg	772
His Cys Val Ser Ala Ser Cys Arg His Glu Tyr Pro Leu Ser Trp Met	
160 165 170	
aaa gag aag atc ttc tct gag gtg acg ccc aag tgt gaa gac tgt cag	820
Lys Glu Lys Ile Phe Ser Glu Val Thr Pro Lys Cys Glu Asp Cys Gln	
175 180 185	
agc ctg gtg aag cct gat atc gtc ttt ttt ggt gag agc ctc cca gcg	868
Ser Leu Val Lys Pro Asp Ile Val Phe Phe Gly Glu Ser Leu Pro Ala	
190 195 200	
cgt ttc ttc tcc tgt atg cag tca gac ttc ctg aag gtg gac ctc ctc	916
Arg Phe Phe Ser Cys Met Gln Ser Asp Phe Leu Lys Val Asp Leu Leu	
205 210 215 220	
ctg gtc atg ggt acc tcc ttg cag gtg cag ccc ttt gcc tcc ctc atc	964
Leu Val Met Gly Thr Ser Leu Gln Val Gln Pro Phe Ala Ser Leu Ile	
225 230 235	
agc aag gca ccc ctc tcc acc cct cgc ctg ctc atc aac aag gag aaa	1012
Ser Lys Ala Pro Leu Ser Thr Pro Arg Leu Leu Ile Asn Lys Glu Lys	
240 245 250	
gct ggc cag tcg gac cct ttc ctg ggg atg att atg ggc ctc gga gga	1060
Ala Gly Gln Ser Asp Pro Phe Leu Gly Met Ile Met Gly Leu Gly Gly	
255 260 265	
ggc atg gac ttt gac tcc aag aag gcc tac agg gac gtg gcc tgg ctg	1108
Gly Met Asp Phe Asp Ser Lys Lys Ala Tyr Arg Asp Val Ala Trp Leu	
270 275 280	
ggt gaa tgc gac cag ggc tgc ctg gcc ctt gct gag ctc ctt gga tgg	1156
Gly Glu Cys Asp Gln Gly Cys Leu Ala Leu Ala Glu Leu Leu Gly Trp	
285 290 295 300	
aag aag gag ctg gag gac ctt gtc cgg agg gag cac gcc agc ata gat	1204
Lys Lys Glu Leu Glu Asp Leu Val Arg Arg Glu His Ala Ser Ile Asp	
305 310 315	
gcc cag tcg ggg gcg ggg gtc ccc aac ccc agc act tca gct tcc ccc	1252
Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Asn Pro Ser Thr Ser Ala Ser Pro	
320 325 330	

ES 2 572 372 T3

aag aag tcc ccg cca cct gcc aag gac gag gcc agg aca aca gag agg 1300
 Lys Lys Ser Pro Pro Pro Ala Lys Asp Glu Ala Arg Thr Thr Glu Arg
 335 340 345

gag aaa ccc cag tgacagctgc atctcccagg cgggatgccg agctcctcag 1352
 Glu Lys Pro Gln
 350

ggacagctga gcccccaaccg ggcttgccc cctcttaacc agcagttctt gtctggggag 1412

ctcagaacat cccccaatct cttacagctc cctcccaaaa actgggggtcc cagcaaccct 1472

ggcccccaac cccagcaaat ctctaacacc tcttagagge caaggcttaa acaggcatct 1532

ctaccagccc cactgtctct aaccactcct gggctaagga gtaacctccc tcatctctaa 1592

ctgccccac ggggccaggg ctaccacaga acttttaact cttccaggac agggagcttc 1652

gggccccac tctgtctcct gccccgggg gcctgtggct aagtaaacca tacctaacct 1712

acccagtggt ggggtgtggc ctctgaatat aaccacacc cagcgtaggg ggagtctgag 1772

ccgggagggc tcccaggtct ctgccttcag ctcccaaagt ggggtgtggg ccccttcac 1832

gtgggacca cttccatgc tggatgggca gaagacattg cttattggag acaaattaa 1892

aacaaaaaca actaacaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1931

5 <210> 6
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 6

Met Asp Phe Leu Arg Asn Leu Phe Ser Gln Thr Leu Ser Leu Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Glu Arg Leu Leu Asp Glu Leu Thr Leu Glu Gly Val Ala Arg
 20 25 30

Tyr Met Gln Ser Glu Arg Cys Arg Arg Val Ile Cys Leu Val Gly Ala
 35 40 45

Gly Ile Ser Thr Ser Ala Gly Ile Pro Asp Phe Arg Ser Pro Ser Thr
 50 55 60

Gly Leu Tyr Asp Asn Leu Glu Lys Tyr His Leu Pro Tyr Pro Glu Ala
 65 70 75 80

Ile Phe Glu Ile Ser Tyr Phe Lys Lys His Pro Glu Pro Phe Phe Ala
 85 90 95

Leu Ala Lys Glu Leu Tyr Pro Gly Gln Phe Lys Pro Thr Ile Cys His
 100 105 110

Tyr Phe Met Arg Leu Leu Lys Asp Lys Gly Leu Leu Leu Arg Cys Tyr
 115 120 125

ES 2 572 372 T3

Thr Gln Asn Ile Asp Thr Leu Glu Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gln Glu
 130 135 140

Asp Leu Val Glu Ala His Gly Thr Phe Tyr Thr Ser His Cys Val Ser
 145 150 155 160

Ala Ser Cys Arg His Glu Tyr Pro Leu Ser Trp Met Lys Glu Lys Ile
 165 170 175

Phe Ser Glu Val Thr Pro Lys Cys Glu Asp Cys Gln Ser Leu Val Lys
 180 185 190

Pro Asp Ile Val Phe Phe Gly Glu Ser Leu Pro Ala Arg Phe Phe Ser
 195 200 205

Cys Met Gln Ser Asp Phe Leu Lys Val Asp Leu Leu Leu Val Met Gly
 210 215 220

Thr Ser Leu Gln Val Gln Pro Phe Ala Ser Leu Ile Ser Lys Ala Pro
 225 230 235 240

Leu Ser Thr Pro Arg Leu Leu Ile Asn Lys Glu Lys Ala Gly Gln Ser
 245 250 255

Asp Pro Phe Leu Gly Met Ile Met Gly Leu Gly Gly Gly Met Asp Phe
 260 265 270

Asp Ser Lys Lys Ala Tyr Arg Asp Val Ala Trp Leu Gly Glu Cys Asp
 275 280 285

Gln Gly Cys Leu Ala Leu Ala Glu Leu Leu Gly Trp Lys Lys Glu Leu
 290 295 300

Glu Asp Leu Val Arg Arg Glu His Ala Ser Ile Asp Ala Gln Ser Gly
 305 310 315 320

Ala Gly Val Pro Asn Pro Ser Thr Ser Ala Ser Pro Lys Lys Ser Pro
 325 330 335

Pro Pro Ala Lys Asp Glu Ala Arg Thr Thr Glu Arg Glu Lys Pro Gln
 340 345 350

<210> 7
 <211> 1927
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (103)..(1299)

<400> 7
 ggcgccgggg gcggggtgg gaggcggagg cggggccggg ggcgccggg cggggcgccg 60
 ggggcggggc gagtccggag gactcctcgg actgcgcgga ac atg gcg ttc tgg 114
 Met Ala Phe Trp
 1

ES 2 572 372 T3

ggt tgg cgc gcc gcg gca gcc ctc cgg ctg tgg ggc cgg gta gtt gaa 162
 Gly Trp Arg Ala Ala Ala Ala Leu Arg Leu Trp Gly Arg Val Val Glu
 5 10 15 20
 cgg gtc gag gcc ggg gga ggc gtg ggg ccg ttt cag gcc tgc ggc tgt 210
 Arg Val Glu Ala Gly Gly Gly Val Gly Pro Phe Gln Ala Cys Gly Cys
 25 30 35
 cgg ctg gtg ctt ggc ggc agg gac gat gtg agt gcg ggg ctg aga ggc 258
 Arg Leu Val Leu Gly Gly Arg Asp Asp Val Ser Ala Gly Leu Arg Gly
 40 45 50
 agc cat ggg gcc cgc ggt gag ccc ttg gac ccg gcg cgc ccc ttg cag 306
 Ser His Gly Ala Arg Gly Glu Pro Leu Asp Pro Ala Arg Pro Leu Gln
 55 60 65
 agg cct ccc aga ccc gag gtg ccc agg gca ttc ccg agg cag ccg agg 354
 Arg Pro Pro Arg Pro Glu Val Pro Arg Ala Phe Arg Arg Gln Pro Arg
 70 75 80
 gca gca gct ccc agt ttc ttc ttt tcg agt att aaa ggt gga aga agg 402
 Ala Ala Ala Pro Ser Phe Phe Phe Ser Ser Ile Lys Gly Gly Arg Arg
 85 90 95 100
 tcc ata tct ttt tct gtg ggt gct tca agt gtt gtt gga agt gga ggc 450
 Ser Ile Ser Phe Ser Val Gly Ala Ser Ser Val Val Val Gly Ser Gly Gly
 105 110 115
 agc agt gac aag ggg aag ctt tcc ctg cag gat gta gct gag ctg att 498
 Ser Ser Asp Lys Gly Lys Leu Ser Leu Gln Asp Val Ala Glu Leu Ile
 120 125 130
 cgg gcc aga gcc tgc cag agg gtg gtg gtc atg gtg ggg gcc ggc atc 546
 Arg Ala Arg Ala Cys Gln Arg Val Val Val Met Val Gly Ala Gly Ile
 135 140 145
 agc aca ccc agt ggc att cca gac ttc aga tcg ccg ggg agt ggc ctg 594
 Ser Thr Pro Ser Gly Ile Pro Asp Phe Arg Ser Pro Gly Ser Gly Leu
 150 155 160
 tac agc aac ctc cag cag tac gat ctc ccg tac ccc gag gcc att ttt 642
 Tyr Ser Asn Leu Gln Gln Tyr Asp Leu Pro Tyr Pro Glu Ala Ile Phe
 165 170 175 180
 gaa ctc cca ttc ttc ttt cac aac ccc aag ccc ttt ttc act ttg gcc 690
 Glu Leu Pro Phe Phe Phe His Asn Pro Lys Pro Phe Phe Thr Leu Ala
 185 190 195
 aag gag ctg tac cct gga aac tac aag ccc aac gtc act cac tac ttt 738
 Lys Glu Leu Tyr Pro Gly Asn Tyr Lys Pro Asn Val Thr His Tyr Phe
 200 205 210
 ctc cgg ctg ctt cat gac aag ggg ctg ctt ctg cgg ctc tac acg cag 786
 Leu Arg Leu Leu His Asp Lys Gly Leu Leu Leu Arg Leu Tyr Thr Gln
 215 220 225

ES 2 572 372 T3

aac atc gat ggg ctt gag aga gtg tgc ggc atc cct gcc tca aag ctg 834
Asn Ile Asp Gly Leu Glu Arg Val Ser Gly Ile Pro Ala Ser Lys Leu
230 235 240

gtt gaa gct cat gga acc ttt gcc tct gcc acc tgc aca gtc tgc caa 882
Val Glu Ala His Gly Thr Phe Ala Ser Ala Thr Cys Thr Val Cys Gln
245 250 255 260

aga ccc ttc cca ggg gag gac att cgg gct gac gtg atg gca gac agg 930
Arg Pro Phe Pro Gly Glu Asp Ile Arg Ala Asp Val Met Ala Asp Arg
265 270 275

gtt ccc cgc tgc ccg gtc tgc acc ggc gtt gtg aag ccc gac att gtg 978
Val Pro Arg Cys Pro Val Cys Thr Gly Val Val Lys Pro Asp Ile Val
280 285 290

ttc ttt ggg gag ccg ctg ccc cag agg ttc ttg ctg cat gtg gtt gat 1026
Phe Phe Gly Glu Pro Leu Pro Gln Arg Phe Leu Leu His Val Val Asp
295 300 305

ttc ccc atg gca gat ctg ctg ctc atc ctt ggg acc tcc ctg gag gtg 1074
Phe Pro Met Ala Asp Leu Leu Leu Ile Leu Gly Thr Ser Leu Glu Val
310 315 320

gag cct ttt gcc agc ttg acc gag gcc gtg cgg agc tca gtt ccc cga 1122
Glu Pro Phe Ala Ser Leu Thr Glu Ala Val Arg Ser Ser Val Pro Arg
325 330 335 340

ctg ctc atc aac cgg gac ttg gtg ggg ccc ttg gct tgg cat cct cgc 1170
Leu Leu Ile Asn Arg Asp Leu Val Gly Pro Leu Ala Trp His Pro Arg
345 350 355

agc agg gac gtg gcc cag ctg ggg gac gtg gtt cac ggc gtg gaa agc 1218
Ser Arg Asp Val Ala Gln Leu Gly Asp Val Val His Gly Val Glu Ser
360 365 370

cta gtg gag ctt ctg ggc tgg aca gaa gag atg cgg gac ctt gtg cag 1266
Leu Val Glu Leu Leu Gly Trp Thr Glu Glu Met Arg Asp Leu Val Gln
375 380 385

cgg gaa act ggg aag ctt gat gga cca gac aaa taggatgatg gctgccccca 1319
Arg Glu Thr Gly Lys Leu Asp Gly Pro Asp Lys
390 395

cacaataaat ggtaacatag gagacatcca catcccaatt ctgacaagac ctcatgctg 1379

aagacagctt gggcaggtga aaccagaata tgtgaactga gtggacaccc gaggctgcca 1439

ctggaatgtc ttctcaggcc atgagctgca gtgactggta gggctgtggt tacagtcagg 1499

gccaccccg t cacatataca aaggagctgc ctgcctgttt gctgtgttga actcttcact 1559

ctgctgaagc tcctaatagga aaaagcttctc ttctgactgt gaccctcttg aactgaatca 1619

gaccaactgg aatcccagac cgagtctgct ttctgtgcct agttgaacgg caagctcggc 1679

atctgttgg tacaagatcc agacttgggc cgagcggctc ccagccctct tcatgttccg 1739

aagtgtagtc ttgagccct ggtgccgcac ttctagcatg ttggtctcct ttagtggggc 1799

ES 2 572 372 T3

tatttttaat gagagaaaat ctgttctttc cagcatgaaa tacatttagt ctctctcaaag 1859
 ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1919
 aaaaaaaaaa 1927

<210> 8
 <211> 399
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 8

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

10

ES 2 572 372 T3

Ala Ser Lys Leu Val Glu Ala His Gly Thr Phe Ala Ser Ala Thr Cys
 245 250 255
 Thr Val Cys Gln Arg Pro Phe Pro Gly Glu Asp Ile Arg Ala Asp Val
 260 265 270
 Met Ala Asp Arg Val Pro Arg Cys Pro Val Cys Thr Gly Val Val Lys
 275 280 285
 Pro Asp Ile Val Phe Phe Gly Glu Pro Leu Pro Gln Arg Phe Leu Leu
 290 295 300
 His Val Val Asp Phe Pro Met Ala Asp Leu Leu Leu Ile Leu Gly Thr
 305 310 315 320
 Ser Leu Glu Val Glu Pro Phe Ala Ser Leu Thr Glu Ala Val Arg Ser
 325 330 335
 Ser Val Pro Arg Leu Leu Ile Asn Arg Asp Leu Val Gly Pro Leu Ala
 340 345 350
 Trp His Pro Arg Ser Arg Asp Val Ala Gln Leu Gly Asp Val Val His
 355 360 365
 Gly Val Glu Ser Leu Val Glu Leu Leu Gly Trp Thr Glu Glu Met Arg
 370 375 380
 Asp Leu Val Gln Arg Glu Thr Gly Lys Leu Asp Gly Pro Asp Lys
 385 390 395

<210> 9
 <211> 1174
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (21)..(962)

<400> 9

gtccgtagag ctgtgagaga atg aag atg agc ttt gcg ttg act ttc agg tca 53
 Met Lys Met Ser Phe Ala Leu Thr Phe Arg Ser
 1 5 10

gca aaa ggc cgt tgg atc gca aac ccc agc cag ccg tgc tcg aaa gcc 101
 Ala Lys Gly Arg Trp Ile Ala Asn Pro Ser Gln Pro Cys Ser Lys Ala
 15 20 25

tcc att ggg tta ttt gtg cca gca agt cct cct ctg gac cct gag aag 149
 Ser Ile Gly Leu Phe Val Pro Ala Ser Pro Pro Leu Asp Pro Glu Lys
 30 35 40

gtc aaa gag tta cag cgc ttc atc acc ctt tcc aag aga ctc ctt gtg 197
 Val Lys Glu Leu Gln Arg Phe Ile Thr Leu Ser Lys Arg Leu Leu Val
 45 50 55

15

ES 2 572 372 T3

atg act ggg gca gga atc tcc acc gaa tcg ggg ata cca gac tac agg	245
Met Thr Gly Ala Gly Ile Ser Thr Glu Ser Gly Ile Pro Asp Tyr Arg	
60 65 70 75	
tca gaa aaa gtg ggg ctt tat gcc cgc act gac cgc agg ccc atc cag	293
Ser Glu Lys Val Gly Leu Tyr Ala Arg Thr Asp Arg Arg Pro Ile Gln	
80 85 90	
cat ggt gat ttt gtc cgg agt gcc cca atc cgc cag cgg tac tgg gcg	341
His Gly Asp Phe Val Arg Ser Ala Pro Ile Arg Gln Arg Tyr Trp Ala	
95 100 105	
aga aac ttc gta ggc tgg cct caa ttc tcc tcc cac cag cct aac cct	389
Arg Asn Phe Val Gly Trp Pro Gln Phe Ser Ser His Gln Pro Asn Pro	
110 115 120	
gca cac tgg gct ttg agc acc tgg gag aaa ctc gga aag ctg tac tgg	437
Ala His Trp Ala Leu Ser Thr Trp Glu Lys Leu Gly Lys Leu Tyr Trp	
125 130 135	
ttg gtg acc caa aat gtg gat gct ttg cac acc aag gcg ggg agt cgg	485
Leu Val Thr Gln Asn Val Asp Ala Leu His Thr Lys Ala Gly Ser Arg	
140 145 150 155	
cgc ctg aca gag ctc cac gga tgc atg gac agg gtc ctg tgc ttg gat	533
Arg Leu Thr Glu Leu His Gly Cys Met Asp Arg Val Leu Cys Leu Asp	
160 165 170	
tgt ggg gaa cag act ccc cgg ggg gtg ctg caa gag cgt ttc caa gtc	581
Cys Gly Glu Gln Thr Pro Arg Gly Val Leu Gln Glu Arg Phe Gln Val	
175 180 185	
ctg aac ccc acc tgg agt gct gag gcc cat ggc ctg gct cct gat ggt	629
Leu Asn Pro Thr Trp Ser Ala Glu Ala His Gly Leu Ala Pro Asp Gly	
190 195 200	
gac gtc ttt ctc tca gag gag caa gtc cgg agc ttt cag gtc cca acc	677
Asp Val Phe Leu Ser Glu Glu Gln Val Arg Ser Phe Gln Val Pro Thr	
205 210 215	
tgc gtt caa tgt gga ggc cat ctg aaa cca gat gtc gtt ttc ttc ggg	725
Cys Val Gln Cys Gly Gly His Leu Lys Pro Asp Val Val Phe Phe Gly	
220 225 230 235	
gac aca gtg aac cct gac aag gtt gat ttt gtg cac aag cgt gta aaa	773
Asp Thr Val Asn Pro Asp Lys Val Asp Phe Val His Lys Arg Val Lys	
240 245 250	
gaa gcc gac tcc ctc ttg gtg gtg gga tca tcc ttg cag gta tac tct	821
Glu Ala Asp Ser Leu Leu Val Val Gly Ser Ser Leu Gln Val Tyr Ser	
255 260 265	
ggt tac agg ttt atc ctc act gcc tgg gag aag aag ctc ccg att gca	869
Gly Tyr Arg Phe Ile Leu Thr Ala Trp Glu Lys Lys Leu Pro Ile Ala	
270 275 280	
ata ctg aac att ggg ccc aca cgg tcg gat gac ttg gcg tgt ctg aaa	917
Ile Leu Asn Ile Gly Pro Thr Arg Ser Asp Asp Leu Ala Cys Leu Lys	
285 290 295	

ES 2 572 372 T3

ctg aat tct cgt tgt gga gag ttg ctg cct ttg ata gac cca tgc 962
 Leu Asn Ser Arg Cys Gly Glu Leu Leu Pro Leu Ile Asp Pro Cys
 300 305 310

tgaccacagc ctgatattcc agaacctgga acagggactt tcaattgaat cttgctgcta 1022

aatgtaaagc ccttctcaaa tgacagattc cagttcccat tcaacagagt aggggtgcaact 1082

gacaaagtat agaaggttct aggtatctta atgtgtggat attottaatt aaaactcatt 1142

ttttttaaat aaaaaattgt tcagctttaa aa 1174

<210> 10

<211> 314

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 10

Met Lys Met Ser Phe Ala Leu Thr Phe Arg Ser Ala Lys Gly Arg Trp
 1 5 10 15

Ile Ala Asn Pro Ser Gln Pro Cys Ser Lys Ala Ser Ile Gly Leu Phe
 20 25 30

Val Pro Ala Ser Pro Pro Leu Asp Pro Glu Lys Val Lys Glu Leu Gln
 35 40 45

Arg Phe Ile Thr Leu Ser Lys Arg Leu Leu Val Met Thr Gly Ala Gly
 50 55 60

Ile Ser Thr Glu Ser Gly Ile Pro Asp Tyr Arg Ser Glu Lys Val Gly
 65 70 75 80

Leu Tyr Ala Arg Thr Asp Arg Arg Pro Ile Gln His Gly Asp Phe Val
 85 90 95

Arg Ser Ala Pro Ile Arg Gln Arg Tyr Trp Ala Arg Asn Phe Val Gly
 100 105 110

Trp Pro Gln Phe Ser Ser His Gln Pro Asn Pro Ala His Trp Ala Leu
 115 120 125

Ser Thr Trp Glu Lys Leu Gly Lys Leu Tyr Trp Leu Val Thr Gln Asn
 130 135 140

Val Asp Ala Leu His Thr Lys Ala Gly Ser Arg Arg Leu Thr Glu Leu
 145 150 155 160

His Gly Cys Met Asp Arg Val Leu Cys Leu Asp Cys Gly Glu Gln Thr
 165 170 175

Pro Arg Gly Val Leu Gln Glu Arg Phe Gln Val Leu Asn Pro Thr Trp
 180 185 190

Ser Ala Glu Ala His Gly Leu Ala Pro Asp Gly Asp Val Phe Leu Ser
 195 200 205

10

ES 2 572 372 T3

Glu Glu Gln Val Arg Ser Phe Gln Val Pro Thr Cys Val Gln Cys Gly
 210 215 220

Gly His Leu Lys Pro Asp Val Val Phe Phe Gly Asp Thr Val Asn Pro
 225 230 235 240

Asp Lys Val Asp Phe Val His Lys Arg Val Lys Glu Ala Asp Ser Leu
 245 250 255

Leu Val Val Gly Ser Ser Leu Gln Val Tyr Ser Gly Tyr Arg Phe Ile
 260 265 270

Leu Thr Ala Trp Glu Lys Lys Leu Pro Ile Ala Ile Leu Asn Ile Gly
 275 280 285

Pro Thr Arg Ser Asp Asp Leu Ala Cys Leu Lys Leu Asn Ser Arg Cys
 290 295 300

Gly Glu Leu Leu Pro Leu Ile Asp Pro Cys
 305 310

5 <210> 11
 <211> 2350
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (219)..(1115)

<400> 11

15 attcgggggc gcgagctgcc ccagtaaatg gaaatgtttt ctaacatata aaaacctaca 60
 gaagaagaaa ataattttct ggatcaaatt agaagtctgt attatattga tgtctccaga 120
 ttcaaatata ttagaaagca gccgtggaga caaccatctt cattttgggc gaaataacta 180
 aagccccgct caagcattag aactacagac aaaccctg atg cga cct ctc cag att 236
 Met Arg Pro Leu Gln Ile
 1 5

gtc cca agt cga ttg att tcc cag cta tat tgt ggc ctg aag cct cca 284
 Val Pro Ser Arg Leu Ile Ser Gln Leu Tyr Cys Gly Leu Lys Pro Pro
 10 15 20

gcg tcc aca cga aac cag att tgc ctg aaa atg gct cgg cca agt tca 332
 Ala Ser Thr Arg Asn Gln Ile Cys Leu Lys Met Ala Arg Pro Ser Ser
 25 30 35

agt atg gca gat ttt cga aag ttt ttt gca aaa gca aag cac ata gtc 380
 Ser Met Ala Asp Phe Arg Lys Phe Phe Ala Lys Ala Lys His Ile Val
 40 45 50

atc atc tca gga gct ggt gtt agt gca gaa agt ggt gtt ccg acc ttc 428
 Ile Ile Ser Gly Ala Gly Val Ser Ala Glu Ser Gly Val Pro Thr Phe
 55 60 65 70

ES 2 572 372 T3

aga gga gct gga ggt tat tgg aga aaa tgg caa gcc cag gac ctg gcg 476
Arg Gly Ala Gly Gly Tyr Trp Arg Lys Trp Gln Ala Gln Asp Leu Ala
75 80 85

act ccc ctg gcc ttt gcc cac aac ccg tcc cgg gtg tgg gag ttc tac 524
Thr Pro Leu Ala Phe Ala His Asn Pro Ser Arg Val Trp Glu Phe Tyr
90 95 100

cac tac cgg cgg gag gtc atg ggg agc aag gag ccc aac gcc ggg cac 572
His Tyr Arg Arg Glu Val Met Gly Ser Lys Glu Pro Asn Ala Gly His
105 110 115

cgc gcc ata gcc gag tgt gag acc cgg ctg gcc aag cag ggc cgg cga 620
Arg Ala Ile Ala Glu Cys Glu Thr Arg Leu Gly Lys Gln Gly Arg Arg
120 125 130

gtc gtg gtc atc acc cag aac atc gat gag ctg cac cgc aag gct ggc 668
Val Val Val Ile Thr Gln Asn Ile Asp Glu Leu His Arg Lys Ala Gly
135 140 145 150

acc aag aac ctt ctg gag atc cat ggt agc tta ttt aaa act cga tgt 716
Thr Lys Asn Leu Leu Glu Ile His Gly Ser Leu Phe Lys Thr Arg Cys
155 160 165

acc tct tgt gga gtt gtg gct gag aat tac aag agt cca att tgt cca 764
Thr Ser Cys Gly Val Val Ala Glu Asn Tyr Lys Ser Pro Ile Cys Pro
170 175 180

gct tta tca gga aaa ggt gct cca gaa cct gga act caa gat gcc agc 812
Ala Leu Ser Gly Lys Gly Ala Pro Glu Pro Gly Thr Gln Asp Ala Ser
185 190 195

atc cca gtt gag aaa ctt ccc cgg tgt gaa gag gca ggc tgc ggg ggc 860
Ile Pro Val Glu Lys Leu Pro Arg Cys Glu Glu Ala Gly Cys Gly Gly
200 205 210

ttg ctg cga cct cac gtc gtg tgg ttt gga gaa aac ctg gat cct gcc 908
Leu Leu Arg Pro His Val Val Trp Phe Gly Glu Asn Leu Asp Pro Ala
215 220 225 230

att ctg gag gag gtt gac aga gag ctc gcc cac tgt gat tta tgt cta 956
Ile Leu Glu Glu Val Asp Arg Glu Leu Ala His Cys Asp Leu Cys Leu
235 240 245

gtg gtg ggc act tcc tct gtg gtg tac cca gca gcc atg ttt gcc ccc 1004
Val Val Gly Thr Ser Ser Val Val Tyr Pro Ala Ala Met Phe Ala Pro
250 255 260

cag gtg gct gcc agg ggc gtg cca gtg gct gaa ttt aac acg gag acc 1052
Gln Val Ala Ala Arg Gly Val Pro Val Ala Glu Phe Asn Thr Glu Thr
265 270 275

acc cca gct acg aac aga ttc agt cat ttg atc tcc atc tca tct cta 1100
Thr Pro Ala Thr Asn Arg Phe Ser His Leu Ile Ser Ile Ser Ser Leu
280 285 290

att att ata aag aat taaaacaagt catcattgta gaaaagcaag aaaatgcaga 1155
Ile Ile Ile Lys Asn
295

ES 2 572 372 T3

tagagaaaaa gaagaaaata aaactggagt atttcacaa cccaagtta gagttggccc 1215
 ccacctcca tgccatggac tgagcagcag gggcccagca tcccttggat atggtggctg 1275
 tgtcttcacg tgaagaaac tgaacttggg ggtttttcct gccagttcag gagagattct 1335
 tggcatgtaa tatatatcac tgcctcaagtc aagcctccta aaaccacaga cctgtttcag 1395
 ctgctacttc agccaaaatt cttcagcttc atattgtctt gaaaacctat gattgtctct 1455
 aacaaacagg ctacttgcta gttagaaatt cttatcaatt tggcaagcta cttatcaacc 1515
 agactgacca caagaactgt catctcatca atgaaggagt aactgatcaa tgaagccagc 1575
 aatgcttttt tcttggcacc atcaaagctg acatttagaa gagatgctgg tgatagtcac 1635
 ctcatcctac tcaatttttc aaaggcagaa accaaccttg gagcaattga gaggactgtt 1695
 taaacacaga gcttaacaat ggcagaattg tatatctcgt gcttaacaga ttttggttga 1755
 actttaccct aggtcagggg tcagcaaact actgcctgtg ggccaaattt gccaccacc 1815
 tgtatctgta aataaggttt cattggaaca cagctgtggc catatgtttg tatattgtgt 1875
 gtggctgctt ttgcattagg atgacagagg tgaatagttg caacagagac tggctggctc 1935
 gcaaagccta aaatatgtcc tgtgtggccc tttacagaaa aagttttcta acccctgctc 1995
 taggttacgg agaaaaaaaa atggaataat gttctctgct acttttaacc tgattttctt 2055
 tgtacctaaa taggcagcta gaatgctgcc tatattttaa taaggatttg gatctcacia 2115
 gacaccttag gcctacacia gttgttcaga ttctttgcc cagttctaac ctagtgacaa 2175
 aggcatagaa ttctcctccc acaggaatgt atttctattt tcaagggtgtt aattagttcc 2235
 agttttgggt ttgtcgtttt ccccatgtcc gatgcttata ttggatgatt tctgataaac 2295
 ctgactattc caataaacc taggcatttt tgaatttaa aaaaaaaaaa aaaaa 2350

210> 12
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

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

15

ES 2 572 372 T3

Ser Gly Val Pro Thr Phe Arg Gly Ala Gly Gly Tyr Trp Arg Lys Trp
65 70 75 80

Gln Ala Gln Asp Leu Ala Thr Pro Leu Ala Phe Ala His Asn Pro Ser
85 90 95

Arg Val Trp Glu Phe Tyr His Tyr Arg Arg Glu Val Met Gly Ser Lys
100 105 110

Glu Pro Asn Ala Gly His Arg Ala Ile Ala Glu Cys Glu Thr Arg Leu
115 120 125

Gly Lys Gln Gly Arg Arg Val Val Ile Thr Gln Asn Ile Asp Glu
130 135 140

Leu His Arg Lys Ala Gly Thr Lys Asn Leu Leu Glu Ile His Gly Ser
145 150 155 160

Leu Phe Lys Thr Arg Cys Thr Ser Cys Gly Val Val Ala Glu Asn Tyr
165 170 175

Lys Ser Pro Ile Cys Pro Ala Leu Ser Gly Lys Gly Ala Pro Glu Pro
180 185 190

Gly Thr Gln Asp Ala Ser Ile Pro Val Glu Lys Leu Pro Arg Cys Glu
195 200 205

Glu Ala Gly Cys Gly Gly Leu Leu Arg Pro His Val Val Trp Phe Gly
210 215 220

Glu Asn Leu Asp Pro Ala Ile Leu Glu Glu Val Asp Arg Glu Leu Ala
225 230 235 240

His Cys Asp Leu Cys Leu Val Val Gly Thr Ser Ser Val Val Tyr Pro
245 250 255

Ala Ala Met Phe Ala Pro Gln Val Ala Ala Arg Gly Val Pro Val Ala
260 265 270

Glu Phe Asn Thr Glu Thr Thr Pro Ala Thr Asn Arg Phe Ser His Leu
275 280 285

Ile Ser Ile Ser Ser Leu Ile Ile Ile Lys Asn
290 295

<210> 13
<211> 1670
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
10 <222> (297)..(1226)

<400> 13

15 ccggagcgcg gtcgggacac agcgcctcta ggagaaagcc tggaaggcgc tccgggggta 60

ES 2 572 372 T3

```

cccagagctc ttagcgggcc ggcagcatgt gcggggccca agtaaattgga aatgttttct 120
aacatataaa aacctacaga agaagaaaat aattttctgg atcaaattag aagtctgtat 180
tatattgatg tctccagatt caaatatatt agaaagcagc cgtggagaca accatcttca 240
ttttgggaga aataactaaa gcccgcctca agcattagaa ctacagacaa acctcg atg 299
Met
1

cga cct ctc cag att gtc cca agt cga ttg att tcc cag cta tat tgt 347
Arg Pro Leu Gln Ile Val Pro Ser Arg Leu Ile Ser Gln Leu Tyr Cys
5 10 15

ggc ctg aag cct cca gcg tcc aca cga aac cag att tgc ctg aaa atg 395
Gly Leu Lys Pro Pro Ala Ser Thr Arg Asn Gln Ile Cys Leu Lys Met
20 25 30

gct cgg cca agt tca agt atg gca gat ttt cga aag ttt ttt gca aaa 443
Ala Arg Pro Ser Ser Ser Met Ala Asp Phe Arg Lys Phe Phe Ala Lys
35 40 45

gca aag cac ata gtc atc atc tca gga gct ggt gtt agt gca gaa agt 491
Ala Lys His Ile Val Ile Ile Ser Gly Ala Gly Val Ser Ala Glu Ser
50 55 60 65

ggg gtt ccg acc ttc aga gga gct gga ggt tat tgg aga aaa tgg caa 539
Gly Val Pro Thr Phe Arg Gly Ala Gly Gly Tyr Trp Arg Lys Trp Gln
70 75 80

gcc cag gac ctg gcg act ccc ctg gcc ttt gcc cac aac ccg tcc cgg 587
Ala Gln Asp Leu Ala Thr Pro Leu Ala Phe Ala His Asn Pro Ser Arg
85 90 95

gtg tgg gag ttc tac cac tac cgg cgg gag gtc atg ggg agc aag gag 635
Val Trp Glu Phe Tyr His Tyr Arg Arg Glu Val Met Gly Ser Lys Glu
100 105 110

ccc aac gcc ggg cac cgc gcc ata gcc gag tgt gag acc ccg ctg ggc 683
Pro Asn Ala Gly His Arg Ala Ile Ala Glu Cys Glu Thr Arg Leu Gly
115 120 125

aag cag ggc cgg cga gtc gtg gtc atc acc cag aac atc gat gag ctg 731
Lys Gln Gly Arg Arg Val Val Val Ile Thr Gln Asn Ile Asp Glu Leu
130 135 140 145

cac cgc aag gct ggc acc aag aac ctt ctg gag atc cat ggt agc tta 779
His Arg Lys Ala Gly Thr Lys Asn Leu Leu Glu Ile His Gly Ser Leu
150 155 160

ttt aaa act cga tgt acc tct tgt gga gtt gtg gct gag aat tac aag 827
Phe Lys Thr Arg Cys Thr Ser Cys Gly Val Val Ala Glu Asn Tyr Lys
165 170 175

agt cca att tgt cca gct tta tca gga aaa ggt gct cca gaa cct gga 875
Ser Pro Ile Cys Pro Ala Leu Ser Gly Lys Gly Ala Pro Glu Pro Gly
180 185 190

```

ES 2 572 372 T3

act caa gat gcc agc atc cca gtt gag aaa ctt ccc cgg tgt gaa gag 923
 Thr Gln Asp Ala Ser Ile Pro Val Glu Lys Leu Pro Arg Cys Glu Glu
 195 200 205

gca ggc tgc ggg ggc ttg ctg cga cct cac gtc gtg tgg ttt gga gaa 971
 Ala Gly Cys Gly Gly Leu Leu Arg Pro His Val Val Trp Phe Gly Glu
 210 215 220 225

aac ctg gat cct gcc att ctg gag gag gtt gac aga gag ctc gcc cac 1019
 Asn Leu Asp Pro Ala Ile Leu Glu Glu Val Asp Arg Glu Leu Ala His
 230 235 240

tgt gat tta tgt cta gtg gtg ggc act tcc tct gtg gtg tac cca gca 1067
 Cys Asp Leu Cys Leu Val Val Gly Thr Ser Ser Val Val Tyr Pro Ala
 245 250 255

gcc atg ttt gcc ccc cag gtg gct gcc agg ggc gtg cca gtg gct gaa 1115
 Ala Met Phe Ala Pro Gln Val Ala Ala Arg Gly Val Pro Val Ala Glu
 260 265 270

ttt aac acg gag acc acc cca gct acg aac aga ttc agg ttt cat ttc 1163
 Phe Asn Thr Glu Thr Thr Pro Ala Thr Asn Arg Phe Arg Phe His Phe
 275 280 285

cag gga ccc tgt gga acg act ctt cct gaa gcc ctt gcc tgt cat gaa 1211
 Gln Gly Pro Cys Gly Thr Thr Leu Pro Glu Ala Leu Ala Cys His Glu
 290 295 300 305

aat gaa act gtt tct taagtgtcct ggggaagaaa gaaattacag tataatctaag 1266
 Asn Glu Thr Val Ser
 310

aactaggcca cacgcagagg agaaatggtc ttatgggtgg tgagctgagt actgaacaat 1326

ctaaaaatag cctctgattc cctcgtgga atccaacctg ttgataagtg atggggggttt 1386

agaagtagca aagagcaccc acattcaaaa gtcacagaac tggaaagtta attcatatta 1446

tttggtttga actgaaacgt gaggtatctt tgatgtgtat ggttggttat tgggagggaa 1506

aaattttgta aattagattg tctaaaaaaaa atagttattc tgattatatt tttgttatct 1566

gggcaaagta gaagtcaagg ggtaaaaacc ctactattct gatttttgca caagttttag 1626

tggaaaataa aatcacactc tacagtaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1670

<210> 14
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

5

10

Met Arg Pro Leu Gln Ile Val Pro Ser Arg Leu Ile Ser Gln Leu Tyr
 1 5 10 15
 Cys Gly Leu Lys Pro Pro Ala Ser Thr Arg Asn Gln Ile Cys Leu Lys
 20 25 30

ES 2 572 372 T3

Met Ala Arg Pro Ser Ser Ser Met Ala Asp Phe Arg Lys Phe Phe Ala
 35 40 45

Lys Ala Lys His Ile Val Ile Ile Ser Gly Ala Gly Val Ser Ala Glu
 50 55 60

Ser Gly Val Pro Thr Phe Arg Gly Ala Gly Tyr Trp Arg Lys Trp
 65 70 75 80

Gln Ala Gln Asp Leu Ala Thr Pro Leu Ala Phe Ala His Asn Pro Ser
 85 90 95

Arg Val Trp Glu Phe Tyr His Tyr Arg Arg Glu Val Met Gly Ser Lys
 100 105 110

Glu Pro Asn Ala Gly His Arg Ala Ile Ala Glu Cys Glu Thr Arg Leu
 115 120 125

Gly Lys Gln Gly Arg Arg Val Val Val Ile Thr Gln Asn Ile Asp Glu
 130 135 140

Leu His Arg Lys Ala Gly Thr Lys Asn Leu Leu Glu Ile His Gly Ser
 145 150 155 160

Leu Phe Lys Thr Arg Cys Thr Ser Cys Gly Val Val Ala Glu Asn Tyr
 165 170 175

Lys Ser Pro Ile Cys Pro Ala Leu Ser Gly Lys Gly Ala Pro Glu Pro
 180 185 190

Gly Thr Gln Asp Ala Ser Ile Pro Val Glu Lys Leu Pro Arg Cys Glu
 195 200 205

Glu Ala Gly Cys Gly Gly Leu Leu Arg Pro His Val Val Trp Phe Gly
 210 215 220

Glu Asn Leu Asp Pro Ala Ile Leu Glu Glu Val Asp Arg Glu Leu Ala
 225 230 235 240

His Cys Asp Leu Cys Leu Val Val Gly Thr Ser Ser Val Val Tyr Pro
 245 250 255

Ala Ala Met Phe Ala Pro Gln Val Ala Ala Arg Gly Val Pro Val Ala
 260 265 270

Glu Phe Asn Thr Glu Thr Thr Pro Ala Thr Asn Arg Phe Arg Phe His
 275 280 285

Phe Gln Gly Pro Cys Gly Thr Thr Leu Pro Glu Ala Leu Ala Cys His
 290 295 300

Glu Asn Glu Thr Val Ser
 305 310

5 <210> 15
 <211> 1638
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> CDS

ES 2 572 372 T3

<222> (61)..(1125)

<400> 15

```

gcttccggcg gaagcggcct caacaagggga aactttattg ttcccgtggg gcagtcgagg 60

atg tcg gtg aat tac gcg gcg ggg ctg tcg ccg tac gcg gac aag ggc 108
Met Ser Val Asn Tyr Ala Ala Gly Leu Ser Pro Tyr Ala Asp Lys Gly
  1                    5                    10                    15

aag tgc ggc ctc ccg gag atc ttc gac ccc ccg gag gag ctg gag cgg 156
Lys Cys Gly Leu Pro Glu Ile Phe Asp Pro Pro Glu Glu Leu Glu Arg
                20                    25                    30

aag gtg tgg gaa ctg gcg agg ctg gtc tgg cag tct tcc agt gtg gtg 204
Lys Val Trp Glu Leu Ala Arg Leu Val Trp Gln Ser Ser Ser Val Val
                35                    40                    45

ttc cac acg ggt gcc ggc atc agc act gcc tct ggc atc ccc gac ttc 252
Phe His Thr Gly Ala Gly Ile Ser Thr Ala Ser Gly Ile Pro Asp Phe
                50                    55                    60

agg ggt ccc cac gga gtc tgg acc atg gag gag cga ggt ctg gcc ccc 300
Arg Gly Pro His Gly Val Trp Thr Met Glu Glu Arg Gly Leu Ala Pro
  65                    70                    75                    80

aag ttc gac acc acc ttt gag agc gcg cgg ccc acg cag acc cac atg 348
Lys Phe Asp Thr Thr Phe Glu Ser Ala Arg Pro Thr Gln Thr His Met
                85                    90                    95

gcg ctg gtg cag ctg gag cgc gtg ggc ctc ctc cgc ttc ctg gtc agc 396
Ala Leu Val Gln Leu Glu Arg Val Gly Leu Leu Arg Phe Leu Val Ser
                100                    105                    110

cag aac gtg gac ggg ctc cat gtg cgc tca ggc ttc ccc agg gac aaa 444
Gln Asn Val Asp Gly Leu His Val Arg Ser Gly Phe Pro Arg Asp Lys
                115                    120                    125

ctg gca gag ctc cac ggg aac atg ttt gtg gaa gaa tgt gcc aag tgt 492
Leu Ala Glu Leu His Gly Asn Met Phe Val Glu Glu Cys Ala Lys Cys
                130                    135                    140

aag acg cag tac gtc cga gac aca gtc gtg ggc acc atg ggc ctg aag 540
Lys Thr Gln Tyr Val Arg Asp Thr Val Val Gly Thr Met Gly Leu Lys
  145                    150                    155                    160

gcc acg ggc cgg ctc tgc acc gtg gct aag gca agg ggg ctg cga gcc 588
Ala Thr Gly Arg Leu Cys Thr Val Ala Lys Ala Arg Gly Leu Arg Ala
                165                    170                    175

tgc agg gga gag ctg agg gac acc atc cta gac tgg gag gac tcc ctg 636
Cys Arg Gly Glu Leu Arg Asp Thr Ile Leu Asp Trp Glu Asp Ser Leu
                180                    185                    190

ccc gac cgg gac ctg gca ctc gcc gat gag gcc agc agg aac gcc gac 684
Pro Asp Arg Asp Leu Ala Leu Ala Asp Glu Ala Ser Arg Asn Ala Asp
                195                    200                    205

```

ES 2 572 372 T3

ctg tcc atc acg ctg ggt aca tcg ctg cag atc cgg ccc agc ggg aac 732
 Leu Ser Ile Thr Leu Gly Thr Ser Leu Gln Ile Arg Pro Ser Gly Asn
 210 215 220

 ctg ccg ctg gct acc aag cgc cgg gga ggc cgc ctg gtc atc gtc aac 780
 Leu Pro Leu Ala Thr Lys Arg Arg Gly Gly Arg Leu Val Ile Val Asn
 225 230 235 240

 ctg cag ccc acc aag cac gac cgc cat gct gac ctc cgc atc cat ggc 828
 Leu Gln Pro Thr Lys His Asp Arg His Ala Asp Leu Arg Ile His Gly
 245 250 255

 tac gtt gac gag gtc atg acc cgg ctc atg gag cac ctg ggg ctg gag 876
 Tyr Val Asp Glu Val Met Thr Arg Leu Met Glu His Leu Gly Leu Glu
 260 265 270

 atc ccc gcc tgg gac ggc ccc cgt gtg ctg gag agg gcg ctg cca ccc 924
 Ile Pro Ala Trp Asp Gly Pro Arg Val Leu Glu Arg Ala Leu Pro Pro
 275 280 285

 ctg ccc cgc ccg ccc acc ccc aag ctg gag ccc aag gag gaa tct ccc 972
 Leu Pro Arg Pro Pro Thr Pro Lys Leu Glu Pro Lys Glu Glu Ser Pro
 290 295 300

 acc cgg atc aac ggc tct atc ccc gcc ggc ccc aag cag gag ccc tgc 1020
 Thr Arg Ile Asn Gly Ser Ile Pro Ala Gly Pro Lys Gln Glu Pro Cys
 305 310 315 320

 gcc cag cac aac ggc tca gag ccc gcc agc ccc aaa cgg gag cgg ccc 1068
 Ala Gln His Asn Gly Ser Glu Pro Ala Ser Pro Lys Arg Glu Arg Pro
 325 330 335

 acc agc cct gcc ccc cac aga ccc ccc aaa agg gtg aag gcc aag gcg 1116
 Thr Ser Pro Ala Pro His Arg Pro Pro Lys Arg Val Lys Ala Lys Ala
 340 345 350

 gtc ccc agc tgaccagggt gcttggggag ggtggggcctt tttgtagaaa 1165
 Val Pro Ser
 355

 ctgtggattc tttttctctc gtggtctcac tttgttactt gtttctgtcc ccgggagcct 1225
 cagggctctg agagctgtgc tccaggccag gggttacacc tgccctccgt ggccctccc 1285
 tgggctccag gggcctctgg tgcggttccg ggaagaagcc acacccaga ggtgacagct 1345
 gagccccctgc cacaccccag cctctgactt gctgtgttgt ccagaggtga ggctgggccc 1405
 tccttggtct ccagcttaaa caggagttaa ctcctctgt cccagggcc tccttctg 1465
 gccccctaca gccacccta ccctcctcc atgggcccctg caggagggga gaccacctt 1525
 gaagtggggg atcagtagag gcttgcactg cctttggggc tggagggaga cgtgggtcca 1585
 ccaggcttct ggaaaagtcc tcaatgcaat aaaaacaatt tcttcttgc aaa 1638

<210> 16
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

ES 2 572 372 T3

<400> 16

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

ES 2 572 372 T3

Leu Pro Arg Pro Pro Thr Pro Lys Leu Glu Pro Lys Glu Glu Ser Pro
 290 295 300

Thr Arg Ile Asn Gly Ser Ile Pro Ala Gly Pro Lys Gln Glu Pro Cys
 305 310 315 320

Ala Gln His Asn Gly Ser Glu Pro Ala Ser Pro Lys Arg Glu Arg Pro
 325 330 335

Thr Ser Pro Ala Pro His Arg Pro Pro Lys Arg Val Lys Ala Lys Ala
 340 345 350

Val Pro Ser
 355

5 <210> 17
 <211> 1718
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (34)..(1233)

<400> 17

gcggaagcgg aagagcaggt ctccagggga gcg atg gca gcc ggg ggt ctg agc 54
 Met Ala Ala Gly Gly Leu Ser
 1 5

cgc tcc gag cgc aaa gcg gcg gag cgg gtc cgg agg ttg cgg gag gag 102
 Arg Ser Glu Arg Lys Ala Ala Glu Arg Val Arg Arg Leu Arg Glu Glu
 10 15 20

cag cag agg gag cgc ctc cgc cag gtg tcg cgc atc ctg agg aag gcg 150
 Gln Gln Arg Glu Arg Leu Arg Gln Val Ser Arg Ile Leu Arg Lys Ala
 25 30 35

gcg gcg gag cgc agc gcc gag gag ggc cgg ctg ctg gcc gag agc gcg 198
 Ala Ala Glu Arg Ser Ala Glu Glu Gly Arg Leu Leu Ala Glu Ser Ala
 40 45 50 55

gac ctg gta acg gag ctg cag ggc cgg agc cgg cgg cgc gag ggc ctg 246
 Asp Leu Val Thr Glu Leu Gln Gly Arg Ser Arg Arg Arg Glu Gly Leu
 60 65 70

aag cgg cgg cag gag gag gtg tgc gac gac ccg gag gag ctg cgg ggg 294
 Lys Arg Arg Gln Glu Glu Val Cys Asp Asp Pro Glu Glu Leu Arg Gly
 75 80 85

aag gtc cgg gag ctg gcc agc gcc gtc cgg aac gcc aaa tac ttg gtc 342
 Lys Val Arg Glu Leu Ala Ser Ala Val Arg Asn Ala Lys Tyr Leu Val
 90 95 100

gtc tac aca ggc gcg gga atc agc acg gca gcg tct atc cca gac tac 390
 Val Tyr Thr Gly Ala Gly Ile Ser Thr Ala Ala Ser Ile Pro Asp Tyr
 105 110 115

15

ES 2 572 372 T3

cgg ggc cct aat gga gtg tgg aca ctg ctt cag aaa ggg aga agc gtt Arg Gly Pro Asn Gly Val Trp Thr Leu Leu Gln Lys Gly Arg Ser Val 120 125 130 135	438
agt gct gcc gac ctg agc gag gcc gag cca acc ctc acc cac atg agc Ser Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ala Glu Pro Thr Leu Thr His Met Ser 140 145 150	486
atc acc cgt ctg cat gag cag aag ctg gtg cag cat gtg gtg tct cag Ile Thr Arg Leu His Glu Gln Lys Leu Val Gln His Val Val Ser Gln 155 160 165	534
aac tgt gac ggg ctc cac ctg agg agt ggg ctg ccg cgc acg gcc atc Asn Cys Asp Gly Leu His Leu Arg Ser Gly Leu Pro Arg Thr Ala Ile 170 175 180	582
tcc gag ctc cac ggg aac atg tac att gaa gtc tgt acc tcc tgc gtt Ser Glu Leu His Gly Asn Met Tyr Ile Glu Val Cys Thr Ser Cys Val 185 190 195	630
ccc aac agg gag tac gtg cgg gtg ttc gat gtg acg gag cgc act gcc Pro Asn Arg Glu Tyr Val Arg Val Phe Asp Val Thr Glu Arg Thr Ala 200 205 210 215	678
ctc cac aga cac cag aca ggc cgg acc tgc cac aag tgt ggg acc cag Leu His Arg His Gln Thr Gly Arg Thr Cys His Lys Cys Gly Thr Gln 220 225 230	726
ctg cgg gac acc att gtg cac ttt ggg gag agg ggg acg ttg ggg cag Leu Arg Asp Thr Ile Val His Phe Gly Glu Arg Gly Thr Leu Gly Gln 235 240 245	774
cct ctg aac tgg gaa gcg gcg acc gag gct gcc agc aga gca gac acc Pro Leu Asn Trp Glu Ala Ala Thr Glu Ala Ala Ser Arg Ala Asp Thr 250 255 260	822
atc ctg tgt cta ggg tcc agc ctg aag gtt cta aag aag tac cca cgc Ile Leu Cys Leu Gly Ser Ser Leu Lys Val Leu Lys Lys Tyr Pro Arg 265 270 275	870
ctc tgg tgc atg acc aag ccc cct agc cgg cgg ccg aag ctt tac atc Leu Trp Cys Met Thr Lys Pro Pro Ser Arg Arg Pro Lys Leu Tyr Ile 280 285 290 295	918
gtg aac ctg cag tgg acc ccg aag gat gac tgg gct gcc ctg aag cta Val Asn Leu Gln Trp Thr Pro Lys Asp Asp Trp Ala Ala Leu Lys Leu 300 305 310	966
cat ggg aag tgt gat gac gtc atg cgg ctc ctc atg gcc gag ctg ggc His Gly Lys Cys Asp Asp Val Met Arg Leu Leu Met Ala Glu Leu Gly 315 320 325	1014
ttg gag atc ccc gcc tat agc agg tgg cag gat ccc att ttc tca ctg Leu Glu Ile Pro Ala Tyr Ser Arg Trp Gln Asp Pro Ile Phe Ser Leu 330 335 340	1062
gcg act ccc ctg cgt gct ggt gaa gaa ggc agc cac agt cgg aag tcg Ala Thr Pro Leu Arg Ala Gly Glu Glu Gly Ser His Ser Arg Lys Ser 345 350 355	1110

ES 2 572 372 T3

```

ctg tgc aga agc aga gag gag gcc ccg cct ggg gac cgg ggt gca ccg 1158
Leu Cys Arg Ser Arg Glu Glu Ala Pro Pro Gly Asp Arg Gly Ala Pro
360                365                370                375

ctt agc tgc gcc ccc atc cta ggg ggc tgg ttt ggc agg ggc tgc aca 1206
Leu Ser Ser Ala Pro Ile Leu Gly Gly Trp Phe Gly Arg Gly Cys Thr
                380                385                390

aaa cgc aca aaa agg aag aaa gtg acg taatcacgtg ctcgatgaag 1253
Lys Arg Thr Lys Arg Lys Lys Val Thr
                395                400

aacagttggc actttgcaga tggccagtgt cacgggtgaag gctggggttc ccccacgggt 1313
ctagggagaa cgaactcttt ggggatgaca ttttcaccgt gacattttta gccatttgtc 1373
cttgaggaag ccccttgca c tgcctgcggt gtaccctgat acggcctggc catcgaggac 1433
acctgccccat ccggcctctg tgtcaagagg tggcagccgc acctttctgt gagaacggaa 1493
ctcgggttat ttcagccccg gcctgcagag tgggaagcgc cagcggcctt tcctcgetca 1553
ccaggccagt ctcagggcct cacctatctt ctactactac ttaatgaaaa agtggtgaact 1613
ttatagaatc ctctctgtac tggatgtgcg gcagaggggt ggctccgagc ctcggtctta 1673
tgcagacctt tttatttcta ttaaactgtt ctgcactggc aaaaa 1718

```

5 <210> 18
 <211> 400
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 18

```

Met Ala Ala Gly Gly Leu Ser Arg Ser Glu Arg Lys Ala Ala Glu Arg
 1                5                10                15

Val Arg Arg Leu Arg Glu Glu Gln Gln Arg Glu Arg Leu Arg Gln Val
                20                25                30

Ser Arg Ile Leu Arg Lys Ala Ala Ala Glu Arg Ser Ala Glu Glu Gly
 35                40                45

Arg Leu Leu Ala Glu Ser Ala Asp Leu Val Thr Glu Leu Gln Gly Arg
 50                55                60

Ser Arg Arg Arg Glu Gly Leu Lys Arg Arg Gln Glu Glu Val Cys Asp
 65                70                75                80

Asp Pro Glu Glu Leu Arg Gly Lys Val Arg Glu Leu Ala Ser Ala Val
                85                90                95

Arg Asn Ala Lys Tyr Leu Val Val Tyr Thr Gly Ala Gly Ile Ser Thr
 100                105                110

Ala Ala Ser Ile Pro Asp Tyr Arg Gly Pro Asn Gly Val Trp Thr Leu
 115                120                125

```

ES 2 572 372 T3

Leu Gln Lys Gly Arg Ser Val Ser Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ala Glu
 130 135 140
 Pro Thr Leu Thr His Met Ser Ile Thr Arg Leu His Glu Gln Lys Leu
 145 150 155 160
 Val Gln His Val Val Ser Gln Asn Cys Asp Gly Leu His Leu Arg Ser
 165 170 175
 Gly Leu Pro Arg Thr Ala Ile Ser Glu Leu His Gly Asn Met Tyr Ile
 180 185 190
 Glu Val Cys Thr Ser Cys Val Pro Asn Arg Glu Tyr Val Arg Val Phe
 195 200 205
 Asp Val Thr Glu Arg Thr Ala Leu His Arg His Gln Thr Gly Arg Thr
 210 215 220
 Cys His Lys Cys Gly Thr Gln Leu Arg Asp Thr Ile Val His Phe Gly
 225 230 235 240
 Glu Arg Gly Thr Leu Gly Gln Pro Leu Asn Trp Glu Ala Ala Thr Glu
 245 250 255
 Ala Ala Ser Arg Ala Asp Thr Ile Leu Cys Leu Gly Ser Ser Leu Lys
 260 265 270
 Val Leu Lys Lys Tyr Pro Arg Leu Trp Cys Met Thr Lys Pro Pro Ser
 275 280 285
 Arg Arg Pro Lys Leu Tyr Ile Val Asn Leu Gln Trp Thr Pro Lys Asp
 290 295 300
 Asp Trp Ala Ala Leu Lys Leu His Gly Lys Cys Asp Asp Val Met Arg
 305 310 315 320
 Leu Leu Met Ala Glu Leu Gly Leu Glu Ile Pro Ala Tyr Ser Arg Trp
 325 330 335
 Gln Asp Pro Ile Phe Ser Leu Ala Thr Pro Leu Arg Ala Gly Glu Glu
 340 345 350
 Gly Ser His Ser Arg Lys Ser Leu Cys Arg Ser Arg Glu Glu Ala Pro
 355 360 365
 Pro Gly Asp Arg Gly Ala Pro Leu Ser Ser Ala Pro Ile Leu Gly Gly
 370 375 380
 Trp Phe Gly Arg Gly Cys Thr Lys Arg Thr Lys Arg Lys Lys Val Thr
 385 390 395 400

<210> 19
 <211> 6
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (1)
 <223> Lys(Ac)

ES 2 572 372 T3

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)
<223> Lys(Ac)
5
<400> 19

Lys Gln Thr Ala Arg Lys
1 5

10
<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> Lys(Ac)

20
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)
<223> Lys(Ac)

25
<400> 20

Lys Ser Thr Gly Gly Lys
1 5

30
<210> 21
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> Lys(Ac)

40
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)
<223> Ser(PO3)

45
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)
<223> Lys(Ac)

50
<400> 21

Lys Ser Thr Gly Gly Lys
1 5

55
<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 572 372 T3

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> Lys(Ac)
5

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)
<223> Lys(Ac)
10

<400> 22

Lys Ala Pro Arg Lys
1 5

15 <210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (5)
<223> Lys(Ac)

25 <400> 23

Ser Gly Arg Gly Lys
1 5

30 <210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <220>
<221> MOD_RES
<222> (5)
<223> Lys(Ac)

40 <400> 24

Lys Gly Gly Ala Lys
1 5

45 <210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

50 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> Lys(Ac)

55 <220>
<221> MOD_RES
<222> (5)
<223> Lys(Ac)

ES 2 572 372 T3

<400> 25

Lys Gly Gly Ala Lys
1 5

5 <210> 26
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)
<223> Lys(Ac)

15 <400> 26

Gln Pro Lys Lys
1

20 <210> 27
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> Lys(Ac)

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)
<223> Lys(Ac)

35 <400> 27

Lys Ser Lys Lys
1

40 <210> 28
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)
<223> Lys(Ac)

50 <400> 28

Arg His Lys Lys
1

55 <210> 29
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

ES 2 572 372 T3

<221> MOD_RES
 <222> (3)
 <223> Lys(Ac)

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)
 <223> Lys(Ac)

10 <400> 29

Arg His Lys Lys
 1

15 <210> 30
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

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

20

25

30

35

ES 2 572 372 T3

Tyr Thr Gln Asn Ile Asp Thr Leu Glu Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gln
 145 150 155 160

Glu Asp Leu Val Glu Ala His Gly Thr Phe Tyr Thr Ser His Cys Val
 165 170 175

Ser Ala Ser Cys Arg His Glu Tyr Pro Leu Ser Trp Met Lys Glu Lys
 180 185 190

Ile Phe Ser Glu Val Thr Leu Lys Cys Glu Asp Cys Gln Ser Leu Val
 195 200 205

Lys Pro Asp Ile Val Phe Phe Gly Glu Ser Leu Pro Ala Arg Phe Phe
 210 215 220

Ser Cys Met Gln Ser Asp Phe Leu Lys Val Asp Leu Leu Leu Val Met
 225 230 235 240

Gly Thr Ser Leu Gln Val Gln Pro Phe Ala Ser Leu Ile Ser Lys Ala
 245 250 255

Pro Leu Ser Thr Pro Arg Leu Leu Ile Asn Lys Glu Lys Ala Gly Gln
 260 265 270

Ser Asp Pro Phe Leu Gly Met Ile Met Gly Leu Gly Gly Gly Met Asp
 275 280 285

Phe Asp Ser Lys Lys Ala Tyr Arg Asp Val Ala Trp Leu Gly Glu Cys
 290 295 300

Asp Gln Gly Cys Leu Ala Leu Ala Glu Leu Leu Gly Trp Lys Lys Glu
 305 310 315 320

Leu Glu Asp Leu Val Arg Arg Glu His Ala Ser Ile Asp Ala Gln Ser
 325 330 335

Gly Ala Gly Val Pro Asn Pro Ser Thr Ser Ala Ser Pro Lys Lys Ser
 340 345 350

Pro Pro Pro Ala Lys Asp Glu Ala Arg Thr Thr Glu Arg Glu Lys Pro
 355 360 365

Gln

<210> 31

<211> 562

<212> PRT

5 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 31

Met Thr Ile Pro His Met Lys Tyr Ala Val Ser Lys Thr Ser Glu Asn
 1 5 10 15

Lys Val Ser Asn Thr Val Ser Pro Thr Gln Asp Lys Asp Ala Ile Arg
 20 25 30

10

15

ES 2 572 372 T3

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

ES 2 572 372 T3

Ala Gly Ile Ser Thr Asp Lys Leu Val Gln Cys His Gly Ser Phe Ala
 355 360 365

Thr Ala Thr Cys Val Thr Cys His Trp Asn Leu Pro Gly Glu Arg Ile
 370 375 380

Phe Asn Lys Ile Arg Asn Leu Glu Leu Pro Leu Cys Pro Tyr Cys Tyr
 385 390 395 400

Lys Lys Arg Arg Glu Tyr Phe Pro Glu Gly Tyr Asn Asn Lys Val Gly
 405 410 415

Val Ala Ala Ser Gln Gly Ser Met Ser Glu Arg Pro Pro Tyr Ile Leu
 420 425 430

Asn Ser Tyr Gly Val Leu Lys Pro Asp Ile Thr Phe Phe Gly Glu Ala
 435 440 445

Leu Pro Asn Lys Phe His Lys Ser Ile Arg Glu Asp Ile Leu Glu Cys
 450 455 460

Asp Leu Leu Ile Cys Ile Gly Thr Ser Leu Lys Val Ala Pro Val Ser
 465 470 475 480

Glu Ile Val Asn Met Val Pro Ser His Val Pro Gln Val Leu Ile Asn
 485 490 495

Arg Asp Pro Val Lys His Ala Glu Phe Asp Leu Ser Leu Leu Gly Tyr
 500 505 510

Cys Asp Asp Ile Ala Ala Met Val Ala Gln Lys Cys Gly Trp Thr Ile
 515 520 525

Pro His Lys Lys Trp Asn Asp Leu Lys Asn Lys Asn Phe Lys Cys Gln
 530 535 540

Glu Lys Asp Lys Gly Val Tyr Val Val Thr Ser Asp Glu His Pro Lys
 545 550 555 560

Thr Leu

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si un sujeto tiene una enfermedad neurodegenerativa, que comprende: determinar el nivel o actividad de una proteína sirtuína en una muestra biológica obtenida de un sujeto, en el que un nivel o una actividad elevados de la proteína sirtuína en la muestra biológica del sujeto con relación a un nivel control indica que el sujeto tiene una enfermedad neurodegenerativa, en el que la proteína sirtuína es SIRT1.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es una muestra celular.
3. El método de la reivindicación 2, en el que la muestra celular es una muestra de cerebro.
4. El método de la reivindicación 2, en el que la muestra celular es una muestra de sangre.
5. El método de la reivindicación 2, en el que la muestra celular es una muestra de la médula espinal.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el nivel de la proteína sirtuína en la muestra biológica se determina utilizando un anticuerpo.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la actividad de la proteína sirtuína en la muestra biológica se mide determinando la actividad de desacetilación de la proteína sirtuína.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el nivel de control corresponde al nivel o actividad de una proteína sirtuína en una muestra biológica de un individuo que no tiene una enfermedad neurodegenerativa.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el nivel de control corresponde a la media del nivel o actividad de una proteína sirtuína en muestras biológicas de 2 o más individuos que no tienen una enfermedad neurodegenerativa.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el nivel o actividad de la proteína sirtuína se determina una vez.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el nivel o actividad de la proteína sirtuína se determina más de una vez.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), una encefalopatía espongiiforme, demencia (incluyendo enfermedad del cuerpo de Lewy, discapacidad cognitiva leve (MCI), demencia degenerativa senil primaria, demencia senil de tipo Alzheimer y demencia de tipo Alzheimer), trastornos parkinsonianos (incluyendo enfermedad de Parkinson, enfermedad del cuerpo de Lewy y parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva (también conocida como síndrome o enfermedad Steele-Richardson-Olszewski, oftalmoplegia supranuclear progresiva), enfermedad de Pick y degeneración corticobasal.
13. El método de la reivindicación 12, en el que la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer.
14. El método de la reivindicación 12, en el que la enfermedad neurodegenerativa es esclerosis lateral amiotrófica (ALS).
15. El método de la reivindicación 11, en el que un cambio en el nivel de proteína o actividad de la proteína sirtuína dentro de dos muestras indica que la enfermedad neurodegenerativa está progresando en el sujeto.

Fig. 1

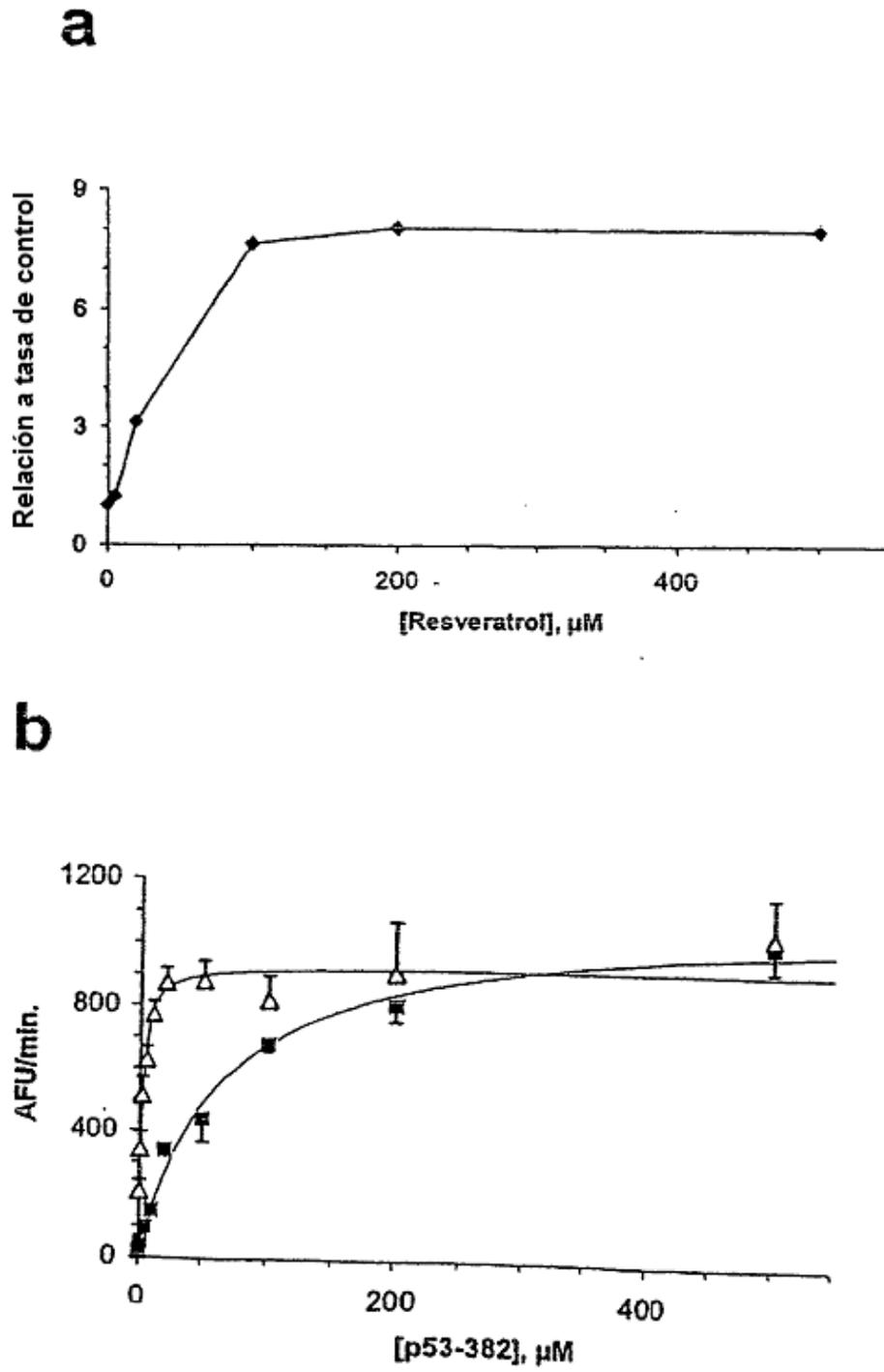


Fig. 1

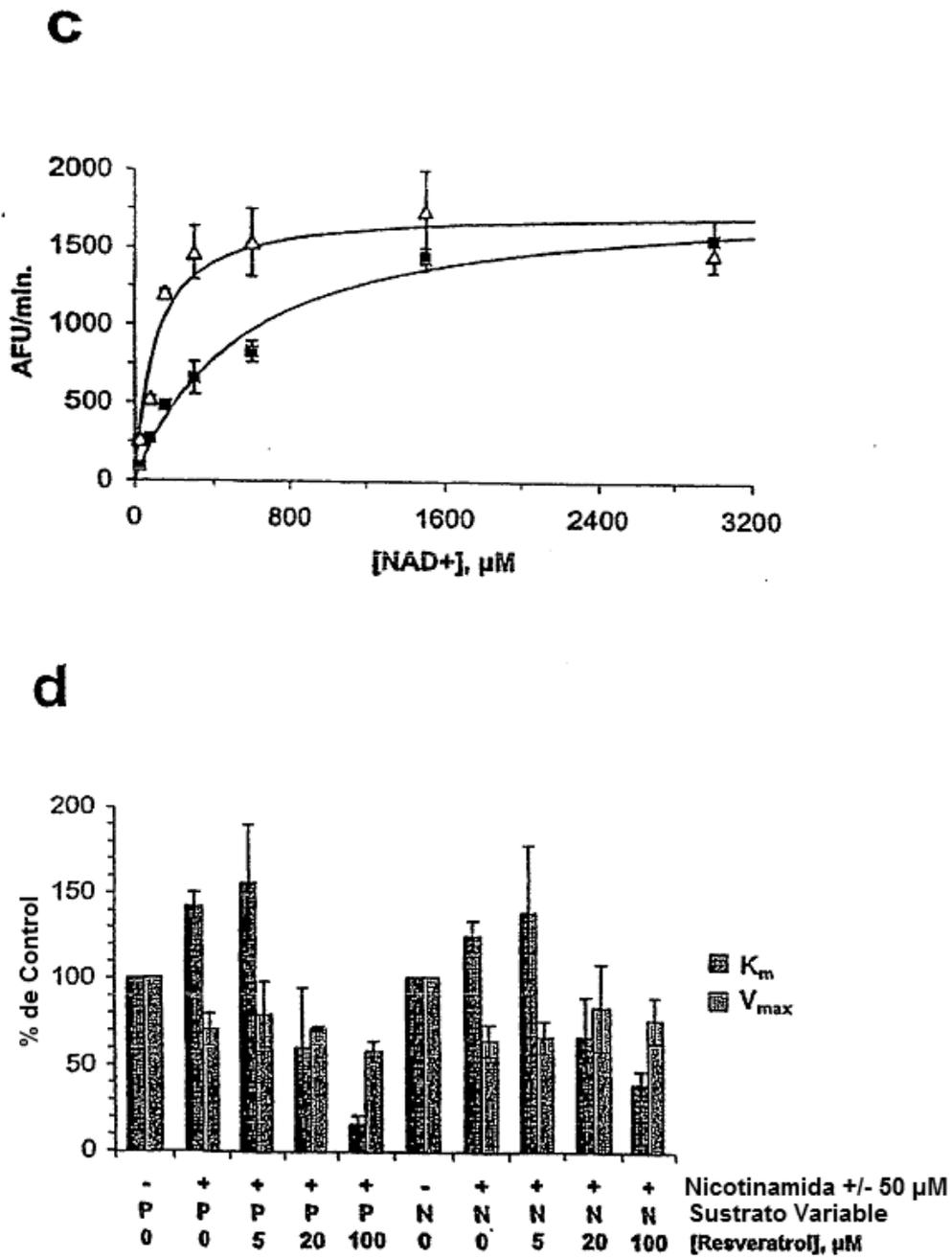


Figura 2

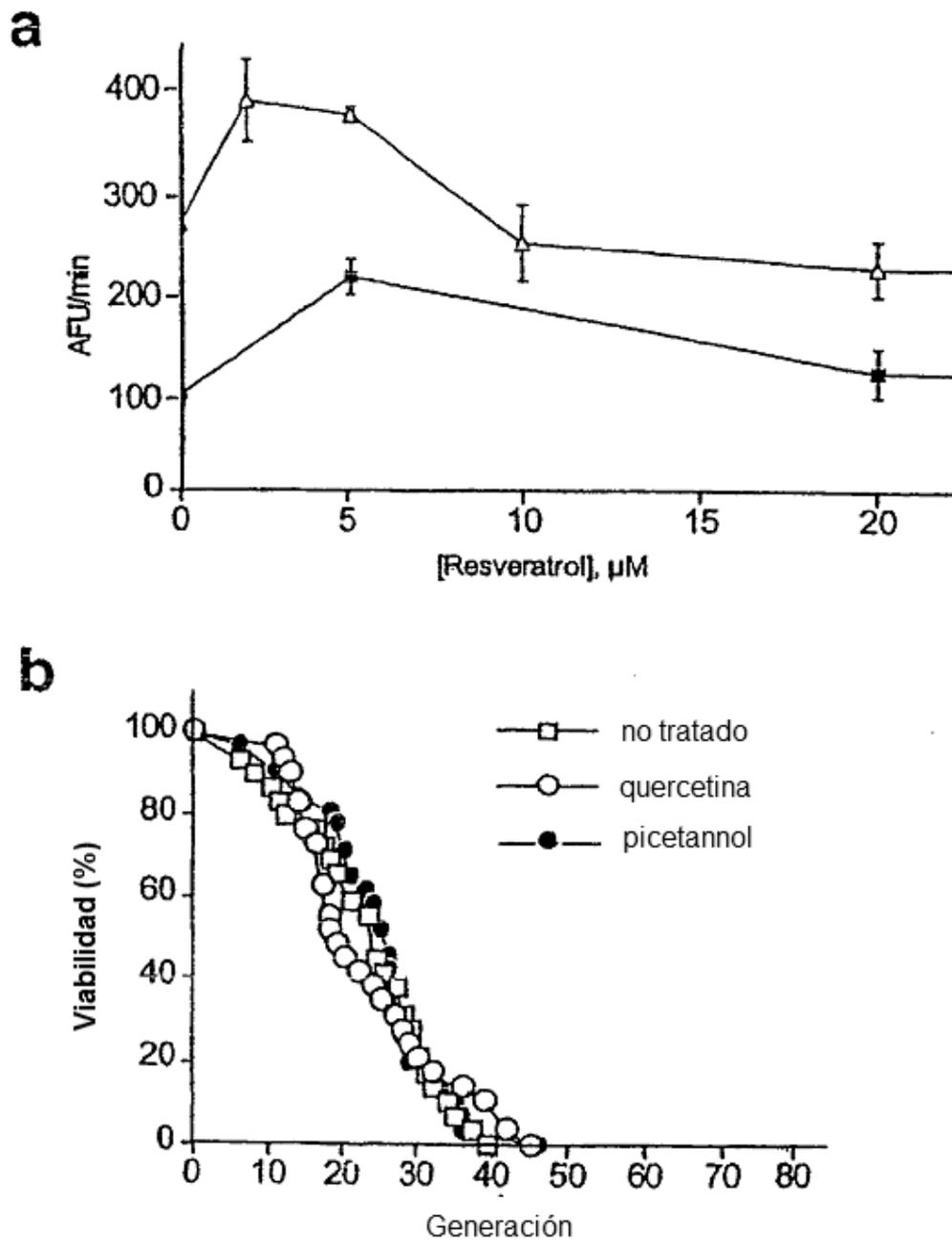


Figura 2

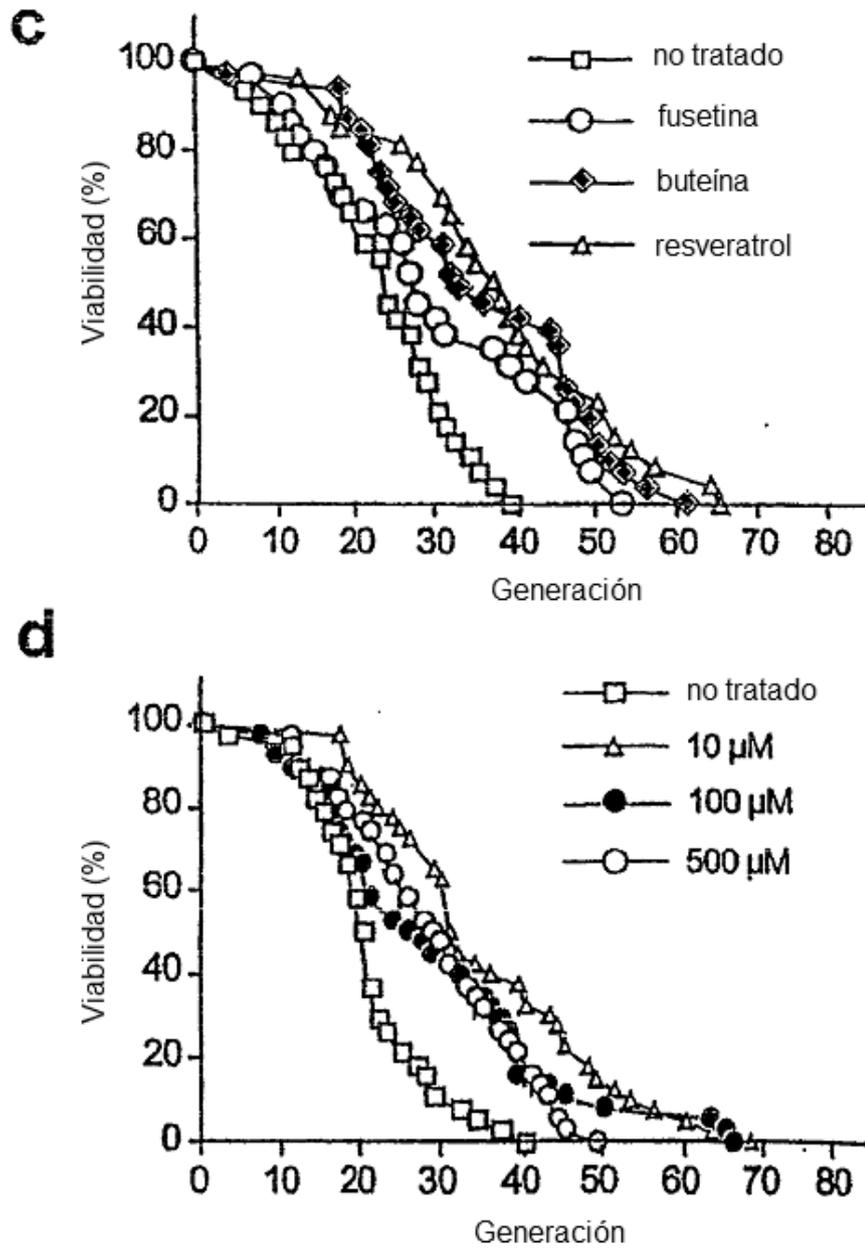


Figura 3

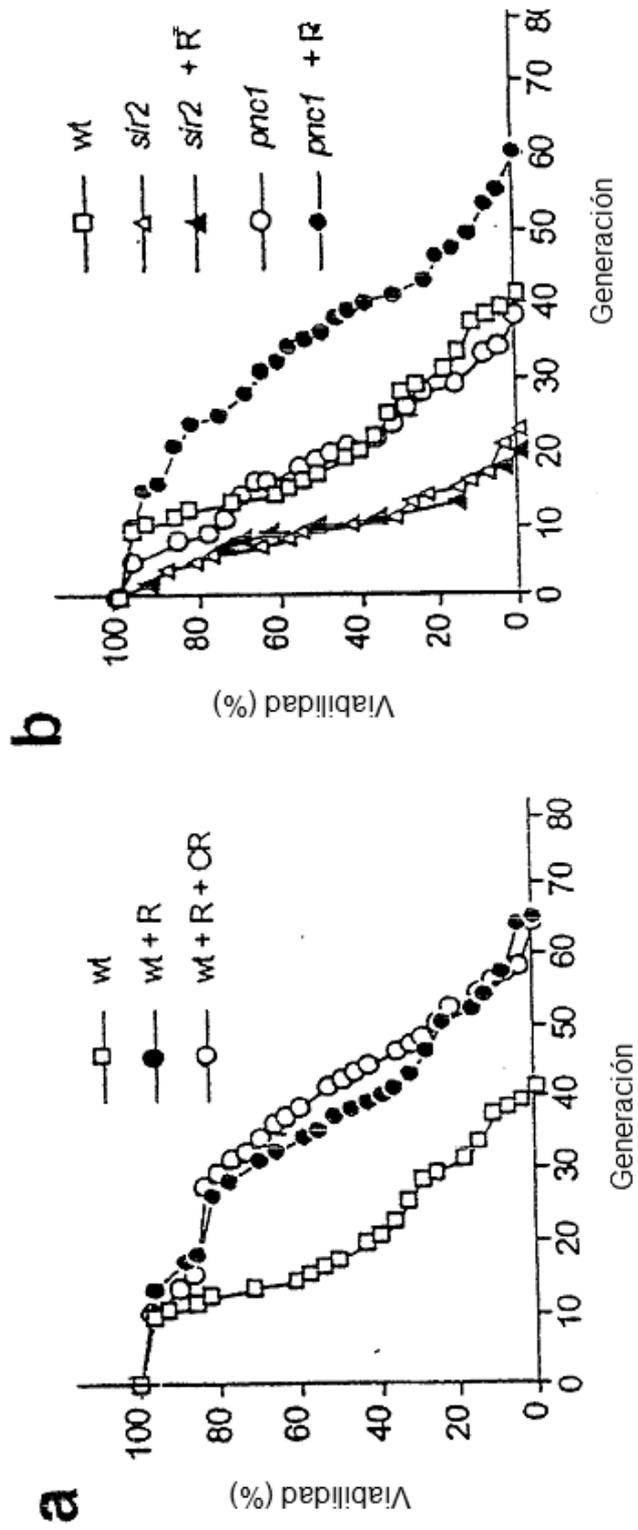


Figura 3

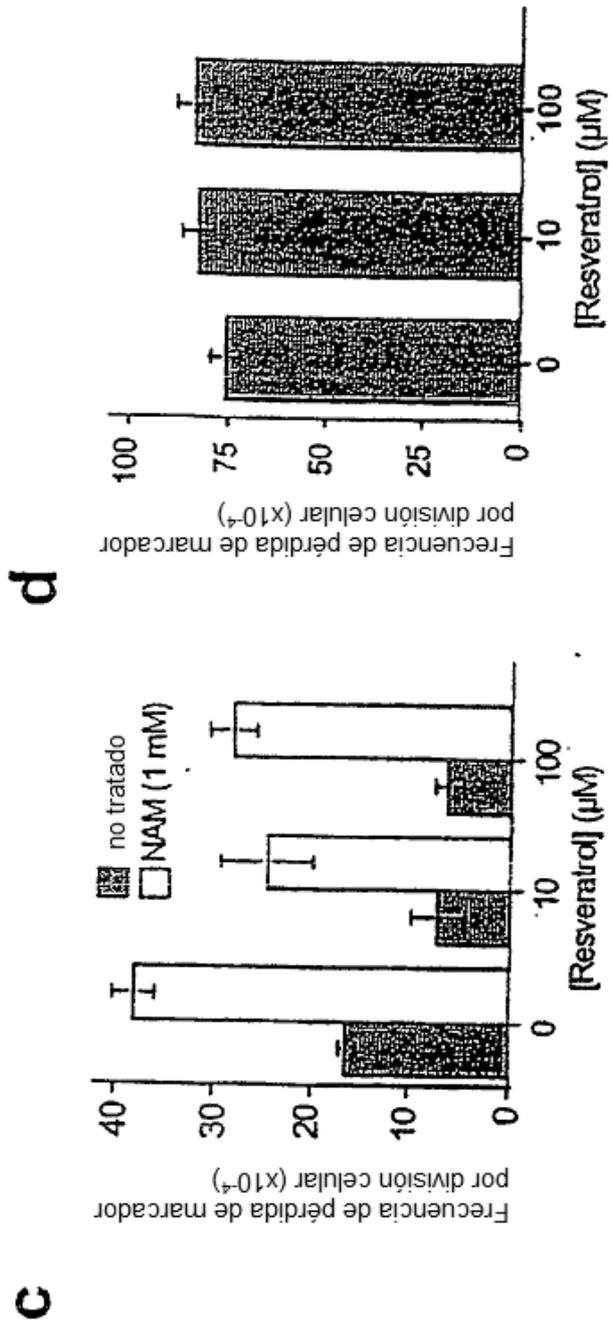


Figura 3

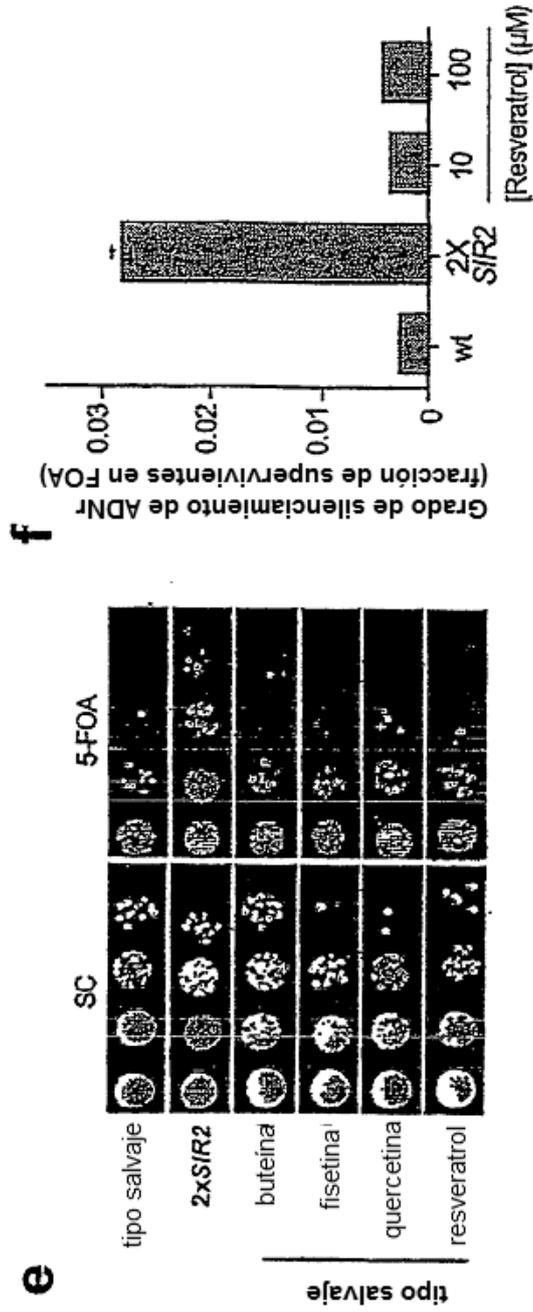


Figura 4

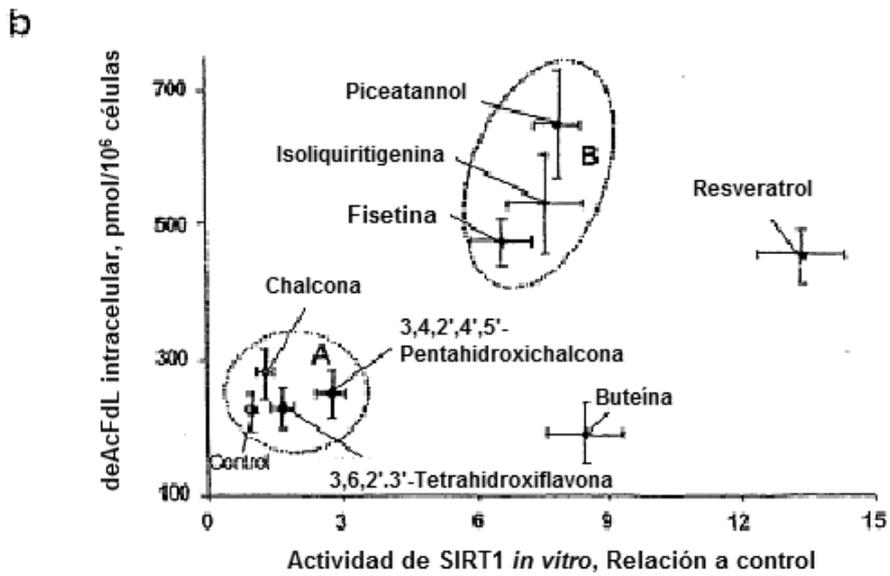
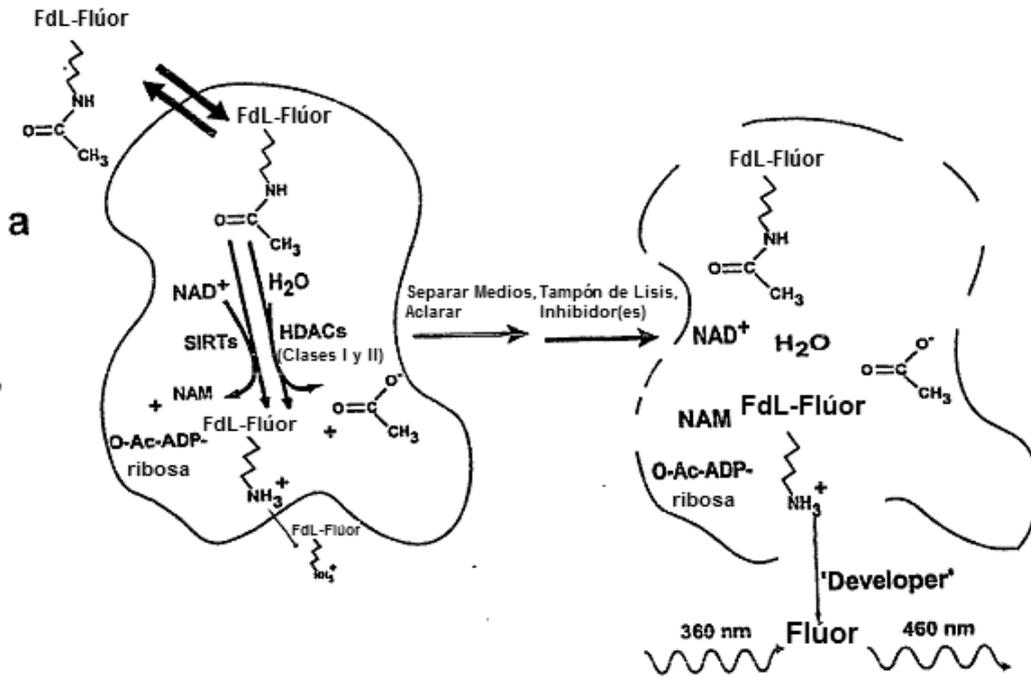


Figura 4

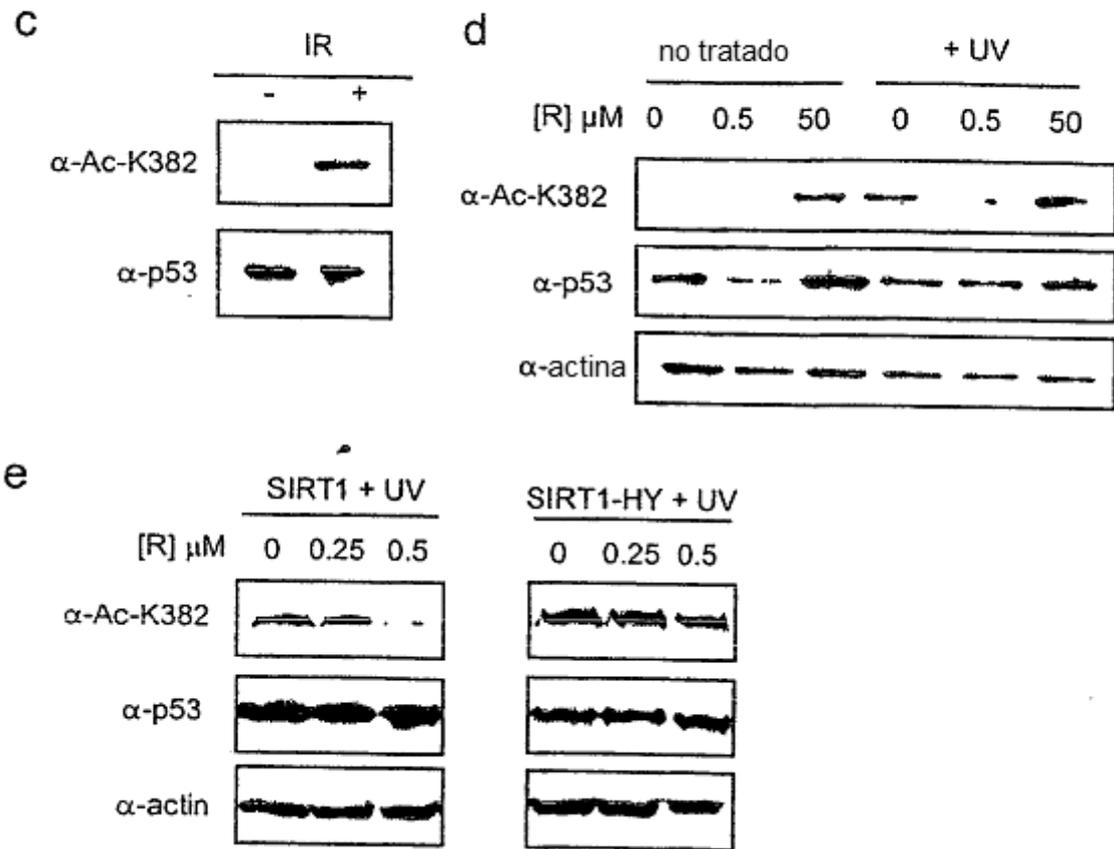


Figura 5

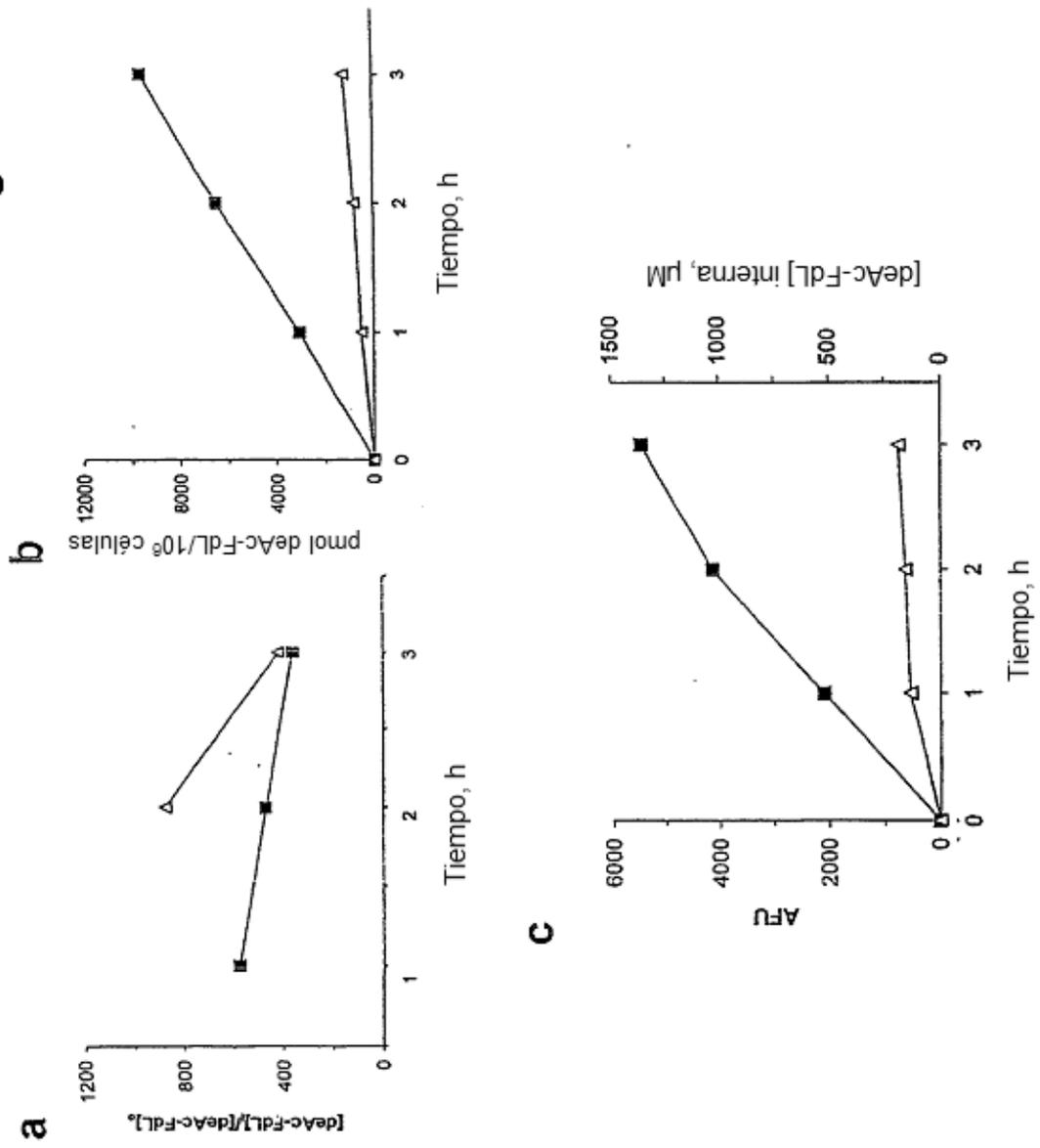
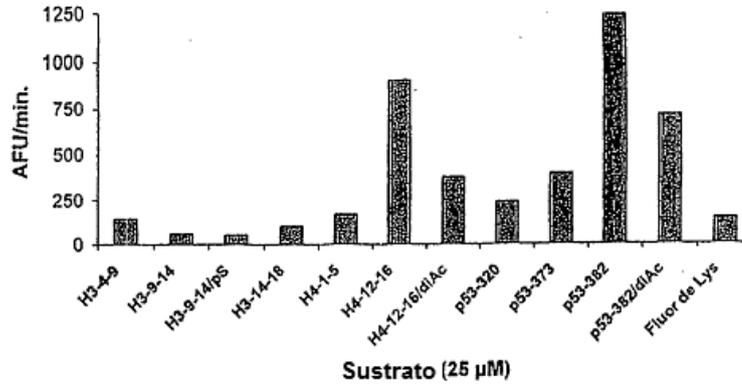


Figura 6



Nombre del Sustrato	Secuencia
Fuente de Secuencia - Residuo n° (s), (nombre del sustrato del fabricante (BIOMOL, Plymouth Meeting, PA)	
H3-4-9	K(Ac)QTARK(Ac)
H3-9-14	K(Ac)STGGK(Ac)
H3-9-14/pS	K(Ac)-S(PO3)-TGGK(Ac)
H3-14-18	K(Ac)APRK(Ac)
H4-1-5	SGRGK(Ac)
H4-12-16 (Fluor de Lys-H4-AcK16)	KGGAK(Ac)
H4-12-16/diAc	K(Ac)GGAK(Ac)
p53-320 (Fluor de Lys-SIRT2)	QPKK(Ac)
p53-373	K(Ac)SKK(Ac)
p53-382 (Fluor de Lys-SIRT1)	RHKK(Ac)
p53-382/di-Ac (Fluor de Lys-HDAC8)	RHK(Ac)K(Ac)
ε-acetil lisina (Fluor de Lys, FdL)	K(Ac)

Figura 7

	AFU/min	SE		AFU/20 min	SD
0	96.35835	7.819439		1927.167	270.8733
2	105.3334	5.888088		2106.667	203.9
5	98.15	13.83784		1963	472.4288
20	98.675	4.85032		1971.5	168.02
100	60.85835	9.009262		1217.167	312.09
200	32.43335	1.127555		648.667	39.06
500	5.33335	9.047858		108.667	313.42

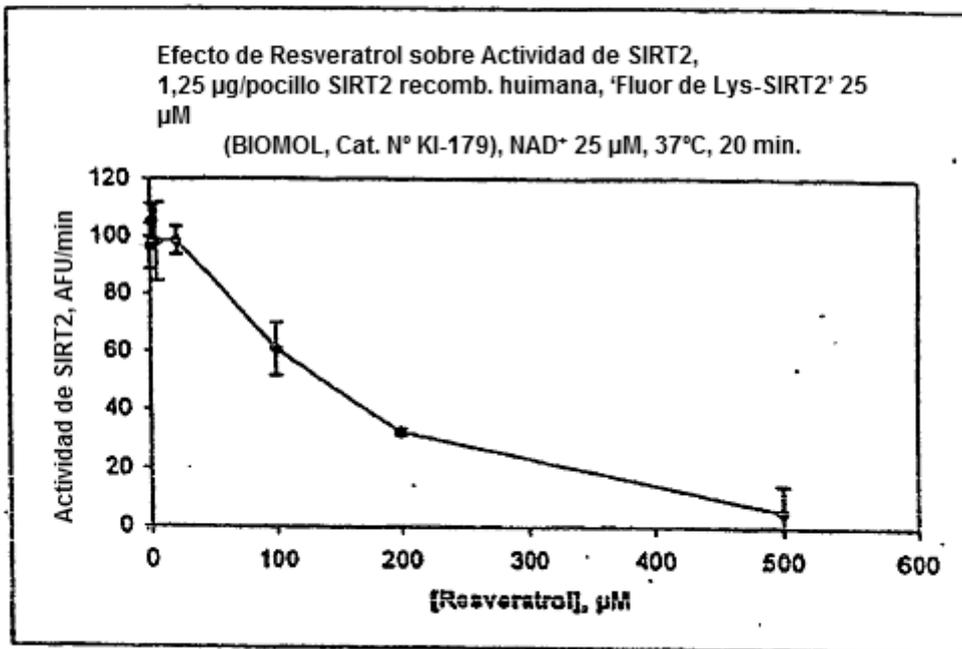


Figura 9

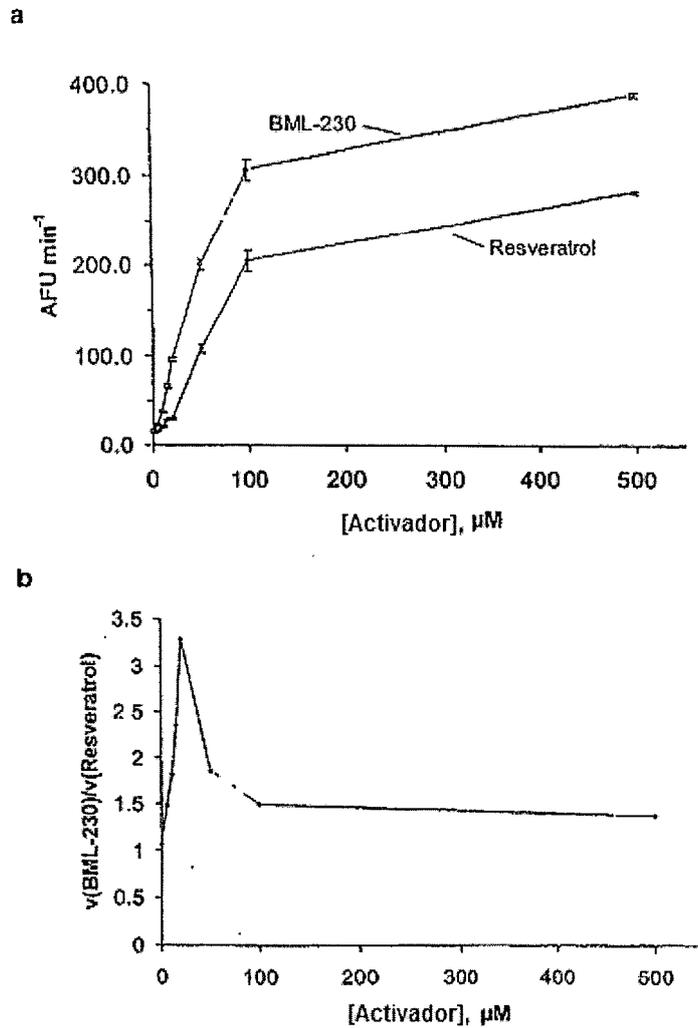


Figura 9. Dosis respuestas de Resveratrol y BML-230 de tasa catalítica de SIRT1. a, Las tasas iniciales de SIRT1 como una función de la concentración de activador se determinaron a $25 \mu\text{M}$ de cada uno de NAD^+ y péptido acetilado p53-382 con incubaciones de 20 min. Los puntos representan la media de tres determinaciones y las barras de errores son errores típicos de la media. b., Relación de tasas de SIRT1 activada con BML-230 a activada con resveratrol como una función de la concentración de activador. Relaciones calculadas a partir de datos de a.

Figura 10

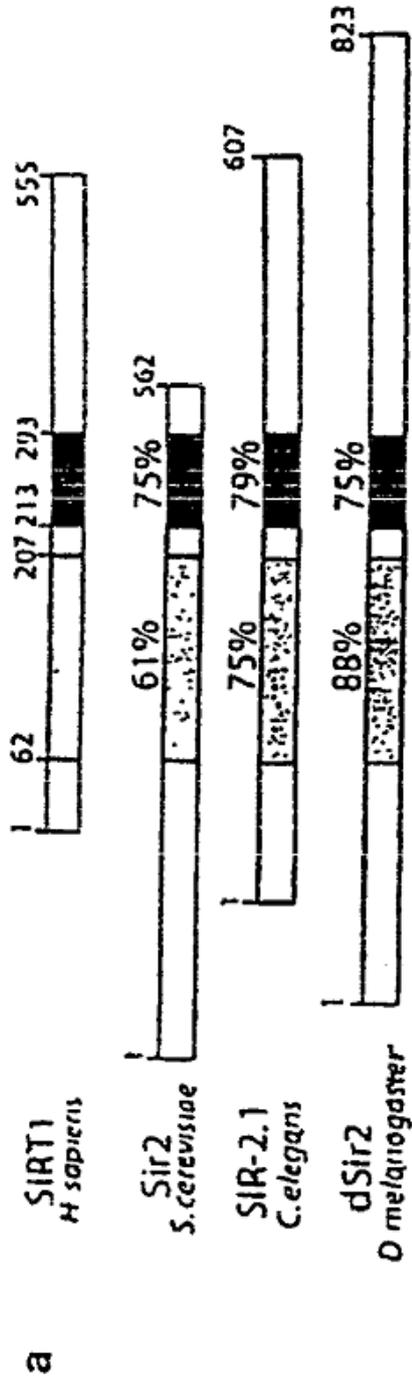


Figura 10

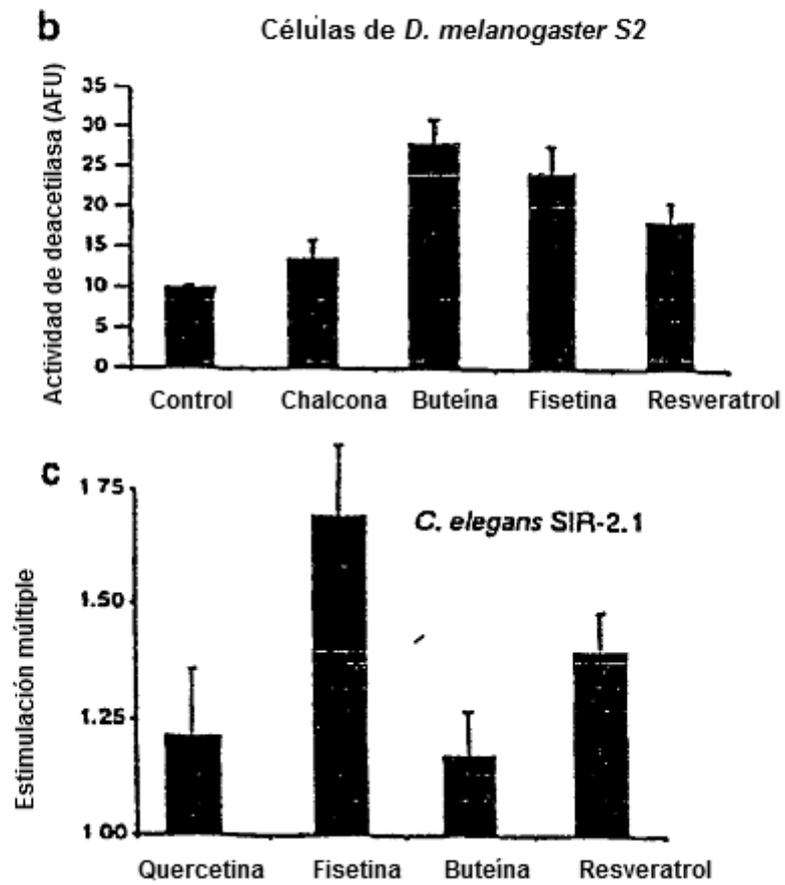


Figura 10

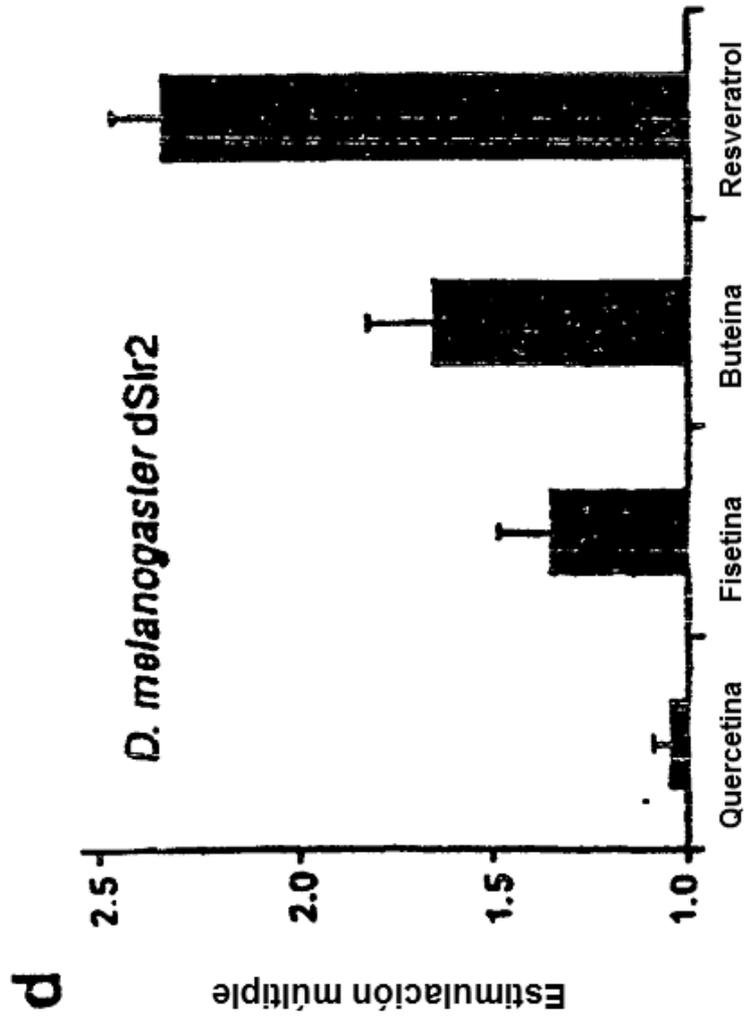


Figura 10_e

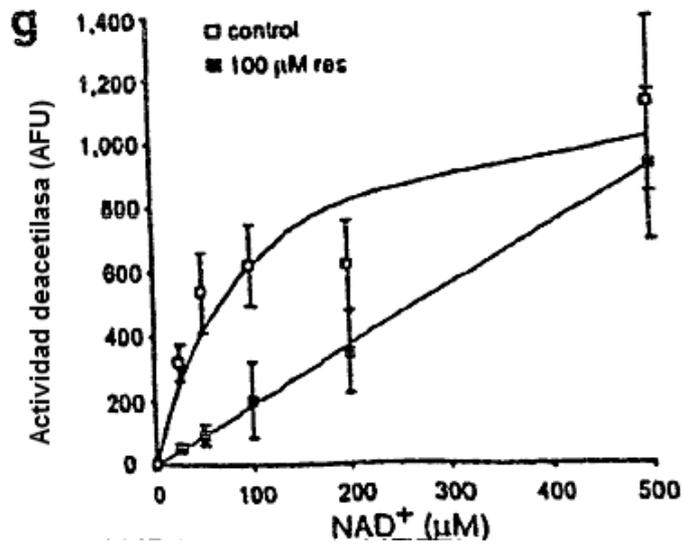
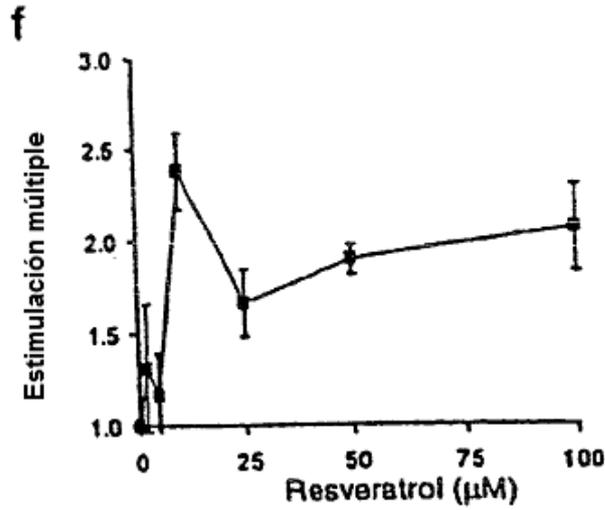
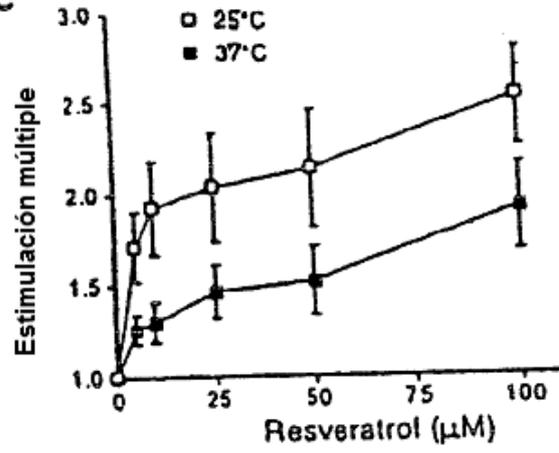


Figura 11

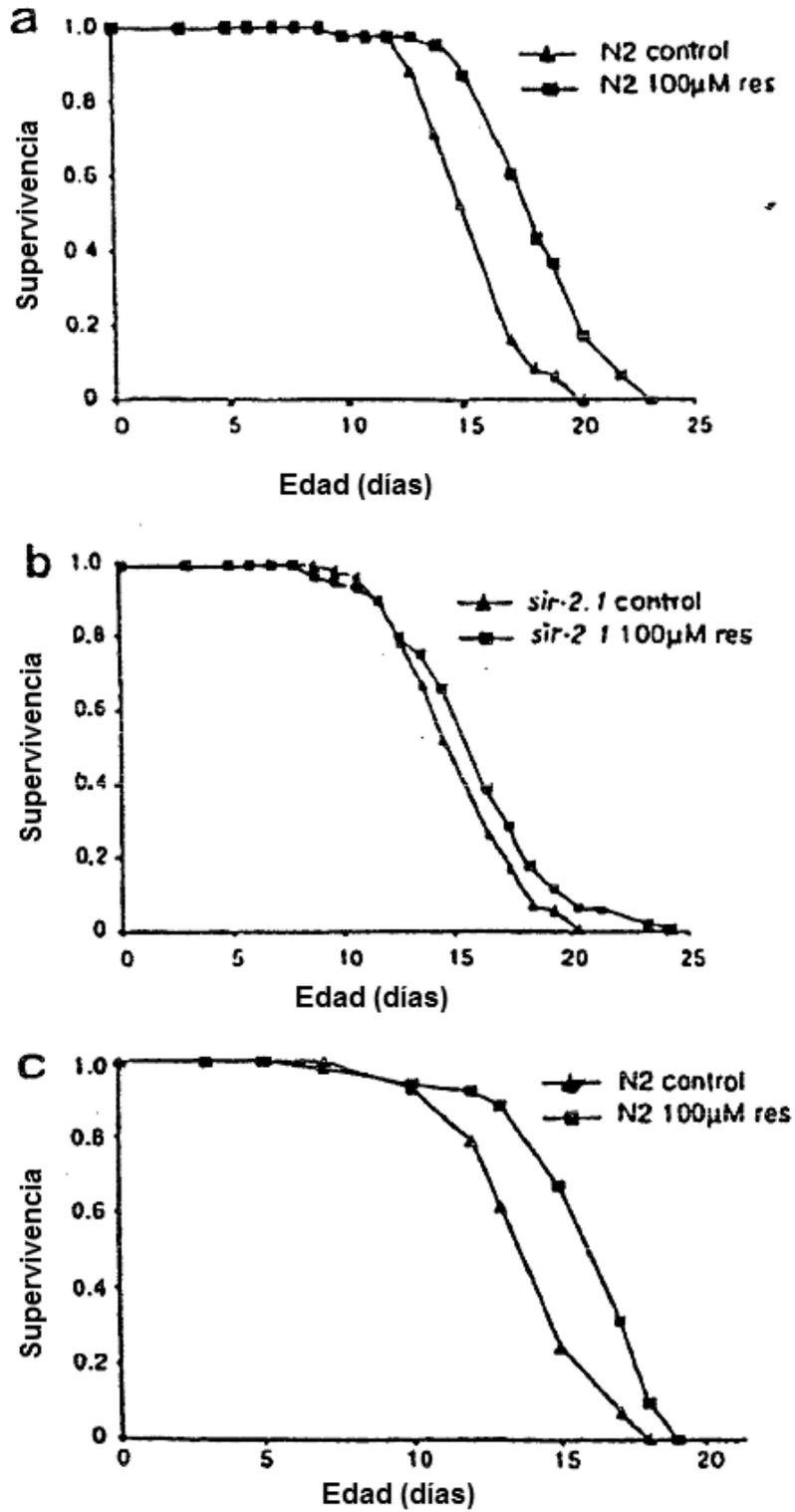


Figura 11

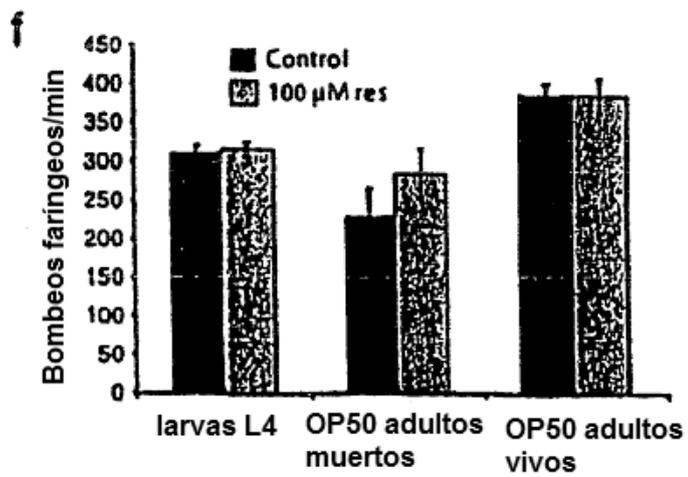
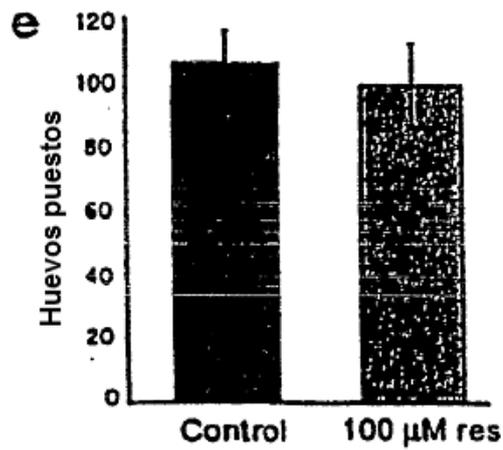
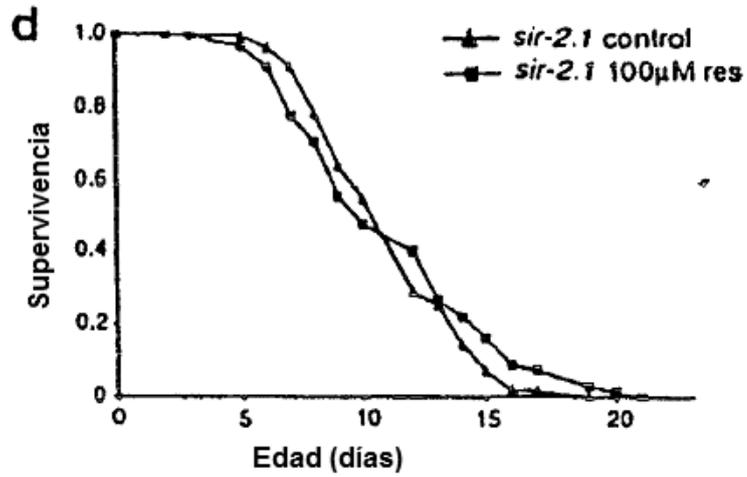


Figura 12

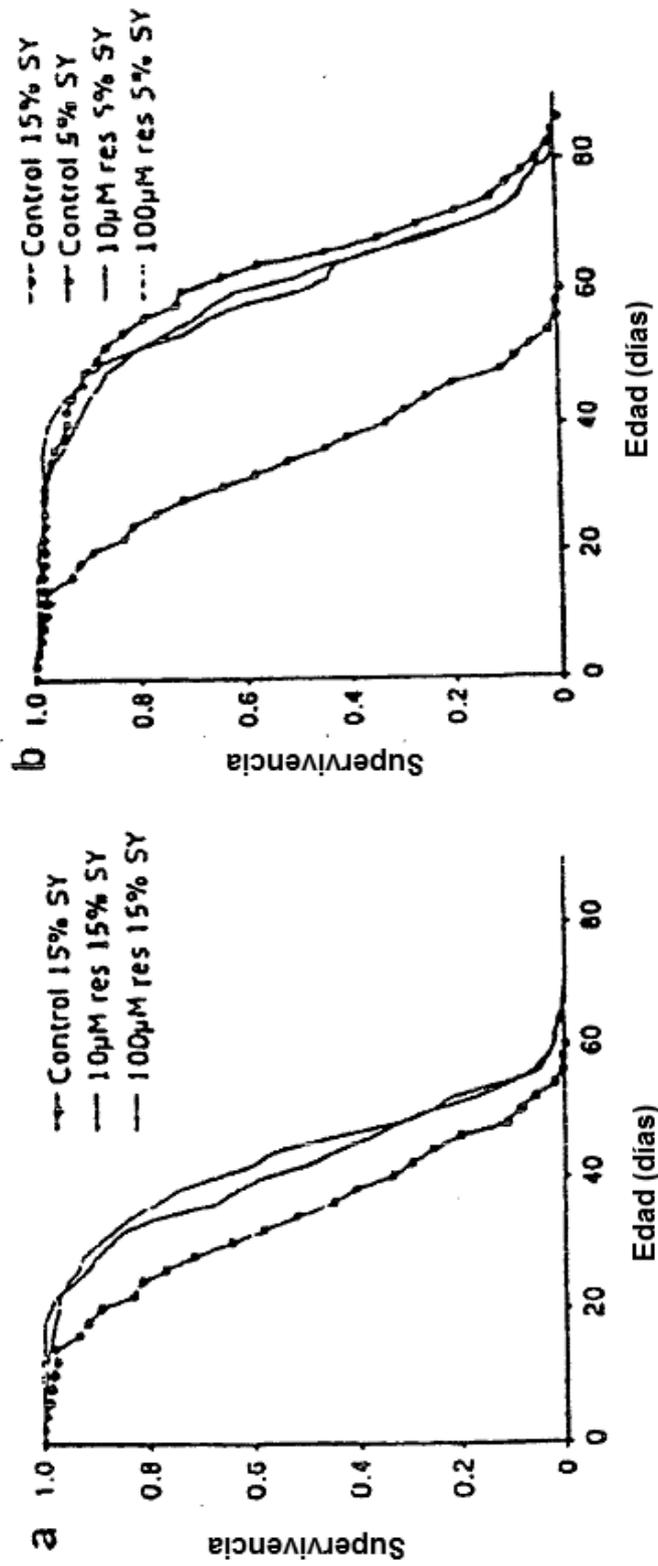


Figura 12

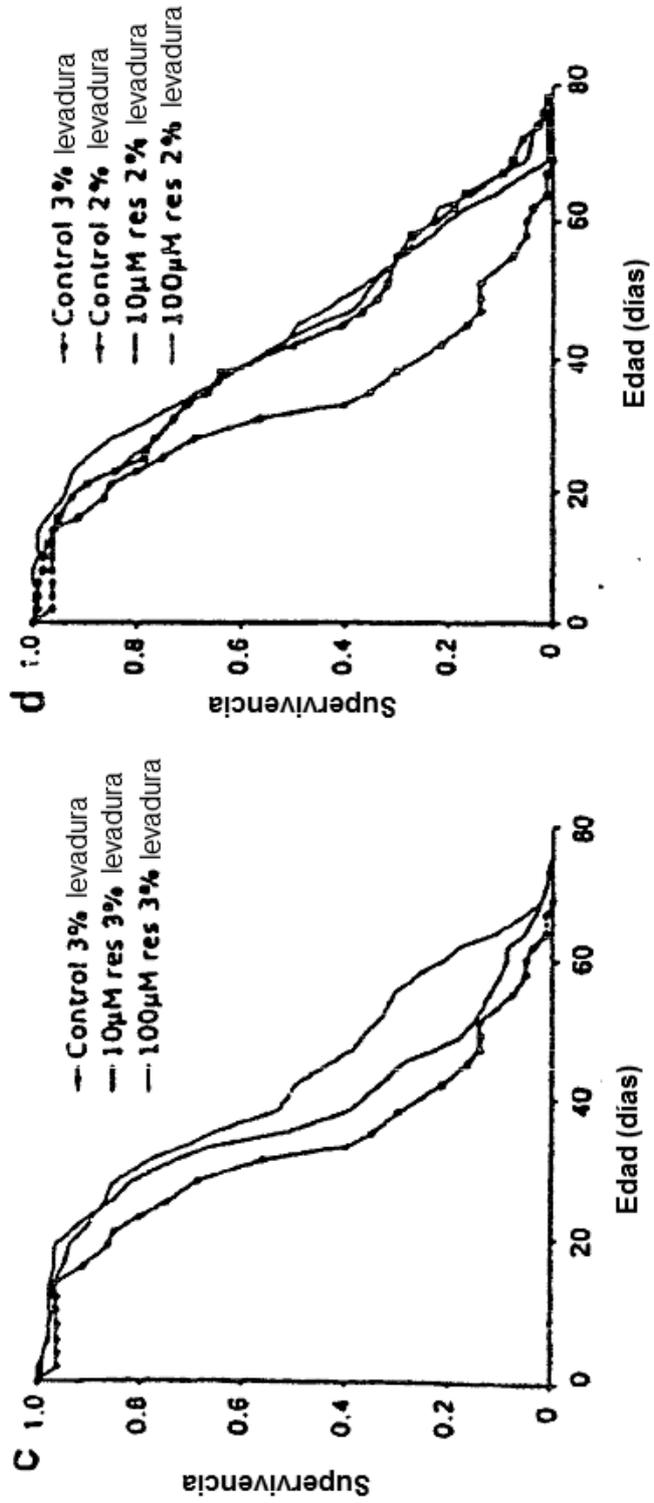


Figura 12

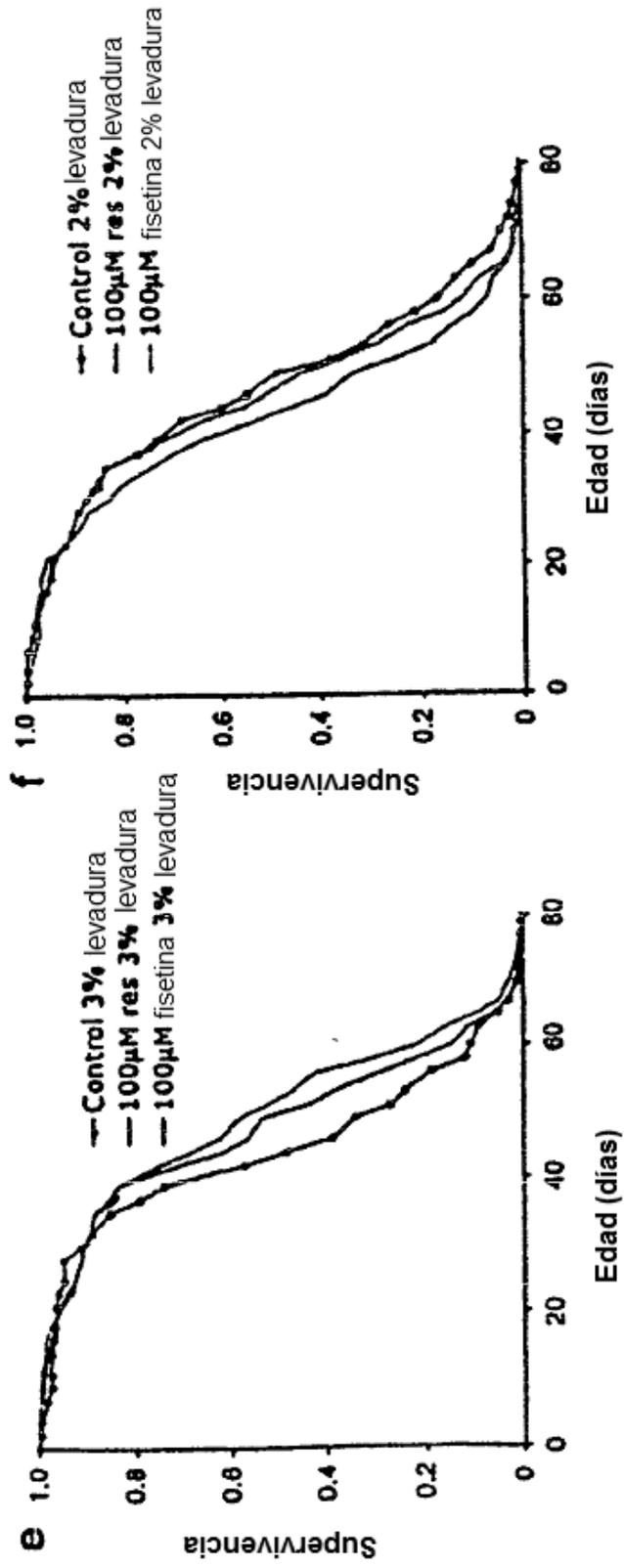


Figura 12

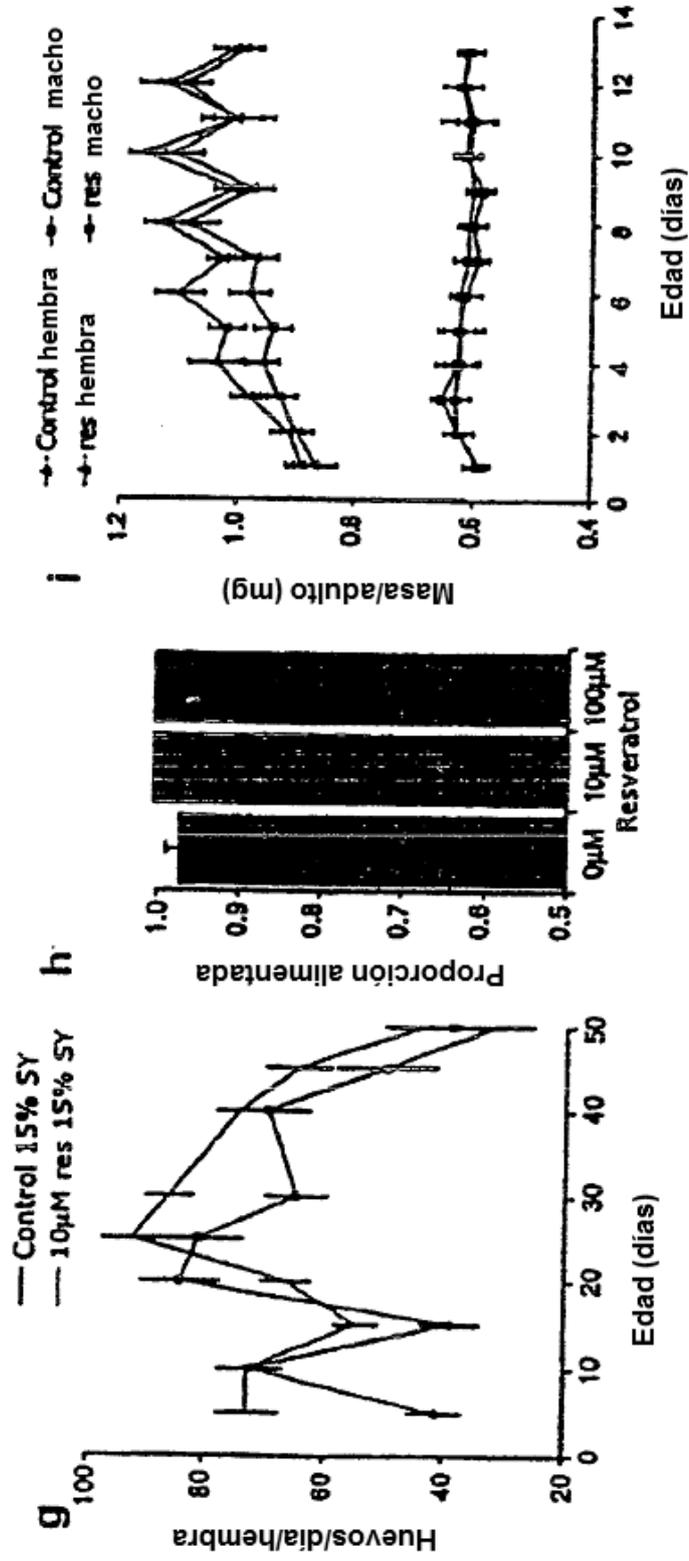


Figura 13

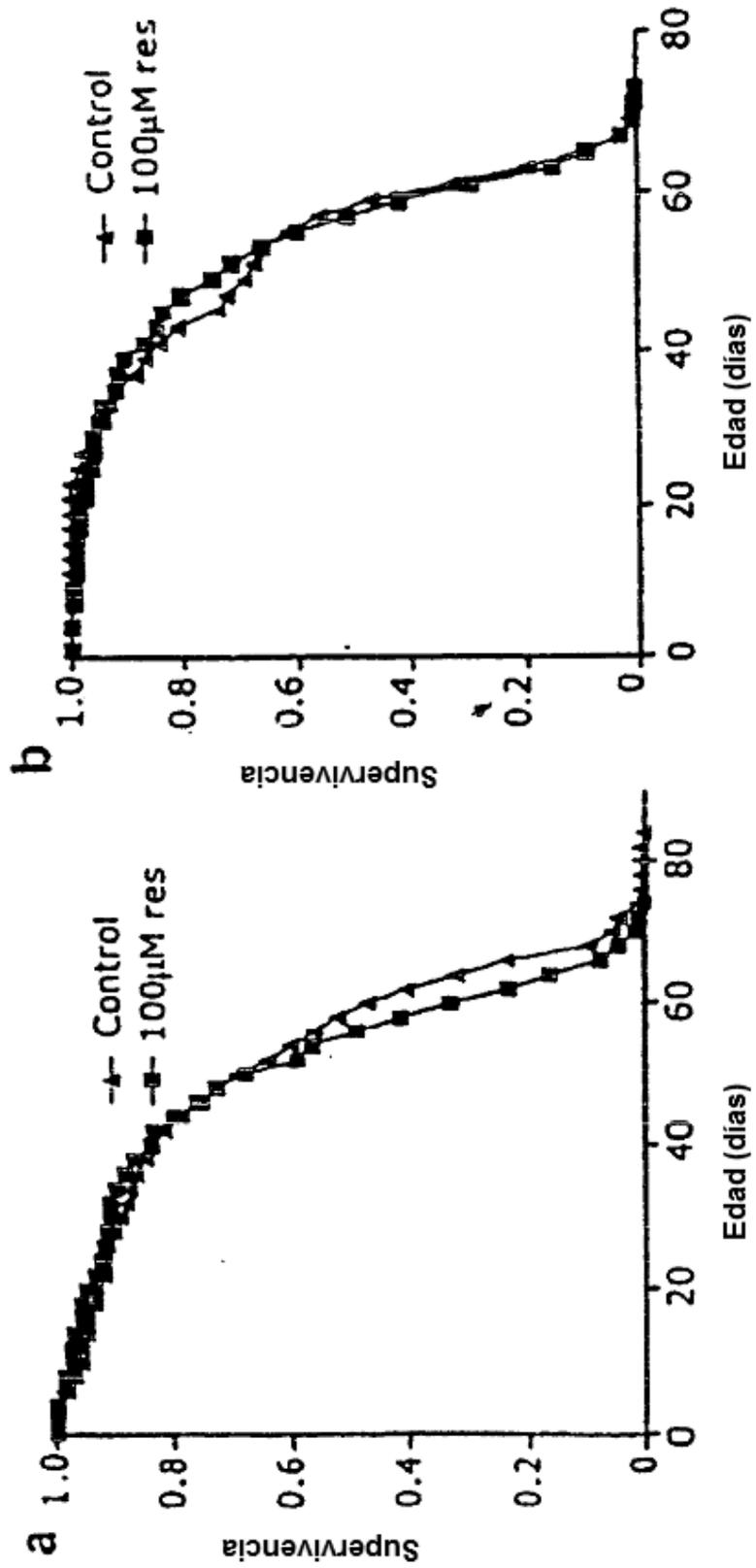


Figura 13

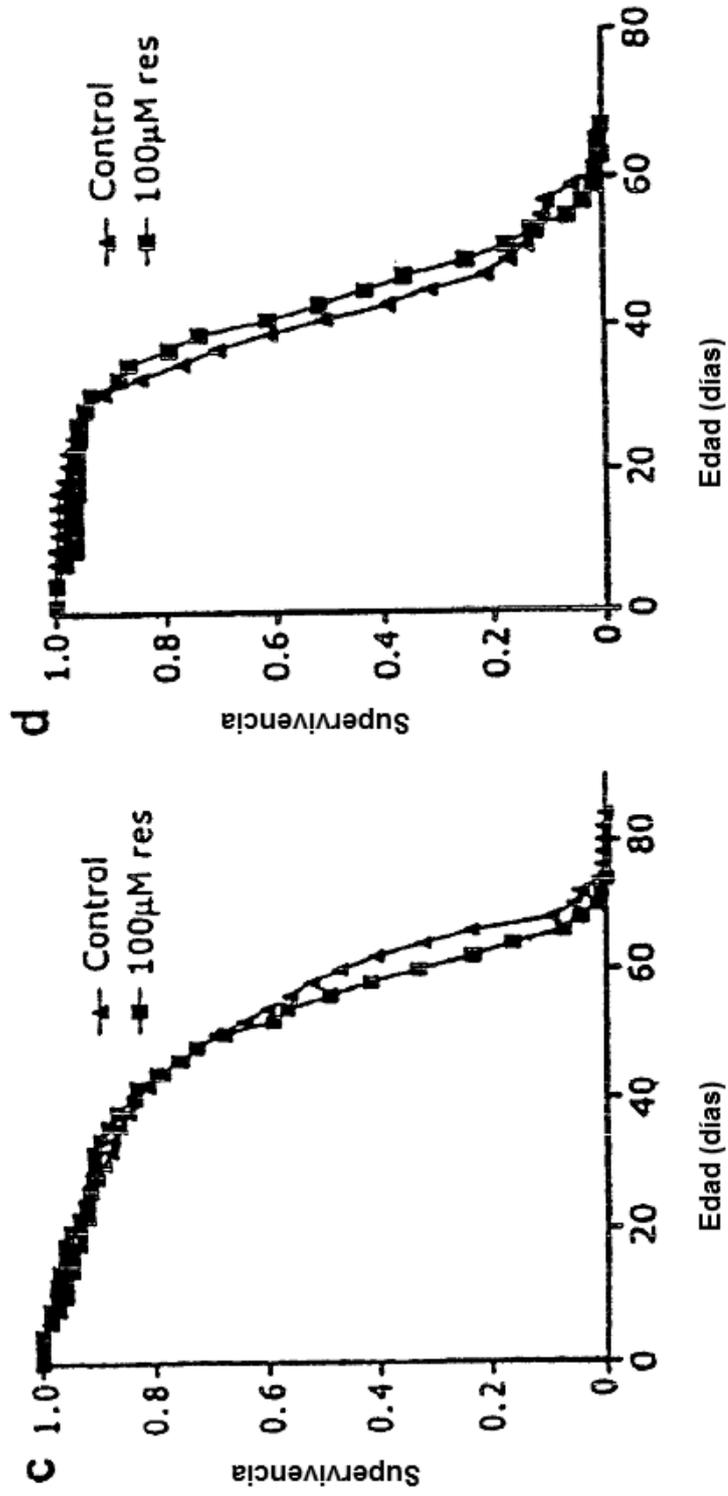


Figura 14

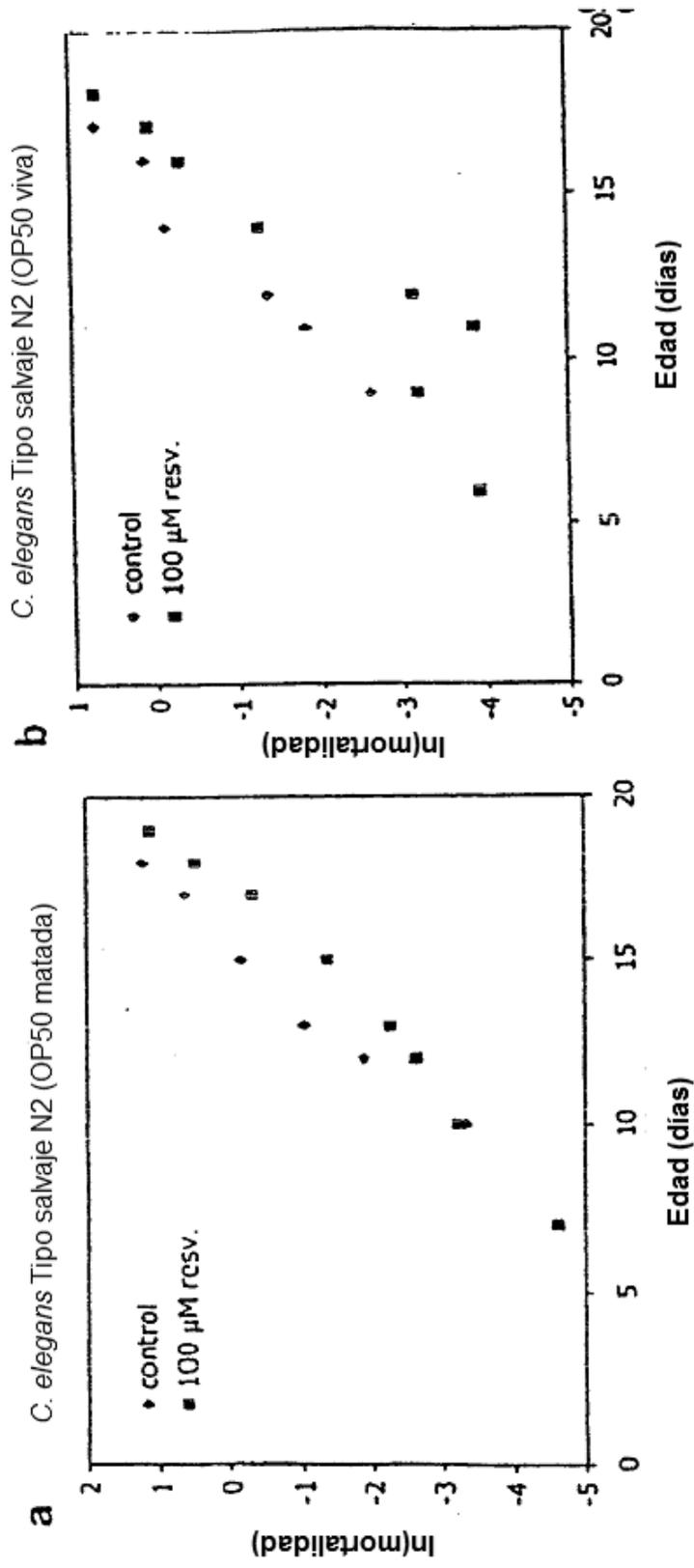


Figura 14

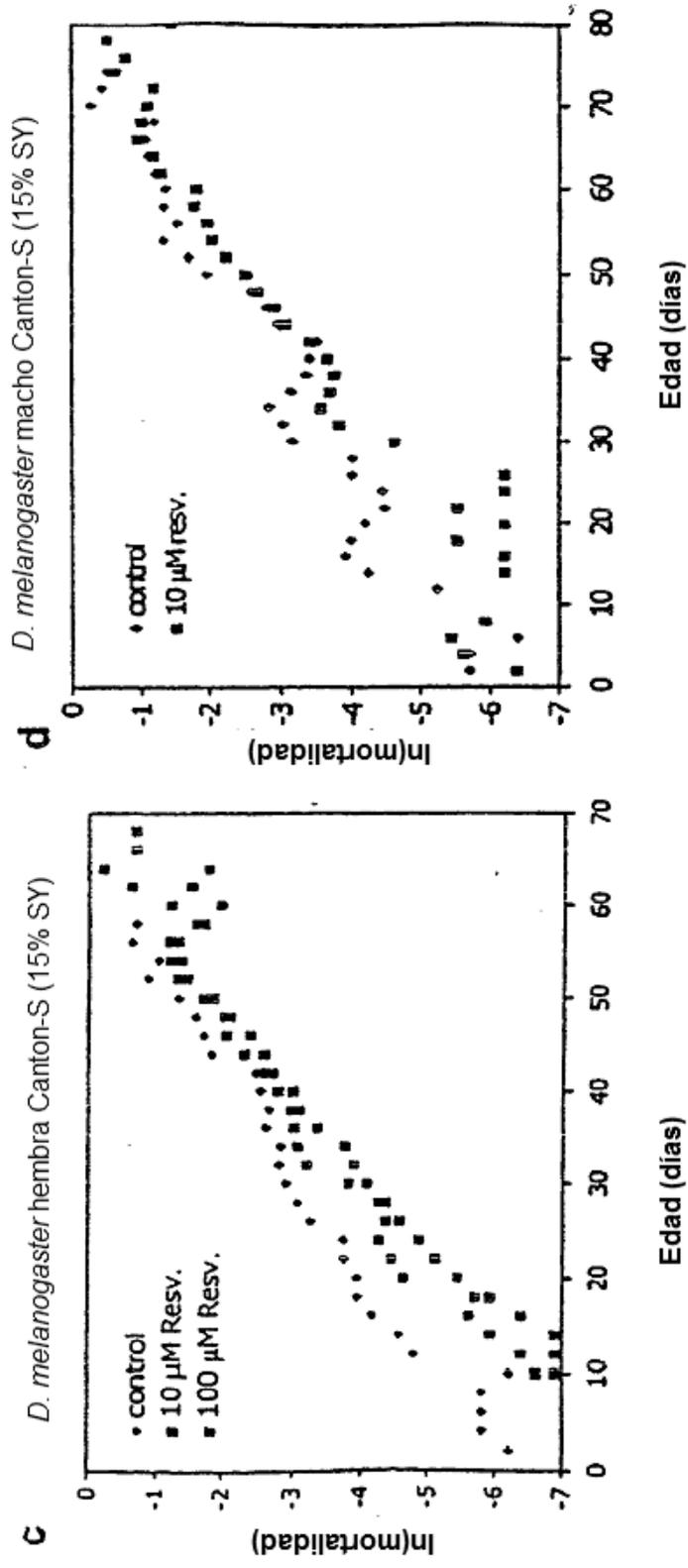


Figura 15

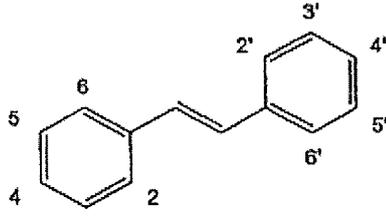
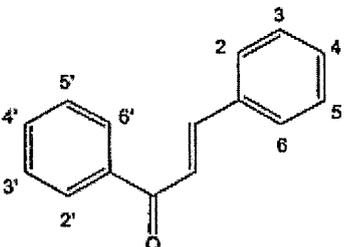
Tabla 1. Estimulación de la Tasa Catalítica de SIRT1 por Polifenoles Vegetales (100 μM)

Compuesto	Relación a tasa de control Media \pm SE	Estructura
Resveratrol (3,5,4'-trihidroxi- <i>trans</i> -estilbeno)	13.4 \pm 1.0	
Buteína (3,4,2',4'-tetrahidroxichalcona)	8.53 \pm 0.89	
Piceatannol (3,5,3',4'-tetrahidroxi- <i>trans</i> -estilbeno)	7.90 \pm 0.50	
Isoliquiriligenina (4,2',4'-trihidroxichalcona)	7.57 \pm 0.34	
Fisetina (3,7,3',4'-tetrahidroxiflavona)	6.58 \pm 0.69	
Quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona)	4.59 \pm 0.47	

Abreviatura: SE, error típico de la media. Las mediciones de las tasas con NAD^+ 25 μM y sustrato de péptido acetilado p53-382 25 μM se realizaron tal como se describe en Métodos. Todos los datos de las relaciones se calcularon a partir de experimentos en los que la desacetilación total en la reacción de control era péptido 0,25-1,25 μM de la concentración inicial de péptido acetilado.

Figura 16.

Tabla Suplementaria 1. Efectos de Estilbenos y Chalconas (100 μM) sobre la tasa de SIRT1.

Compuesto	Relación a tasa de control Media \pm SE	Réplicas	Estructura del Esqueleto
Resveratrol (3,5,4'-trihidroxi- <i>trans</i> -estilbeno)	13.4 \pm 1.0	10	 <p>ESTILBENOS (<i>trans</i>)</p>
Piceatannol (3,5,3',4'-tetrahidroxi- <i>trans</i> -estilbeno)	7.90 \pm 0.60	7	
Desoxirapontina (3,5-dihidroxi-4'-metoxiestilbeno-3-O β -D-glucósido)	1.94 \pm 0.21	6	
<i>trans</i> -Estilbeno	1.48 \pm 0.15	6	
Rapontina 3,3',5-trihidroxi-4'-metoxiestilbeno-3-O β -D-glucósido	1.40 \pm 0.37	6	 <p>CHALCONAS</p>
<i>cis</i> -Estilbeno	1.14 \pm 0.29	6	
Buteína (3,4,2',4'-tetrahidroxichalcona)	8.53 \pm 0.89	6	
Isoliquiritigen (4,2',4'-trihidroxichalcona)	7.57 \pm 0.84	6	
3,4,2',4',6'-pentahidroxichalcona	2.80 \pm 0.32	6	
Chalcona	1.34 \pm 0.17	6	

Abreviatura: SE, error típico de la media. Las mediciones de las tasas con NAD^+ 25 μM y sustrato de péptido acetilado p53-382 25 μM se realizaron tal como se describe en Métodos. Todos los datos de las relaciones se calcularon a partir de experimentos en los que la desacetilación total en la reacción de control era péptido 0,25-1,25 μM o 1-5% de la concentración inicial de péptido acetilado.

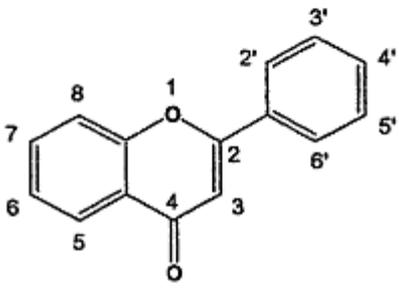
Figura 17.**Tabla Suplementaria 2.** Efectos de Flavonas (100 μ M) sobre la tasa de SIRT1 (Parte I).

Compuesto	Relación a tasa de control Media \pm SE	Réplicas	Estructura del esqueleto
Fisetina (3,7,3',4'- tetrahidroxiflavona)	6.58 \pm 0.69	9	<p style="text-align: center;">FLAVONAS</p>
5,7,3',4',5'- pentahidroxiflavona	6.05 \pm 0.98	6	
Luteolina (5,7,3',4'- tetrahidroxiflavona)	5.66 \pm 0.80	6	
3,6,3',4'- tetrahidroxiflavona	5.45 \pm 0.57	12	
Quercetina (3,5,7,3',4'- pentahidroxiflavona)	4.59 \pm 0.47	16	
7,3',4',5'- tetrahidroxiflavona	3.62 \pm 0.56	6	
Kaempferol (3,5,7,4'- tetrahidroxiflavona)	3.55 \pm 0.56	6	
6-hidroxiapigenina (5,6,7,4'- tetrahidroxiflavona; escutelareína)	3.06 \pm 0.29	6	
Apigenina (5,7,4'- trihidroxiflavona)	2.77 \pm 0.40	6	
3,6,2',4'- tetrahidroxiflavona	2.10 \pm 0.22	6	
7,4'-dihidroxiflavona	1.91 \pm 0.17	6	

Abreviatura: SE, error típico de la media. Las mediciones de las tasas con NAD⁺ 25 μ M y sustrato de péptido acetilado p53-382 25 μ M se realizaron tal como se describe en Métodos. Todos los datos de las relaciones se calcularon a partir de experimentos en los que la desacetilación total en la reacción de control era péptido 0,25-1,25 μ M o 1-5% de la concentración inicial de péptido acetilado.

Figura 18.

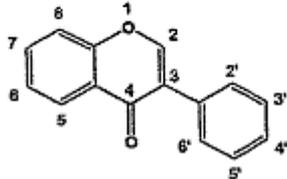
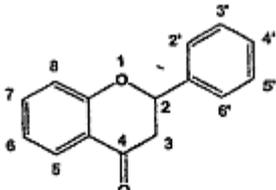
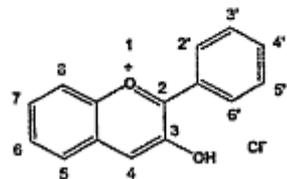
Tabla Suplementaria 3. Efectos de Flavonas (100 μ M) sobre la tasa de SIRT1 (Parte II).

Compuesto	Relación a tasa de control Media \pm SE	Réplicas	Estructuras del Esqueleto
7,8,,3',4'-tetrahidroxiflavona	1.91 \pm 0.39	6	 <p style="text-align: center;">FLAVONAS</p>
3,6,2',3'-tetrahidroxiflavona	1.74 \pm 0.27	6	
4'-hidroxiflavona	1.73 \pm 0.12	6	
5,4'-dihidroxiflavona	1.56 \pm 0.15	6	
5,7-dihidroxiflavona	1.51 \pm 0.18	6	
Morin (3,5,7,2',4'-pentahidroxiflavona)	1.461 \pm 0.071	6	
Flavona	1.41 \pm 0.23	6	
5-hidroxiflavona	1.22 \pm 0.19	6	
Miricatin (Cannabiscetina; 3,5,7,3',4',5'-hexahidroxiflavona)	0.898 \pm 0.070	12	
3,7,3',4',5'-pentahidroxiflavona	0.826 \pm 0.074	12	
Gosipetina (3,5,7,8,3',4'-hexahidroxiflavona)	0.723 \pm 0.062	6	

Abreviatura: SE, error típico de la media. Las mediciones de las tasas con NAD⁺ 25 μ M y sustrato de péptido acetilado p53-382 25 μ M se realizaron tal como se describe en Métodos. Todos los datos de las relaciones se calcularon a partir de experimentos en los que la desacetilación total en la reacción de control era péptido 0,25-1,25 μ M o 1-5% de la concentración inicial de péptido acetilado.

Figura 19.

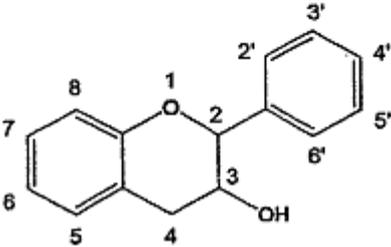
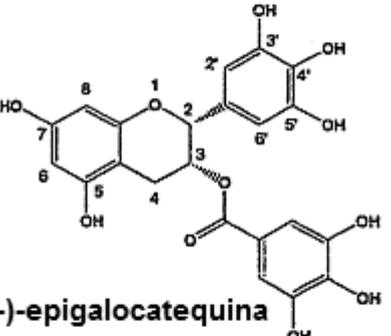
Tabla Suplementaria 4. Efectos de Isoflavonas, Flavononas y Antocianidinas (100 μM) sobre la tasa de SIRT1.

Compuesto	Relación a tasa de control Media \pm SE	Réplicas	Estructura del Esqueleto
Daidzeína (7,4'- dihidroxiisoflavona)	2.28 \pm 0.74	2	
Genisteína (5,7,4'- trihidroxiisoflavona)	1.109 \pm 0.026	2	ISOFLAVONAS
Naringenina (5,7,4'- trihidroxiiflavanona)	2.10 \pm 0.23	6	
3,5,7,3',4'- pentahidroxiiflavanona	1.97 \pm 0.22	5	FLAVANONAS
Flavanona	1.92 \pm 0.24	6	
Cloruro de pelargonidina (cloruro de 3,5,7,4'- tetrahidroxiiflavilio)	1.586 \pm 0.037	2	
Cloruro de cianidina (3,5,7,3',4',5'- pentahidroxiiflavilio)	0.451 \pm 0.015	2	
Cloruro de delphinidina (cloruro de 3,5,7,3',4',5'- hexahidroxiiflavilio)	0.4473 \pm 0.0071	2	ANTOCIANIDINAS (sales cloruro de flavilio)

Abreviatura: SE, error típico de la media. Las mediciones de las tasas con NAD^+ 25 μM y sustrato de péptido acetilado p53-382 25 μM se realizaron tal como se describe en Métodos. Todos los datos se calcularon a partir de experimentos en los que la desacetilación total en la reacción de control era péptido 0,25-1,25 μM o 1-5% de la concentración inicial de péptido acetilado.

Figura 20.

Tabla Suplementaria 5. Efectos de Catequinas (Flavan-3-oles) (100 µM) sobre la tasa de SIRT1

Compuesto	Relación a tasa de control Media ± SE	Réplicas	Estructura del Esqueleto/Estructura
(-)-Epicatequina (Sitios hidroxilados: 3,5,7,3',4')	1.53 ± 0.31	4	 <p style="text-align: center;">CATEQUINAS (Flavan-3-oles)</p>
(-)-Catequina (Sitios hidroxilados: 3,5,7,3',4')	1.41 ± 0.21	4	
(-)-Galocatequina (Sitios hidroxilados: 3,5,7,3',4',5')	1.35 ± 0.25	4	
(+)-Catequina (Sitios hidroxilados: 3,5,7,3',4')	1.31 ± 0.19	4	
(+)-Epicatequina (Sitios hidroxilados: 3,5,7,3',4')	1.26 ± 0.20	4	
(-)-Epigalocatequina (Sitios hidroxilados: 3,5,7,3',4',5')	0.41 ± 0.11	4	
Galato de (-)-epigalocatequina (Sitios hidroxilados: 3*,3,5,7,3',4'; *Posición del éster de galato)	0.32 ± 0.12	4	 <p style="text-align: center;">Galato de (-)-epigalocatequina</p>

Abreviatura: SE, error típico de la media. Las mediciones de las tasas con NAD⁺ 25 µM y sustrato de péptido acetilado p53-382 25 µM se realizaron tal como se describe en Métodos. Todos los datos de las relaciones se calcularon a partir de experimentos en los que la desacetilación total en la reacción de control era péptido 0,25-1,25 µM o 1-5% de la concentración inicial de péptido acetilado.

Figura 21.

Tabla Suplementaria 6. Efectos de Compuestos Protectores de Radicales Libres (100 µM) sobre la tasa de SIRT1 .

Compuesto	Relación a tasa de control Media ± SE	Réplicas	Mecanismo Protector
Hinokilol (b-tujaplicina; 2-hidroxi-1-isopropil-2,4,6-cicloheptatrien-1-ona)	2.48 ± 0.15	2	Quelante de hierro
L-(+)-ergotioneina (sal interna de (S)-a-carboxi-2,3-dihidro-N,N,N-trimetil-2-tioxo-1H-imidazol-4-etanaminio)	2.06 ± 0.48	2	Antioxidante, Agente Depurador de Peroxinitrito
Éster Fenílico del Ácido Cafeico	1.80 ± 0.16	2	Quelante de hierro
MCI (3-metil-1-fenil-2-pirazoli-5-ona)	1.2513 ± 0.0080	2	Agente Depurador de Radicales y Antioxidante
HBED (Ácido N,N'-di-(2-hidroxibencil)etilendiamina-N,N'-diacético-HCl-H ₂ O)	1.150 ± 0.090	2	Quelante de hierro
Ambroxol (trans-4-(2-amino-3,5-dibromobencilamino)ciclohexano-HCl)	1.075 ± 0.0026	2	Agente Depurador de Radicales
U-83836E ((-)-2-((4-(2,6-di-1-pirrolidinil-4-pirimidinil)-1-piperazinil)metil)-3,4-dihidro-2,5,7,8-tetrametil-2H-1-benzopiran-6-ol-2HCl)	1.030 ± 0.055	2	Aminoesteroide "Lazaroid", Inhibidor de la Peroxidación
Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico)	0.995 ± 0.019	2	Antioxidante

Abreviatura: SE, error típico de la media. Las mediciones de las tasas con NAD⁺ 25 µM y sustrato de péptido acetilado p53-382 25 µM se realizaron tal como se describe en Métodos. Todos los datos de las relaciones se calcularon a partir de experimentos en los que la desacetilación total en la reacción de control era péptido 0,25-1,25 µM o 1-5% de la concentración inicial de péptido acetilado.

Figura 22.

Tabla Suplementaria 7. Efectos de Compuestos Misceláneos (100 µM) sobre la Tasa Catalítica de SIRT1

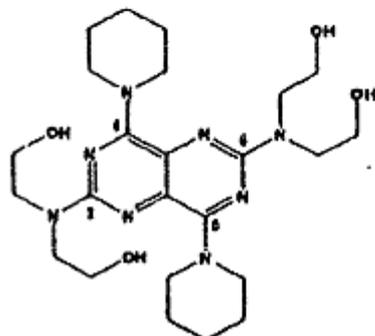
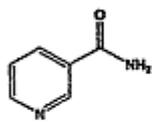
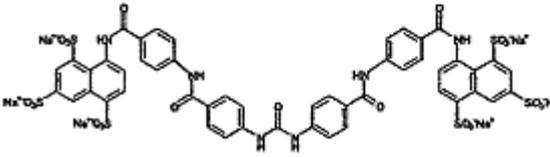
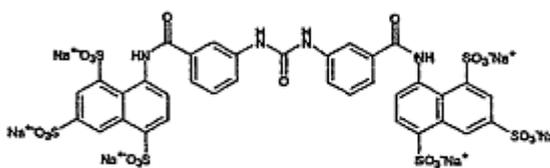
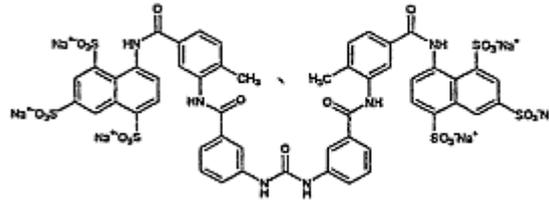
Compuesto	Relación a tasa de control Media ± SE	Réplicas	Estructuras y Actividades
Dipiridamol (2,6-bis(dietanol-amino)-4,8-dipiperidino-pirimido[5,4-d]pirimidina)	3.54 ± 0.20	2	 <p>Inhibidor de Transporte de Adenosina, Fosfodiesterasa, 5-lipoxigenasa</p>
Nicotinamida	0.428 ± 0.019	42	 <p>Producto/Inhibidor de la Reacción de Sirtuina</p>
NF279	0.0035 ± 0.0011	3	 <p>Antagonista de Receptor Purinérgico</p>
NF023	-0.0016 ± 0.0015	3	 <p>Antagonista de proteína G</p>

Figura 22.
Tabla Suplementaria 7 (cont.)

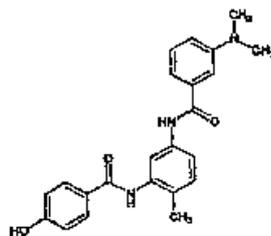
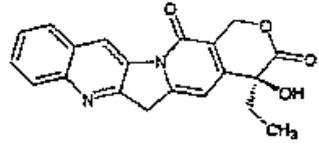
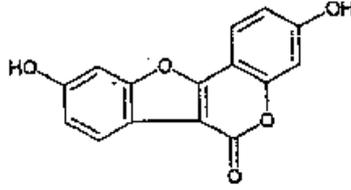
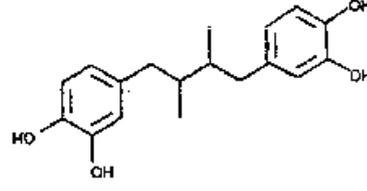
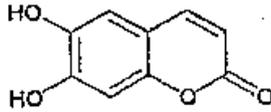
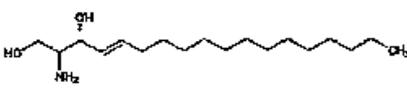
Suramina -0.0002 ± 0.0010 3



**Antagonista de proteína G, Inhibidor
 de Transcriptasa Inversa**

Abreviatura: SE, error típico de la media. Las mediciones de las tasas con NAD^+ 25 μM y sustrato de péptido acetilado p53-382 25 μM se realizaron tal como se describe en Métodos. Todos los datos se calcularon a partir de experimentos en los que la desacetilación total en la reacción de control era péptido 0,25-1,25 μM o 1-5% de la concentración inicial de péptido acetilado.

Figura 23.
Tabla Suplementaria 8. Efectos de Diversos Moduladores sobre la Tasa de SIRT1 .

Compuesto (Concentración)	Relación a tasa de control Media \pm SE	Réplicas	Estructura
ZM 336372, (100 μ M)	3.5 \pm 1.1	3	
Camptotecina (10 μ M)	2.92 \pm 0.41	3	
Coumestrol, (10 μ M)	2.30 \pm 0.31	2	
NDGA, (100 μ M)	1.738 \pm 0.088	3	
Esculetina (10 μ M)	1.737 \pm 0.082	3	
Esfingosina	0.069 \pm 0.028	3	

Abreviatura: SE, error típico de la media. Las mediciones de las tasas con NAD⁺ 25 μ M y sustrato de péptido acetilado p53-382 25 μ M se realizaron tal como se describe en Métodos. Todos los datos de las relaciones se calcularon a partir de experimentos en los que la desacetilación total en la reacción de control era péptido 0,25-1,25 μ M o 1-5% de la concentración inicial de péptido acetilado.

Figura 24.

Tabla 9. Efectos de la Tasa de SIRT1 de Nuevos Análogos de Resveratrol (100 µM).

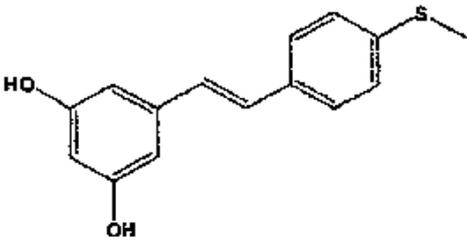
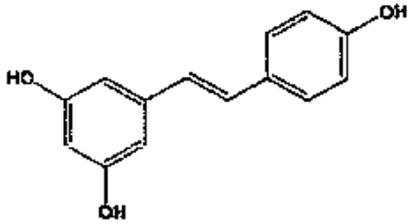
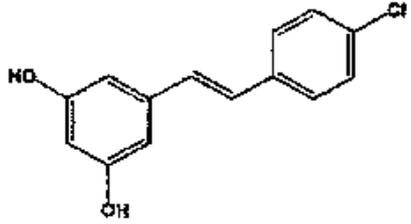
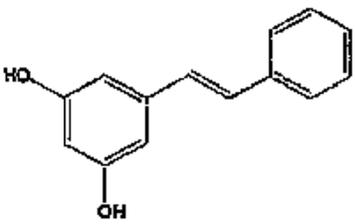
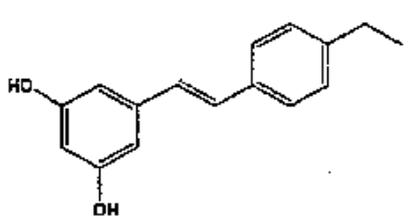
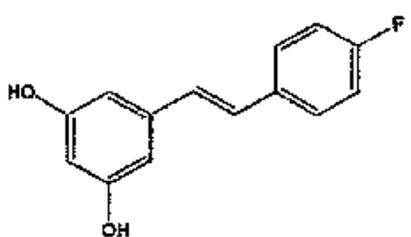
Compuesto	Relación a tasa de control Media ± SE	N	Estructura	Estabilidad en Disolución, t ^{1/2} , h
BML-230 (3,5-dihidroxi-4'-tiometil- <i>trans</i> -estilbeno)	11.8 ± 1.9	12		59 (etanol) 20 (agua)
Resveratrol (3,5,4'-trihidroxi- <i>trans</i> -estilbeno)	10.7 ± 0.4	49		
BML-217 (3,5-dihidroxi-4'-cloro- <i>trans</i> -estilbeno)	10.6 ± 0.4	3		
Pinosilvina (3,5-dihidroxi- <i>trans</i> -estilbeno)	9.95 ± 0.45	3		
BML-225 (3,5-dihidroxi-4'-etil- <i>trans</i> -estilbeno)	9.373 ± 0.014	3		
BML-212 (3,5-dihidroxi-4'-fluoro- <i>trans</i> -estilbeno)	8.20 ± 0.69	3		

Figura 25.

Tabla 10. Efectos de la Tasa de SIRT1 de Nuevos Análogos de Resveratrol (100 μ M).

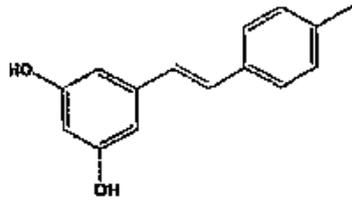
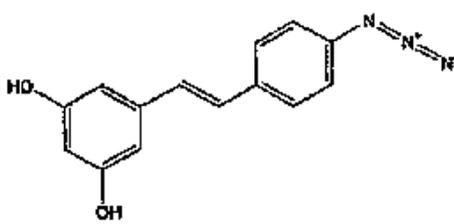
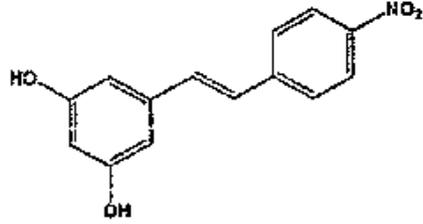
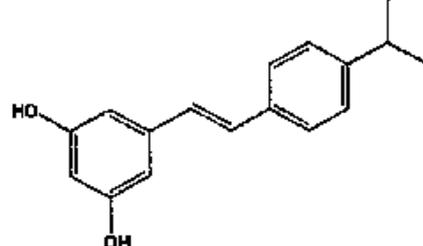
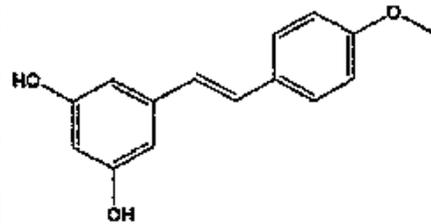
Compuesto	Relación a tasa de control Media \pm SE	N	Estructura	Estabilidad en Disolución, $t_{1/2}$, h
BML-228 (3,5-dihidroxi-4'-metil- <i>trans</i> -estilbeno)	7.72 \pm 0.12	3		
BML-232 (3,5-dihidroxi-4'-azido- <i>trans</i> -estilbeno)	7.24 \pm 0.12	3		
BML-229 (3,5-dihidroxi-4'-nitro- <i>trans</i> -estilbeno)	6.78 \pm 0.22	3		
BML-231 (3,5-dihidroxi-4'-isopropil- <i>trans</i> -estilbeno)	6.01 \pm 0.15	3		
BML-233 (3,5-dihidroxi-4'-metoxi- <i>trans</i> -estilbeno)	5.48 \pm 0.33	6		

Figura 26.

Tabla 11. Efectos de la Tasa de SIRT1 de Nuevos Análogos de Resveratrol (100 μ M).

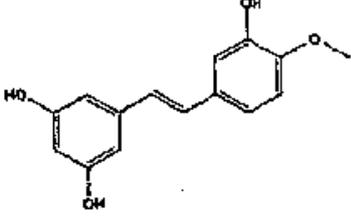
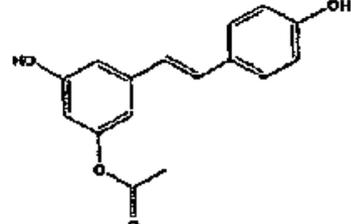
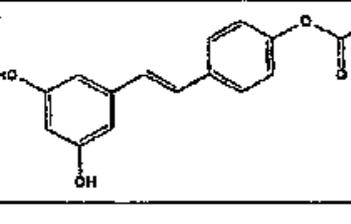
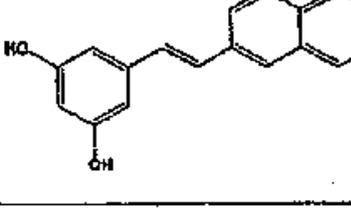
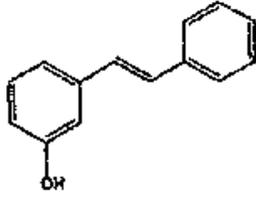
Compuesto	Relación a tasa de control Media \pm SE	N	Estructura	Estabilidad en Disolución, t $\frac{1}{2}$, h
Raponlin aglicona (3,5,3'-trihidroxi-4'-metoxi- <i>trans</i> -estilbeno)	4.060 \pm 0.059	3		
BML-227 (3,4'-dihidroxi-5-acetoxi- <i>trans</i> -estilbeno)	3.340 \pm 0.093	3		
BML-221 (3,5-dihidroxi-4'-acetoxi- <i>trans</i> -estilbeno)	3.05 \pm 0.54	6		504 (etanol)
BML-218 (E)-1-(3,5-dihidroxi-fenil)-2-(2-naftil)-eteno	3.05 \pm 0.37	6		
BML-216 3-hidroxiestilbeno	2.357 \pm 0.074	3		

Figura 27.

Tabla 12. Efectos de la Tasa de SIRT1 de Nuevos Análogos de Resveratrol (100 μ M).

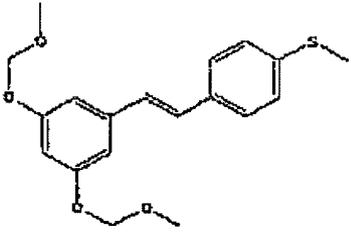
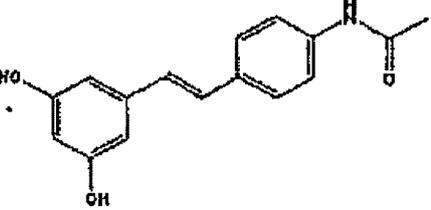
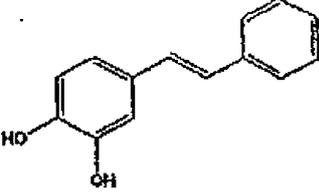
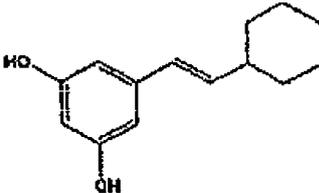
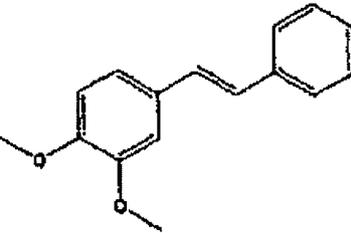
Compuesto	Relación a tasa de control Media \pm SE	N	Estructura	Estabilidad en Disolución, $t_{1/2}$, h
BML-226 (3,5-dimetoximetoxi-4'-tiometil- <i>trans</i> -estilbeno)	2.316 \pm 0.097	3		
BML-222 (3,5-dihidroxi-4'-acetamido- <i>trans</i> -estilbeno)	1.88 \pm 0.11	3		
BML-215 (3,4-dihidroxi- <i>trans</i> -estilbeno)	1.84 \pm 0.10	6		
BML-224 (E)-1-(3,5-dihidroxi-2-(ciclohexil)eteno)	1.297 \pm 0.042	3		
3,4-dimetoxi- <i>trans</i> -estilbeno	1.127 \pm 0.019	3		

Figura 28.

Tabla 13. Efectos de la Tasa de SIRT1 de Nuevos Análogos de Resveratrol (100 μ M).

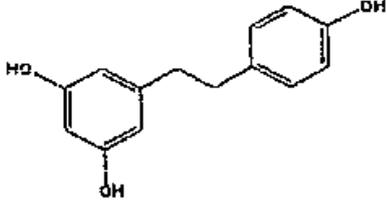
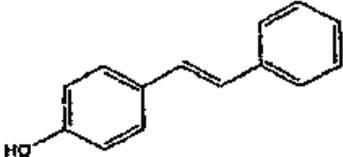
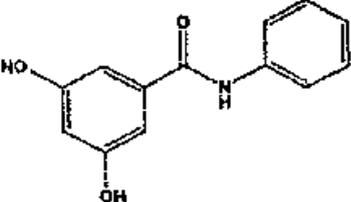
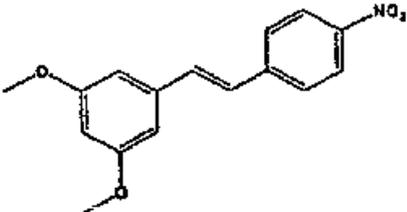
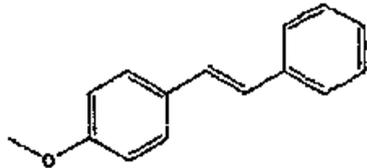
Compuesto	Relación a tasa de control Media \pm SE	N	Estructura	Estabilidad en Disolución, $t_{1/2}$, h
Dihidroresveratrol (1-(3,5-dihidroxifenil)- 2-(4-hidroxifenil) etano)	1.08 \pm 0.14	4		
4-hidroxi-trans- estilbeno	0.943 \pm 0.039	3		
BML-219 N-fenil-(3,5- dihidroxi) benzamida	0.902 \pm 0.014	3		
3,5-dihidroxi-4'- trans-estilbeno	0.870 \pm 0.019	3		
4-metoxi-trans- estilbeno	0.640 \pm 0.089	3		

Figura 29

Tabla 14. Compuestos Intermedios Sintéticos Análogos de Resveratrol

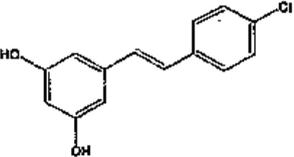
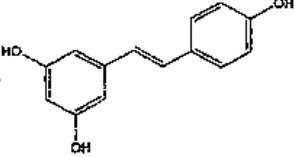
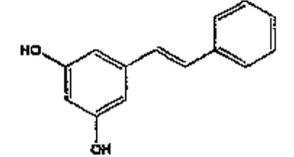
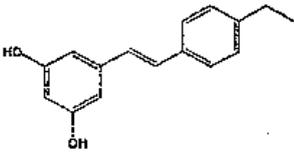
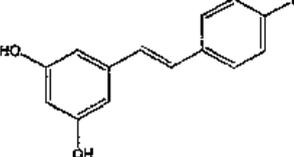
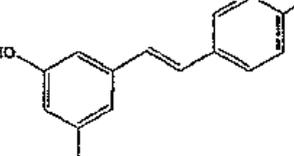
Compuesto	Bencilfosfonato	Aldehído	Estructura
BML-217 (3,5-dihidroxi-4'-cloro- <i>trans</i> -estilbena)	3-5-dimetoxi-bencilfosfonato de dietilo	4-clorobenzaldehído	
Resveratrol (3,5,4'-trihidroxi- <i>trans</i> -estilbena)	N/A	N/A	
Pinosilvina (3,5-dihidroxi- <i>trans</i> -estilbena)	Fosfonato de dietilbencilo	3,5-dimetoxi-benzaldehído	
BML-225 (3,5-dihidroxi-4'-etil- <i>trans</i> -estilbena)	3-5-dimetoxi-bencilfosfonato de dietilo	4-etilbenzaldehído	
BML-212 (3,5-dihidroxi-4'-fluoro- <i>trans</i> -estilbena)	4-fluorobencil-fosfonato de dietilo	3,5-dimetoxi-benzaldehído	
BML-228 (3,5-dihidroxi-4'-metil- <i>trans</i> -estilbena)	3-5-dimetoxi-bencilfosfonato de dietilo	4-metilbenzaldehído	

Figura 30.

Tabla 15. Compuestos Intermedios Sintéticos Análogos de Resveratrol

Compuesto	Bencilfosfonato	Aldehído	Estructura
BML-232 (3,5-dihidroxi-4'-azido- <i>trans</i> -estilbeno)	4-azido-bencilfosfonato de dietilo	3,5-dimetoximetoxi benzaldehído	
BML-230 (3,5-dihidroxi-4'-tiometil- <i>trans</i> -estilbeno)	4-metiltio-bencilfosfonato de dietilo	3,5-dimetoximetoxi benzaldehído	
BML-229 (3,5-dihidroxi-4'-nitro- <i>trans</i> -estilbeno)	3-5-dimetoxiibencil fosfonato de dietilo	4-nitrobenzaldehído	
BML-231 (3,5-dihidroxi-4'-isopropil- <i>trans</i> -estilbeno)	3-5-dimetoxiibencil fosfonato de dietilo	4-isopropil benzaldehído	
3,5-dihidroxi-4'-metoxi- <i>trans</i> -estilbeno	N/A	N/A	

Figura 31

Tabla 16. Compuestos Intermedios Sintéticos Análogos de Resveratrol

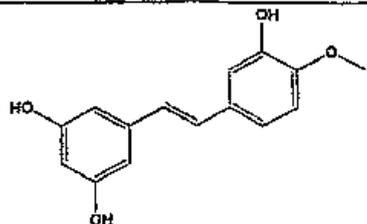
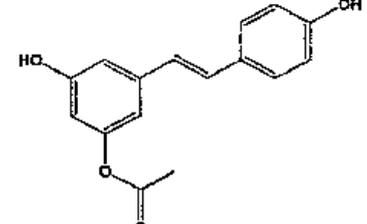
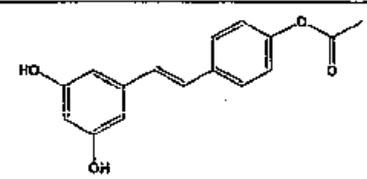
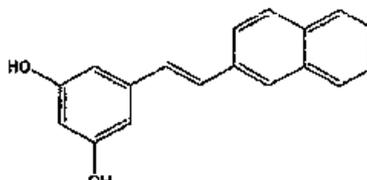
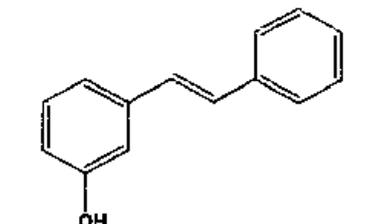
Compuesto	Bencilfosfonato	Aldehído	Estructura
Ranpolin aglicona (3,5,3'-trihidroxi-4'-metoxi- <i>trans</i> -estilbeno)	N/A	N/A	
BML-227 (3,4'-dihidroxi-5-acetoxi- <i>trans</i> -estilbeno)	N/A	N/A	
BML-221 (3,5-dihidroxi-4'-acetoxi- <i>trans</i> -estilbeno)	N/A	N/A	
BML-218 (E)-1-(3,5-dihidroxifenil)-2-(2-naftil) eteno	3-5-dimetoxibencil fosfonato de dietilo	2-naftaldehído	
BML-216 3-hidroxiestilbeno	Fosfonato de bencilo	3-metoxi benzaldehído	

Figura 32

Tabla 17. Compuestos Intermedios Sintéticos Análogos de Resveratrol

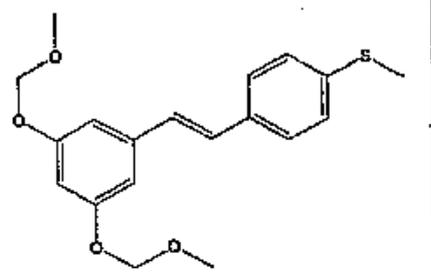
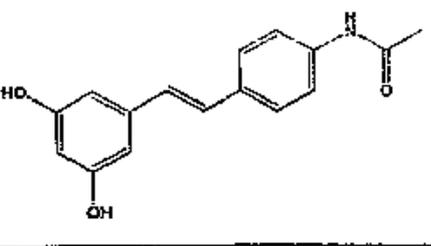
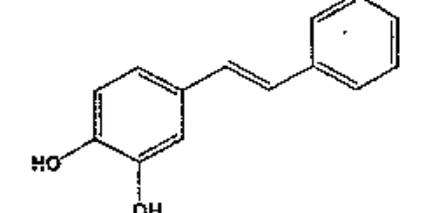
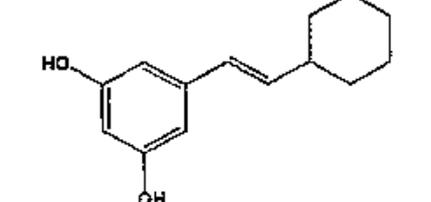
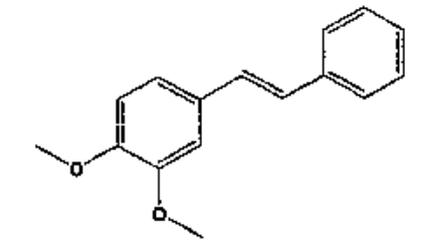
Compuesto	Bencilfosfonato	Aldehído	Estructura
BML-226 (3,5-dimetoxi-4'-tiometil- <i>trans</i> -estilbeno)	4-metiltiobencil fosfonato de dietilo	3,5-dimetoximetoxi benzaldehído	
BML-222 (3,5-dihidroxi-4'-acetamida- <i>trans</i> -estilbeno)	4-acetamidobencil fosfonato de dietilo	3,5-dimetoximetoxi benzaldehído	
BML-215 3,4-dihidroxi- <i>trans</i> -estilbeno	Bencilfosfonato	3,4-dimetoximetoxi benzaldehído	
BML-224 (E)-1-(3,5-dihidroxifenil)-2-(ciclohexil) eteno	3,5-dimetoxibencil fosfonato	Ciclohexano carboxamida	
3,4-dimetoxi- <i>trans</i> -estilbeno	Bencilfosfonato	3,4-dimetoxi benzaldehído	

Figura 33

Tabla 18. Compuestos Intermedios Sintéticos Análogos de Resveratrol

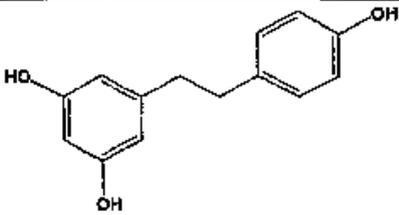
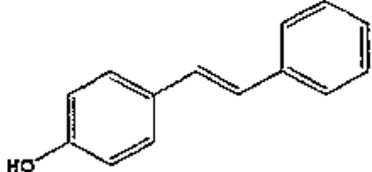
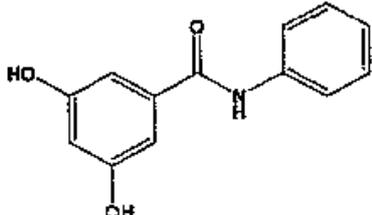
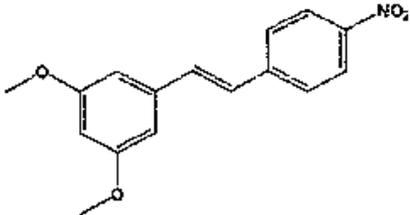
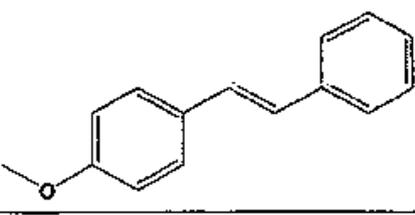
Compuesto	Bencilfosfonato	Aldehído	Estructura
Dihidroresveratrol (1-(3,5-dihidroxifenil)- 2-(4-hidroxifenil) etano)	N/A	N/A	
BML-214 4-hidroxí- <i>trans</i> - estilbeno)	Bencilfosfonato	4-metoxi benzaldehído	
BML-219 <i>N</i> -fenil-(3,5-dihidroxi) benzamida	N/A	N/A	
3,5-dihidroxi- 4'-nitro- <i>trans</i> - estilbeno	3,5-dimetoxi bencilfosfonato	4-nitrobenzaldehído	
4-metoxi- <i>trans</i> - estilbeno	Bencilfosfonato	4-metoxi benzaldehído	

Figura 34

Tabla 20

hembra

Ensayo	Genotipo	Dieta	Tratamiento	N(0)	Tiempo de vida Mediano		Test Loc-Rank			
					% cambio †	dias	χ ²	p-rrb		
1	Canton-S	15% SY	control	159	35	34.5	0.83			
			10µM Resv	203	45	28.6	43.2	0.73	53.8 <0.0001	
			100µM Resv	189	41	17.1	41.8	0.75	34.2 <0.0001	
			200µM Resv	189	36	2.9	36.6	0.65	0.14 0.71	
			control	198	66	63.6	0.93			
			10µM Resv	203	63	-4.5	60	0.9	11.2 0.0308	
		5% SY	100µM Resv	194	60	-9.1	60.8	0.87	8.7 0.0032	
			200µM Resv	202	66	0.0	63.9	0.99	0.99 0.32	
			3% CSY	control	80	29	30.5	1.2		
				10µM Resv	93	32	10.3	34.6	1.1	5.5 0.019
				100µM Resv	100	36	24.1	39	1.3	19.7 <0.0001
			2	YW	2% CSY	control	106	36	37.9	1.3
10µM Resv	103	36				0.0	38.6	1.1	0.65 0.42	
100µM Resv	127	37				2.8	38.4	1.2	0.003 0.95	
control	237	43				45.3	0.8			
10µM Resv	223	47				9.3	46.5	0.78	0.16 0.69	
100µM Resv	274	51				18.6	50.7	0.81	28.7 <0.0001	
3% CSY	10µM Fisetina	305			43	0.0	42.9	0.81	1.85 0.17	
	100µM Fisetina	288			53	23.3	48.6	0.76	10.3 0.0013	
	2% CSY	control			311	47	47.4	0.82		
		10µM Resv			456	53	12.8	48.7	0.66	2.45 0.118
		100µM Resv			380	43	-6.5	43.2	0.74	21.5 <0.0001
		10µM Fisetina			307	45	-4.3	47	0.82	0.11 0.737
100µM Fisetina		360	46	-2.1	45.9	0.8	3.98 0.046			
control		175	58	53.5	1.2					
4	Pérdida de función de Sir2	15% SY	196	54	-6.9	51.5	1	16.9 <0.0001		
		100µM Resv	185	55	51.7	0.84				
5	homomorfismo de Sir2	15% SY	183	54	-1.8	51.7	0.86	0.29 0.59		
		100µM Resv	184	50	47	1.1				
6	homomorfismo de Sir2	15% SY	184	52	4.0	49.1	1.2	10.9 0.0009		
		100µM Resv	173	52	4.0	50.2	1	6.98 0.0083		
		200µM Resv	141	48	-4.0	43.3	1.6	7.23 0.027		
		control	194	62	59.2	1.3				
7	homomorfismo de Sir2	15% SY	199	72	16.1	67.7	1.1	26.1 <0.0001		
		100µM Resv	195	63	1.6	59.3	1.5	1.62 0.202		
		200µM Resv	186	73	17.7	67	1.2	22.1 <0.0001		

† porcentaje de cambio es con relación a control
 En **Itálica**: disminución en tiempo de vida en criterio de significancia; p < 0.05
 En **Negrita**: aumento en tiempo de vida en criterio de significancia; p < 0.05
 CSY: dieta: harina de maíz-azúcar-levadura

Figura 34

Tabla 20 (cont.)

Ensayo	Genotipo	Dieta	Tratamiento	Tiempo de vida Mediano		Tiempo de vida Medio		Test Loc-Rank	
				W(t)	días	% cambio †	días	s.e.	X 2
1	Canton-S	15% SY	control	189	51	47.4	0.51	17.8	<0.0001
			10µM Resv	182	56	7.7	0.11	0.8	0.383
			100µM Resv	188	53	1.9	0.9	0.0	0.838
			200µM Resv	198	49	-5.8	0.95	0.0	0.838
			control	180	67	67.9	0.93	7.0	0.0081
			10µM Resv	180	66	-1.5	1.1	3.2	0.07
		3% CSY	10µM Resv	179	70	4.5	0.85	5.4	0.02
			100µM Resv	174	70	4.5	0.91	1.1	1.1
			control	113	38	40.1	1.1	3.8	0.053
			10µM Resv	98	40	5.3	1.2	15.4	<0.0001
			100µM Resv	118	49	28.9	1.2	1.2	1.2
			control	118	41	42.7	1.2	1.3	1.3
2	Yw	2% CSY	10µM Resv	102	43	4.9	1.3	1.3	0.26
			100µM Resv	100	51	24.4	1.6	21.7	<0.0001
			control	210	55	53.5	1.2	14.0	0.0002
			10µM Resv	218	65	18.2	1.3	38.7	<0.0001
			100µM Resv	208	64	16.4	0.97	0.0	0.958
			10µM Fisetina	204	50	-9.1	1	37.2	<0.0001
		3% CSY	100µM Fisetina	285	67	21.8	0.94	1.6	1.6
			control	168	64	61.7	1.1	24.5	<0.0001
			100µM Resv	166	61	-4.7	0.94	1.6	0.21
			control	168	38	39.4	0.72	42.8	<0.0001
			10µM Resv	284	58	-5.2	1	7.8	0.0052
			100µM Resv	290	48	-17.2	0.88	17.1	<0.0001
3	Yw	2% CSY	10µM Fisetina	274	54	-6.9	0.99	1	1
			100µM Fisetina	290	52	-10.3	1	1	1
			control	168	64	61.7	1.1	1.1	1.1
			100µM Resv	166	61	-4.7	0.94	24.5	<0.0001
			control	168	38	39.4	0.72	1.6	0.21
			100µM Resv	177	40	5.3	0.78	1.6	0.21
		15% SY	control	167	53	50.1	1.2	6.4	0.0037
			10µM Resv	152	59	11.3	1.1	10.8	0.001
			100µM Resv	163	59	13.3	1	2.4	0.125
			200µM Resv	139	54	1.8	1.5	0.85	0.85
			control	172	68	67.2	0.85	7.9	0.005
			10µM Resv	185	74	6.8	1.2	0.4	0.507
15% SY	100µM Resv	171	69	1.5	1.3	14.3	0.0002		
	200µM Resv	176	73	7.4	0.94	1.3	1.3		
	control	176	73	7.4	0.94	1.3	1.3		
	10µM Resv	185	74	6.8	1.2	1.3	1.3		
	100µM Resv	171	69	1.5	1.3	1.3	1.3		
	200µM Resv	176	73	7.4	0.94	1.3	1.3		

† porcentaje de cambio con relación a control
 En Itálica: disminución en tiempo de vida en criterio de significancia: p < 0,01
 SY: dieta: azúcar-levadura CSY: dieta: harina maiz-azúcar-levadura

Figura 35A

Tabla 21. Activadores de Sirtuina

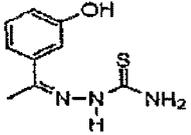
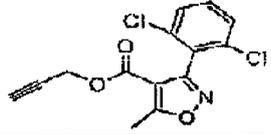
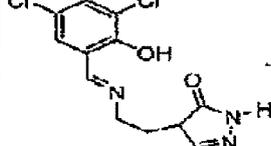
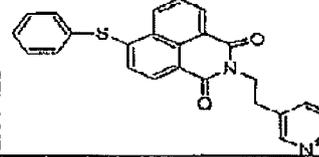
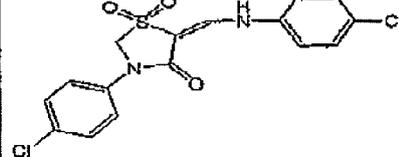
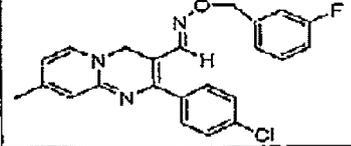
Compuesto	Activación múltiple	Estructura	Incluida en fórmula número
2-[1-(2-hidroxifenil)etiliden] hidrazina-1-carbotioamida	1,1		32
3-(2,6-diclorofenil)-5-metil-isoxazolo-4-carboxilato de prop-2-inoilo	1,1		33
4-[3-[(3,5-dicloro-2-hidroxibenciliden)aminopropil] 4,5-dihidro-1H-pirazol-5-ona	1,2		34
6-(feniltio)-2-[2-(2-piridil)etil]-2,3-dihidro-1H-venzo[de]isoquinolina-1,3-dieno	1,15		35
5-[(4-cloroanilino)metilen]-3-(4-clorofenil)-1lambda-6-3-tiazolano-1,1,4-triona	1,15		36
2-(4-clorofenil)-7-metilimidazo[1,2-a]piridina-3-carbaldehído O-(3-fluorobencil)oxima	1,1		37

Figura 35B

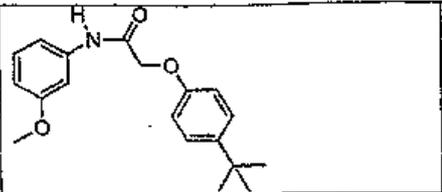
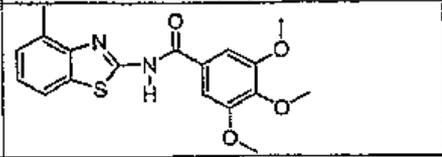
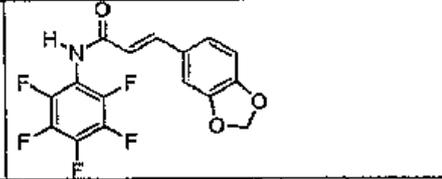
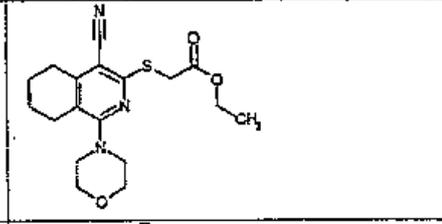
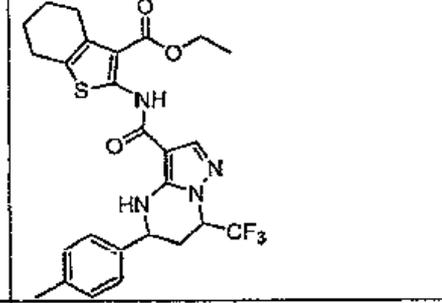
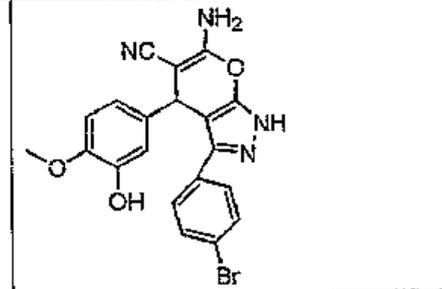
<p>2-(4-terc.-butilfenoxi)-N-(3-metoxifenil)acetamida</p>	<p>1.12</p>		<p>38</p>
<p>3,4,5-trimetoxi-N-(4-metil-1,3-benzotiazol-2-il)benzamida</p>	<p>1.12</p>		<p>39</p>
<p>3-(1,3-benzodioxal-5-il)-N-(pentafluorofenil)acrilamida</p>	<p>1.09</p>		<p>40</p>
<p>[(4-ciano-1-morfolin-4-il-5,6,7,8-tetrahidro-isoquinolin-3-il)tio] acetato de etilo</p>	<p>1.11</p>		<p>41</p>
<p>2-([5-(4-metilfenil)-7-(trifluorometil)-4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]carbonil)amino-4,5,6,7-tetrahidro-1-benzotiofen-3-carboxilato de etilo</p>	<p>1.1</p>		<p>42</p>
<p>6-amino-3-(4-bromofenil)-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-1,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrilo</p>	<p>1.1</p>		<p>43</p>

Figura 35C

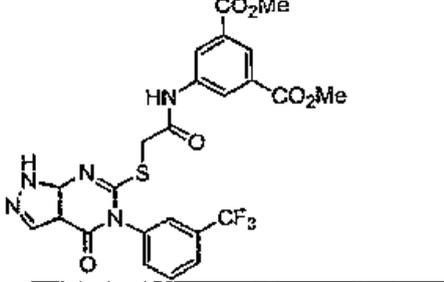
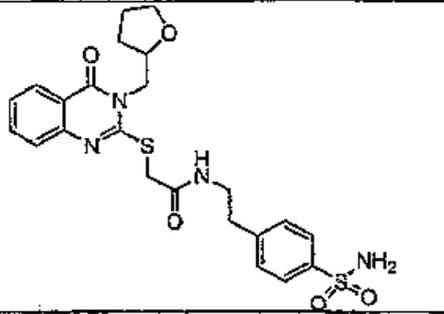
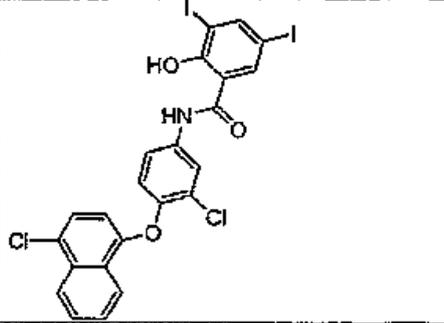
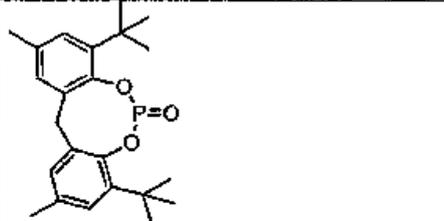
<p>5-((4-oxo-5-[3-(trifluormetil)fenil]-4,5-dihidro-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-il)tio)actil]amino]isofalato de dimetilo</p>	1.08		44
<p>N-[2-[4-(aminosulfonyl)fenil]etil]-2-[[4-oxo-3-(tetrahidrofuran-2-ilmetil)-3,4-dihidroquinazolin-2-il]tio]acetamida</p>	1.05		45
<p>N-(3-cloro-4-[(4-cloro-1-naftil)oxi]fenil]-2-hidroxi-3,5-diyodobenzamida</p>	1.24		46
	1.2		47

Figura 35D

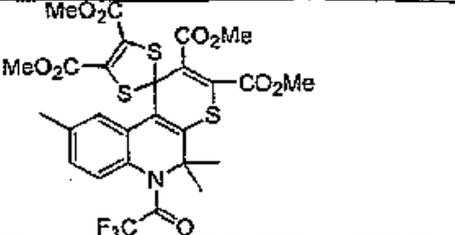
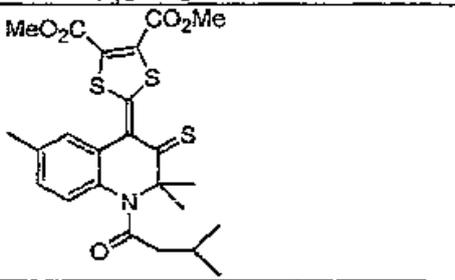
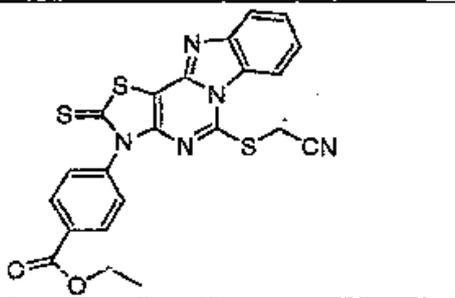
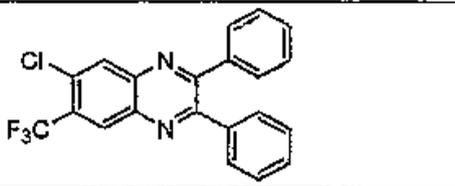
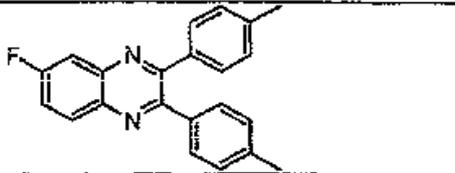
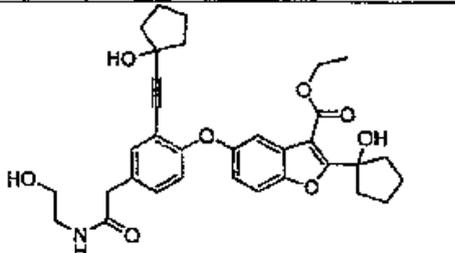
5',5',9'-trimetil-6'-(trifluoroacetil)-5',6'-dihidroespiro[1,3-ditiol-2,1'-tiopirano[2,3-c]quinolina]-2',3',4,5-tetracarboxilato de tetrametilo	1.14		48
2-[2,2,6-trimetil-1-(3-metilbutanoil)-3-tioxo-2,3-dihidroquinolin-4(1H)-iliden]-1,3-ditiol-4,5-dicarboxilato de diemtilo	1.17		49
4-[5-[(cianometil)tio]-2-tioxo[1,3]tiazolo[4',5':4,5]pirimido[1,6-a]bencimidazol-3(2H)-il]benzoato de etilo	1.47		50
6-cloro-2,3-difenil-7-(trifluorometil)quinoxalina	1.12		51
6-fluoro-2,3-bis(4-metilfenil)quinoxalina	1.27		51
	1.1		52

Figura 35E

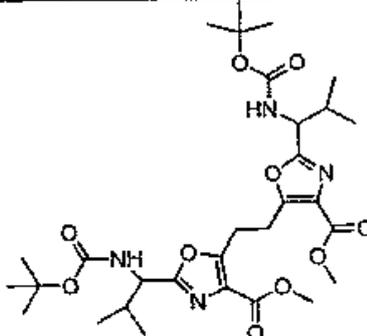
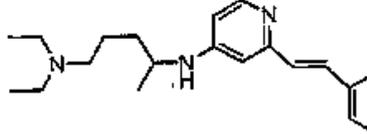
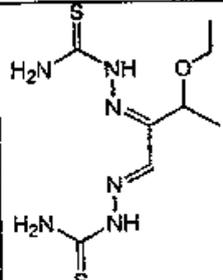
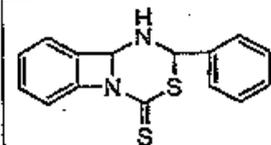
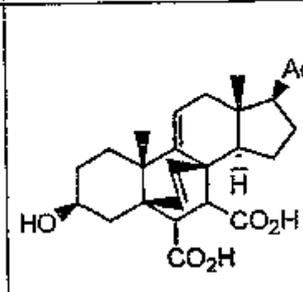
	1.28		53
Piridina, 2-(p-cloroestiril)-4-[[4-(dietilamino)-1-metilbutil]amino]-, (E)-	1.06		54
Gloxazona	1.16		55
	1.25		56
	1.1		57

Figura 35F

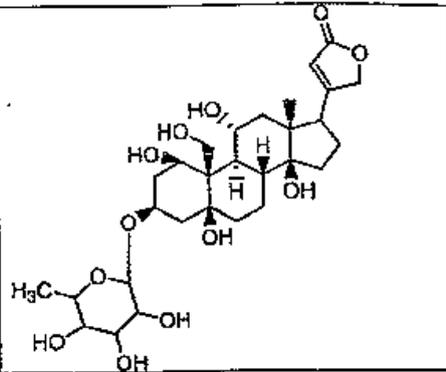
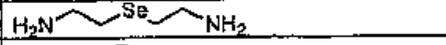
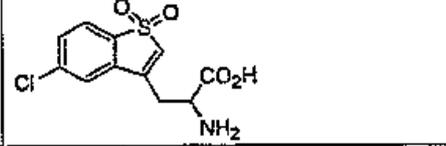
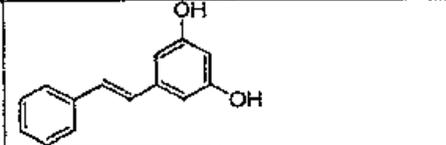
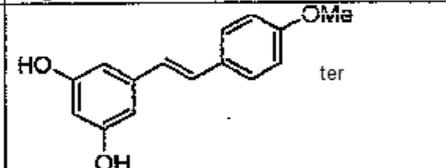
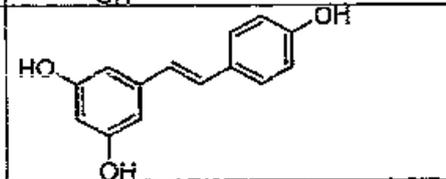
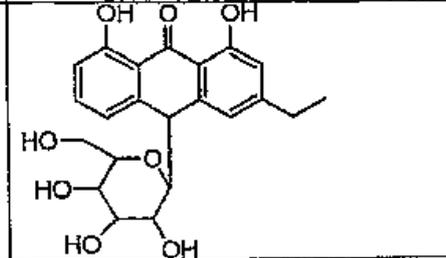
Oubaina	1.07		58
	1.16		59
	1.06		60
Pinosilvina	3.28		61
Resveratrol 4''-metil éter	2.1		1
Resveratrol	2.2		1
Aloína	1.2		62

Figura 35G

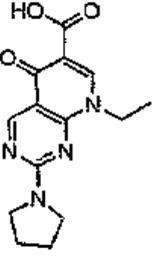
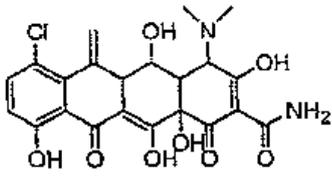
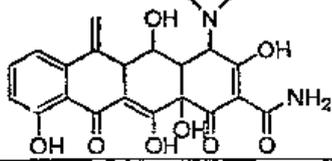
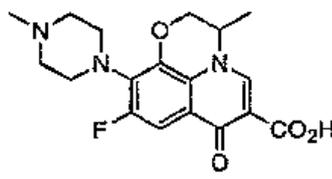
Ácido Piromídico	1.47		63
Sulfosalicilato de meclociclina	1.12		64
Hidrocloruro de metaciclina	1.14		64
Ofloxacina	1.5		65

Figura 36

Tabla 22. Inhibidores de Sirtuina

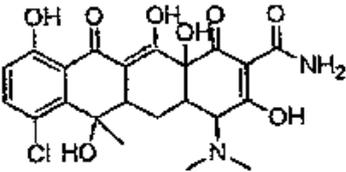
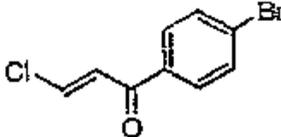
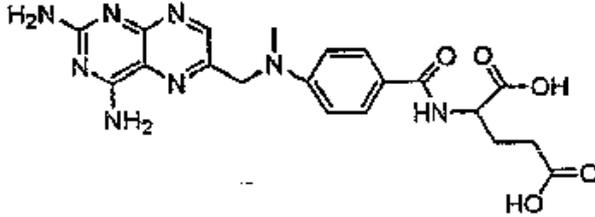
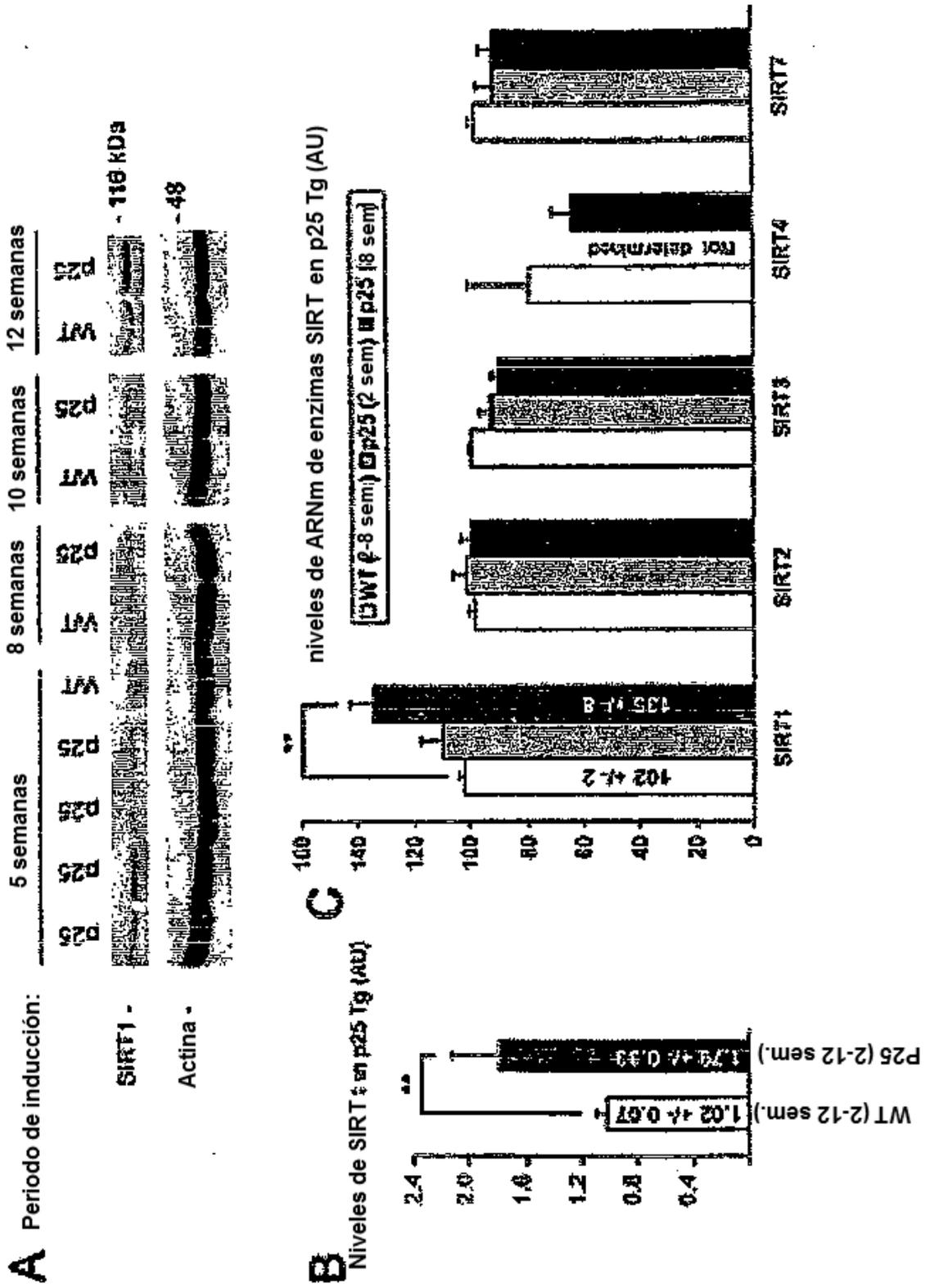
Compuesto	Activación múltiple	Estructura	Incluido en fórmula número
Clortetraciclina	<1	 <p>The structure shows a tetracycline core with a chlorine atom at C4, a methyl group at C5, and an amino group at C7. It features multiple hydroxyl groups at C1, C2, C3, and C6, and a dimethylamino group at C8.</p>	66
	0.27	 <p>The structure is a brominated alpha-chloroacrylate derivative, consisting of a vinyl group with a chlorine atom on the alpha carbon, attached to a carbonyl group, which is further attached to a para-bromophenyl ring.</p>	67
Metotrexano	0.53	 <p>The structure is Methotrexate, featuring a 2,4-diaminopteridine ring system connected via a methylene bridge to a dimethylamino group, which is further attached to a para-phenylene ring. This ring is linked to a methylene group, which is connected to a chiral center bearing a hydroxyl group, an amino group, and a propionic acid side chain.</p>	68

Figura 37



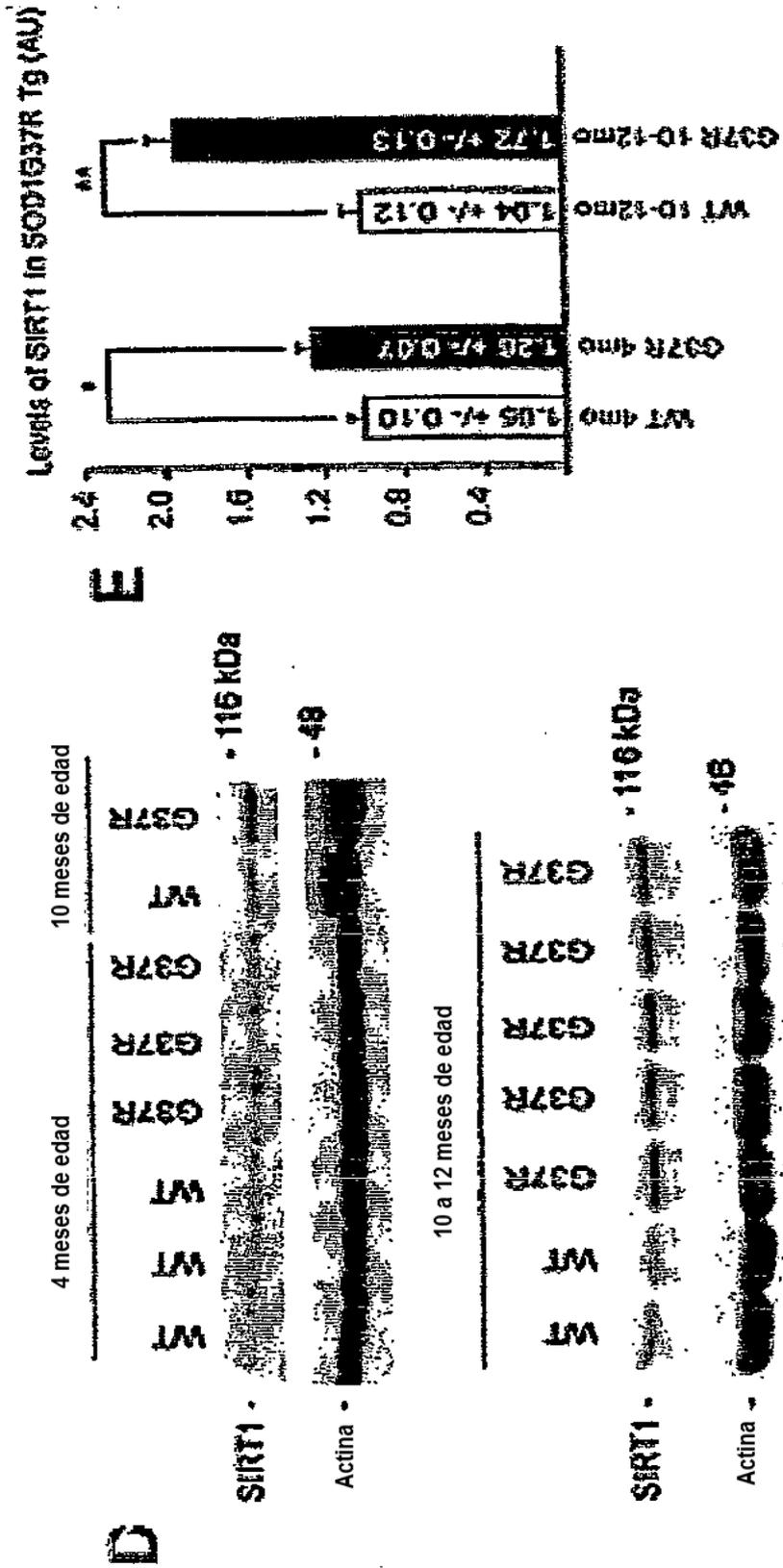


Figura 37

Figura 37

F

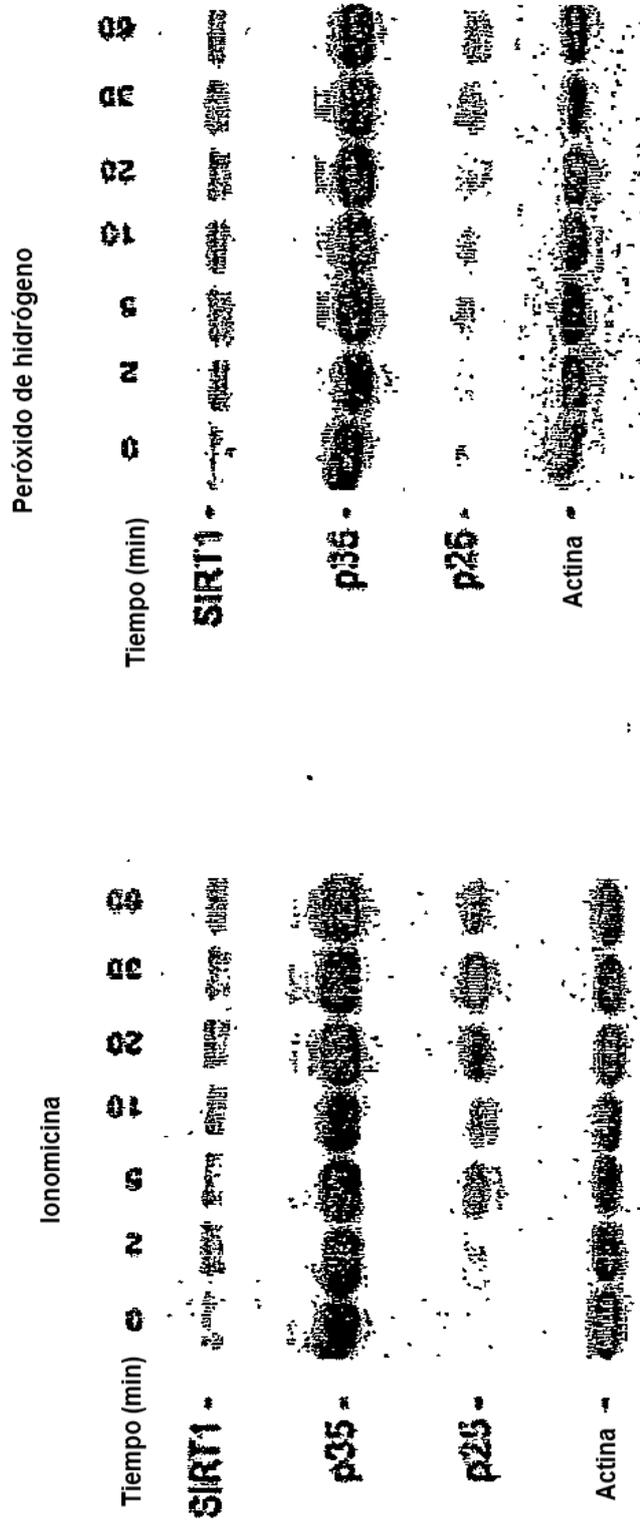


Figura 38

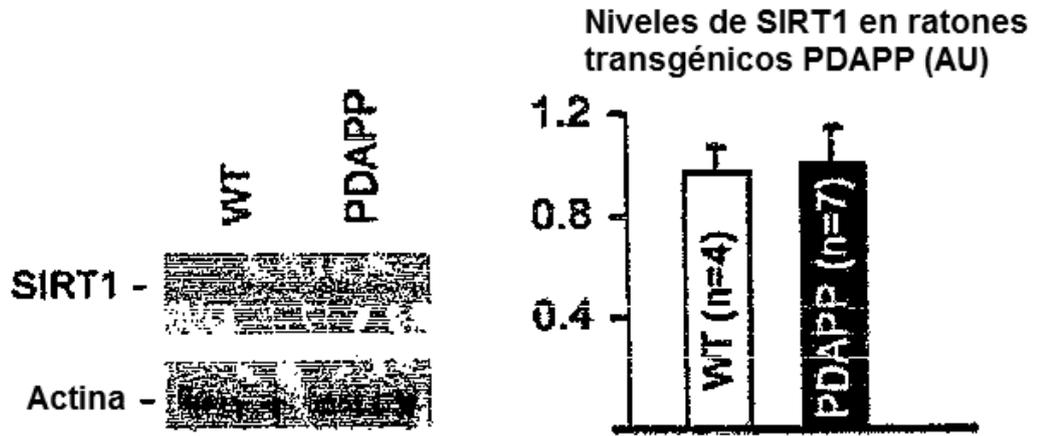


Figura 39

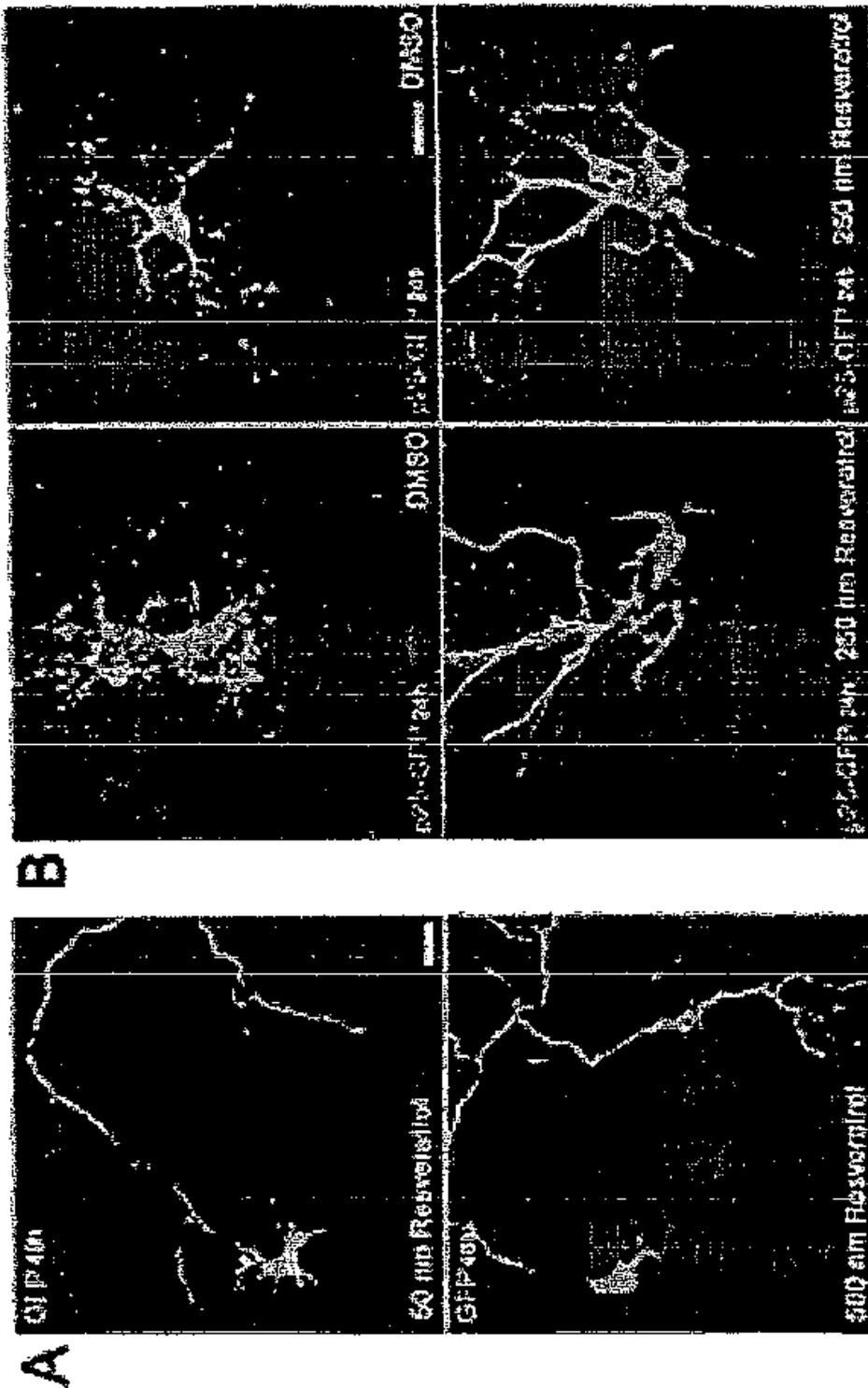
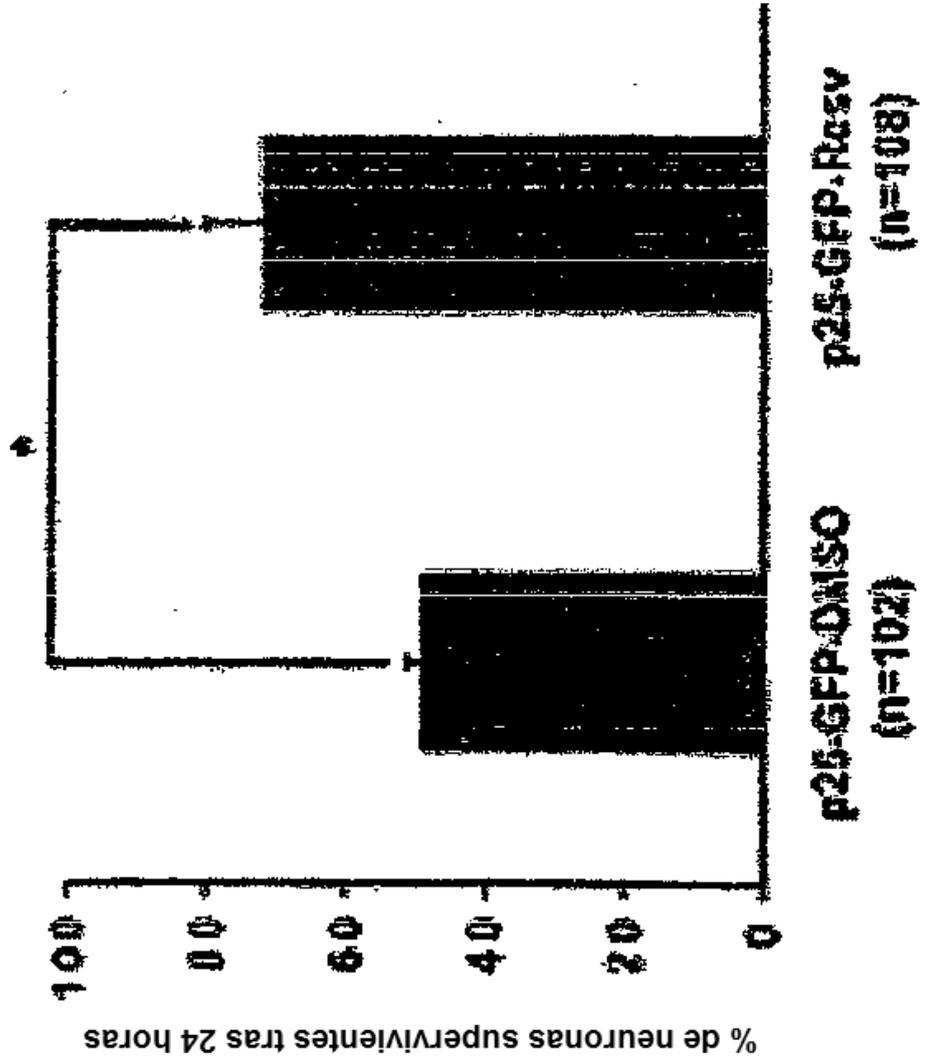


Figura 39

C



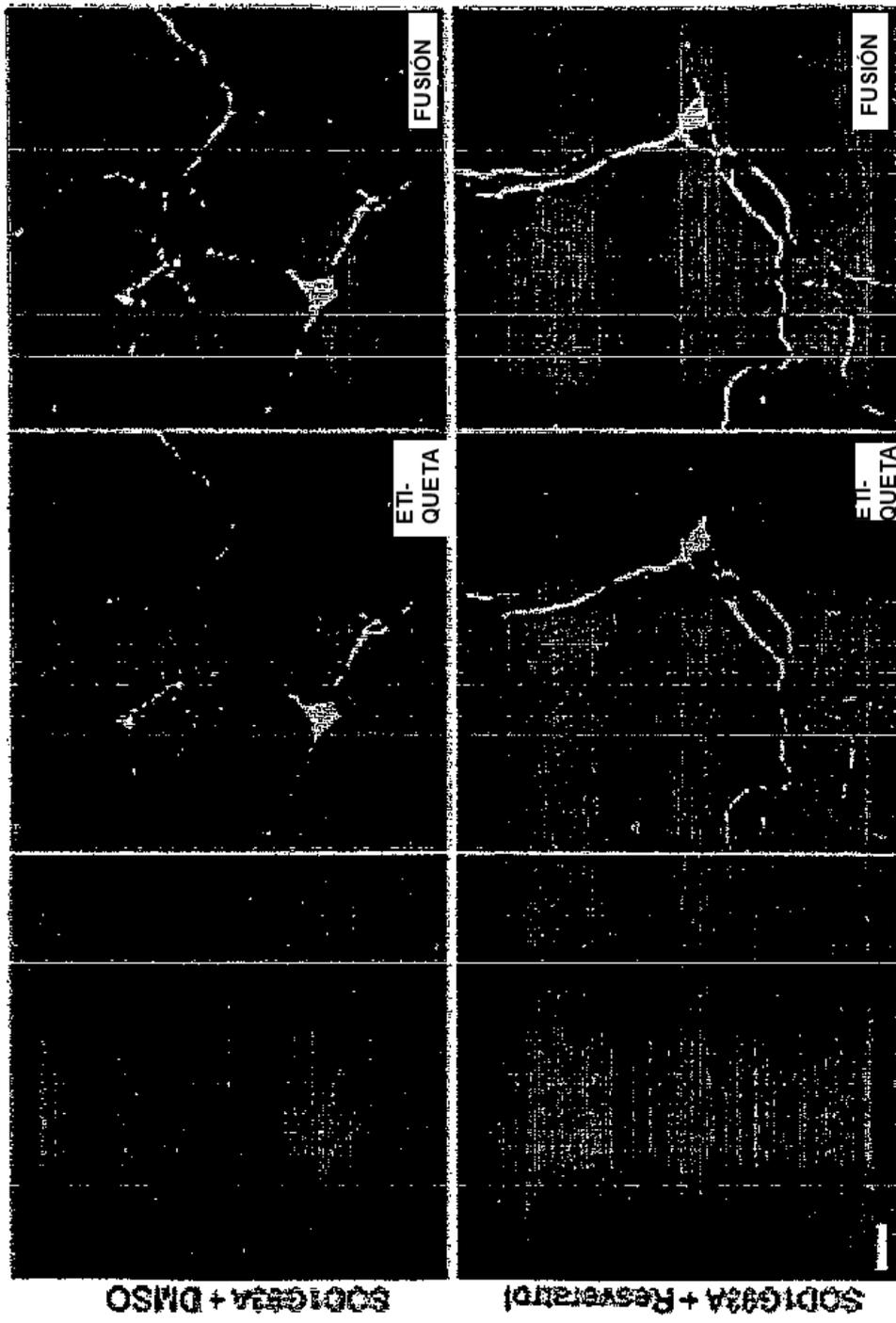


Figura 39

D

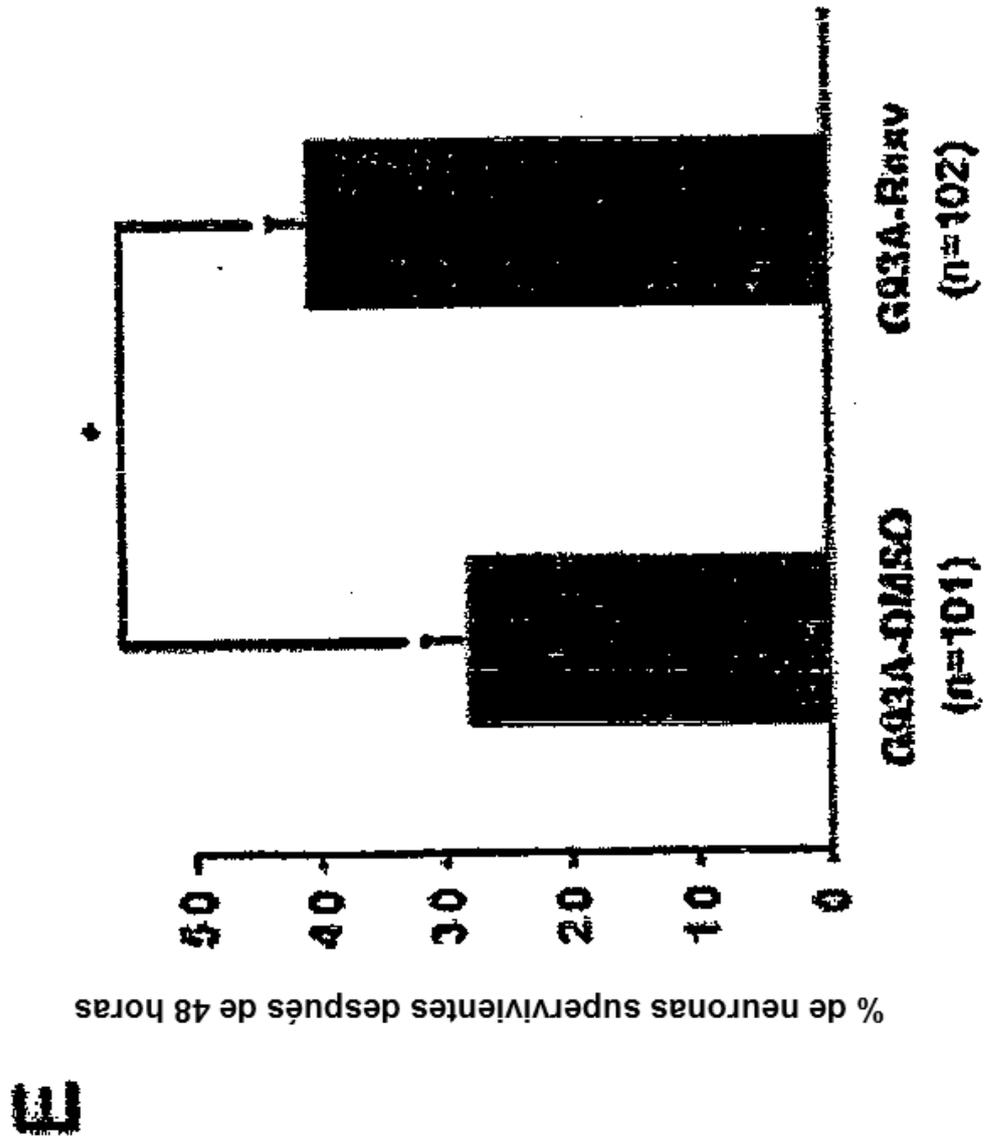


Figura 39

Figura 40

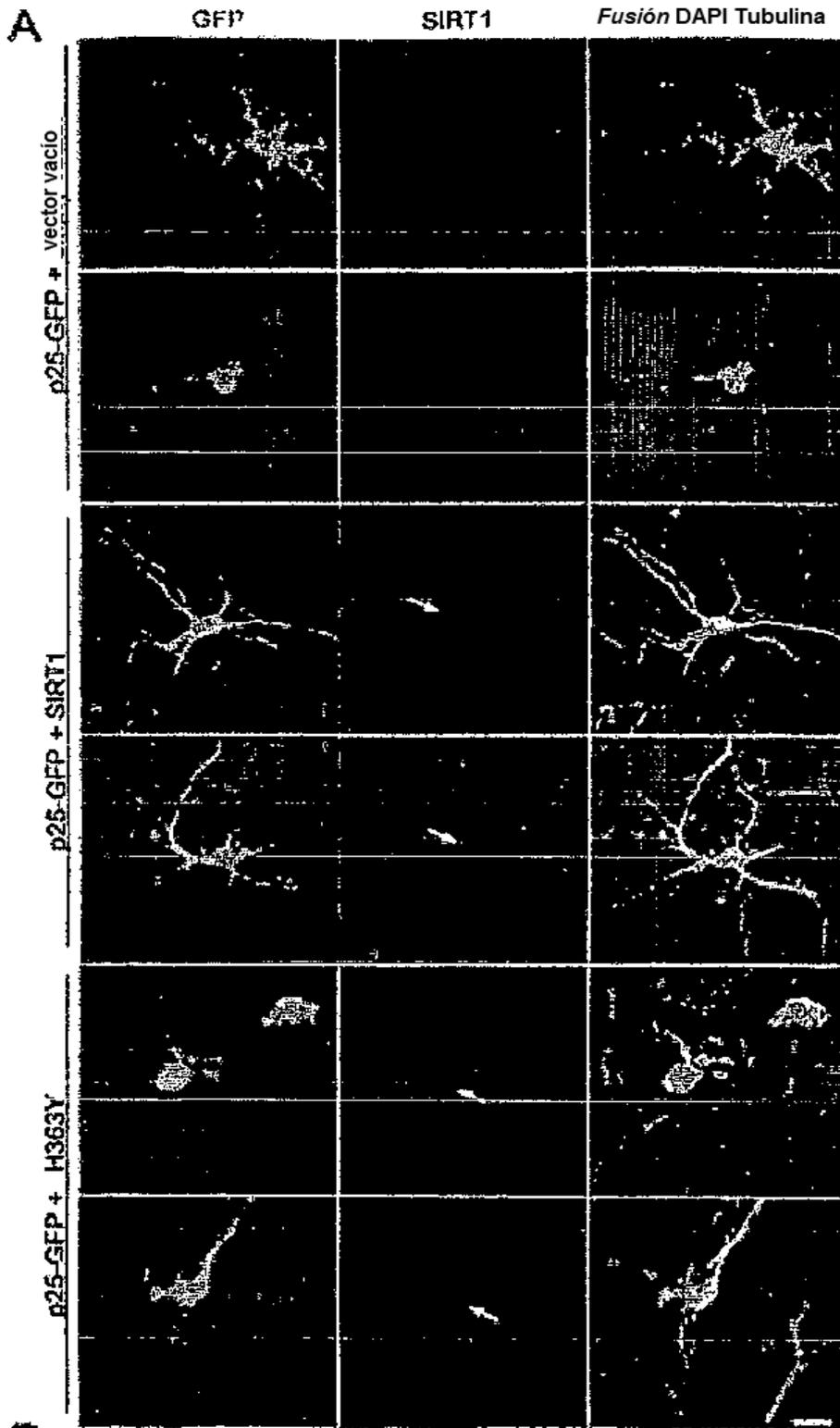
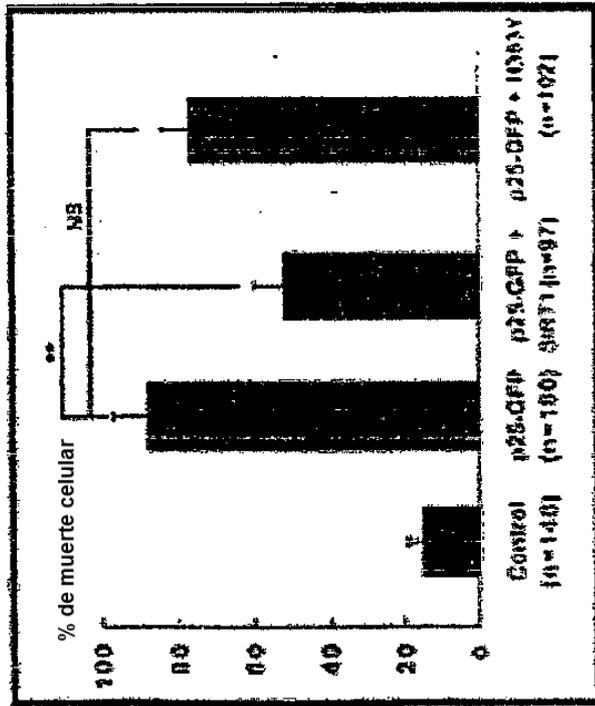
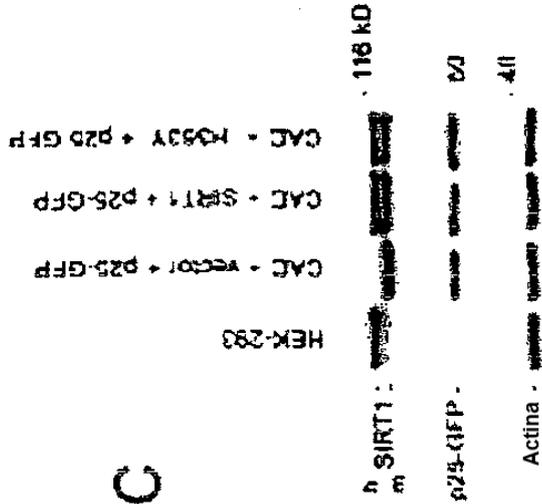


Figura 40

B



C



D

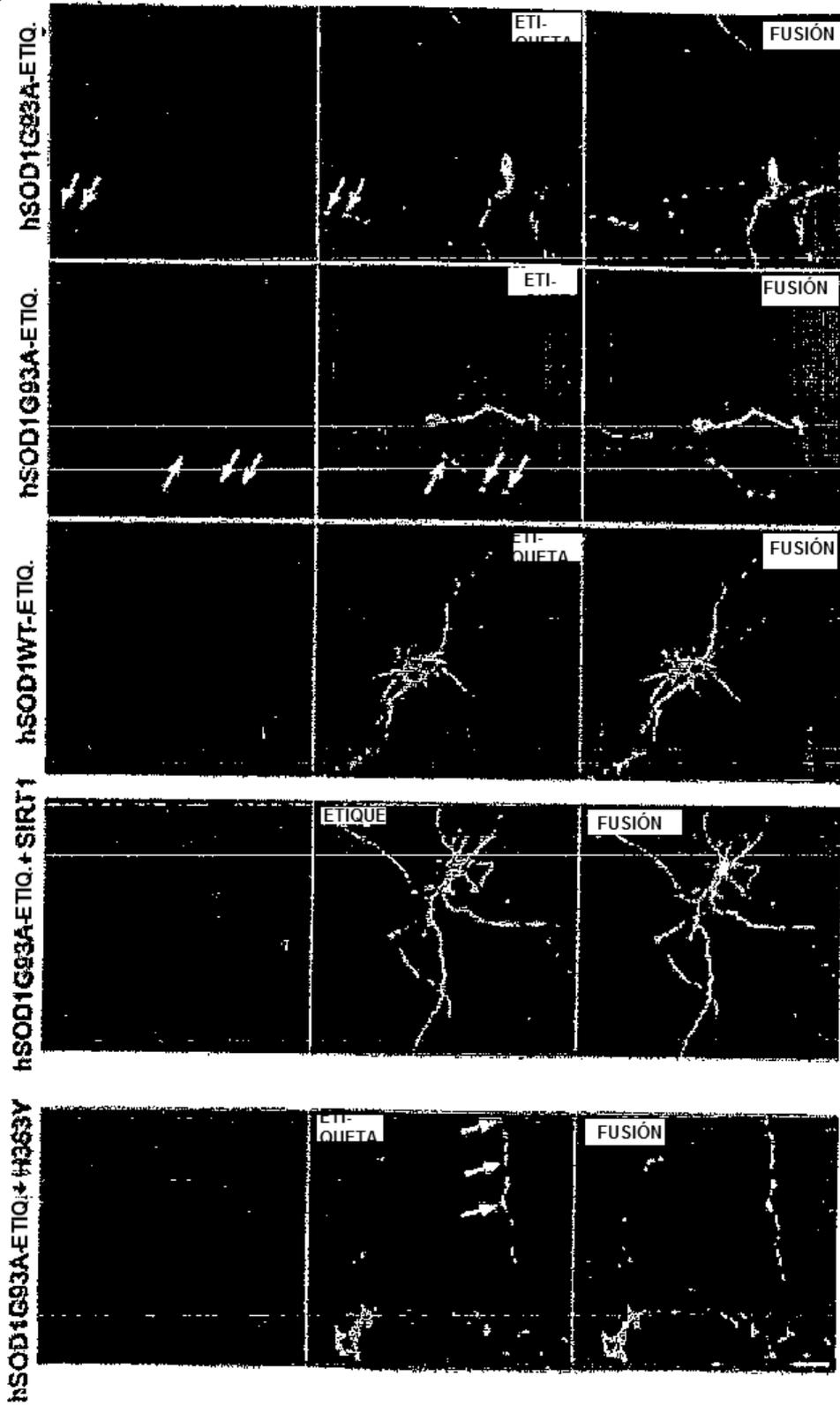


Figura 40E

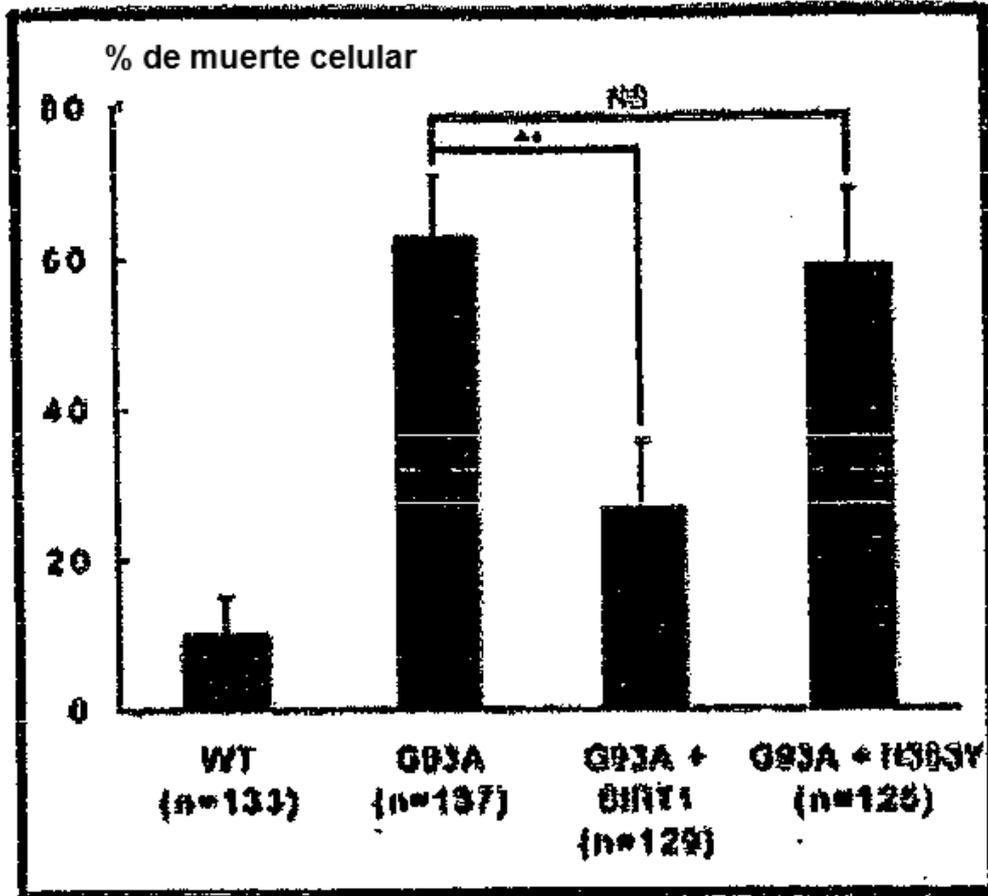


Figura 41

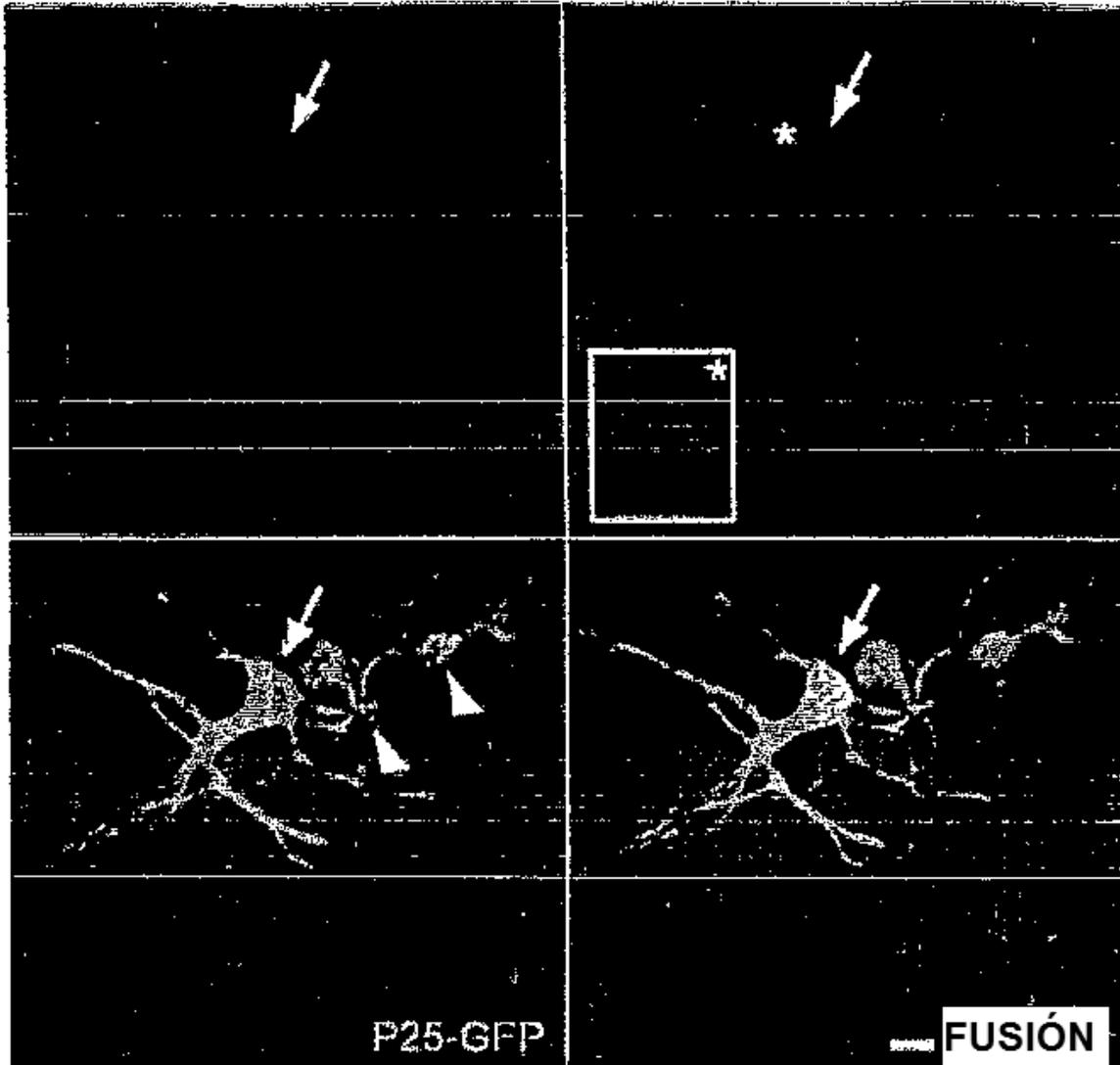
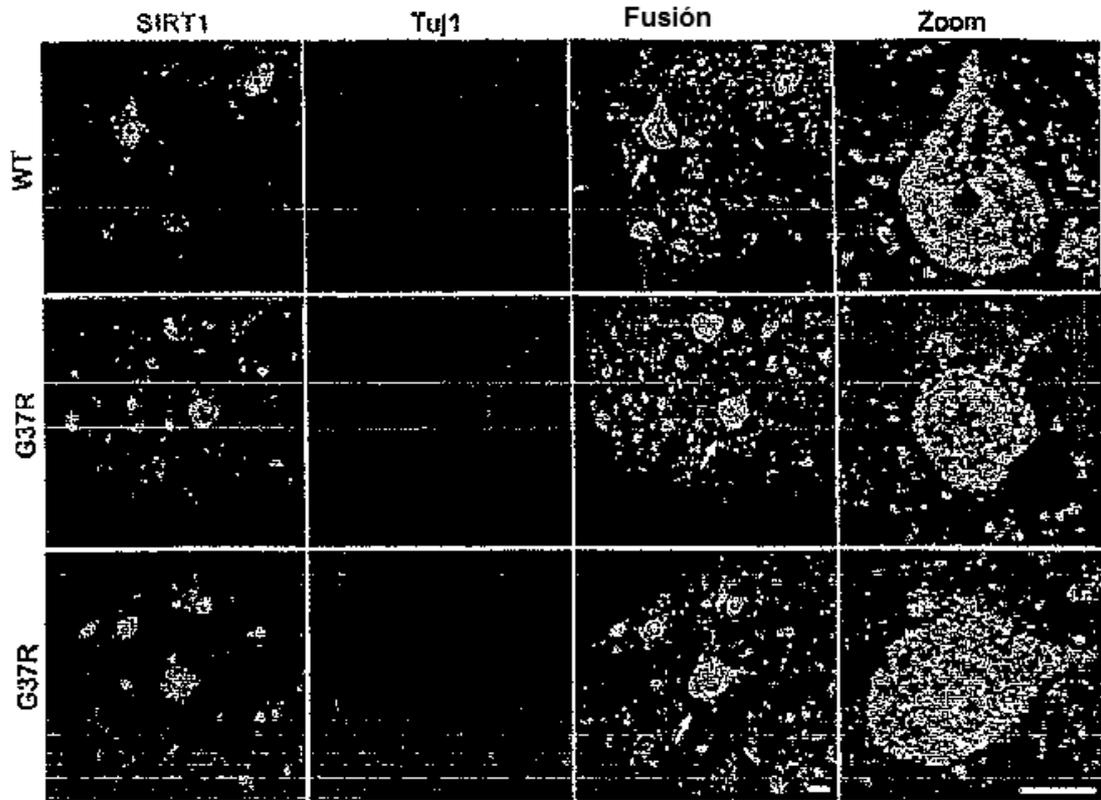


Figure 42



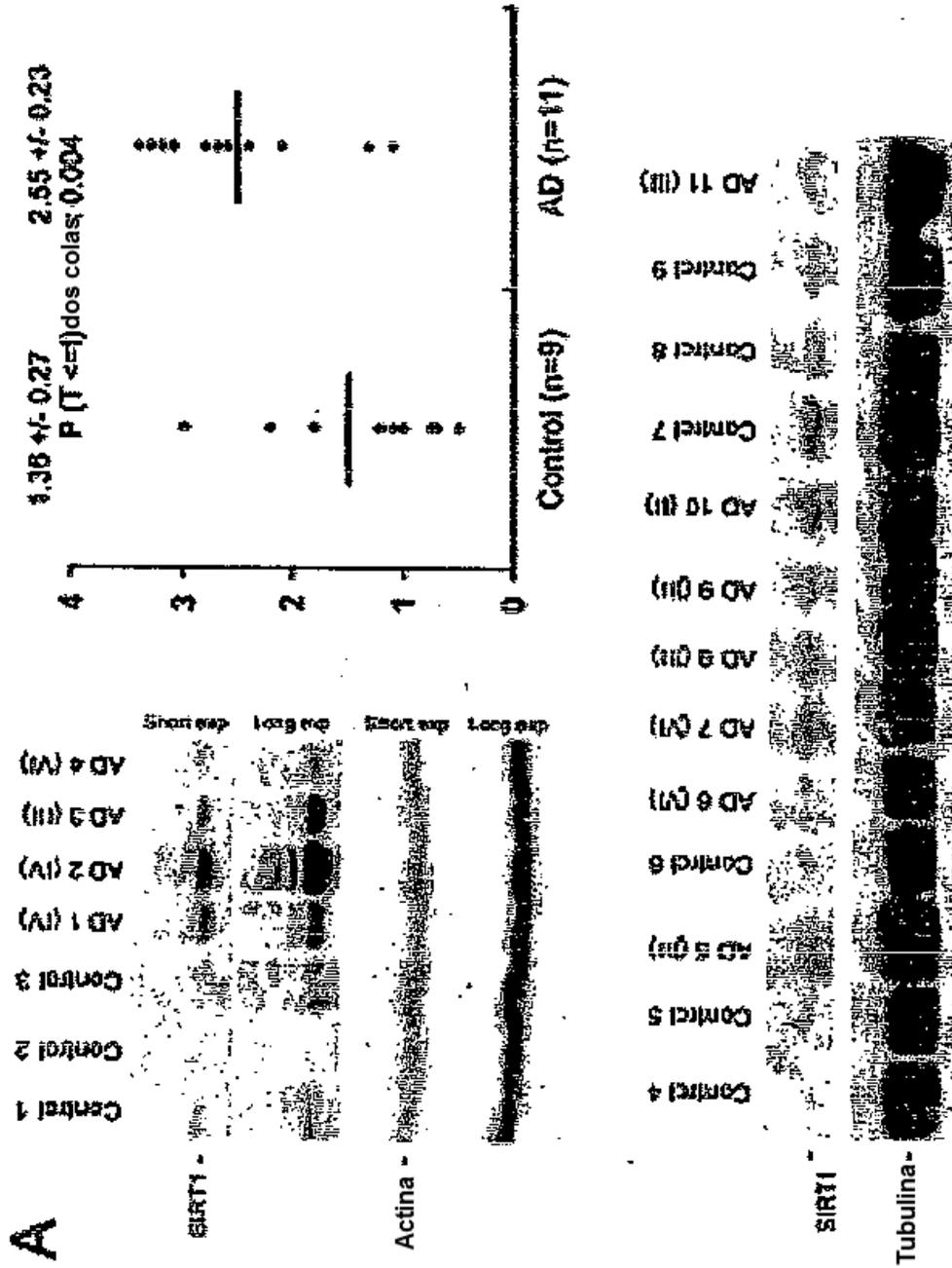


Figura 43

Figura 43

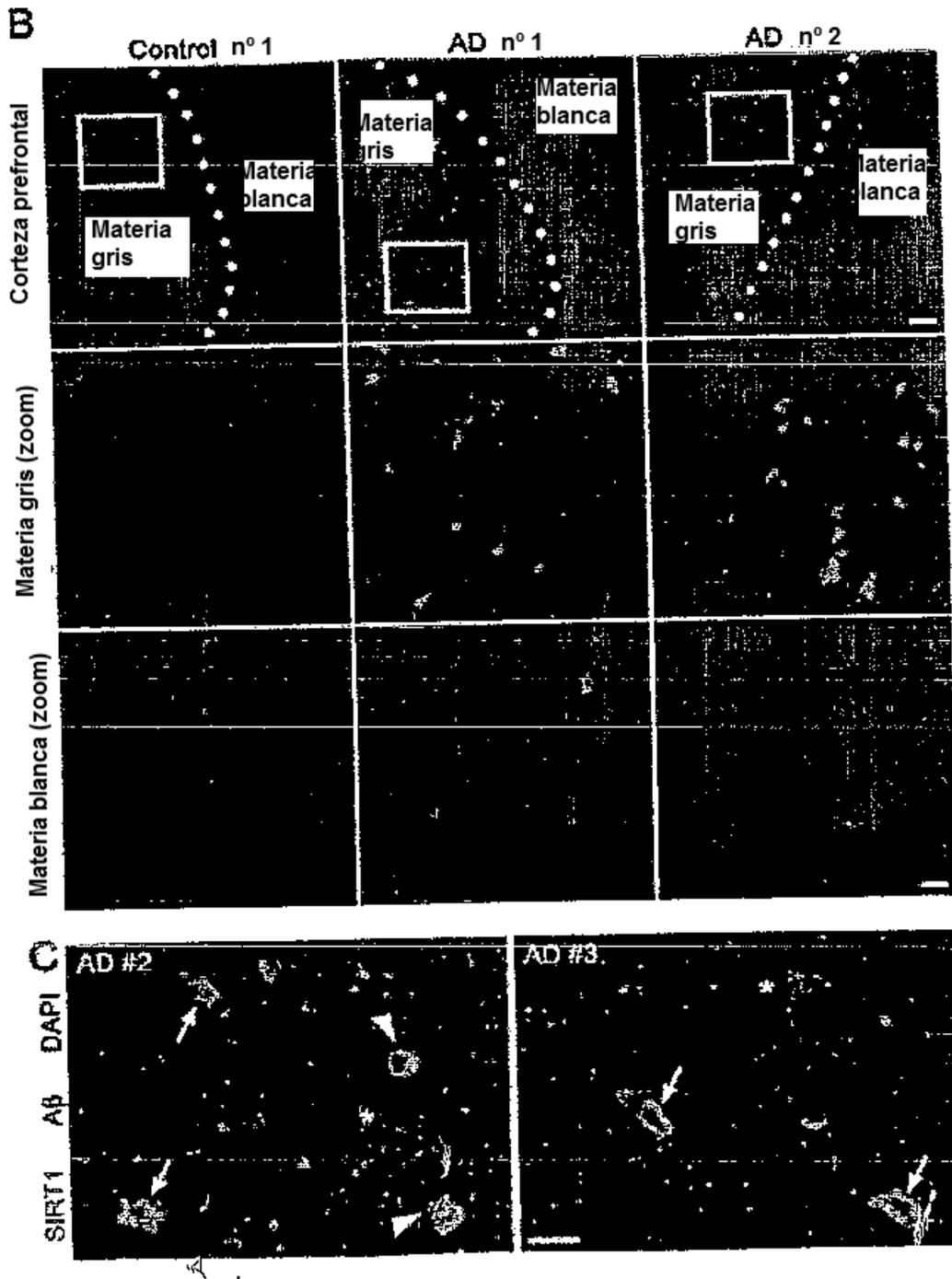


Figura 44

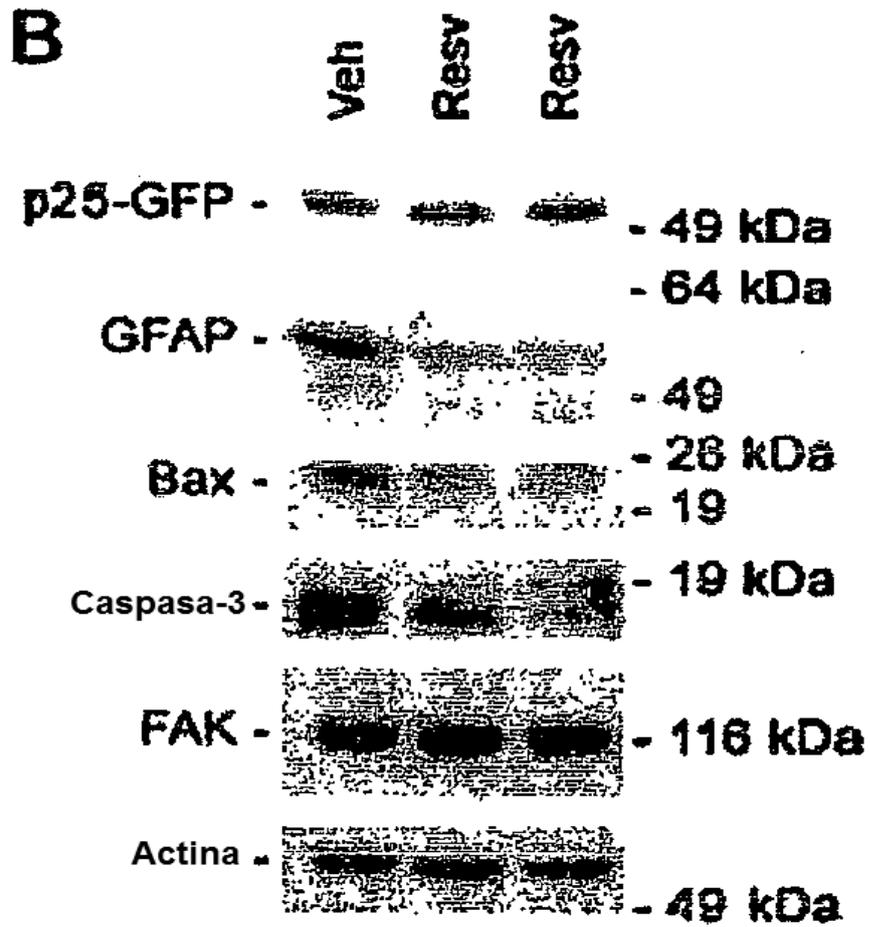
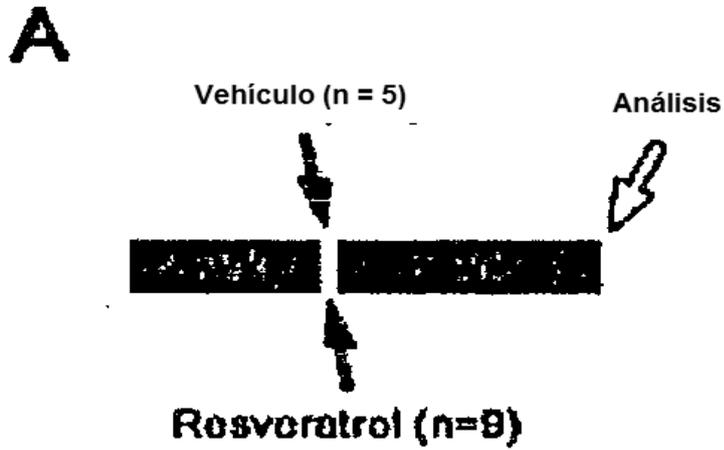


Figura 44

C

GFAP/DAPI

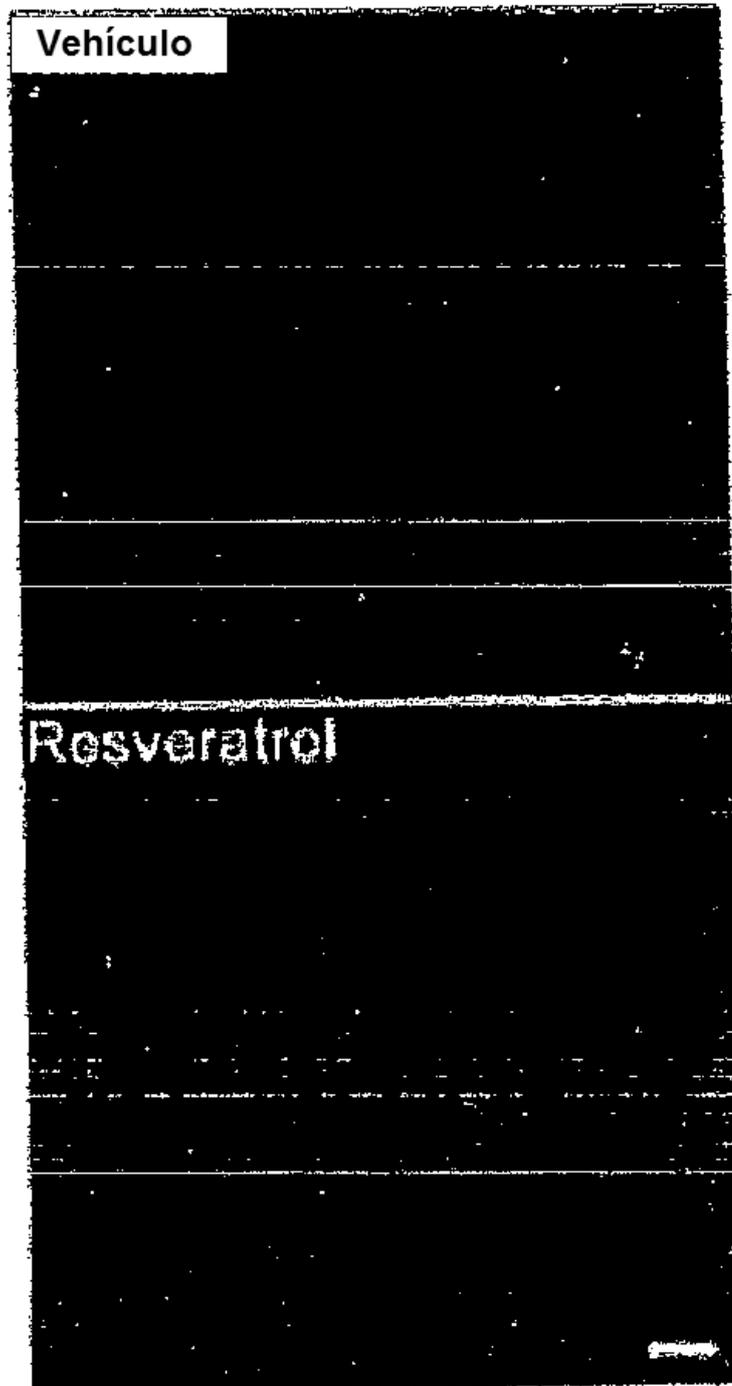
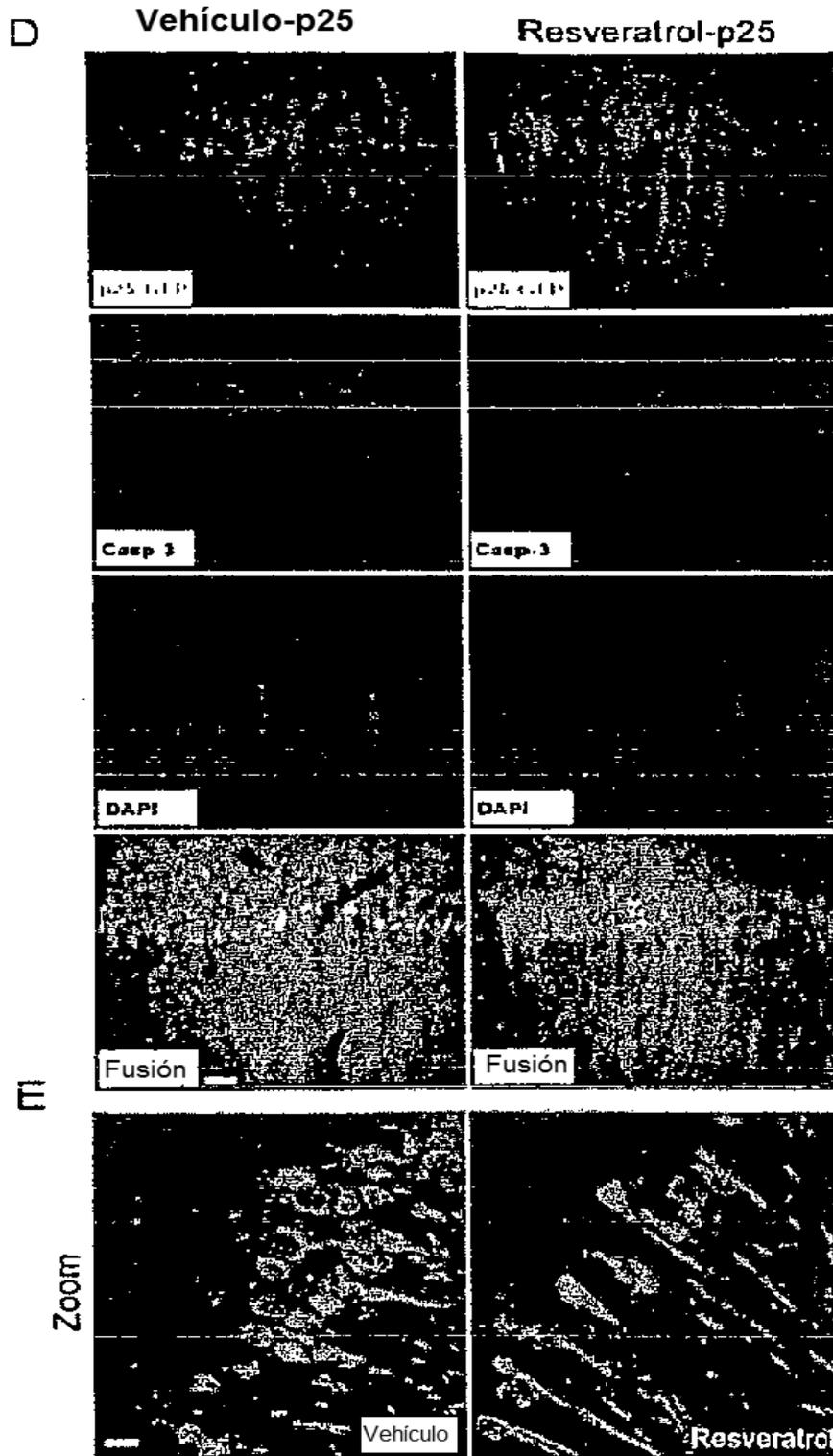
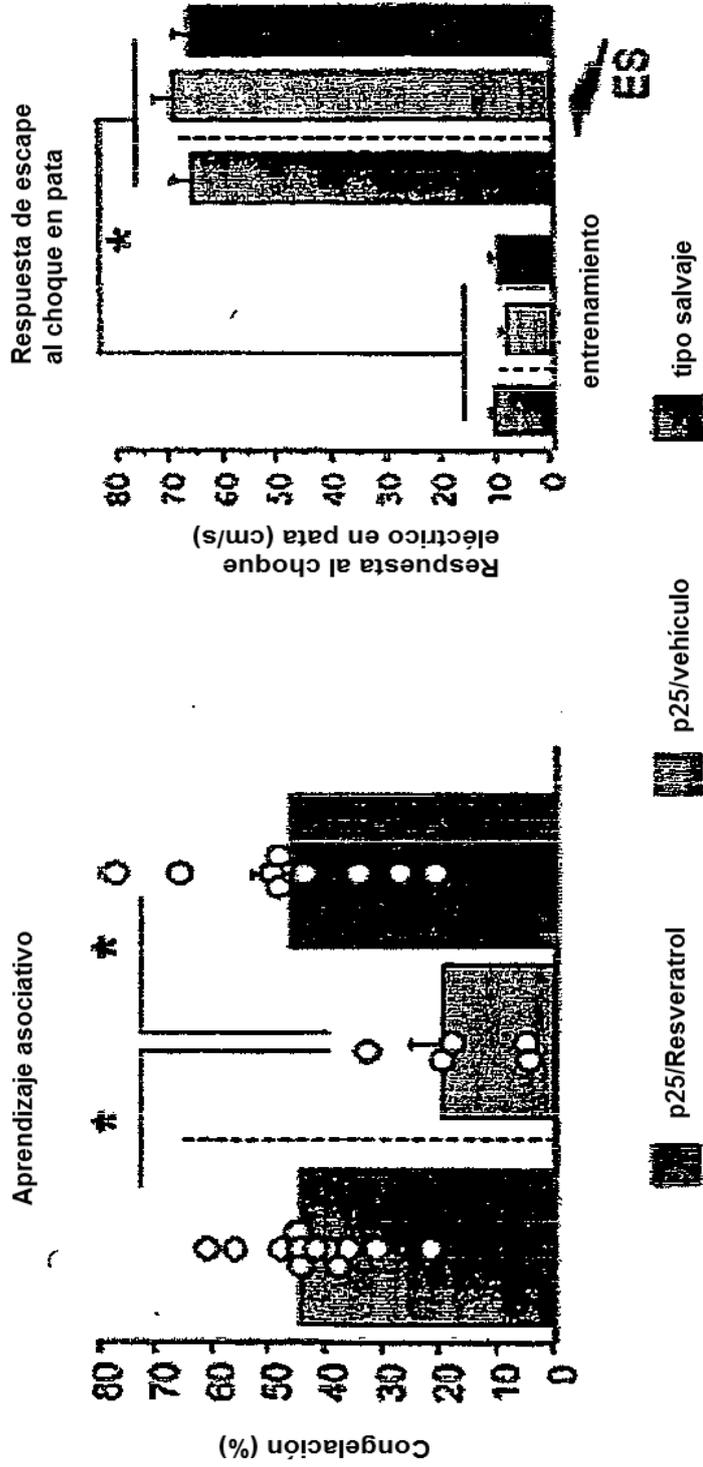


Figura 44





F

Figura 44

Figura 46

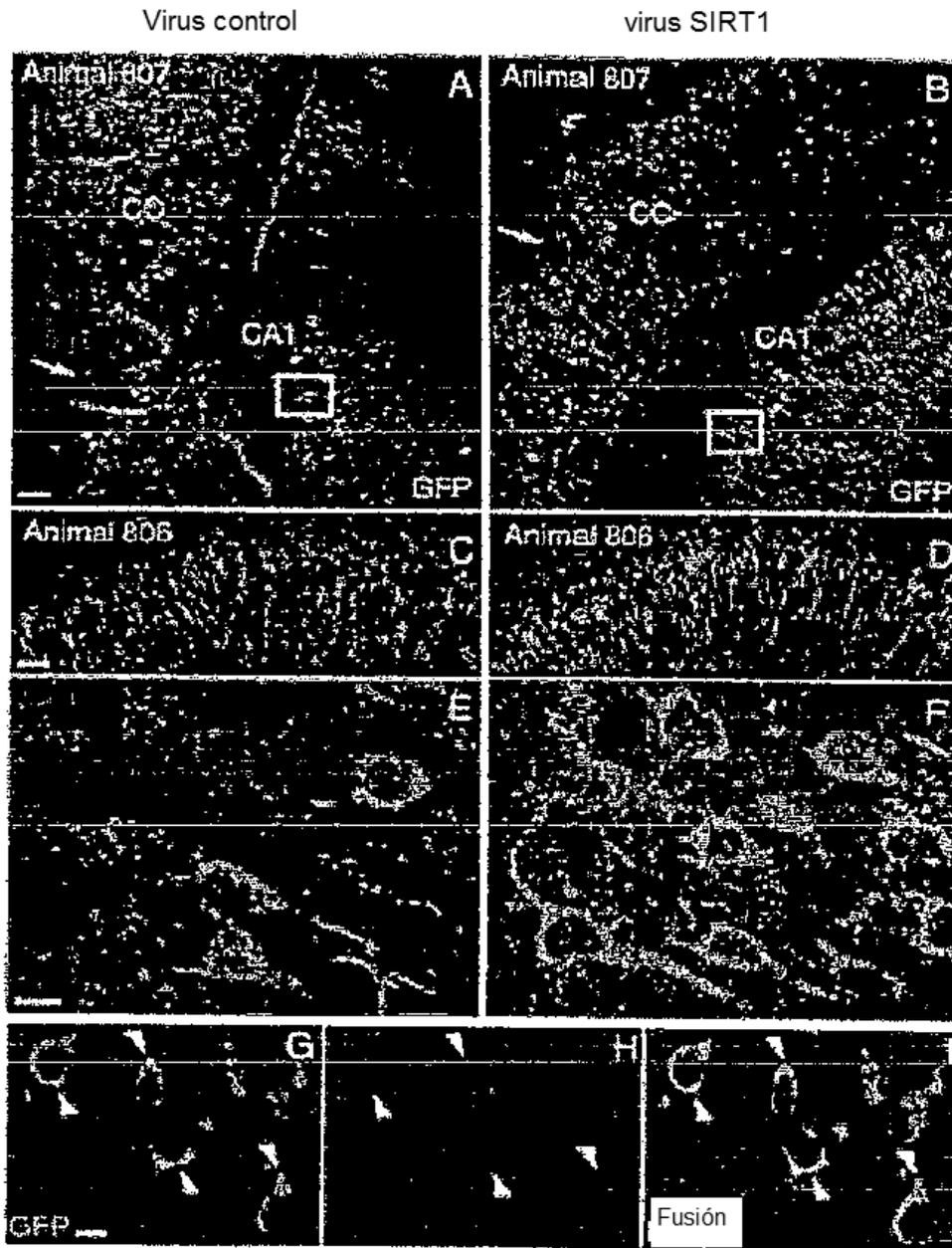


Figura 47

