

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 266**

51 Int. Cl.:

C07C 327/42 (2006.01)

A61K 31/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2012 PCT/US2012/058846**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13052727**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2012 E 12838058 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 2763962**

54 Título: **Métodos de tratamiento utilizando moduladores de SIRT2**

30 Prioridad:

07.10.2011 US 201161544452 P

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

10.07.2020

73 Titular/es:

**CORNELL UNIVERSITY (100.0%)
Center for Technology Licensing at Cornell
University, 395 Pine Tree Road, Suite 310
Ithaca, NY 14850, US**

72 Inventor/es:

**LIN, HENING y
HE, BIN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 773 266 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de tratamiento utilizando moduladores de SIRT2

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta aplicación reivindica prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos Núm. 61/544.452, presentada el 7 de octubre de 2011.

10 Declaración sobre la investigación patrocinada federalmente

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo el Contrato Núm. GM086703 otorgado por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

15 Antecedentes de la descripción

Las sirtuínas son una clase de enzimas conocidas como desacetilasas dependientes de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD). Los seres humanos tienen siete sirtuínas, Sirt1-7, que regulan una variedad de procesos biológicos, incluidos el envejecimiento, la transcripción y el metabolismo. Por lo tanto, se pueden utilizar pequeñas moléculas que pueden regular la actividad de la sirtuína para tratar varias enfermedades humanas.

Se han utilizado diversas proteínas (tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 o HER2 para el tratamiento del cáncer de mama, BCR-ABL para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica) como dianas farmacológicas para el tratamiento del cáncer humano. Sin embargo, debido a la heterogeneidad del cáncer y la aparición de resistencia a los medicamentos, existe una necesidad constante de identificación de nuevas dianas proteicas y nuevos reactivos farmacológicos para el tratamiento del cáncer.

Sirt2 es uno de los siete miembros de la familia Sir2 de desacetilasas dependientes de NAD⁺ (o sirtuínas) en seres humanos. Un esquema general del procedimiento por el cual las sirtuínas catalizan la desacetilación de la proteína lisina dependiente de NAD se muestra en la FIG. 1. Las sirtuínas se han conservado a través de la evolución y han sido implicadas en una serie de funciones biológicas, quizás la más importante es la regulación de la vida útil (p. ej., Haigis, M. C., et al., *Annu. Rev. Pathol.* 5, 253-295, 2010; y Imai, S.-i., et al., *Trends in Pharmacological Sciences* 31, 212-220, 2010). Entre las siete sirtuínas de mamíferos, Sirt2 es la única citosólica (p. ej., Michishita, E., et al., *Mol. Biol. Cell* 16, 4623-4635, 2005). Se han identificado y confirmado dos sustratos citosólicos de Sirt2 en estudios celulares, α -tubulina y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) (p. ej., North, B. J., et al., *Mol. Cell* 11, 437-444, 2003; Jiang, W., et al., *Mol. Cell* 43, 33-44, 2011). Sirt2 desestabiliza los microtúbulos al desacetilar la Lys40 de la α -tubulina. Al desacetilar PEPCK y regular la estabilidad de PEPCK, Sirt2 también regula la gluconeogénesis.

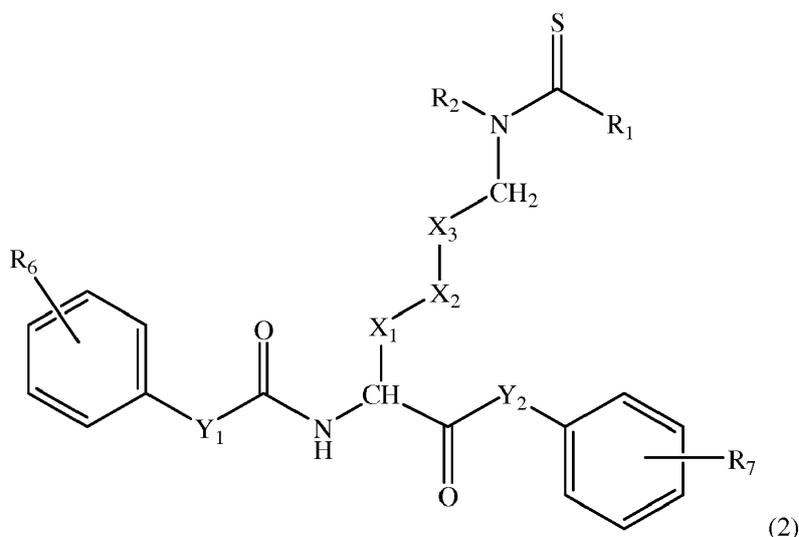
Se han descrito los efectos anticancerosos de los inhibidores de moléculas pequeñas de Sirt2, p. ej., Heltweg, B., et al., *Cancer Res.* 66, 4368-4377, 2006; Zhang, Y., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 386, 729-733, 2009. Sin embargo, los inhibidores conocidos generalmente tienen valores de CI_{50} superiores al óptimo contra Sirt2, y también carecen de especificidad contra Sirt2. Por otra parte, alcanzar tal especificidad contra Sirt2 podría proporcionar ventajas significativas para el tratamiento de tipos concretos de cáncer, tales como el cáncer de mama y, más concretamente, el cáncer de mama triple negativo. También se ha demostrado que Sirt2 está implicado en las enfermedades neurodegenerativas (p. ej., Luthi-Carter, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(17):7927-32, 27 de abril, 2010 y de Oliveira, R. M., et al., *Front Pharmacol.*, 3:82, 2012). Por lo tanto, tales inhibidores contra Sirt2 también podrían proporcionar un tratamiento mejorado de las enfermedades neurodegenerativas.

El documento US2005/0137230 describe compuestos que son inhibidores del factor Xa, adecuados para el tratamiento de enfermedades tromboembólicas y tumores. El documento US2007/0021434 describe compuestos no nucleosídicos con una base amídica que tienen actividad antiviral contra Hepacivirus. El documento US2007/0142638 describe derivados de ornitina útiles como agonistas o antagonistas de prostaglandina E₂. El documento US2008/0171783 describe compuestos no nucleosídicos con una base amídica que tienen actividad inhibidora de las polimerasas endógenas.

55 Breve descripción de la invención

En esta solicitud, se describen nuevos moduladores que tienen una actividad mejorada e incluso selectiva contra la proteína Sirt2 humana. Estos moduladores son útiles en el tratamiento, por ejemplo, de cánceres, tales como cáncer de mama y enfermedades neurodegenerativas.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un compuesto que modula la actividad Sirt2 que tiene la siguiente estructura química:



en donde R_1 es un grupo hidrocarbonado que tiene al menos cinco átomos de carbono conectados por enlaces carbono-carbono, en donde uno o más átomos de hidrógeno en dicho grupo hidrocarbonado se reemplazan opcionalmente por átomos de flúor;

R_2 se selecciona entre un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarbonado;

R_6 y R_7 se seleccionan independientemente entre átomos de hidrógeno, grupos hidrocarbonados no sustituidos que tienen hasta seis átomos de carbono, grupos alcoxi $-OR$, grupos amida $-NR'C(O)R$ o $-C(O)NR'R$, grupos cetona $-C(O)R$, grupos éster $-C(O)OR$ o $-OC(O)R$, grupos carbamato $-OC(O)NR'R$ o $-NR'C(O)OR$, y grupos urea $-NR'C(O)NR$, en donde R es un grupo hidrocarbonado que tiene hasta seis átomos de carbono, y R' es un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarbonado que tiene hasta seis átomos de carbono;

X_1 , X_2 y X_3 se seleccionan independientemente entre $-(CH_2)_n-$, $-NR_5-$, $-O-$, $-S-$, o un enlace, en donde n representa 1, 2 o 3, y al menos uno de X_1 , X_2 y X_3 es un grupo $-CH_2-$;

Y_1 se selecciona entre grupos $-OCH_2-$, $-O-$, $-NR_5-$ y $-S-$;

Y_2 se selecciona entre grupos $-O-$, $-NR_5-$ y $-S-$; y

en donde R_5 es un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarbonado.

La invención también se refiere a un modulador de Sirt2 como se define en la presente memoria para su uso en el tratamiento del cáncer (p. ej., cáncer de mama).

La invención se refiere adicionalmente a un modulador de Sirt2 como se define en la presente memoria para su uso en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo (p. ej., Parkinson, Huntington o Alzheimer).

Otras características de la invención se definen en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

FIG. 1. Esquema general que muestra el procedimiento por el cual las sirtuinas catalizan la desacetilación de la proteína lisina dependiente de NAD.

FIG. 2. Arriba: esquema general que describe el mecanismo para la inhibición de las sirtuinas por los compuestos de tioacetil lisina. Abajo: estructuras de algunos inhibidores ilustrativos de Sirt2 (TA [técnica anterior], TB, TH y TM). En cada estructura, el radical de enlace correspondiente a Y_1 en la fórmula (2) debe ser $-OCH_2-$ no $-O-$. Los cuatro compuestos mostrados fueron preparados y probados para determinar su actividad contra Sirt2.

FIG. 3A, 3B. Gráfico que muestra la capacidad de inhibición de los cuatro ejemplos de compuestos inhibidores de Sirt2 (TA, TB, TH y TM), utilizando como control DMSO. 3 (A). (B) Gráfico que muestra la capacidad de inhibición de TH y TM (25 μM) contra la línea celular de cáncer MCF7 y la línea celular normal MCF10a, FIG. 3(B).

FIG. 4A, 4B. Micrografías de un ensayo en agar blando, que demuestra que el inhibidor específico de Sirt2, TM, puede inhibir el crecimiento independiente del anclaje de la línea celular TNBC MDA-MB-231.

FIG. 5A-5C. Micrografías de un ensayo en agar blando, que demuestra que Sirt2 KD, pero no Sirt1 KD, puede inhibir eficazmente la formación de colonias por las células MCF7.

Descripción detallada de la descripción

Por conveniencia, antes de una descripción adicional de la presente invención, se describen ciertos términos empleados en la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas. Estas definiciones deberían

leerse a la luz de toda la descripción y como entendería un experto en la técnica.

Los términos "un", "uno", "una", "el" y "la" se utilizan en la presente memoria para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" puede significar uno o más elementos, a menos que se especifique lo contrario.

Se pretende que el término "aminoácido" abarque todas las moléculas, ya sean naturales o sintéticas, que incluyen tanto una funcionalidad amino como una funcionalidad ácido y que pueden incluirse en un polímero de aminoácidos de origen naturales. Los ejemplos de aminoácidos incluyen aminoácidos de origen natural; análogos, derivados y congéneres de los mismos; análogos de aminoácidos que tienen cadenas laterales variantes; y todos los estereoisómeros de cualquiera de los anteriores. En algunas realizaciones, el término "aminoácido" se refiere solo a los veinte aminoácidos esenciales conocidos, o un subconjunto de los mismos, es decir, glicina (G), alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), cisteína (C), metionina (M), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W), prolina (P), serina (S), treonina (T), asparragina (N), glutamina (Q), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), histidina (H), lisina (K) y arginina (R). En algunas realizaciones, se excluyen una o más de cualquiera de las clases anteriores o tipos específicos de aminoácidos.

El término "polipéptido", y los términos "proteína" y "péptido", que se utilizan indistintamente en la presente memoria, se refieren a un polímero de aminoácidos. Los polipéptidos ilustrativos incluyen productos génicos, proteínas de origen natural, homólogos, ortólogos, parálogos, fragmentos y otros equivalentes, variantes y análogos de los anteriores. Pueden incluir uno o más tipos de cualquiera de los residuos de aminoácidos descritos anteriormente, o una forma modificada de los mismos, y típicamente incluyen al menos 10, 20, 30, 40 o 50, y hasta 80, 100, 120, 150, 200, 300, 400, 500 o 1.000 residuos de aminoácidos. El término "oligopéptido", como se emplea en la presente memoria, generalmente se refiere a una cadena de residuos de aminoácidos de al menos 4, 5 o 6 y hasta 8, 10, 15 o 20. Los términos "dipéptido" y "tripéptido" se refieren, respectivamente, a dos y tres residuos de aminoácidos conectados.

El término "escrutinio de alto rendimiento" (HTS) se refiere a un método automatizado a gran escala para probar inhibidores de moléculas pequeñas para la inhibición de una actividad enzimática o proceso celular concretos. El HTS generalmente prueba una biblioteca de diferentes compuestos para determinar sus actividades.

Como se emplea en la presente memoria, el término "modulador" incluye cualquier sustancia que active o inhiba la actividad de la desacilasa Sirt2. Por otra parte, un "activador" es una sustancia que aumenta, mejora o acelera la actividad de la desacilasa Sirt2, mientras que un "inhibidor" es una sustancia que reduce, inhibe o previene la actividad de la desacilasa Sirt2.

Los términos "grupo hidrocarbonado", es decir, "grupo hidrocarbonado (R)" y "conector hidrocarbonado", como se emplean en la presente memoria, están, en una primera realización, compuestos únicamente de carbono e hidrógeno. En diferentes realizaciones, uno o más de los grupos o conectores hidrocarbonados pueden contener con precisión, o un mínimo, o un máximo de, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno, veintidós o veintitrés átomos de carbono, o un número de átomos de carbono dentro de un intervalo concreto delimitado por dos cualesquiera de los números de carbono anteriores. Los grupos o conectores hidrocarbonados en diferentes compuestos descritos en la presente memoria, o en diferentes posiciones de un compuesto, pueden poseer el mismo o diferente número (o intervalo preferido de los mismos) de átomos de carbono para ajustar u optimizar independientemente la actividad u otras características del compuesto.

Los grupos o conectores hidrocarbonados pueden ser, por ejemplo, saturados y de cadena lineal (es decir, grupos alquilo de cadena lineal o conectores de alquileo). Algunos ejemplos de grupos alquilo de cadena lineal (o conectores de alquileo) incluyen grupos metilo (o conector de metileno, es decir, $-CH_2-$, o conector de metino), etilo (o conector de etileno o dimetileno, es decir, conector de $-CH_2CH_2-$), *n*-propilo, *n*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo *n*-heptilo, *n*-octilo, *n*-nonilo, *n*-decilo, *n*-undecilo, *n*-dodecilo, *n*-tridecilo, *n*-tetradecilo, *n*-pentadecilo, *n*-hexadecilo, *n*-heptadecilo, *n*-octadecilo y *n*-eicosilo (o sus respectivos análogos conectores).

Los grupos o conectores hidrocarbonados pueden ser saturados y ramificados (es decir, grupos alquilo o conectores de alquileo ramificados). Algunos ejemplos de grupos alquilo ramificados incluyen isopropilo, isobutilo, *sec*-butilo, *t*-butilo, isopentilo, neopentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo y los numerosos grupos hidrocarbonados saturados y ramificados C_7 , C_8 , C_9 , C_{10} , C_{11} , C_{12} , C_{13} , C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} , C_{18} , C_{19} , C_{20} , C_{21} , C_{22} , y C_{23} . Algunos ejemplos de conectores de alquileo ramificado son los derivados de la eliminación de un átomo de hidrógeno de uno de los grupos alquilo ramificados ilustrativos anteriores (p. ej., isopropileno, $-CH(CH_3)CH_2-$).

Los grupos o conectores hidrocarbonados pueden ser alternativamente saturados y cíclicos (es decir, grupos cicloalquilo o conectores de cicloalquileo). Algunos ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen grupos ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo. El grupo cicloalquilo también puede ser un grupo

hidrógeno y átomos anulares adyacentes), mientras que uno o más heteroátomos anulares no están unidos a otro grupo. En otras realizaciones, el grupo heterocíclico está unido mediante uno de sus heteroátomos a otro grupo, mientras que los átomos de carbono anulares pueden estar unidos a otro grupo o no.

5 Algunos ejemplos de grupos heterocíclicos saturados incluyen aquellos que contienen al menos un átomo de oxígeno (p. ej., anillos de oxetano, tetrahydrofurano, tetrahidropirano, 1,4-dioxano, 1,3-dioxano y 1,3-dioxepano), aquellos que contienen al menos un átomo de nitrógeno (p. ej., anillos de pirrolidina, piperidina, piperazina, imidazolidina, azepano y decahidroquinolina), aquellos que contienen al menos un átomo de azufre (p. ej., anillos de tetrahidrotiofeno, tetrahidrotiopirano, 1,4-ditiano, 1,3-ditiano y 1,3-ditilano), aquellos que contienen al menos un
10 átomo de oxígeno y al menos un átomo de nitrógeno (p. ej., anillos de morfolina y oxazolidina), aquellos que contienen al menos un átomo de oxígeno y al menos un átomo de azufre (p. ej., 1,4-tioxano), y aquellos que contienen al menos un átomo de nitrógeno y al menos un átomo de azufre (p. ej., anillos de tiazolidina y tiamorfolina).

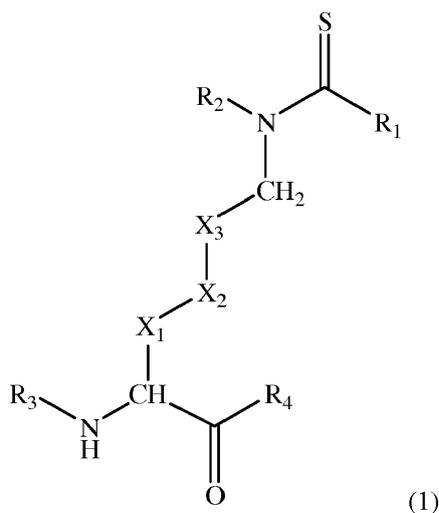
15 Algunos ejemplos de grupos heterocíclicos insaturados incluyen aquellos que contienen al menos un átomo de oxígeno (p. ej., anillos de furano, pirano, 1,4-dioxina y dibenzodioxina), aquellos que contienen al menos un átomo de nitrógeno (p. ej., anillos de pirrol, imidazol, pirazol, piridina, pirazina, pirimidina, 1,3,5-triazina, azepina, diazepina, indol, purina, benzimidazol, indazol, 2,2'-bipiridina, quinolina, isoquinolina, fenantrolina, 1,4,5,6-tetrahidropirimidina, 1,2,3,6-tetrahidropiridina, 1,2,3,4-tetrahydroquinolina, quinoxalina, quinazolina, piridazina, cinolina, 5,6,7,8-
20 tetrahydroquinoxalina, 1,8-naftiridina y 4-azabencimidazol), aquellos que contienen al menos un átomo de azufre (p. ej., anillos de tiofeno, tianafteno y benzotiofeno), aquellos que contienen al menos un átomo de oxígeno y al menos un átomo de nitrógeno (p. ej., anillos de oxazol, isoxazol, benzoxazol, benzisoxazol, oxazolina, 1,2,5-oxadiazol (furazano) y 1,3,4-oxadiazol), y aquellos que contienen al menos un átomo de nitrógeno y al menos un átomo de
25 azufre (p. ej., anillos de tiazol, isotiazol, benzotiazol, benzoisotiazol, tiazolina y 1,3,4-tiadiazol).

En algunas realizaciones, cualquiera de los sustituyentes genéricos (p. ej., R, R₁, R₂ y similares) descritos a continuación pueden excluir independientemente una o más de las clases, subclases o grupos de hidrocarburos particulares descritos anteriormente, o pueden incluir independientemente solo grupos hidrocarbonados específicos seleccionados entre los grupos hidrocarbonados (R) descritos anteriormente.

30 El término "acilo" utilizado en la presente memoria se refiere a un grupo orgánico de la fórmula general -C(X)R, en donde X es oxígeno (=O), azufre (=S) o amino (=NR) y R representa independientemente un grupo hidrocarbonado. Para los fines de la presente invención, el grupo hidrocarbonado R anclado a C(X) posee al menos tres átomos de carbono conectados por enlaces carbono-carbono. En diferentes realizaciones, el grupo hidrocarbonado R anclado a C(X) posee con precisión o al menos tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez,
35 once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve o veinte átomos de carbono, o un número de átomos de carbono dentro de un intervalo limitado por cualquiera de los dos números anteriores de átomos de carbono (p. ej., un número de carbono en el intervalo de 3-20, 3-18, 3-16, 3-14, 3-12, 3-10, 3-8, 4-20, 4-
40 18, 4-16, 4-14, 4-12, 4-10, 4-8, 5-20, 5-18, 5-16, 5-14, 5-12, 5-10, 5-8, 6-20, 6-18, 6-16, 6-14, 6-12, 6-10, 6-8, 7-20, 7-18, 7-16, 7-14, 7-12, 7-10, 8-20, 8-18, 8-16, 8-14, 8-12, 9-20, 9-18, 9-16, 9-14, 9-12, 10-20, 10-18, 10-16, 10-14, 10-12, 11-20, 11-18, 11-16, 11-14, 12-20, 12-18, 12-16, 12-14, 13-20, 13-18, 13-16, 14-20, 14-18 o 14-16 átomos de carbono).

45 En un conjunto de realizaciones, el grupo hidrocarbonado R anclado a C(X) está compuesto solo por átomos de carbono e hidrógeno. En otro conjunto de realizaciones, el grupo hidrocarbonado R anclado a C(X) está compuesto de átomos de carbono e hidrógeno, en donde uno o más átomos de hidrógeno pueden estar sustituidos por uno o más átomos de flúor (F). En otro conjunto de realizaciones, el grupo hidrocarbonado R anclado a C(X) está compuesto de átomos de carbono e hidrógeno, y opcionalmente uno o más átomos de flúor, junto con un heteroátomo seleccionado entre O, N y S que interrumpe un enlace carbono-carbono del grupo hidrocarbonado (R) o reemplaza un átomo de carbono (es decir, grupo metileno o metino) del grupo hidrocarbonado (R), excepto que el heteroátomo no está incluido como grupo OH, SH o NH₂, o cualquier grupo cargado, tal como grupos alcóxido, sulfuro, carboxilato o amonio, ya que estos tipos de grupos harían que la porción acílica sea demasiado hidrófila (es decir, no suficientemente hidrófoba). En algunas realizaciones, el grupo hidrocarbonado R anclado a C(X) se selecciona entre uno o más de alquilo, alqueno o alquino de cadena lineal o ramificada, que puede incluir o excluir
50 uno o más heteroátomos; cicloalquilo; anillo aromático; heterocicloalquilo; heteroaromático; o un grupo hidrocarbonado que incluye una cualquiera o más de las clases sustituyentes anteriores, tales como un grupo alquil-aromático, alquil-heterocíclico o alquil-heteroaromático. Cuando un heteroátomo reemplaza un átomo de carbono, se incluye la posibilidad de que el heteroátomo esté anclado al carbono de C(X), es decir, como C(X)-OR, C(X)-SR, C(X)-NH-R, o C(X)-NR-R, donde cada caso de un grupo R es una selección independiente.

60 En esta descripción (no según la invención), los moduladores considerados en la presente memoria tienen la siguiente estructura química:



En la fórmula (1), R₁ es un grupo hidrocarbonado que tiene exactamente o al menos cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno, veintidós, veintitrés átomos de carbono conectados por enlaces carbono-carbono, en donde el grupo hidrocarbonado incluye opcionalmente un grupo heteroátomo seleccionado entre -O-, -NR₅- y -S- que interrumpe un enlace carbono-carbono del grupo hidrocarbonado, y en donde uno o más átomos de hidrógeno en el grupo hidrocarbonado se reemplazan opcionalmente por átomos de flúor. En algunas realizaciones de esta descripción (no según la invención), R₁ tiene al menos cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince o dieciséis átomos de carbono conectados por enlaces carbono-carbono en ausencia de sustitución de heteroátomo, excepto que uno o más átomos de hidrógeno opcionalmente se puede reemplazar por átomos de flúor. El grupo R₅ es típicamente un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarbonado, que típicamente tiene hasta uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis átomos de carbono. El grupo R₂ también se selecciona entre un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarbonado, que típicamente tiene hasta uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis átomos de carbono. Los grupos R₃ y R₄ se seleccionan independientemente entre átomos de hidrógeno y grupos hidrocarbonados R, en donde los grupos hidrocarbonados R están opcionalmente sustituidos con uno o más heteroátomos. Los radicales conectores X₁, X₂ y X₃ se seleccionan independientemente entre -(CH₂)_n-, -NR₅-, -O-, -S-, o un enlace, en donde n representa 1, 2 o 3, y al menos uno de X₁, X₂ y X₃ es un grupo -CH₂. En algunas realizaciones de esta descripción (no según la invención), todos los X₁, X₂ X₃ son grupos -(CH₂)_n- o CH₂.

Los grupos R₃ y R₄ son independientemente átomos de hidrógeno o cualquiera de los grupos hidrocarbonados R sustituidos o no sustituidos descritos anteriormente, o una selección de los mismos, en donde R₄ alternativamente puede ser OH, NH₂ o SH. En algunas realizaciones de esta descripción (no según la invención), uno o ambos de R₃ y R₄ son grupos no biológicos (es decir, sintéticos) que contienen al menos 1, 2, 3, 4 o 5 y hasta 10, 15, 20, 25, 30, 40 o 50 átomos que no son hidrógeno. En otras realizaciones de esta descripción (no según la invención), uno o ambos de R₃ y R₄ son o incluyen al menos un grupo biológicamente relacionado, tal como un aminoácido, dipéptido, tripéptido, oligopéptido, polipéptido (p. ej., proteína, que incluye una enzima, anticuerpo o receptor), nucleobase, nucleósido, nucleótido, dinucleótido, oligonucleótido, polinucleótido, monosacárido, disacárido, oligosacárido, polisacárido, biotina, avidina, estreptavidina o ligando, cualquiera de los cuales puede ser una molécula pequeña o una macromolécula que contiene cientos de átomos que no son de hidrógeno. En otras realizaciones más de esta descripción (no según la invención), uno o ambos de R₃ y R₄ son o incluyen al menos un anillo monocíclico insaturado (o aromático), que puede ser un anillo carbomonocíclico insaturado (p. ej., benceno, ciclohexeno o ciclopentadieno) o un anillo insaturado heteromonocíclico (p. ej., anillo de o-, m- o p-piridina, pirazina o pirimidina). En algunas realizaciones de esta descripción (no según la invención), uno o ambos de R₃ y R₄ contribuyen a la modulación de Sirt2 o a proporcionar una función importante cuando el compuesto modulador se administra a un sujeto, por ejemplo, R₃ y/o R₄ pueden hacer que el modulador sea más biodisponible, funcionar para dirigirse a Sirt2 de manera más eficaz o funcionar como un radical de fármaco coadyuvante.

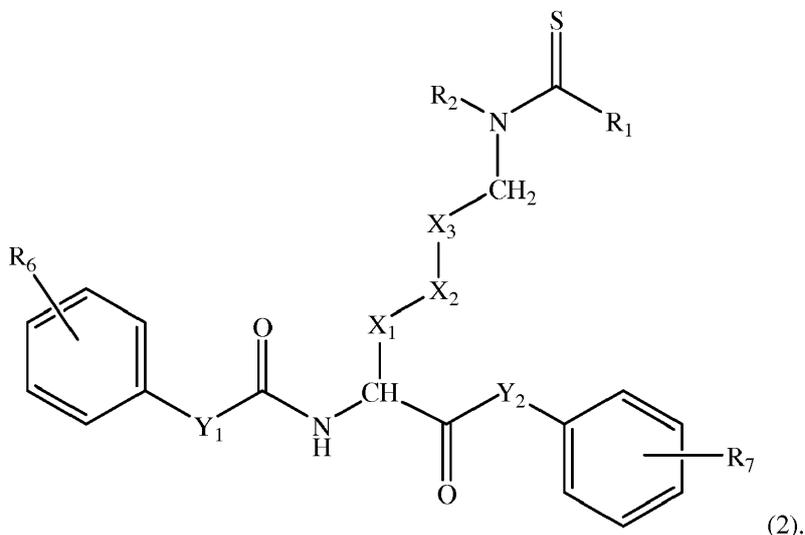
En otras realizaciones de Fórmula (1) de esta descripción (no según la invención), R₄ puede ser un grupo amino -NRR', en donde R es típicamente un grupo hidrocarbonado que tiene hasta uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis átomos de carbono, y R' es típicamente un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarbonado que tiene hasta uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis átomos de carbono, en donde los grupos hidrocarbonados pueden estar o no sustituidos con uno o más heteroátomos o grupos heteroátomos, tales como -OH, -OR, -NHR, -NRR'. Algunos ejemplos particulares de tales grupos para R₄ incluir -NH₂, -NH(CH₃), -N(CH₃)₂, -NH(CH₂CH₃), -NH(CH₂CH₂OH), -NH(CH₂CH₂OCH₃), -NH(CH₂CH₂NH₂), -NH(CH₂CH₂NH(CH₃)), y -NH(CH₂CH₂N(CH₃)₂).

En diferentes realizaciones bajo la Fórmula (1) de esta descripción (no según la invención), R₁ es un grupo

hidrocarbonado, o más específicamente, un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada, que posee precisamente o al menos cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve o veinte átomos de carbono, o un número de átomos de carbono dentro de un intervalo limitado por cualquiera de los dos números anteriores de átomos de carbono (p. ej., un número de carbono en el intervalo de 5-20, 5-18, 5-16, 5-14, 5-12, 5-10, 5-8, 6-20, 6-18, 6-16, 6-14, 6-12, 6-10, 6-8, 7-20, 7-18, 7-16, 7-14, 7-12, 7-10, 8-20, 8-18, 8-16, 8-14, 8-12, 9-20, 9-18, 9-16, 9-14, 9-12, 10-20, 10-18, 10-16, 10-14, 10-12, 11-20, 11-18, 11-16, 11-14, 12-20, 12-18, 12-16, 12-14, 13-20, 13-18, 13-16, 14-20, 14-18 o 14-16 átomos de carbono).

En un conjunto de realizaciones bajo la Fórmula (1) de esta descripción (no según la invención), el grupo hidrocarbonado R_1 está compuesto solo por átomos de carbono e hidrógeno. En otro conjunto de realizaciones de esta descripción (no según la invención), el grupo hidrocarbonado R_1 está compuesto de átomos de carbono e hidrógeno, en donde uno o más átomos de hidrógeno pueden estar sustituidos por uno o más átomos de flúor (F). En otro conjunto de realizaciones de esta descripción (no según la invención), el grupo hidrocarbonado R_1 está compuesto de átomos de carbono e hidrógeno, y opcionalmente uno o más átomos de flúor, junto con un heteroátomo seleccionado entre O, N y S que interrumpe un enlace carbono-carbono del grupo hidrocarbonado R_1 o reemplaza un átomo de carbono (es decir, un grupo metileno o metino) del grupo hidrocarbonado R_1 , excepto que el heteroátomo no está incluido como grupo OH, SH o NH_2 , o cualquier grupo cargado, tal como grupos alcóxido, sulfuro, carboxilato o amonio, ya que estos tipos de grupos harían que la porción acíclica sea demasiado hidrófila (es decir, no suficientemente hidrófoba). El resultado puede ser, por ejemplo, un éter (R-O-R), tioéter (R-S-R), amina secundaria (R-NH-R) o amina terciaria (R-NR-R) en R_1 , en donde los grupos R en cada caso se seleccionan independientemente. En algunas realizaciones de esta descripción (no según la invención), el grupo hidrocarbonado R_1 se selecciona o incluye uno o más de: alquilo, alquenilo o alquinilo de cadena lineal o ramificada, que puede incluir o excluir uno o más heteroátomos; cicloalquilo; anillo aromático; heterocicloalquilo; heteroaromático; o un grupo hidrocarbonado que incluye una cualquiera o más de las clases sustituyentes anteriores, tales como un grupo alquil-aromático, alquil-heterocíclico o alquil-heteroaromático. Cuando un heteroátomo reemplaza un átomo de carbono, se incluye la posibilidad de que el heteroátomo esté unido al carbono de C(=S), es decir, como C(=S)-O- R_1 , C(=S)-S- R_1 , C(=S)-NH- R_1 o C(=S)-NR- R_1 . En algunas realizaciones de esta descripción (no según la invención), se excluyen una o más de las posibilidades anteriores.

Según la invención, se proporciona un compuesto que modula la actividad Sirt2 que tiene la siguiente estructura química:



En el compuesto de fórmula (2):

R_1 es un grupo hidrocarbonado que tiene al menos cinco átomos de carbono conectados por enlaces carbono-carbono, en donde uno o más átomos de hidrógeno en dicho grupo hidrocarbonado se reemplazan opcionalmente por átomos de flúor;

R_2 se selecciona entre un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarbonado;

R_6 y R_7 se seleccionan independientemente entre átomos de hidrógeno, grupos hidrocarbonados no sustituidos que tienen hasta seis átomos de carbono, grupos alcoxi -OR, grupos amida -NR'C(O)R o -C(O)NR'R, grupos cetona -C(O)R, grupos éster -C(O)OR o -OC(O)R, grupos carbamato -OC(O)NR'R o -NR'C(O)OR, y grupos urea -NR'C(O)NR, en donde R es un grupo hidrocarbonado que tiene hasta seis átomos de carbono, y R' es un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarbonado que tiene hasta seis átomos de carbono;

X_1 , X_2 y X_3 se seleccionan independientemente entre $-(CH_2)_n-$, $-NR_5-$, $-O-$, $-S-$, o un enlace, en donde n

representa 1, 2 o 3, y al menos uno de X_1 , X_2 y X_3 es un grupo $-CH_2$;
 Y_1 se selecciona entre grupos $-OCH_2-$, $-O-$, $-NR_5-$ y $-S-$;
 Y_2 se selecciona entre grupos $-O-$, $-NR_5-$ y $-S-$; y
 R_5 es un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarbonado.

En otro aspecto, la invención se refiere a un modulador de Sirt2 como se define en la presente memoria para su uso en el tratamiento del cáncer (p. ej., cáncer de mama). La invención en un aspecto adicional se refiere a un modulador de Sirt2 como se define en la presente memoria para su uso en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo (p. ej., Parkinson, Huntington o Alzheimer).

Esta descripción (no según la invención) también describe una composición farmacéutica que incluye uno o más de los compuestos moduladores de Sirt2 descritos anteriormente dispersos en uno o más portadores o excipientes fisiológicamente aceptables. La composición farmacéutica es útil para tratar o prevenir un trastorno cuya etiología o expresión depende de la actividad de la desacilasa Sirt2. Las frases "excipiente farmacéuticamente aceptable" o "portador farmacéuticamente aceptable", como se emplean en la presente memoria, se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptables, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, portador, auxiliar de fabricación (p. ej., lubricante, talco y magnesio), estearato de calcio o zinc, o ácido esteárico), disolvente o material de encapsulación, implicado en la conducción o el transporte de la composición terapéutica para la administración al sujeto. Cada excipiente debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y fisiológicamente seguro para el sujeto.

El compuesto modulador de Sirt2 en la composición farmacéutica también puede ser una sal o solvato fisiológicamente aceptable de cualquiera de los compuestos moduladores descritos anteriormente. Las sales y solvatos aceptables se pueden preparar mediante cualquiera de los mecanismos conocidos en la técnica. Como se conoce en la técnica, se puede producir una sal haciendo reaccionar una porción alcalina (p. ej., amino) del compuesto activo con un ácido de Brønsted, tal como HCl o H_2SO_4 o con un ácido de Lewis, tal como CH_3Br . Si se desea, el anión o catión introducido inicialmente se puede intercambiar por otro anión o catión. Como también se conoce en la técnica, se puede producir un solvato disolviendo o tratando el compuesto activo con un disolvente en condiciones en las que una, dos o más moléculas de disolvente permanecen asociadas con cada molécula del ingrediente activo.

La composición farmacéutica también puede incluir uno o más estabilizadores, tensioactivos, sales, agentes tamponadores, aditivos o una combinación de los mismos. El estabilizador puede ser, por ejemplo, un oligosacárido (p. ej., sacarosa, trehalosa, lactosa o un dextrano), un alcohol de azúcar (p. ej., manitol) o una combinación de los mismos. El tensioactivo puede ser cualquier tensioactivo adecuado, incluidos, por ejemplo, aquellos que contienen unidades de óxido de polialquileño (p. ej., Tween 20, Tween 80, Pluronic F-68), que se incluyen típicamente en cantidades de aproximadamente 0,001% (p/v) a aproximadamente 10% (p/v). La sal o agente tamponador puede ser cualquier sal o agente tamponador adecuado, tal como, por ejemplo, cloruro de sodio o fosfato de sodio o potasio, respectivamente. Algunos ejemplos de aditivos incluyen, por ejemplo, glicerol, alcohol bencílico y 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol (p. ej., cloretona o clorobutanol). Si fuera necesario, el pH de las soluciones se puede ajustar y amortiguar adecuadamente.

Las composiciones farmacéuticas (incluidas las preparaciones cosméticas) pueden comprender de aproximadamente 0,00001 a 100%, tal como de 0,001 a 10% o de 0,1% a 5% en peso de uno o más compuestos moduladores de Sirt2 descritos en la presente memoria. En ciertas formulaciones tópicas, el agente activo está presente en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,25% en peso a 75% en peso de la formulación, o en el intervalo de aproximadamente 0,25% en peso a 30% en peso de la formulación, o en el intervalo de aproximadamente 0,5% en peso a 15% en peso de la formulación, o en el intervalo de aproximadamente 1,0% en peso a 10% en peso de la formulación.

Esta descripción (no según la invención) también describe métodos para tratar o prevenir un trastorno cuya etiología o expresión depende de la actividad de la desacilasa Sirt2. Los métodos incluyen administrar a un sujeto un modulador de Sirt2 en una cantidad farmacéuticamente efectiva, es decir, una cantidad que trata o previene el trastorno de la manera deseada.

El trastorno puede ser cáncer. El cáncer puede localizarse en cualquier parte del organismo. Algunos ejemplos de partes corporales aplicables que contienen células cancerosas incluyen los senos, pulmones, estómago, intestinos, próstata, ovarios, cuello uterino, páncreas, riñón, hígado, piel, linfa, huesos, vejiga, útero, colon, recto o cerebro. El cáncer o la neoplasia también pueden incluir la presencia de uno o más carcinomas, sarcomas, linfomas, blastomas o teratomas (tumores de células germinales). El cáncer también puede ser una forma de leucemia.

El trastorno puede ser una enfermedad neurodegenerativa, que generalmente se refiere a una enfermedad que se manifiesta como la pérdida progresiva de la función y estructura neuronal. La enfermedad neurodegenerativa puede ser, por ejemplo, enfermedad de Parkinson, Alzheimer o Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), neuropatías

periféricas y otras afecciones caracterizadas por daño, necrosis o pérdida de neuronas, incluidas, por ejemplo, neuronas centrales, periféricas o motoras.

5 Como es bien sabido en la técnica, la dosificación del ingrediente o ingredientes activos depende de factores tales como el trastorno o la afección que se vayan a tratar, el grado del trastorno o afección, el método de administración, el tamaño del paciente y los potenciales efectos secundarios. Dependiendo de estos y otros factores, una dosis adecuada del modulador de Sirt2 y/u otro ingrediente activo puede ser con precisión, al menos, o no más de, por ejemplo, 1 mg, 10 mg, 50 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg, 1000 mg, 1200 mg o 1500 mg, o una dosificación dentro de un intervalo limitado por cualquiera de las dosificaciones ilustrativas anteriores. Además, la composición se puede administrar en la cantidad indicada por cualquier programa adecuado, por ejemplo, una vez, dos o tres veces al día o en días alternos durante un tiempo de tratamiento total de uno, dos, tres, cuatro o cinco días, o una, dos, tres o cuatro semanas, o uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis meses, o dentro de un período de tiempo intermedio. Alternativamente, o adicionalmente, la composición se puede administrar hasta que se produzca un cambio deseado en el trastorno o afección, o cuando se crea que se proporciona un efecto preventivo.

15 Los compuestos moduladores de Sirt2 descritos en la presente memoria se pueden tomar solos o combinados con uno o más de otros compuestos que pueden funcionar o no también para modular Sirt2 o aumentar o modificar favorablemente la actividad del compuesto modulador que modula Sirt2. Se puede administrar una mezcla de dos o 20 más compuestos moduladores que modulan Sirt2 a un sujeto que lo necesite. Se pueden administrar uno o más compuestos moduladores de Sirt2 con uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento o prevención de un trastorno cuya etiología o expresión depende de la actividad de la desacilasa Sirt2. Los uno o más agentes terapéuticos se pueden administrar al mismo tiempo que el compuesto modulador de Sirt2 (p. ej., como una composición farmacéutica que contiene el uno o más agentes terapéuticos y el compuesto modulador de Sirt2); 25 alternativamente, los uno o más agentes terapéuticos se pueden administrar por separado del compuesto modulador de Sirt2. Cuando se utilizan formulaciones separadas, el compuesto modulador de Sirt2 se puede administrar al mismo tiempo que, antes, después de, o intermitentemente o gradualmente con, la administración de otro agente terapéutico.

30 Cualquiera de los compuestos moduladores de Sirt2 descritos en la presente memoria se puede fabricar o modificar para que tenga propiedades mejoradas para la administración a un sujeto mamífero, por ejemplo, para mejorar la estabilidad, la capacidad de penetración celular, una vida útil más larga y similares. Por ejemplo, para mejorar la permeabilidad celular del sustrato, el modulador puede incluir una cadena peptídica que contiene una cadena de múltiples aminoácidos, como 8-10 arginina o residuos químicamente similares, o una cadena de óxido de polialquileño, como una cadena de polietilenglicol (PEG) que tiene 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o un número mayor de 35 unidades de óxido de etileno (p. ej., en los grupos R₃, R₄, R₆ o R₇).

Los compuestos moduladores de Sirt2 y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables se pueden administrar (y, por lo tanto, formular adecuadamente) mediante, por ejemplo, inyección (p. ej., SubQ, IM, IP, IV), inhalación o 40 insuflación (ya sea por la boca o la nariz) o administración oral, bucal, sublingual, transdérmica, nasal, parenteral o rectal. Un compuesto modulador de Sirt2 se puede administrar localmente, en el sitio donde están presentes las células diana, es decir, en un tejido, órgano o líquido específico (p. ej., sangre, líquido cefalorraquídeo, etc.). Los compuestos moduladores de Sirt2 se pueden formular para una variedad de modos de administración, incluida la administración sistémica, tópica o localizada. Las técnicas de administración y el diseño de formulaciones son bien 45 conocidas en la técnica, tal como se describe en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, Pa.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos moduladores de Sirt2 se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales. La DL₅₀ es la dosis 50 letal para 50% de la población. La razón de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos (DL₅₀/DE₅₀) es el índice terapéutico. Se prefieren los compuestos moduladores de Sirt2 que exhiben índices terapéuticos grandes. Si bien se pueden utilizar compuestos moduladores de Sirt2 que exhiben efectos secundarios tóxicos, es preferible utilizar un sistema de administración que dirija dichos compuestos al sitio del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden utilizar para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de tales compuestos puede estar dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. 60 Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluya la CI₅₀ según lo determinado en cultivo celular. Tal información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

En algunas realizaciones, el inhibidor de Sirt2 es un inhibidor selectivo de Sirt2. Generalmente, al ser un inhibidor selectivo, el inhibidor de Sirt2 exhibe un valor de CI_{50} contra Sirt2 que es inferior a una o más (o todas) otras sirtuinas humanas, tales como las Sirt 1, 3, 4, 5 y 6. Por ejemplo, el inhibidor selectivo de Sirt2 puede exhibir un CI_{50} de hasta 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2 o 1 μM o menos, mientras que la CI_{50} de una o más (o todas) las otras sirtuinas humanas son mayores que cualquiera de los valores anteriores, o más concretamente mayores que 50, 60, 70, 80, 90 o 100 μM .

La descripción instantánea (no según la invención) también describe un método de ensayo para identificar un modulador de la actividad de la desacilasa Sirt2 (específicamente, desacetilasa). El método se puede practicar en un modo de detección de alto rendimiento.

En una primera parte del método de ensayo, un sustrato acilado (es decir, el "sustrato") que puede ser desacilado por Sirt2 (p. ej., imitando sustancialmente un residuo de lisina acilado) se pone en contacto con Sirt2 en presencia de un compuesto candidato. Con el fin de que el sustrato acilado sea eficaz, el grupo acilo del radical de acil-lisina (es decir, la "porción que imita la acil-lisina") del sustrato se selecciona como uno que se sabe que es desacilado eficazmente por Sirt2, como se encuentra mediante cualquier protocolo experimental adecuado que confirme la actividad detectable de Sirt2 para un sustrato concreto, como se conoce generalmente en la técnica. Típicamente, el radical acilo del sustrato contiene un grupo alquilo que tiene al menos uno, dos o tres átomos de carbono. Otras características estructurales aparte del radical acil-lisina (p. ej., aquellos grupos anclados al extremo amino o carboxilo del radical de lisina, o una secuencia peptídica concreta) se pueden ajustar adecuadamente para proporcionar un sustrato más eficaz si se encuentra que tales características adicionales tienen un impacto significativo sobre el nivel de actividad de desacilación.

El radical de lisina del sustrato se puede derivatizar o modificar de cualquier manera adecuada mientras se preserva su estructura básica de aminoácidos. En particular, se puede modificar el grupo ϵ -aminobutilo de cadena lateral del radical de lisina. Por ejemplo, el radical de lisina puede tener la forma $-NH-CH(R'')-C(O)-$, donde R'' es una cadena lateral, que puede ser una cadena de alquilo o alqueno de, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez átomos de carbono. El grupo acilo y R'' también pueden incluir o excluir independientemente uno o más heteroátomos seleccionados entre N, O y S, en donde el heteroátomo se inserta entre dos átomos de carbono o reemplaza un átomo de carbono (o grupo metileno), o está en forma de un grupo heteroátomo, tal como C(O). El heteroátomo no se puede incluir como grupo OH, SH o NH_2 , y uno o más átomos de hidrógeno en el grupo acilo o R'' pueden o no ser reemplazados por átomos de flúor. Por otra parte, si el radical de lisina no es parte de una estructura oligopeptídica o polipeptídica, el NH de la cadena principal (extremo terminal NH) se puede unir a un grupo hidrocarbonado (R), o el átomo de hidrógeno del NH se puede sustituir por un grupo hidrocarbonado (R), y/o el C(O) de la cadena principal se puede anclar a un grupo hidrocarbonado (R), o un grupo -OR, o un grupo -SR, o un grupo -NHR, o un grupo $-NR_2$, en donde cada grupo R se selecciona independientemente.

El sustrato está conectado a un radical indicador. Cuando el sustrato tiene una estructura sustancialmente similar a cualquiera de las estructuras mostradas en las Fórmulas (1) o (2), se incluye al menos un radical indicador en cualquier sustituyente genérico que se muestra en estas fórmulas. El indicador puede ser, por ejemplo, uno o más de los grupos seleccionados entre R_3 , R_4 , R_6 y R_7 , o alternativamente, se puede incorporar un radical indicador a uno cualquiera o más de dichos grupos. El enlace es un enlace covalente que puede ser cortado por un agente de escisión solo después de eliminar el grupo acilo en la lisina. El enlace covalente puede ser un enlace amida formado entre el terminal carboxilo del radical de lisina y un grupo amino del compuesto indicador. El radical indicador preferiblemente no está conectado a la porción acílica del sustrato, ya que esto probablemente obviaría el mismo mecanismo descrito en la presente memoria para generar una señal. Cuando el sustrato se pone en contacto con Sirt2 en condiciones para que Sirt2 desacile el sustrato, la eliminación del grupo acilo permite que el agente de escisión corte el enlace entre la lisina y el radical indicador, liberando así el radical indicador. La liberación del radical indicador da como resultado la generación de una señal detectable. El radical de acil lisina puede estar conectado mediante un enlace peptídico a al menos otro residuo de aminoácido, y el radical indicador está conectado a la lisina que porta el grupo acilo (particularmente si la lisina que porta el grupo acilo está en un extremo terminal) o conectado a otro aminoácido, que puede ser otra lisina que está o no también acilada, particularmente si la lisina que porta el grupo acilo está interiorizada, es decir, no se encuentra en un extremo terminal.

El agente de escisión puede ser cualquier sustancia que pueda escindir un enlace peptídico entre residuos de aminoácidos específicos (es decir, el patrón de escisión proteolítica), pero incapaz de escindir el enlace peptídico si está presente una lisina acilada. El agente de escisión puede ser una enzima proteolítica, es decir, una enzima que hidroliza un enlace peptídico (también denominada peptidasa). Los ejemplos de enzimas proteolíticas que pueden funcionar como agente de escisión incluyen, entre otros, tripsina, calpaína, lisilendopeptidasa, endoproteinasa Lys-C, metaloendopeptidasa, plasmina, carboxipeptidasa, quimotripsina, proteasa V8, pepsina, papaína, subtilisina, trombina, elastasa, gluc-C, endo lys-C o proteinasa K, caspasa-1, caspasa-2, caspasa-3, caspasa-4, caspasa-5, caspasa-6, caspasa-7, caspasa-8, MetAP-2, proteasa de adenovirus, proteasa del VIH y similares.

En esta descripción (no según la invención), el agente de escisión puede ser tripsina. La tripsina escindiría los péptidos anclados al extremo carboxi terminal del residuo de lisina del sustrato. Otro agente de escisión adecuado es la pepsina, que hidroliza los enlaces peptídicos en los extremos amino terminales de los residuos de fenilalanina, triptófano y tirosina; así, la pepsina escindiría un péptido sustrato entre un residuo de lisina y un residuo de fenilalanina, triptófano o tirosina adyacente.

El radical indicador es cualquier molécula que es detectable una vez escindida del sustrato. El radical indicador puede ser un fluoróforo. Algunos fluoróforos comunes incluyen isotiocianato de fluoresceína (FITC), derivados de rodamina (TRITC), cumarina, pireno, cianina, colorantes derivados de maleimida, colorantes CF, los colorantes FluoProbes, los colorantes DyLight, los colorantes de poliéster, los colorantes Atto, los fluoruros HiLyte, luciferinas y Alexa Fluor. Las luciferinas, tales como la luciferina de luciérnaga, pueden emitir luz cuando se incuban con luciferasa de luciérnaga y ATP. El radical indicador puede ser un fluoróforo de aminocumarina, o más específicamente, un fluoróforo de aminometilcumarina, tal como 7-amino-4-metilcumarina (AMC).

La intensidad de fluorescencia o la longitud de onda de emisión del fluoróforo pueden depender de la presencia o ausencia de un enlace entre el fluoróforo y el sustrato. El cambio en la intensidad de fluorescencia o la longitud de onda de emisión del fluoróforo (es decir, en comparación antes y después de la escisión del sustrato) se miden típicamente con un espectrofotómetro de fluorescencia.

La intensidad de fluorescencia o la longitud de onda de emisión fluoróforo anclado al sustrato pueden no cambiar necesariamente dependiendo de la presencia o ausencia de un enlace entre el fluoróforo y el sustrato, pero en cambio se proporciona una señal detectable marcando también el sustrato con un grupo extintor. Por ejemplo, el fluoróforo se puede unir al extremo carboxilo terminal de la lisina acilada, mientras que el grupo extintor se puede anclar a un aminoácido diferente en una cadena peptídica u otra porción de la estructura molecular que contiene la lisina acilada. Antes de la escisión del fluoróforo o del grupo extintor, la intensidad de fluorescencia de estos sustratos es baja debido a la proximidad del grupo extintor al fluoróforo. Después de la escisión del fluoróforo o del grupo extintor del sustrato, se mejora la intensidad de fluorescencia. Esto permite medir la cantidad del péptido sustrato escindido. Los ejemplos de grupos extintores adecuados para su uso en la presente memoria incluyen DNP, radicales Black Hole Quencher™ y DABCYL. El extintor también puede ser un fluoróforo.

El sustrato puede contener un par donador-aceptor de fluoróforos, como se emplea comúnmente en experimentos de transferencia de energía de fluorescencia (FRET). Antes de la escisión de los fluoróforos donadores o receptores, los fluoróforos donadores y aceptores están lo suficientemente cerca para la transferencia de energía entre el donador y el receptor, donde tal transferencia de energía se puede medir mediante FRET. Un fluoróforo se puede unir, por ejemplo, al terminal carboxilo de la lisina acilada, y el otro miembro del par donante-receptor se coloca muy cerca, por ejemplo, se une a otra porción del sustrato, como otro residuo de aminoácido del sustrato, o en otra porción del residuo de lisina, como en la cadena lateral de lisina. Cuando se separa uno de los fluoróforos del par, la intensidad de la señal FRET disminuye significativamente, lo que puede correlacionarse con un nivel de actividad para Sirt2.

El compuesto candidato puede ser cualquier molécula o macromolécula (p. ej., una proteína, polinucleótido o polisacárido) que se está probando para determinar su capacidad para inhibir, activar o modular las actividades de la desacilasa Sirt2. El compuesto candidato puede contener una porción que imita la acil-lisina hidrófoba, como se describió anteriormente para el sustrato, excepto que no se requiere que el compuesto candidato incluya un radical indicador (o excluya un radical indicador). Sin desear estar limitados por ninguna teoría, se cree que un compuesto candidato eficaz forma un intermedio covalente inmovilizado con Sirt2. Por lo tanto, se puede incluir cualquier característica estructural que pueda fomentar esta interacción con Sirt2 en el compuesto candidato en un esfuerzo por hacer que el compuesto candidato sea un modulador más eficaz. El compuesto candidato puede ser una molécula pequeña. Una "molécula pequeña" se refiere a compuestos orgánicos pequeños, tales como heterociclos, péptidos, sacáridos, esteroides y similares. Los moduladores de molécula pequeña tienen preferiblemente un peso molecular de menos de o hasta aproximadamente 5000, 3000, 1500, 1000, 800 o 500 Daltons. Los compuestos candidatos se pueden modificar para mejorar, por ejemplo, la eficacia, la estabilidad o la compatibilidad farmacéutica. El compuesto candidato puede ser un compuesto que tenga una estructura dentro del alcance de la Fórmula (1) o (2).

Después de la escisión del radical indicador en el sustrato de acilo, se detecta la intensidad de la señal generada por la reacción de escisión. Mediante métodos conocidos en la técnica para correlacionar una intensidad de señal con actividad enzimática, la intensidad de señal generada por la reacción de escisión se correlaciona con la actividad desacilasa de Sirt2. La actividad de desacilasa observada, que aparece en presencia del compuesto candidato, se compara con la actividad de desacilasa de Sirt2 en las mismas o sustancialmente las mismas condiciones, excepto en ausencia del compuesto candidato (es decir, la actividad de desacilasa de control). El valor de la actividad desacilasa de control se puede obtener realizando un experimento separado en el que el sustrato acilado se pone en contacto con Sirt2, en ausencia de un compuesto candidato, en condiciones para que Sirt2 desacile el sustrato, poniendo en contactando el sustrato desacilado con un agente de escisión, y observando una intensidad de señal. El

experimento para determinar el valor de la actividad desacilasa de control se puede incluir como otra etapa del presente método realizado directamente antes o después del método descrito anteriormente que incluye el compuesto candidato. Alternativamente, el valor de la actividad desacilasa de control se puede conocer ya a partir de un experimento anterior y, por lo tanto, puede no ser necesario restablecerlo en el método anterior.

Si no se encuentra ninguna diferencia entre el valor de la actividad desacilasa de control y el valor de la actividad desacilasa observado en presencia del compuesto candidato, se puede concluir que el compuesto candidato no es un modulador de Sirt2. Por el contrario, si se encuentra una diferencia entre el valor de la actividad desacilasa de control y el valor de la actividad desacilasa observado en presencia del compuesto candidato, se puede concluir que el compuesto candidato es un modulador de Sirt2. Un compuesto candidato se identifica como un inhibidor de Sirt2 cuando hay una disminución en la actividad desacilasa de Sirt2 en presencia del compuesto candidato, con respecto a la actividad desacilasa de Sirt2 en ausencia del compuesto candidato. Un compuesto candidato se identifica como un activador de Sirt2 cuando hay un aumento en la actividad desacilasa de Sirt2 en presencia del compuesto candidato, con respecto a la actividad desacilasa de Sirt2 en ausencia del compuesto candidato.

Para realizar un ensayo para detectar la actividad Sirt2, en primer lugar, se pone en contacto una muestra que contiene Sirt2 con un sustrato adecuado descrito en la presente memoria y se incuba en condiciones apropiadas. El término "muestra" se refiere a cualquier muestra de interés que contiene Sirt2 purificado, parcialmente purificado o no purificado, y puede ser un producto lisado de células o tejidos, o una preparación de proteína Sirt2 (purificada a partir de células o tejidos o un sistema de expresión recombinante). Después del período de incubación entre una muestra de Sirt2 y un sustrato, se añade un agente de escisión a la reacción junto con un tampón de reacción apropiado. Después de este segundo período de incubación, la reacción se puede diluir con agua u otro tampón de pH neutro, y la fluorescencia se registra mediante un detector de fluorescencia que detecta la fluorescencia a las longitudes de onda de excitación y detección apropiadas para el fluoróforo utilizado. La intensidad de la señal se correlaciona con la actividad Sirt2. Alternativamente, el agente de escisión está presente en el momento en que el sustrato acilado está en presencia de Sirt2 y el compuesto candidato, y, por lo tanto, no se necesita una segunda etapa para la reacción de escisión.

Los ensayos se pueden realizar en un formato de microplaca. Por ejemplo, se puede añadir un péptido sustrato a un tampón de reacción, y verter la solución en los pocillos de una microplaca para fluorimetría, y a continuación incubar la placa. Si se observa el efecto de un compuesto candidato, el compuesto candidato se puede incluir con el sustrato. A continuación, se añade una alícuota de una muestra de Sirt2 a cada pocillo, y se somete a desacilación durante un período de tiempo determinado. Posteriormente o al mismo tiempo, se agrega una alícuota de enzima proteolítica y un tampón de reacción apropiado a cada pocillo, y a continuación se mide periódicamente la intensidad de fluorescencia de la solución, utilizando un lector de microplacas de fluorescencia.

Los ensayos se pueden miniaturizar y automatizar para análisis de alto rendimiento. Los ensayos también se pueden realizar en uno o más recipientes separados; sin embargo, uno de los beneficios de los ensayos descritos es la capacidad de los ensayos para llevarse a cabo en un solo recipiente, tal como un pocillo de microplaca, que permite la facilidad de uso y la automatización. El sustrato se puede inmovilizar opcionalmente sobre un material sólido, tal como mediante una conexión biotina-estreptavidina, en situaciones en las que se desea dicha inmovilización.

Otro ensayo proporcionado en la presente memoria es un ensayo de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS). En este ensayo, la actividad Sirt2 se identifica determinando las cantidades del péptido sustrato y péptido producto después del contacto con Sirt2. La cromatografía líquida (LC), particularmente HPLC, funciona para separar el sustrato del producto. La cuantificación se puede lograr utilizando el área de absorción de luz ultravioleta (como a 215 nm o 280 nm) para el pico del producto y el pico del sustrato en el cromatograma LC, o utilizando la intensidad iónica del ion producto y del ion sustrato en la espectrometría de masas. La comparación de la cantidad de sustrato (p. ej., péptido acilado) con el producto (es decir, péptido desacilado) se correlaciona con la cantidad de actividad Sirt2 en el sustrato. En este ensayo, un aumento en la cantidad de producto indica actividad Sirt2, y poco o ningún producto indica poca o ninguna actividad Sirt2.

Mediante el uso de un ensayo de espectrometría de masas, un compuesto candidato se puede identificar como un inhibidor o activador de Sirt2 de la siguiente manera. Un compuesto candidato se identifica como un inhibidor de Sirt2 cuando hay una disminución en el producto (p. ej., péptido desacilado) producido en presencia del compuesto candidato con respecto al producto producido en ausencia del compuesto candidato. Un compuesto candidato se identifica como un activador de Sirt2 cuando hay un aumento en el producto (p. ej., péptido desacilado) producido en presencia del compuesto candidato con respecto al producto producido en ausencia del compuesto candidato. Preferiblemente, para que el compuesto candidato se considere un modulador, la diferencia de actividad entre la presencia y ausencia del compuesto candidato debe ser al menos, por ejemplo, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o más.

Para evitar la escasez del sustrato con respecto a la actividad enzimática Sirt2 pronosticada, se puede utilizar una cantidad en exceso del sustrato en el ensayo. Específicamente, para determinar la actividad Sirt2 en una muestra

biológica general, tal como extracto nuclear de células, la concentración del sustrato que se debe utilizar en la reacción es típicamente de 1 a 200 μM , o más concretamente, de 20 a 50 μM . La concentración del agente de escisión también se puede ajustar dependiendo de la cantidad de sustrato utilizado. Típicamente, la cantidad del agente de escisión se ajusta de acuerdo con la cantidad pronosticada del péptido sustrato generado para realizar una escisión suficiente del péptido sustrato en una condición dada. Cuando se utiliza sustrato a una concentración de aproximadamente 0,01 a 1 mM en la reacción, la cantidad de tripsina que se debe utilizar puede ser, por ejemplo, de 0,2 a 5 μg mediante reacción de 60 μL , preferiblemente de 1 a 2 μg por reacción de 60 μL .

Con respecto a la primera reacción (desacilación por Sirt2), el pH para la reacción se puede seleccionar teniendo en cuenta el pH óptimo de Sirt2. El pH se ajusta típicamente a un pH de 6,0 a 8,5, o más concretamente, un pH de 6,8 a 8,5. El tampón de reacción proporciona preferiblemente el pH mencionado anteriormente. Por ejemplo, se pueden utilizar Tris-HCl, HEPES-KOH y otros tampones de este tipo en el presente método. Más específicamente, por ejemplo, se puede utilizar Tris-HCl 20 mM que tiene un pH de 7,4. Generalmente, el NAD es un co-sustrato requerido para el funcionamiento de Sirt2, y se utiliza típicamente a una concentración de aproximadamente 0,5 mM. En la solución de reacción también se incluyen generalmente sales y conservantes. Por ejemplo, se puede añadir ditioneitol (DTT) 1 mM a la reacción. La primera reacción (desacilación por Sirt2) puede incubarse, por ejemplo, a 35-40°C, durante un tiempo de, por ejemplo, 2-20 horas. Las condiciones de incubación ilustrativas específicas incluyen, por ejemplo, incubar una mezcla líquida de un sustrato y una muestra que contiene Sirt2 en tampón Tris-HCl (pH 7,4, aproximadamente 20 mM) que contiene NAD (aproximadamente 0,5 mM) y DTT (aproximadamente 1 mM) durante aproximadamente 4 horas a aproximadamente 37°C. Para la segunda reacción mediante un agente de escisión, el agente de escisión se añade a la reacción junto con un tampón de reacción apropiado. Por ejemplo, se pueden añadir tripsina (1 μg) y CaCl_2 (1 mM) e incubar la reacción durante aproximadamente 3 horas a aproximadamente 37°C.

Después de la incubación con tripsina, la reacción se puede diluir con agua u otro tampón de pH neutro, y la fluorescencia se registra mediante un detector de fluorescencia que detecta la fluorescencia a las longitudes de onda de excitación y detección apropiadas para el fluoróforo utilizado. La intensidad de la señal se correlaciona con la actividad Sirt2 como se comentó anteriormente.

El sustrato, el compuesto candidato, o ambos, pueden tener R_3 y/o R_4 R_6 y/o R_7 , como radicales unidos a amida, típicamente radicales de péptidos o que imitan péptidos. Los radicales conectados a amida pueden excluir uno o más enlaces o grupos no amídicos, tales como enlaces o grupos tioamida, tiourea, sulfonamida, sulfona, sulfamida, sulfóxido, organoéster (es decir, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$), organotioéster (es decir, $-\text{C}(\text{S})\text{O}-$), urea, éter (es decir, $\text{R}-\text{O}-\text{R}$), tioéter (es decir, $\text{R}-\text{S}-\text{R}$), disulfuro, azo, carbamato (es decir, $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$), carbonato (es decir, $-\text{OC}(\text{O})\text{O}-$), imina, fosfato, fosfonato, fosfinato y óxido de fosfina. Los grupos que están excluidos pueden ser grupos hidrolizables, o grupos que experimentarían hidrólisis o escisión cuando se introdujeran en el tejido celular. Se pueden incluir uno o más de tales grupos si se desea tal hidrólisis, o dotar a la molécula de otras propiedades mejoradas, tales como una capacidad de direccionamiento, biodistribución o biodisponibilidad mejorada.

Los métodos para sintetizar los sustratos y los compuestos candidatos (o moduladores) descritos en la presente memoria son conocidos en la técnica, y como se describe en los Ejemplos que siguen. Por ejemplo, el acoplamiento de grupos acilo a cadenas laterales de lisina se puede lograr utilizando condiciones de reacción bien conocidas para la preparación de amidas a partir de aminas y ácidos carboxílicos. Por otra parte, la conversión de un átomo de oxígeno carbonílico (es decir, R_2 o R_8) a un tiocarbonilo se puede lograr, por ejemplo, mediante reacción con el reactivo de Lawesson por medio de métodos bien conocidos en la técnica.

La capacidad de un compuesto candidato para inhibir la actividad Sirt2 se mide típicamente determinando la CI_{50} del compuesto candidato. Como se emplea en la presente memoria, la " CI_{50} " o "concentración inhibidora semimáxima" identifica cuánto compuesto se necesita para inhibir la actividad a la mitad. La CI_{50} de un compuesto se puede determinar construyendo una curva dosis-respuesta y examinando el efecto de diferentes concentraciones de un compuesto sobre la reducción o prevención de la actividad enzimática. Los valores de CI_{50} se pueden calcular para un inhibidor dado determinando la concentración necesaria para inhibir la mitad de la actividad enzimática máxima. El análisis matemático utilizado para obtener un valor de CI_{50} es bien conocido en la técnica.

La capacidad de un compuesto candidato para activar la actividad Sirt2 se mide determinando la CE_{50} del compuesto candidato. Como se emplea en la presente memoria, " CE_{50} " o "concentración eficaz semimáxima" se refiere a la concentración de un compuesto que induce una respuesta a medio camino entre el valor inicial y el máximo. La CE_{50} de una curva dosis-respuesta graduada, por lo tanto, representa la concentración de un compuesto donde se observa 50% de su efecto máximo. El análisis matemático utilizado para obtener un valor de CE_{50} es bien conocido en la técnica.

Los inhibidores de Sirt2 de la invención inhiben preferiblemente la actividad desacilasa de Sirt2 con una CI_{50} o CE_{50} menor o igual a 1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , 30 μM , 40 μM , 50 μM o 100 μM , o un valor de CI_{50} o CE_{50} dentro de un intervalo limitado por cualquiera de estos dos valores.

Esta descripción (no según la invención) también describe un kit útil para medir la actividad Sirt2 en una muestra, y para seleccionar compuestos que inhiben o mejoran la actividad Sirt2 descrita anteriormente. El kit contiene, como mínimo, un sustrato o precursor de sustrato que incluye una lisina acilada o mimético de la misma, como se describió anteriormente. El kit también puede incluir uno o más de los siguientes componentes: una o más muestras de Sirt2; un agente de escisión, como se describe anteriormente; uno o más compuestos candidatos o precursores de compuestos candidatos; uno o más compuestos indicadores; un extintor; un tampón; un componente estabilizador de proteínas o de desnaturalización de proteínas, tal como BSA o un poliol, tal como sacarosa o fructosa; y uno o más dispositivos para combinar reactivos y/o probar la actividad de desacilasa, como cualquiera de los dispositivos o aparatos utilizados para realizar mediciones cinéticas para determinar la actividad enzimática.

A continuación se presentan ejemplos con fines ilustrativos y para describir el mejor modo de la invención en la actualidad.

Ejemplo 1

Síntesis de inhibidores de tioacilo seleccionados entre Sirt2 (TA, TB, TH y TM)

Se sintetizaron e investigaron 4 compuestos para determinar sus habilidades inhibitoras de Sirt2. Los compuestos se identifican aquí como tioacetilo (TA), tiobutirilo (TB), tioheptanoilo (TH) y tiomiristoilo (TM), que corresponden al grupo tioacilo en estos compuestos. El Compuesto TA se conoce en la técnica anterior (véase más adelante); el Compuesto TB es un compuesto de referencia que no está de acuerdo con la presente invención. Las estructuras de los cuatro compuestos se muestran en la FIG. 2 (abajo). En cada estructura, el radical conector que corresponde a Y₁ en la fórmula (2) debe ser "-OCH₂-" no "-O-". La FIG. 2 (arriba) es un esquema general del mecanismo para la inhibición de sirtuinas por compuestos de tioacetil lisina.

Los reactivos se obtuvieron con la mayor pureza disponible y se utilizaron tal como se suministraron. El RMN H¹ se realizó en un espectrómetro INOVA 400. La LCMS se realizó en un SHIMADZU® LCMS-QP8000α con una columna Sprite® TARGA C18 (40 × 2,1 mm, 5 μm, Higgins Analytical, Inc., Mountain View, CA) a 215 y 260 nm. Los disolventes utilizados en la LCMS fueron agua con ácido fórmico al 0,1% y acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1%. La síntesis de TA es referida en la técnica (Suzuki, T. et al., Bioorg. Med. Chem Lett. 19, 5670-5672, 2009).

El ácido carboxílico deseado (p. ej., ácido butírico, ácido heptanoico o ácido mirístico, 30 mmoles) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (DMF, 20 mL) se añadió a *n*-hidroxisuccinimida (3,45 g, 30 mmoles) con agitación a temperatura ambiente. A continuación, se añadió a la reacción *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (6,19 g, 30 mmoles) en DMF anhidra (20 mL). Después de agitar durante dos horas, la mezcla de reacción se filtró. El producto filtrado se añadió a una solución de Cbz-Lys-OH (5,6 g, 20 mmoles) con *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA, 5,2 mL, 30 mmoles) en DMF anhidra (50,0 mL) a temperatura ambiente (donde Cbz = carboxibencilo, y la temperatura ambiente (RT) es típicamente 18-28°C, o más típicamente, 20-25°C). La mezcla de reacción resultante se agitó durante la noche. A continuación, a la mezcla de reacción se le añadieron 44 mL de agua y 26 mL de ácido clorhídrico 1 M (HCl) para ajustar el pH a aproximadamente 2 a 3. La mezcla se extrajo tres veces con 200 mL de acetato de etilo y se lavó dos veces con 100 mL de salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de la eliminación de los disolventes a vacío, el residuo que contenía Cbz-Lys(acil)-OH se utilizó directamente para la siguiente etapa.

Se añadió gota a gota cloruro de acetilo (14,2 mL, 200 mmoles) a metanol (150 mL) a 0°C. La solución se agitó durante 30 minutos a RT. Después de este tiempo, se añadió una solución de 20 mmoles de Cbz-Lys(acil)-OH obtenida en la última etapa en metanol (50 mL) y la mezcla de reacción se agitó durante otras dos horas o durante la noche. Después de este tiempo, la solución se concentró al vacío y el residuo se purificó a través de una columna de gel de sílice utilizando diclorometano:metanol 20:1 como eluyente para proporcionar Cbz-Lys(acil)-OMe producto con un rendimiento de -95%.

Se suspendió Cbz-Lys(acil)-OMe (20 mmoles) en tolueno anhidro (50 mL). Se añadió a continuación a la suspensión reactivo de Lawesson (8,0 g, 20 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante dos horas bajo nitrógeno (controlado mediante cromatografía en capa fina o TLC). Después de eliminar el tolueno a vacío, el residuo se purificó a través de una columna de gel de sílice utilizando acetato de etilo:hexano 1:4 como eluyente para proporcionar Cbz-Lys(tioacil)-OMe producto como un sólido de color blanco con un rendimiento de ~90%.

Se disolvió Cbz-Lys(tioacil)-OMe (10 mmoles) en THF:H₂O 1:1 (100 mL) y la mezcla se enfrió a 0°C. Se añadió hidróxido de litio (95,8 g, 40 mmoles) y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante tres horas (controlado mediante TLC). La reacción se aciduló con HCl acuoso 1 M y se extrajo con diclorometano (3x, 150 mL). La fracción orgánica combinada se lavó con salmuera (200 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío. El residuo que contenía el producto bruto Cbz-Lys(tioacil)-OH se utilizó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

A una solución de Cbz-Lys(tioacil)-OH (10 mmoles) y *N*-metilmorfolina (1,1 mL, 10 mmoles) en diclorometano seco

(50 mL) se le añadió cloroformiato de isobutilo (1,3 mL, 10 mmoles) gota a gota a 0°C. La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a 0°C. Se añadió anilina (1,09 mL, 12 mmoles) a 0°C y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a RT. El disolvente se eliminó y la sustancia resultante se disolvió en acetato de etilo. La capa orgánica se lavó sucesivamente con una solución saturada de bicarbonato de sodio, una solución de HCl 0,1 N y salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto TB, TH o TM esperado (rendimiento de ~90%), que se purificó mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice con hexano:acetato de etilo 4:1.

RMN ^1H TB (400 MHz, CD_3OD): δ 7,54-7,50 (m, 2H), 7,33-7,21 (m, 7H), 7,07-7,04 (m, 1H), 5,05 (q, 2H, $J = 12$ Hz), 4,27-4,23 (m, 1H), 3,55 (t, 2H, $J = 12$ Hz) 2,51 (t, 2H, $J = 8,0$ Hz), 1,72-1,68 (m, 8H), 0,86 (t, 3H, $J = 8,0$ Hz). LCMS (ESI) calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 442,2, observado 442,3;

RMN ^1H TH (400 MHz, CDCl_3): δ 8,92 (s, 1H), 8,01 (s, 1H), 7,47-7,06 (m, 10H), 6,12 (s, 1H), 5,09-5,00 (m, 2H), 4,43 (s, 1H), 3,58 (s, 2H), 2,56 (t, 2H, $J = 8$ Hz), 1,87-1,23 (m, 14H), 0,84 (s, 3H). LCMS (ESI) calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 484,3, observado 484,3;

RMN ^1H TM (400 MHz, CD_3OD): δ 7,54-7,52 (m, 2H), 7,36-7,26 (m, 7H), 7,10-7,06 (m, 1H), 5,12-5,04 (m, 2H), 4,23-4,20 (m, 1H), 3,57 (t, 2H, $J = 8,0$ Hz) 2,54 (t, 2H, $J = 8,0$ Hz), 1,84-1,26 (m, 28H), 0,87 (t, 3H, $J = 8,0$ Hz). LCMS (ESI) calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 582,4, observado 582,5.

Ejemplo 2

Elucidación de las capacidades inhibitoras de Sirt2 de los inhibidores de TA, TB, TH y TM

Se encontraron perfiles de selectividad distintos para cada uno de los inhibidores estudiados. Los valores de Cl_{50} (μM) para cada uno de los compuestos inhibidores estudiados se proporcionan en la Tabla 1 a continuación. Se preincubaron diferentes concentraciones de TA (técnica anterior), TB (compuesto de referencia), TH o TM con 1 μM de la sirtuina y NAD 1 mM en tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,0) con ditiotreitól 1 mM (DTT) a 37°C durante 30 minutos. A continuación, se añadieron péptidos acilados 0,05 mM (H3K9Ac para Sirt1, Sirt2 y Sirt3; H3K9Su para Sirt5; H3K9Myr para Sirt6 y Sirt7) para iniciar las reacciones. El volumen total de reacción fue de 60 mL. A continuación, las reacciones se incubaron a 37°C durante una cierta cantidad de tiempo (2 minutos para Sirt1, 10 minutos para Sirt2 y Sirt5, 30 minutos para Sirt3 y 1 hora para Sirt6 y Sirt7). Las reacciones se detuvieron añadiendo 60 mL de una solución acuosa que contenía HCl 200 mM y ácido acético 320 mM. Después de la centrifugación para eliminar las proteínas precipitadas, el sobrenadante se analizó mediante HPLC con una columna C18 de fase inversa (250 \times 4,6 mm, 90 A, 10 mm, GraceVydac, Southborough, MA), con un gradiente lineal de 0% a 20% de B durante 10 minutos (1 mL/min). La cuantificación del producto se basó en el área de absorbancia controlada a 215 nm, suponiendo que la hidrólisis del grupo acilo no afecta a la absorbancia. Todas las reacciones se realizaron por duplicado.

En particular, como se muestra en la Tabla 1, TB (compuesto de referencia) y TH pueden inhibir eficazmente Sirt1, mientras que TH y TM pueden inhibir eficazmente Sirt2. Como también se muestra en los datos de la Tabla 1, ninguno de estos compuestos inhibe eficazmente Sirt3, Sirt5 o Sirt6. De particular importancia son los valores de Cl_{50} de TM, que muestran que TM es un inhibidor selectivo de Sirt2 con una eficacia >50 veces mejor en la inhibición de Sirt2 en comparación con las otras sirtuinas probadas. Esta notable selectividad para Sirt2 es particularmente inesperada. Por otra parte, puesto que se observa una tendencia en la cual la selectividad para Sirt2 aumenta con el aumento de la longitud de la cadena de acilo, se ha proporcionado evidencia de que los compuestos inhibidores que contienen longitudes de cadena de acilo mayores que las encontradas en TH y menores que en TM (es decir, por encima de 6 y menos de 13 átomos de carbono) y longitudes de cadena de acilo superiores a las encontradas en TM (p. ej., superiores a 13 y hasta 16, 17, 18, 19 o 20 átomos de carbono) también mostrarían una selectividad sustancial contra Sirt2.

Tabla 1. valores de Cl_{50} (μM) de diferentes compuestos para Sirt1, 2, 3, 5, 6 y 7

	TA	TB	TH	TM
Sirt1	30	2,4	0,31	>205
Sirt2	105	3,0	0,12	0,05
Sirt3	>205	113	105	124
Sirt5	>205	>205	>205	>205
Sirt6	>205	>205	>205	>205
Sirt7	>205	>205	>205	>205

Ejemplo 3**Capacidades de inhibición del cáncer *in vitro* de los inhibidores de TA, TB, TH y TM**

5 A continuación, se probó la capacidad de estos compuestos inhibidores para inhibir la proliferación de células cancerosas. Las células MCF-7 y MDA-MB-231 (ATCC) se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Invitrogen®) con un suplemento de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10%. Las células MCF-10A (ATCC) se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco: mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F12) (Invitrogen®) con un suplementado de suero de caballo al 10% (Invitrogen®).

10

Procedimiento general para el ensayo en agar blando

15 La agarosa tipo VII al 0,6% (Sigma), FBS al 10% y penicilina-estreptomicina al 1% (Invitrogen®) se prepararon en medio RPMI 1640 y se añadieron a una placa de cultivo de seis pocillos (2 mL/pocillo). Las placas se mantuvieron a °C durante 20 minutos para permitir que se solidificara la agarosa. A continuación, las placas se incubaron a 37°C durante 5 minutos antes de la adición de la solución de agar blando/células de 1 mL preparada mezclando agarosa tipo VII al 0,3%, FBS al 10%, penicilina-estreptomicina al 1% y ~3000 células en medio RPMI 1640. Nuevamente, las placas se mantuvieron a 4°C durante 20 minutos para permitir que se solidificara la agarosa. Después de incubar las placas a 37°C durante 7 días, se añadió 1 mL de medio RPMI 1640 con agarosa tipo VII al 0,3%, FBS al 10% y penicilina-estreptomicina al 1% a las placas y las placas se mantuvieron a 4°C durante 20 minutos para permitir que se solidificara la agarosa. Después de incubar las placas a 37°C durante otros 7 días, las formaciones de colonias se examinaron bajo un microscopio. Todos los experimentos fueron duplicados. Para probar los inhibidores, se añadieron las concentraciones indicadas de inhibidores en dimetilsulfóxido (DMSO) o DMSO solo (control negativo) a la solución de agar blando/células; para probar células con disminución de la expresión, se añadieron las células con disminución de la expresión indicadas a la solución de agar blando/células.

25

Procedimiento general para el ensayo de baja supervivencia en suero

30 Para las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, se sembraron 6000 células en 2 mL de medio RPMI 1640 con FBS al 3% (o en 2 mL de DMEM/F12 con suero de caballo al 3% para la línea celular MCF-10A) en una placa de cultivo de seis pocillos. Después de que las células se unieron a las placas, se añadieron a las placas las concentraciones indicadas de inhibidores en DMSO o DMSO solo (control negativo). Después de lavar con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se contaron los números de células vivas el día 0, día 1, día 3 y día 5. La prueba se duplicó.

35

40 La FIG. 3 (A) es un gráfico que muestra la capacidad de inhibición de los cuatro compuestos inhibidores de Sirt2 ilustrativos (TA [técnica anterior], TB [compuesto de referencia], TH y TM), utilizando DMSO como control. Como se muestra, los inhibidores de Sirt2 (TH y TM) pueden inhibir eficazmente la proliferación de células cancerosas, y el compuesto de referencia TB, que solo puede inhibir eficazmente Sirt1, solo tiene un efecto menor sobre la proliferación de las células cancerosas. La FIG. 3(B) es un gráfico que muestra la capacidad de inhibición de TH y TM (25 µM) contra la línea celular de cáncer de mama MCF7 y la línea celular normal MCF10a. Como se muestra, TH y TM son más tóxicos para las células cancerosas ya que el efecto sobre MCF10a (una línea celular epitelial mamaria humana no tumorigénica normal) es mucho menor que sobre la línea celular cancerosa MCF7. Por otra parte, como también se muestra en la FIG. 3(B), a una concentración de 25 µM, el inhibidor selectivo de Sirt2, TM, inhibió completamente la proliferación de células MCF7. El inhibidor selectivo de Sirt1, el compuesto de referencia TB, solo mostró un efecto muy modesto. En contraste, TH, que puede inhibir tanto Sirt1 como Sirt2, es igualmente eficaz que TM. Estos datos sugieren que la inhibición de Sirt2, pero no de Sirt1, puede inhibir la proliferación de células cancerosas. Por lo tanto, puesto que los inhibidores de Sirt2 pueden inhibir eficazmente la proliferación de células cancerosas MCF7, se ha demostrado que los inhibidores de Sirt2 descritos en la presente memoria son útiles en el tratamiento del cáncer, particularmente del cáncer de mama.

50

55 Como también se muestra en las Figs. 3(A) y 3(B), la inhibición/toxicidad del crecimiento es selectiva hacia las células cancerosas, puesto que las células MCF10a, que son consideradas células no cancerosas, aún pueden crecer en presencia de 25 µM de TH o TM, que inhibieron completamente el crecimiento de la línea celular de cáncer MCF7.

55

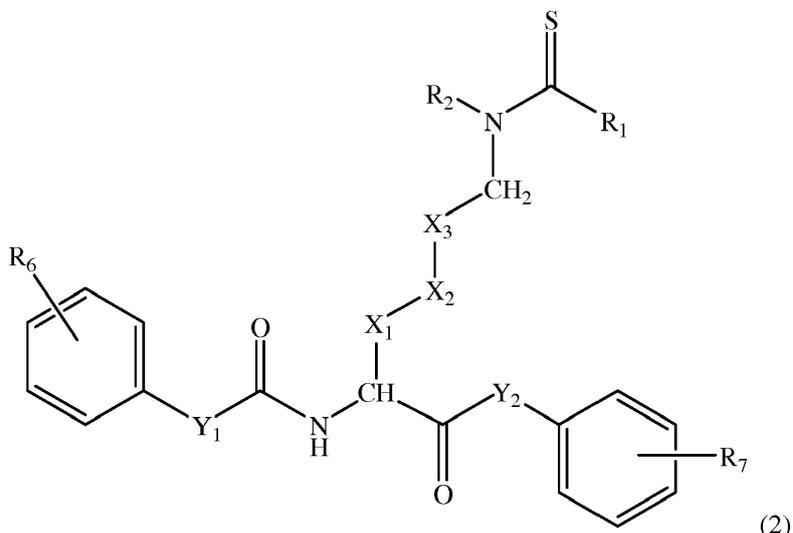
60 Como se muestra por medio de las micrografías de ensayo en las Figs. 4(A) y 4(B), también se ha encontrado en la presente memoria que el inhibidor específico de Sirt2 TM a una concentración de 25 µM puede inhibir el crecimiento independiente del anclaje de la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231. El cáncer de mama triple negativo carece de la expresión del receptor de estrógeno (ER) y del receptor de progesterona (PR), así como la amplificación del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). El cáncer de mama triple negativo es más difícil de tratar clínicamente y, por lo tanto, existe un esfuerzo excepcional para identificar nuevas dianas y el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. La inhibición específica de Sirt2 por TM demuestra que los inhibidores selectivos de Sirt2 se pueden utilizar en el tratamiento del cáncer de mama triple negativo.

60

5 Para validar que la inhibición de Sirt2 condujo a la inhibición del crecimiento independiente de anclaje de las células cancerosas, otro experimento disminuyó la expresión de Sirt1 y Sirt2 con ARNip. Como se muestra por medio de las micrografías de ensayo en las Figs. 5(A), 5(B) y 5(C), Sirt2 KD, pero no Sirt1 KD, inhibieron casi por completo el crecimiento independiente del anclaje de las células MCF7. Los datos de KD están completamente de acuerdo con los datos de inhibición de moléculas pequeñas y sugieren que Sirt2 es una nueva diana terapéutica para el cáncer de mama.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que modula la actividad Sirt2 que tiene la siguiente estructura química:



en donde R_1 es un grupo hidrocarbonado que tiene al menos cinco átomos de carbono conectados por enlaces carbono-carbono, en donde uno o más átomos de hidrógeno en dicho grupo hidrocarbonado se reemplazan opcionalmente por átomos de flúor;

R_2 se selecciona entre un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarbonado;

R_6 y R_7 se seleccionan independientemente entre átomos de hidrógeno, grupos hidrocarbonados no sustituidos que tienen hasta seis átomos de carbono, grupos alcoxi -OR, grupos amida -NR'C(O)R o -C(O)NR'R, grupos cetona -C(O)R, grupos éster -C(O)OR o -OC(O)R, grupos carbamato-OC(O)NR'R o -NR'C(O)OR, y grupos urea -NR'C(O)NR, en donde R es un grupo hidrocarbonado que tiene hasta seis átomos de carbono, y R' es un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarbonado que tiene hasta seis átomos de carbono;

X_1 , X_2 y X_3 se seleccionan independientemente entre $-(CH_2)_n-$, $-NR_5-$, $-O-$, $-S-$, o un enlace, en donde n representa 1, 2 o 3, y al menos uno de X_1 , X_2 y X_3 es un grupo $-CH_2-$;

Y_1 se selecciona entre $-OCH_2-$, $-O-$, $-NR_5-$ y $-S-$ grupos;

Y_2 se selecciona entre grupos $-O-$, $-NR_5-$ y $-S-$; y

en donde R_5 es un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarbonado.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde dicho grupo hidrocarbonado para R_1 tiene al menos seis átomos de carbono, o al menos siete átomos de carbono, o al menos ocho átomos de carbono.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde dicho grupo hidrocarbonado para R_1 tiene hasta veinte átomos de carbono.

4. El compuesto de cualquier reivindicación precedente, en donde cada uno de X_1 , X_2 y X_3 es $-(CH_2)_n-$, en donde n es independientemente 1, 2 o 3, o en donde cada uno de X_1 , X_2 y X_3 es $-CH_2-$.

5. El compuesto de cualquier reivindicación precedente, en donde Y_1 es un átomo de $-O-$ o un grupo $-OCH_2-$ o Y_2 es un grupo $-NR_5-$ o Y_1 es un átomo de $-O-$ o un grupo $-OCH_2-$ e Y_2 es un grupo $-NR_5-$.

6. El compuesto de cualquier reivindicación precedente, en donde R_6 y R_7 se seleccionan independientemente entre átomos de hidrógeno, grupos hidrocarbonados no sustituidos que tienen hasta tres átomos de carbono, grupos alcoxi -OR, grupos amida -NR'C(O)R o -C(O)NR'R, grupos cetona -C(O)R, grupos éster -C(O)OR o -OC(O)R, grupos carbamato -OC(O)NR'R o -NR'C(O)OR, y grupos urea -NR'C(O)NR, en donde R es un grupo hidrocarbonado que tiene hasta tres átomos de carbono, y R' es un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarbonado que tiene hasta tres átomos de carbono.

7. Un modulador de Sirt2 para su uso en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo, en donde el modulador de Sirt2 se define como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8. El modulador de Sirt2 para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho trastorno neurodegenerativo se selecciona entre la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Alzheimer.

9. Un modulador de Sirt2 para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el modulador de Sirt2 se define como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 5 10. El modulador de Sirt2 para su uso según la reivindicación 9, en donde dicho cáncer es cáncer de mama, tal como cáncer de mama triple negativo.

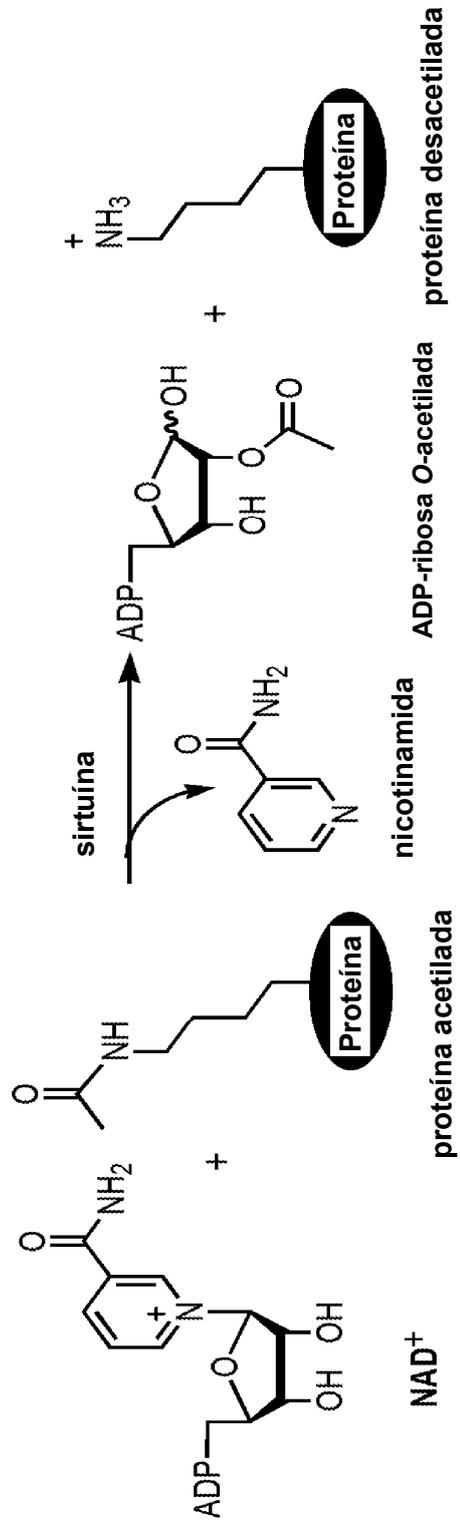


FIG. 1

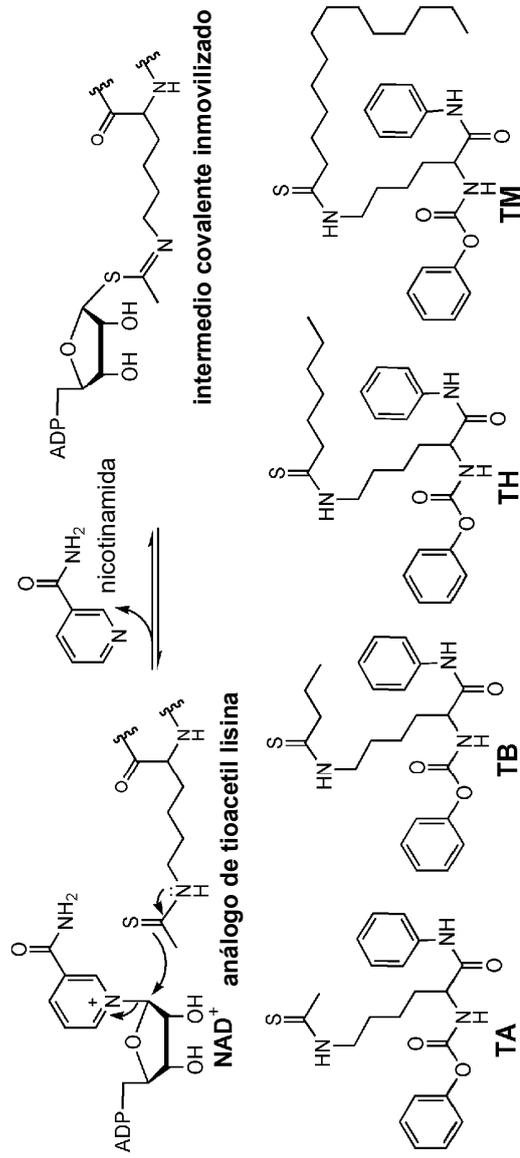
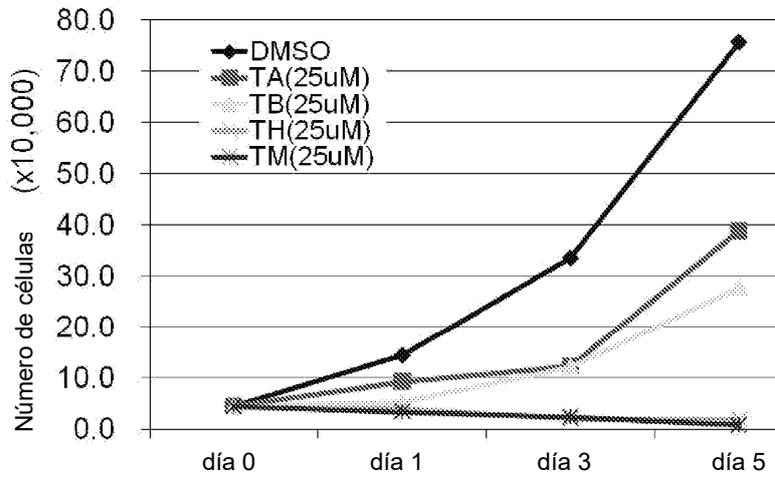
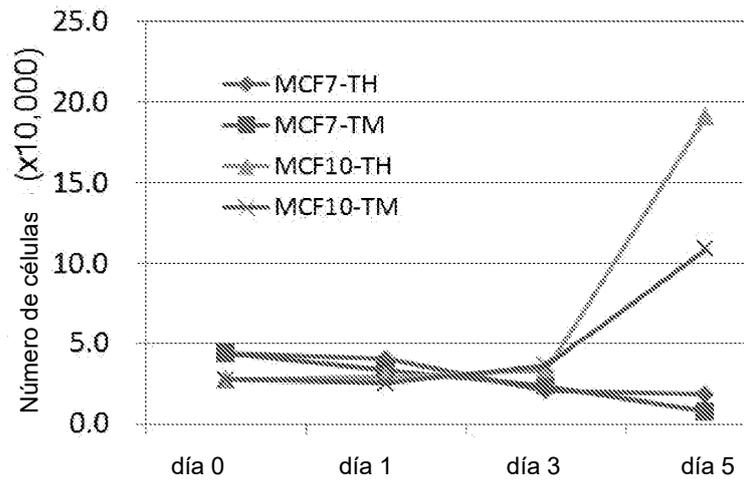


FIG. 2

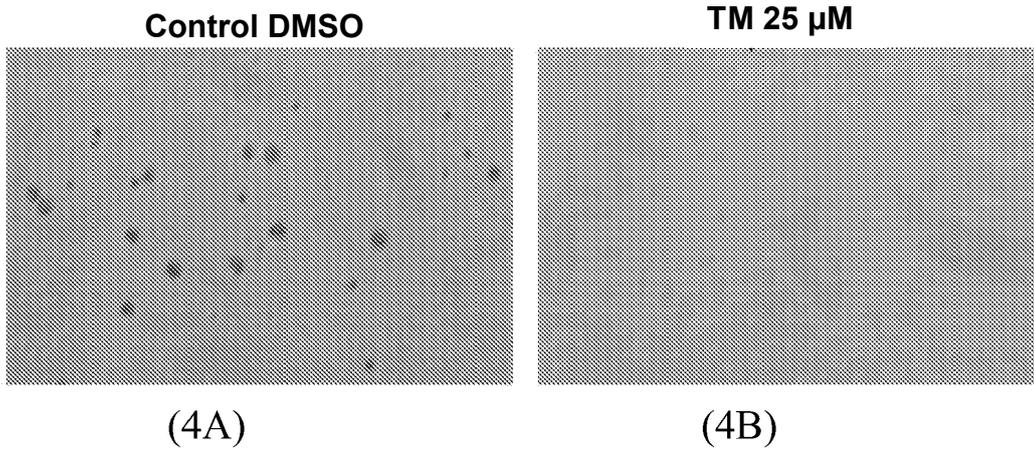


(3A)

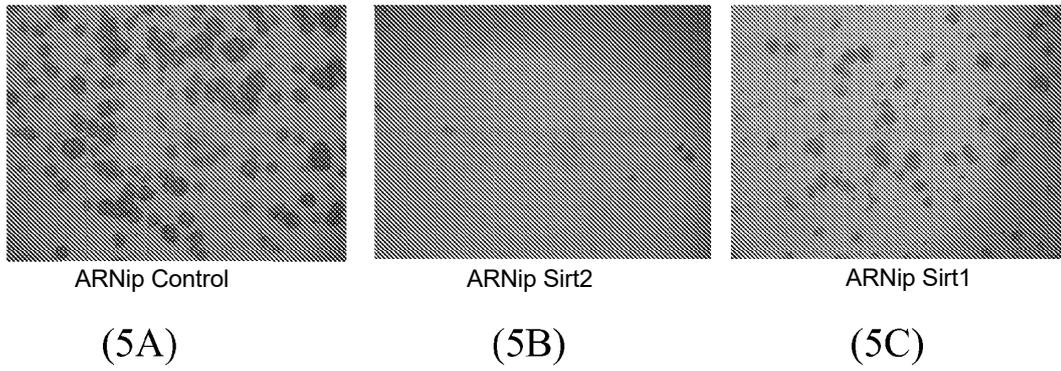


(3B)

FIGS. 3A, 3B



FIGS. 4A, 4B



FIGS. 5A-5C