

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARI

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

10-1888

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: COMPUESTOS DE IMIDAZOTIAZOL COMO MODULADORES DE
SIRTUINA

SOLICITANTE: SIRTRIS PHARMACEUTICALS, INC.

DIRECCIÓN: 200 Technology Square, Suite 300, Cambridge, MA 02139.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 08 de Enero de 2010

P2009/000216

Recibido, Comercio, No Registrado
20-01-2010

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK MOU

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-001988-00000-0000

Fecha: 2010-01-08 16:54:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11. PATENTEIYI Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 238

PETITORIO - FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2009/000216

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: SIRTRIS PHARMACEUTICALS, INC.

Dirección: 200 technology Square, Suite 300, Cambridge, MA 02139

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

Lugar de Constitución: Estados Unidos de América.

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A, Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número 79782747Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER. PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER. PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER. PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/007771

Fecha

Junio 20, 2008

Publicación Internacional No. WO 2008/156866

Fecha

Diciembre 24, 2008

6

Título (54) COMPUESTOS DE IMIDAZOTIAZOL COMO MODULADORES DE SIRTUINA

Clasificación Internacional (51) C07D 513/04, A61P 31/429, A61P 3/10

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Junio 20, 2007

(31) Número de Solicitud

60/936,633

9

Comprobante de pago No. 10-

Fecha 07 Enero de 2010

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☐

Poderes, si fuera el caso. Adjunto copia simple ver expediente No.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

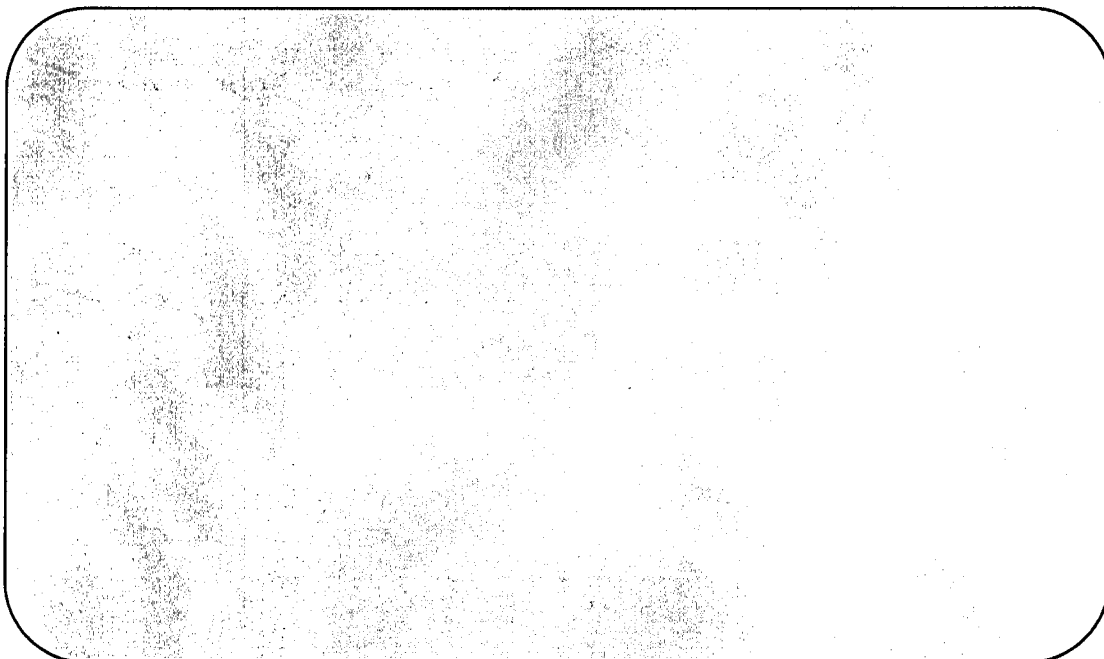
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional.

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS F. OLAFTE

FIRMA:

C.C. 19.782.747 Etá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES**PCT/US2008/007771**

1. **Jean BEMIS,**
256 Appleton Street, Arlington,
MA 02476
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense
2. **Jeremy, S. DISCH,**
18 Waban Street, Natick,
MA 01760
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense
3. **Michael JIROUSEK,**
350 3rd Street, #2204, Cambridge
MA 02142
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense
4. **Walter, Joseph LUNSMANN,**
49 Tahanto Trail, Harvard,
MA 01451
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense
5. **Pui, Yee NG,**
41 Commonwealth Avenue, #3, Boston,
MA 02116
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense
6. **Chi, B. Vu,**
79 Bay State Road, Arlington,
MA 02474
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 1.934
FECHA : ENERO 7 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-001889- -00000-0000
Fecha: 2010-01-08 16:54:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Ira. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 238

***** CONSIGNACION *****

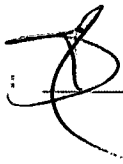
DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	131167820	07/01/2010	5.130.000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRANITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554.000.00
		TOTAL :	\$ 554.000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :



RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 December 2008 (24.12.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/156866 A1

(51) International Patent Classification:

C07D 513.04 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
A61K 31/429 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2008/007771

(22) International Filing Date: 20 June 2008 (20.06.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/936,633 20 June 2007 (20.06.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): SIRTRIS
PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 200 Technology
Square, Suite 300, Cambridge, MA 02139 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BEMIS, Jean
[US/US]; 256 Appleton Street, Arlington, MA 02476
(US). DISCH, Jeremy, S. [US/US]; 18 Waban Street,
Natick, MA 01760 (US). JIROUSEK, Michael [US/US];
350 3rd Street, #2204, Cambridge, MA 02142 (US).
LUNSMANN, Walter, Joseph [US/US]; 49 Tahanto
Trail, Harvard, MA 01451 (US). NG, Pui, Yee [US/US];
41 Commonwealth Avenue, #2, Boston, MA 02116 (US).
VU, Chi, B. [US/US]; 79 Bay State Road, Arlington, MA
02474 (US).(74) Agents: VINCENT, Matthew, P. et al.; Poppe & Gray
LLP, One International Place, Boston, MA 02110 (US).(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CP, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV,
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): APIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, EG, EE, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GE, GR, HP, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MP, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(54) Title: SIRTUIN MODULATING IMIDAZOTHIAZOLE COMPOUNDS

(57) Abstract: Provided herein are novel sirtuin-modulating compounds and methods of use thereof. The sirtuin-modulating compounds may be used for increasing the lifespan of a cell, and treating and/or preventing a wide variety of diseases and disorders including, for example, diseases or disorders related to aging or stress, diabetes, obesity, neurodegenerative diseases, cardiovascular disease, blood clotting disorders, inflammation, cancer, and/or flushing as well as diseases or disorders that would benefit from increased mitochondrial activity. Also provided are compositions comprising a sirtuin-modulating compound in combination with another therapeutic agent.



WO 2008/156866 A1

SIRTUIN MODULATING IMIDAZOTHIAZOLE COMPOUNDS

RELATED APPLICATIONS

This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/936,633, filed June 20, 2007, the contents of which are incorporated by reference in their entirety.

BACKGROUND

The Silent Information Regulator (SIR) family of genes represents a highly conserved group of genes present in the genomes of organisms ranging from archaeobacteria to a variety of eukaryotes (Frye, 2000). The encoded SIR proteins are involved in diverse processes from regulation of gene silencing to DNA repair. The proteins encoded by members of the SIR gene family show high sequence conservation in a 250 amino acid core domain. A well-characterized gene in this family is *S. cerevisiae* SIR2, which is involved in silencing HM loci that contain information specifying yeast mating type, telomere position effects and cell aging (Guarente, 1999; Kaeberlein et al., 1999; Shore, 2000). The yeast Sir2 protein belongs to a family of histone deacetylases (reviewed in Guarente, 2000; Shore, 2000). The Sir2 homolog, CobB, in *Salmonella typhimurium*, functions as an NAD (nicotinamide adenine dinucleotide)-dependent ADP-ribosyl transferase (Tsang and Escalante-Semerena, 1998).

The Sir2 protein is a class III deacetylase which uses NAD as a cosubstrate (Imai et al., 2000; Moazed, 2001; Smith et al., 2000; Tanner et al., 2000; Tanny and Moazed, 2001). Unlike other deacetylases, many of which are involved in gene silencing, Sir2 is insensitive to class I and II histone deacetylase inhibitors like trichostatin A (TSA) (Imai et al., 2000; Landry et al., 2000a; Smith et al., 2000).

Deacetylation of acetyl-lysine by Sir2 is tightly coupled to NAD hydrolysis, producing nicotinamide and a novel acetyl-ADP ribose compound (Tanner et al., 2000; Landry et al., 2000b; Tanny and Moazed, 2001). The NAD-dependent deacetylase activity of Sir2 is essential for its functions which can connect its biological role with cellular metabolism in yeast (Guarente, 2000; Imai et al., 2000; Lin et al., 2000; Smith et al., 2000). Mammalian Sir2 homologs have NAD-dependent histone deacetylase activity (Imai et al., 2000; Smith et al., 2000). Most

information about Sir2 mediated functions comes from the studies in yeast (Gartenberg, 2000; Gottschling, 2000).

Biochemical studies have shown that Sir2 can readily deacetylate the amino-terminal tails of histones H3 and H4, resulting in the formation of 1-O-acetyl-ADP-ribose and nicotinamide. Strains with additional copies of SIR2 display increased rDNA silencing and a 30% longer life span. It has recently been shown that additional copies of the *C. elegans* SIR2 homolog, sir-2.1, and the *D. melanogaster* dSir2 gene greatly extend life span in those organisms. This implies that the SIR2-dependent regulatory pathway for aging arose early in evolution and has been well conserved. Today, Sir2 genes are believed to have evolved to enhance an organism's health and stress resistance to increase its chance of surviving adversity.

SIRT3 is a homolog of SIRT1 that is conserved in prokaryotes and eukaryotes (P. Onyango et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 13653-13658 (2002)). The SIRT3 protein is targeted to the mitochondrial cristae by a unique domain located at the N-terminus. SIRT3 has NAD⁺-dependent protein deacetylase activity and is ubiquitously expressed, particularly in metabolically active tissues. Upon transfer to the mitochondria, SIRT3 is believed to be cleaved into a smaller, active form by a mitochondrial matrix processing peptidase (MPP) (B. Schwer et al., J. Cell Biol. 158: 647-657 (2002)).

Caloric restriction has been known for over 70 years to improve the health and extend the lifespan of mammals (Masoro, 2000). Yeast life span, like that of metazoans, is also extended by interventions that resemble caloric restriction, such as low glucose. The discovery that both yeast and flies lacking the SIR2 gene do not live longer when calorically restricted provides evidence that SIR2 genes mediate the beneficial health effects of this diet (Anderson et al., 2003; Helfand and Rogina, 2004). Moreover, mutations that reduce the activity of the yeast glucose-responsive cAMP (adenosine 3',5'-monophosphate)-dependent (PKA) pathway extend life span in wild type cells but not in mutant sir2 strains, demonstrating that SIR2 is likely to be a key downstream component of the caloric restriction pathway (Lin et al., 2001).

SUMMARY

Provided herein are novel sirtuin-modulating compounds and methods of use thereof.

In one aspect, the invention provides sirtuin-modulating compounds of
5 Formulae I through VI as are described in detail below.

In another aspect, the invention provides methods for using sirtuin-modulating compounds, or compositions comprising sirtuin-modulating compounds. In certain embodiments, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be used for a variety of therapeutic applications
10 including, for example, increasing the lifespan of a cell, and treating and/or preventing a wide variety of diseases and disorders including, for example, diseases or disorders related to aging or stress, diabetes, obesity, neurodegenerative diseases, chemotherapeutic induced neuropathy, neuropathy associated with an ischemic event, ocular diseases and/or disorders, cardiovascular disease, blood clotting
15 disorders, inflammation, and/or flushing, etc. Sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may also be used for treating a disease or disorder in a subject that would benefit from increased mitochondrial activity, for enhancing muscle performance, for increasing muscle ATP levels, or for treating or preventing muscle tissue damage associated with hypoxia or ischemia. In
20 other embodiments, sirtuin-modulating compounds that decrease the level and/or activity of a sirtuin protein may be used for a variety of therapeutic applications including, for example, increasing cellular sensitivity to stress, increasing apoptosis, treatment of cancer, stimulation of appetite, and/or stimulation of weight gain, etc. As described further below, the methods comprise administering to a subject in need
25 thereof a pharmaceutically effective amount of a sirtuin-modulating compound.

In certain aspects, the sirtuin-modulating compounds may be administered alone or in combination with other compounds, including other sirtuin-modulating compounds, or other therapeutic agents.

30 BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows the chloride salt form of Compound 1 characterized by Thermogravimetric Analysis (TGA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC).

Figure 2 shows the free base form of Compound 1 characterized by Thermogravimetric Analysis (TGA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC).

Figure 3 shows the week 2 fed blood glucose in a DIO mouse model administered the free base of Compound 1.

5 Figure 4 shows the week 3 fasted blood glucose in a DIO mouse model administered the free base of Compound 1.

Figure 5 shows the week 4 fed blood glucose in a DIO mouse model administered the free base of Compound 1.

10 Figure 6 shows the week 1 fed blood glucose in an Ob/ob mouse model administered the free base of Compound 1.

Figure 7 shows the week 2 fasted blood glucose in an Ob/ob mouse model administered the free base of Compound 1.

Figure 8 shows the week 3 fed blood glucose in an Ob/ob mouse model administered the free base of Compound 1.

15 Figure 9 shows the week 1 fasted blood glucose in an Ob/ob mouse model administered the free base or the chloride salt form of Compound 1.

Figure 10 shows the week 2 Fasted blood glucose in an Ob/ob mouse model administered the free base or the chloride salt form of Compound 1.

20 **DETAILED DESCRIPTION**

1. **Definitions**

As used herein, the following terms and phrases shall have the meanings set forth below. Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood to one of ordinary skill in the art.

25 The singular forms "a," "an," and "the" include plural reference unless the context clearly dictates otherwise.

The term "agent" is used herein to denote a chemical compound, a mixture of chemical compounds, a biological macromolecule (such as a nucleic acid, an antibody, a protein or portion thereof, e.g., a peptide), or an extract made from
30 biological materials such as bacteria, plants, fungi, or animal (particularly mammalian) cells or tissues. The activity of such agents may render it suitable as a

“therapeutic agent” which is a biologically, physiologically, or pharmacologically active substance (or substances) that acts locally or systemically in a subject.

The term “bioavailable” when referring to a compound is art-recognized and refers to a form of a compound that allows for it, or a portion of the amount of
5 compound administered, to be absorbed by, incorporated to, or otherwise physiologically available to a subject or patient to whom it is administered.

“Biologically active portion of a sirtuin” refers to a portion of a sirtuin protein having a biological activity, such as the ability to deacetylate. Biologically active portions of a sirtuin may comprise the core domain of sirtuins. Biologically
10 active portions of SIRT1 having GenBank Accession No. NP_036370 that encompass the NAD⁺ binding domain and the substrate binding domain, for example, may include without limitation, amino acids 62-293 of GenBank Accession No. NP_036370, which are encoded by nucleotides 237 to 932 of GenBank Accession No. NM_012238. Therefore, this region is sometimes referred
15 to as the core domain. Other biologically active portions of SIRT1, also sometimes referred to as core domains, include about amino acids 261 to 447 of GenBank Accession No. NP_036370, which are encoded by nucleotides 834 to 1394 of GenBank Accession No. NM_012238; about amino acids 242 to 493 of GenBank Accession No. NP_036370, which are encoded by nucleotides 777 to 1532 of
20 GenBank Accession No. NM_012238; or about amino acids 254 to 495 of GenBank Accession No. NP_036370, which are encoded by nucleotides 813 to 1538 of GenBank Accession No. NM_012238.

The term “companion animals” refers to cats and dogs. As used herein, the term “dog(s)” denotes any member of the species *Canis familiaris*, of which there
25 are a large number of different breeds. The term “cat(s)” refers to a feline animal including domestic cats and other members of the family *Felidae*, genus *Felis*.

The terms “comprise” and “comprising” are used in the inclusive, open sense, meaning that additional elements may be included.

“Diabetes” refers to high blood sugar or ketoacidosis, as well as chronic,
30 general metabolic abnormalities arising from a prolonged high blood sugar status or a decrease in glucose tolerance. “Diabetes” encompasses both the type I and type II (Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus or NIDDM) forms of the disease. The

risk factors for diabetes include the following factors: waistline of more than 40 inches for men or 35 inches for women, blood pressure of 130/85 mmHg or higher, triglycerides above 150 mg/dl, fasting blood glucose greater than 100 mg/dl or high-density lipoprotein of less than 40 mg/dl in men or 50 mg/dl in women.

- 5 A “direct activator” of a sirtuin is a molecule that activates a sirtuin by binding to it. A “direct inhibitor” of a sirtuin is a molecule inhibits a sirtuin by binding to it.

 The term “ED₅₀” is art-recognized. In certain embodiments, ED₅₀ means the dose of a drug which produces 50% of its maximum response or effect, or
10 alternatively, the dose which produces a pre-determined response in 50% of test subjects or preparations. The term “LD₅₀” is art-recognized. In certain embodiments, LD₅₀ means the dose of a drug which is lethal in 50% of test subjects. The term “therapeutic index” is an art-recognized term which refers to the therapeutic index of a drug, defined as LD₅₀/ED₅₀.

- 15 The term “hyperinsulinemia” refers to a state in an individual in which the level of insulin in the blood is higher than normal.

 The term “including” is used to mean “including but not limited to”. “Including” and “including but not limited to” are used interchangeably.

- The term “insulin resistance” refers to a state in which a normal amount of
20 insulin produces a subnormal biologic response relative to the biological response in a subject that does not have insulin resistance.

 An “insulin resistance disorder,” as discussed herein, refers to any disease or condition that is caused by or contributed to by insulin resistance. Examples include: diabetes, obesity, metabolic syndrome, insulin-resistance syndromes,
25 syndrome X, insulin resistance, high blood pressure, hypertension, high blood cholesterol, dyslipidemia, hyperlipidemia, dyslipidemia, atherosclerotic disease including stroke, coronary artery disease or myocardial infarction, hyperglycemia, hyperinsulinemia and/or hyperproinsulinemia, impaired glucose tolerance, delayed insulin release, diabetic complications, including coronary heart disease, angina
30 pectoris, congestive heart failure, stroke, cognitive functions in dementia, retinopathy, peripheral neuropathy, nephropathy, glomerulonephritis, glomerulosclerosis, nephrotic syndrome, hypertensive nephrosclerosis some types of

cancer (such as endometrial, breast, prostate, and colon), complications of pregnancy, poor female reproductive health (such as menstrual irregularities, infertility, irregular ovulation, polycystic ovarian syndrome (PCOS)), lipodystrophy, cholesterol related disorders, such as gallstones, cholecystitis and cholelithiasis, 5 gout, obstructive sleep apnea and respiratory problems, osteoarthritis, and prevention and treatment of bone loss, e.g. osteoporosis.

The term "livestock animals" refers to domesticated quadrupeds, which includes those being raised for meat and various byproducts, e.g., a bovine animal including cattle and other members of the genus *Bos*, a porcine animal including 10 domestic swine and other members of the genus *Sus*, an ovine animal including sheep and other members of the genus *Ovis*, domestic goats and other members of the genus *Capra*; domesticated quadrupeds being raised for specialized tasks such as use as a beast of burden, e.g., an equine animal including domestic horses and other members of the family Equidae, genus *Equus*.

15 The term "mammal" is known in the art, and exemplary mammals include humans, primates, livestock animals (including bovines, porcines, etc.), companion animals (e.g., canines, felines, etc.) and rodents (e.g., mice and rats).

"Obese" individuals or individuals suffering from obesity are generally individuals having a body mass index (BMI) of at least 25 or greater. Obesity may 20 or may not be associated with insulin resistance.

The terms "parenteral administration" and "administered parenterally" are art-recognized and refer to modes of administration other than enteral and topical administration, usually by injection, and includes, without limitation, intravenous, intramuscular, intraarterial, intrathecal, intracapsular, intraorbital, intracardiac, 25 intradermal, intraperitoneal, transtracheal, subcutaneous, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subarachnoid, intraspinal, and intrasternal injection and infusion.

A "patient", "subject", "individual" or "host" refers to either a human or a non-human animal.

30 The term "pharmaceutically acceptable carrier" is art-recognized and refers to a pharmaceutically-acceptable material, composition or vehicle, such as a liquid or solid filler, diluent, excipient, solvent or encapsulating material, involved in

carrying or transporting any subject composition or component thereof. Each carrier must be "acceptable" in the sense of being compatible with the subject composition and its components and not injurious to the patient. Some examples of materials which may serve as pharmaceutically acceptable carriers include: (1) sugars, such as
 5 lactose, glucose and sucrose; (2) starches, such as corn starch and potato starch; (3) cellulose, and its derivatives, such as sodium carboxymethyl cellulose, ethyl cellulose and cellulose acetate; (4) powdered tragacanth; (5) malt; (6) gelatin; (7) talc; (8) excipients, such as cocoa butter and suppository waxes; (9) oils, such as peanut oil, cottonseed oil, safflower oil, sesame oil, olive oil, corn oil and soybean
 10 oil; (10) glycols, such as propylene glycol; (11) polyols, such as glycerin, sorbitol, mannitol and polyethylene glycol; (12) esters, such as ethyl oleate and ethyl laurate; (13) agar; (14) buffering agents, such as magnesium hydroxide and aluminum hydroxide; (15) alginic acid; (16) pyrogen-free water; (17) isotonic saline; (18) Ringer's solution; (19) ethyl alcohol; (20) phosphate buffer solutions; and (21) other
 15 non-toxic compatible substances employed in pharmaceutical formulations.

The term "prophylactic" or "therapeutic" treatment is art-recognized and refers to administration of a drug to a host. If it is administered prior to clinical manifestation of the unwanted condition (e.g., disease or other unwanted state of the host animal) then the treatment is prophylactic, i.e., it protects the host against
 20 developing the unwanted condition, whereas if administered after manifestation of the unwanted condition, the treatment is therapeutic (i.e., it is intended to diminish, ameliorate or maintain the existing unwanted condition or side effects therefrom).

The term "pyrogen-free", with reference to a composition, refers to a composition that does not contain a pyrogen in an amount that would lead to an
 25 adverse effect (e.g., irritation, fever, inflammation, diarrhea, respiratory distress, endotoxic shock, etc.) in a subject to which the composition has been administered. For example, the term is meant to encompass compositions that are free of, or substantially free of, an endotoxin such as, for example, a lipopolysaccharide (LPS).

"Replicative lifespan" of a cell refers to the number of daughter cells
 30 produced by an individual "mother cell." "Chronological aging" or "chronological lifespan," on the other hand, refers to the length of time a population of non-

dividing cells remains viable when deprived of nutrients. "Increasing the lifespan of a cell" or "extending the lifespan of a cell," as applied to cells or organisms, refers to increasing the number of daughter cells produced by one cell; increasing the ability of cells or organisms to cope with stresses and combat damage, e.g., to DNA, proteins; and/or increasing the ability of cells or organisms to survive and exist in a living state for longer under a particular condition, e.g., stress (for example, heatshock, osmotic stress, high energy radiation, chemically-induced stress, DNA damage, inadequate salt level, inadequate nitrogen level, or inadequate nutrient level). Lifespan can be increased by at least about 20%, 30%, 40%, 50%, 60% or between 20% and 70%, 30% and 60%, 40% and 60% or more using methods described herein.

"Sirtuin-activating compound" refers to a compound that increases the level of a sirtuin protein and/or increases at least one activity of a sirtuin protein. In an exemplary embodiment, a sirtuin-activating compound may increase at least one biological activity of a sirtuin protein by at least about 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, or more. Exemplary biological activities of sirtuin proteins include deacetylation, e.g., of histones and p53; extending lifespan; increasing genomic stability; silencing transcription; and controlling the segregation of oxidized proteins between mother and daughter cells.

"Sirtuin-inhibiting compound" refers to a compound that decreases the level of a sirtuin protein and/or decreases at least one activity of a sirtuin protein. In an exemplary embodiment, a sirtuin-inhibiting compound may decrease at least one biological activity of a sirtuin protein by at least about 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, or more. Exemplary biological activities of sirtuin proteins include deacetylation, e.g., of histones and p53; extending lifespan; increasing genomic stability; silencing transcription; and controlling the segregation of oxidized proteins between mother and daughter cells.

"Sirtuin-modulating compound" refers to a compound of Formulae (I)-(VI) as described herein. In exemplary embodiments, a sirtuin-modulating compound may either up regulate (e.g., activate or stimulate), down regulate (e.g., inhibit or suppress) or otherwise change a functional property or biological activity of a

sirtuin protein. Sirtuin-modulating compounds may act to modulate a sirtuin protein either directly or indirectly. In certain embodiments, a sirtuin-modulating compound may be a sirtuin-activating compound or a sirtuin-inhibiting compound.

“Sirtuin protein” refers to a member of the sirtuin deacetylase protein family, or preferably to the sir2 family, which include yeast Sir2 (GenBank Accession No. P53685), *C. elegans* Sir-2.1 (GenBank Accession No. NP_501912), and human SIRT1 (GenBank Accession No. NM_012238 and NP_036370 (or AF083106)) and SIRT2 (GenBank Accession No. NM_012237, NM_030593, NP_036369, NP_085096, and AF083107) proteins. Other family members include the four additional yeast Sir2-like genes termed “HST genes” (homologues of Sir two) HST1, HST2, HST3 and HST4, and the five other human homologues hSIRT3, hSIRT4, hSIRT5, hSIRT6 and hSIRT7 (Brachmann et al. (1995) Genes Dev. 9:2888 and Frye et al. (1999) BBRC 260:273). Preferred sirtuins are those that share more similarities with SIRT1, i.e., hSIRT1, and/or Sir2 than with SIRT2, such as those members having at least part of the N-terminal sequence present in SIRT1 and absent in SIRT2 such as SIRT3 has.

“SIRT1 protein” refers to a member of the sir2 family of sirtuin deacetylases. In one embodiment, a SIRT1 protein includes yeast Sir2 (GenBank Accession No. P53685), *C. elegans* Sir-2.1 (GenBank Accession No. NP_501912), human SIRT1 (GenBank Accession No. NM_012238 or NP_036370 (or AF083106)), and human SIRT2 (GenBank Accession No. NM_012237, NM_030593, NP_036369, NP_085096, or AF083107) proteins, and equivalents and fragments thereof. In another embodiment, a SIRT1 protein includes a polypeptide comprising a sequence consisting of, or consisting essentially of, the amino acid sequence set forth in GenBank Accession Nos. NP_036370, NP_501912, NP_085096, NP_036369, or P53685. SIRT1 proteins include polypeptides comprising all or a portion of the amino acid sequence set forth in GenBank Accession Nos. NP_036370, NP_501912, NP_085096, NP_036369, or P53685; the amino acid sequence set forth in GenBank Accession Nos. NP_036370, NP_501912, NP_085096, NP_036369, or P53685 with 1 to about 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 75 or more conservative amino acid substitutions; an amino acid sequence that is at least 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identical to GenBank Accession Nos. NP_036370,

NP_501912, NP_085096, NP_036369, or P53685, and functional fragments thereof. Polypeptides of the invention also include homologs (e.g., orthologs and paralogs), variants, or fragments, of GenBank Accession Nos. NP_036370, NP_501912, NP_085096, NP_036369, or P53685.

- 5 “SIRT3 protein” refers to a member of the sirtuin deacetylase protein family and/or to a homolog of a SIRT1 protein. In one embodiment, a SIRT3 protein includes human SIRT3 (GenBank Accession No. AAH01042, NP_036371, or NP_001017524) and mouse SIRT3 (GenBank Accession No. NP_071878) proteins, and equivalents and fragments thereof. In another embodiment, a SIRT3 protein
- 10 includes a polypeptide comprising a sequence consisting of, or consisting essentially of, the amino acid sequence set forth in GenBank Accession Nos. AAH01042, NP_036371, NP_001017524, or NP_071878. SIRT3 proteins include polypeptides comprising all or a portion of the amino acid sequence set forth in GenBank Accession AAH01042, NP_036371, NP_001017524, or NP_071878; the amino acid
- 15 sequence set forth in GenBank Accession Nos. AAH01042, NP_036371, NP_001017524, or NP_071878 with 1 to about 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 75 or more conservative amino acid substitutions; an amino acid sequence that is at least 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identical to GenBank Accession Nos. AAH01042, NP_036371, NP_001017524, or NP_071878, and
- 20 functional fragments thereof. Polypeptides of the invention also include homologs (e.g., orthologs and paralogs), variants, or fragments, of GenBank Accession Nos. AAH01042, NP_036371, NP_001017524, or NP_071878. In one embodiment, a SIRT3 protein includes a fragment of SIRT3 protein that is produced by cleavage with a mitochondrial matrix processing peptidase (MPP) and/or a mitochondrial
- 25 intermediate peptidase (MIP).

- The terms “systemic administration,” “administered systemically,” “peripheral administration” and “administered peripherally” are art-recognized and refer to the administration of a subject composition, therapeutic or other material other than directly into the central nervous system, such that it enters the patient’s
- 30 system and, thus, is subject to metabolism and other like processes.

 The term “therapeutic agent” is art-recognized and refers to any chemical moiety that is a biologically, physiologically, or pharmacologically active substance

that acts locally or systemically in a subject. The term also means any substance intended for use in the diagnosis, cure, mitigation, treatment or prevention of disease or in the enhancement of desirable physical or mental development and/or conditions in an animal or human.

5 The term “therapeutic effect” is art-recognized and refers to a local or systemic effect in animals, particularly mammals, and more particularly humans caused by a pharmacologically active substance. The phrase “therapeutically-effective amount” means that amount of such a substance that produces some desired local or systemic effect at a reasonable benefit/risk ratio applicable to any
10 treatment. The therapeutically effective amount of such substance will vary depending upon the subject and disease condition being treated, the weight and age of the subject, the severity of the disease condition, the manner of administration and the like, which can readily be determined by one of ordinary skill in the art. For example, certain compositions described herein may be administered in a sufficient
15 amount to produce a desired effect at a reasonable benefit/risk ratio applicable to such treatment.

“Treating” a condition or disease refers to curing as well as ameliorating at least one symptom of the condition or disease.

20 The term “vision impairment” refers to diminished vision, which is often only partially reversible or irreversible upon treatment (e.g., surgery). Particularly severe vision impairment is termed “blindness” or “vision loss”, which refers to a complete loss of vision, vision worse than 20/200 that cannot be improved with corrective lenses, or a visual field of less than 20 degrees diameter (10 degrees radius).

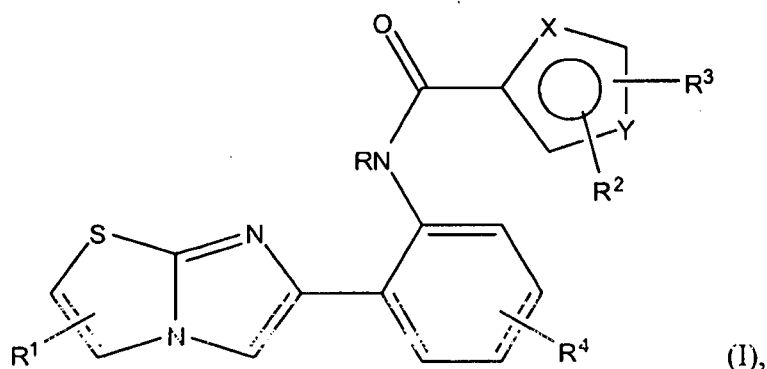
25

2. **Sirtuin Modulators**

 In one aspect, the invention provides novel sirtuin-modulating compounds for treating and/or preventing a wide variety of diseases and disorders including, for example, diseases or disorders related to aging or stress, diabetes, obesity,
30 neurodegenerative diseases, ocular diseases and disorders, cardiovascular disease, blood clotting disorders, inflammation, cancer, and/or flushing, etc. Sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein

may also be used for treating a disease or disorder in a subject that would benefit from increased mitochondrial activity, for enhancing muscle performance, for increasing muscle ATP levels, or for treating or preventing muscle tissue damage associated with hypoxia or ischemia. Other compounds disclosed herein may be suitable for use in a pharmaceutical composition and/or one or more methods disclosed herein.

In one embodiment, sirtuin-modulating compounds of the invention are represented by Structural Formula (I):



or a salt thereof, where:

X is N or S;

Y is S when X is N or Y is N when X is S;

R is -H or a substituted or unsubstituted alkyl group;

R¹ is a solubilizing group;

R² is -H or a substituted or unsubstituted alkyl group;

R³ is a substituted or unsubstituted monocyclic aryl group;

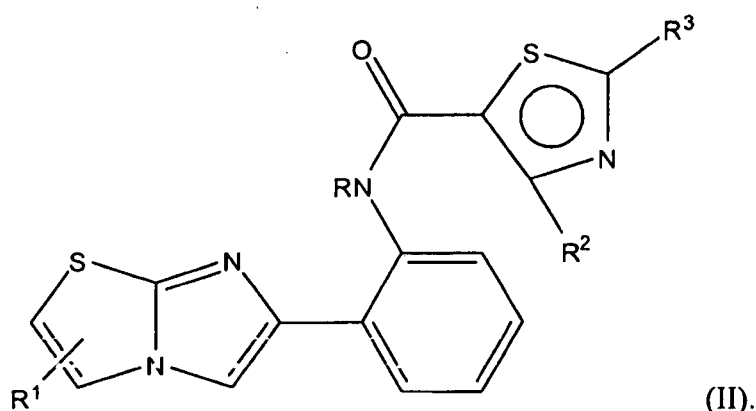
R⁴ is -H, a halogen or a substituted or unsubstituted alkyl group.

In certain embodiments, R is -H or -CH₃.

In certain embodiments, R² is -H or -CH₃.

In certain embodiments, R⁴ is -H, a halogen or -CH₃.

In certain embodiments, the compound of Structural Formula (I) is represented by Structural Formula (II):



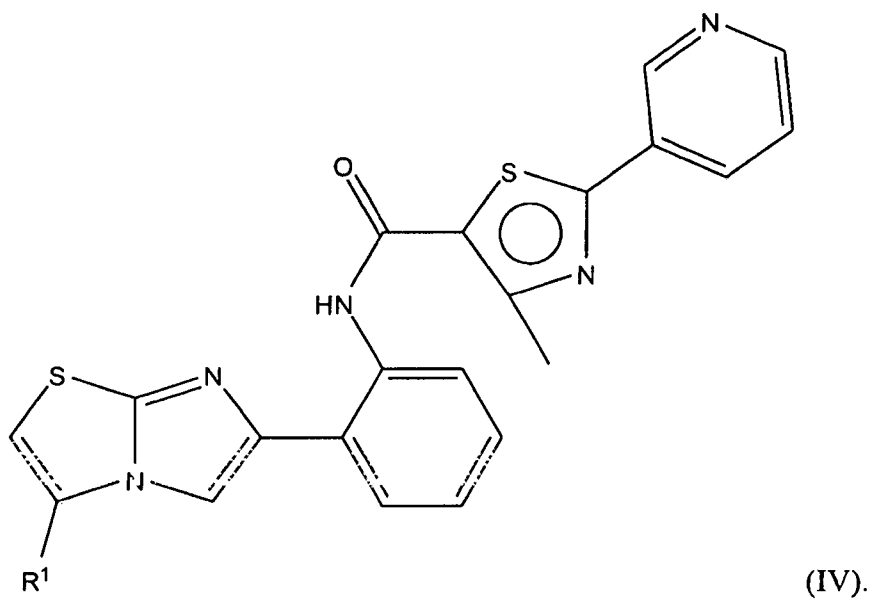
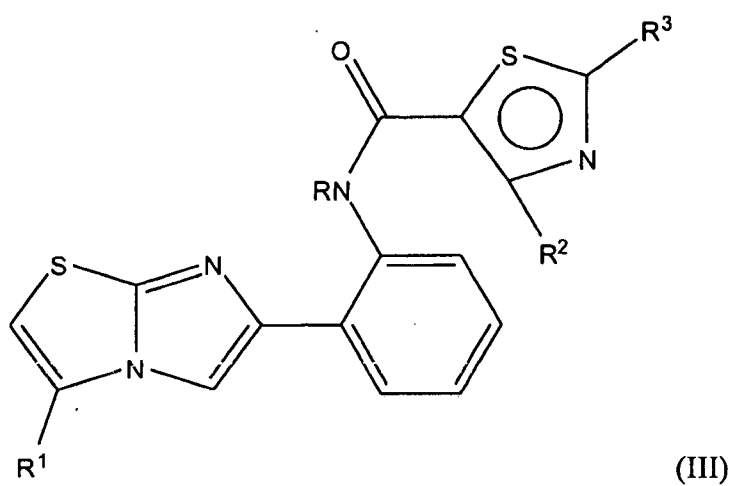
In certain embodiments, R and R² are each independently -H or -CH₃.

In certain embodiments, R³ is a substituted or unsubstituted heteroaryl group, such as a substituted or unsubstituted nitrogen-containing heteroaryl group, particularly a substituted or unsubstituted pyridyl group (e.g., unsubstituted pyridyl).

In certain embodiments, R³ is a substituted or unsubstituted phenyl group, such as a methylphenyl, a halophenyl or an unsubstituted phenyl group.

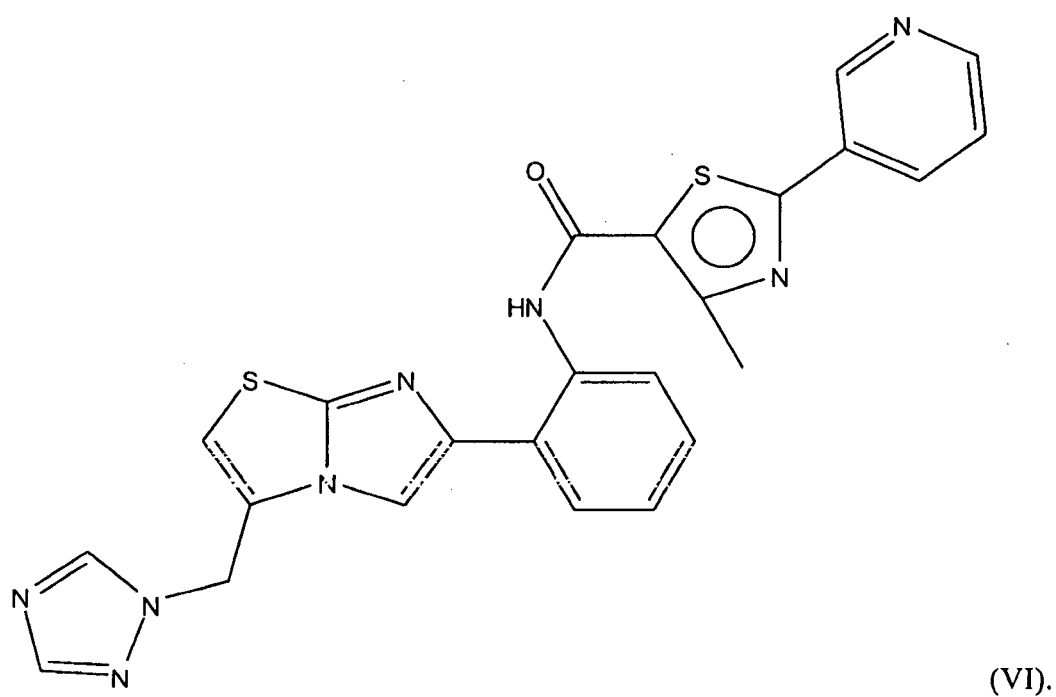
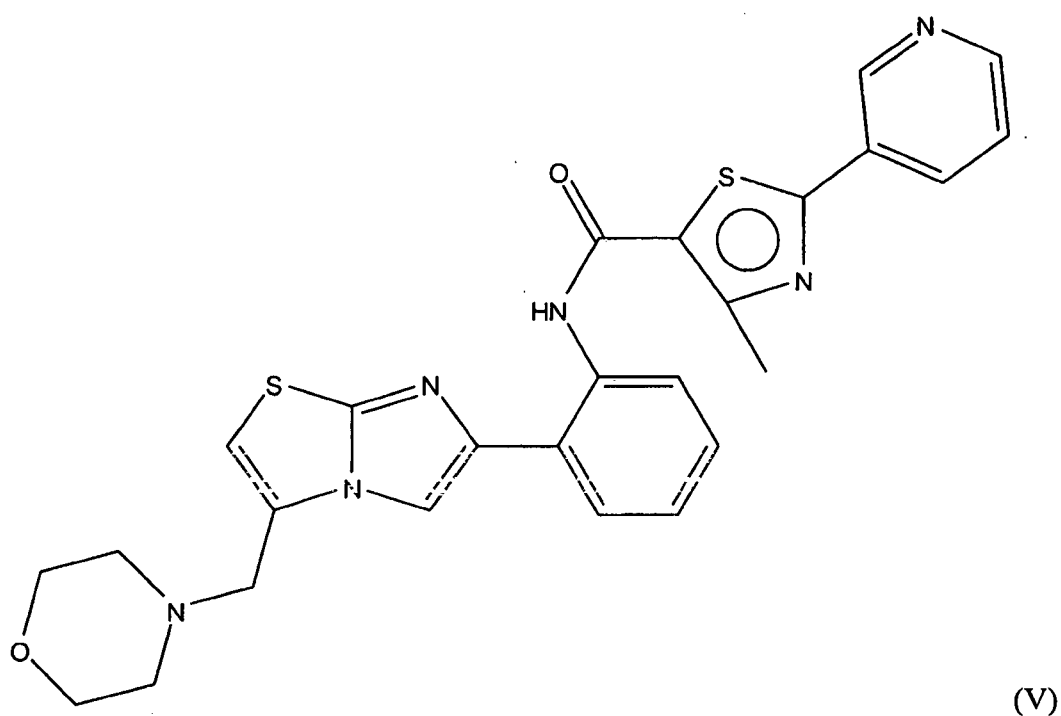
In certain embodiments, R¹ is a substituted or unsubstituted heterocyclylalkyl group, typically where the heterocyclyl moiety is attached to the alkyl moiety by a heteroatom. In certain such embodiments, R¹ is a substituted or unsubstituted heterocyclylmethyl group such as a substituted or unsubstituted nitrogen-containing heterocyclylmethyl group, which, for example, includes a heterocyclylmethyl group containing a nitrogen atom and optionally a second heteroatom selected from nitrogen and oxygen. Particular heterocyclylalkyl groups include morpholinomethyl and 1,2,4-triazolylmethyl groups. Exemplary substituents for the heterocyclic moieties in R¹ include one or more hydroxyl, halo or methyl groups.

In certain embodiments, compounds of Structural Formula (I) are represented by Structural Formula (III) or (IV):



Suitable values of R and R¹-R³ are as described above.

Examples of compounds represented by Structural Formula (I) include those
 5 represented by Structural Formulae (V) and (VI):



Compounds of the invention, including novel compounds of the invention, can also be used in the methods described herein.

5 Sirtuin-modulating compounds of the invention advantageously modulate the level and/or activity of a sirtuin protein, particularly the deacetylase activity of the sirtuin protein.

Separately or in addition to the above properties, certain sirtuin-modulating compounds of the invention do not substantially have one or more of the following activities: inhibition of PI3-kinase, inhibition of aldoreductase, inhibition of tyrosine kinase, transactivation of EGFR tyrosine kinase, coronary dilation, or spasmolytic activity, at concentrations of the compound that are effective for modulating the deacetylation activity of a sirtuin protein (e.g., such as a SIRT1 and/or a SIRT3 protein).

An alkyl group is a straight chained, branched or cyclic non-aromatic hydrocarbon which is completely saturated. Typically, a straight chained or branched alkyl group has from 1 to about 20 carbon atoms, preferably from 1 to about 10, and a cyclic alkyl group has from 3 to about 10 carbon atoms, preferably from 3 to about 8. Examples of straight chained and branched alkyl groups include methyl, ethyl, n-propyl, iso-propyl, n-butyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, hexyl, pentyl and octyl. A C1-C4 straight chained or branched alkyl group is also referred to as a "lower alkyl" group.

Aromatic (aryl) groups include carbocyclic aromatic groups such as phenyl, naphthyl, and anthracyl, and heteroaryl groups such as imidazolyl, thienyl, furyl, pyridyl, pyrimidyl, pyranal, pyrazolyl, pyrrolyl, pyrazinyl, thiazolyl, oxazolyl, and tetrazolyl.

Aromatic groups also include fused polycyclic aromatic ring systems in which a carbocyclic aromatic ring or heteroaryl ring is fused to one or more other heteroaryl rings. Examples include benzothienyl, benzofuryl, indolyl, quinolyl, benzothiazole, benzoxazole, benzimidazole, quinolyl, isoquinolyl and isoindolyl.

Non-aromatic heterocyclic rings are non-aromatic carbocyclic rings which include one or more heteroatoms such as nitrogen, oxygen or sulfur in the ring. The ring can be five, six, seven or eight-membered. Examples include tetrahydrofuryl, tetrahydrothiophenyl, morpholino, thiomorpholino, pyrrolidinyl, piperazinyl, piperidinyl, and thiazolidinyl, along with the cyclic form of sugars.

A ring fused to a second ring shares at least one common bond.

Suitable substituents on an alkyl, non-aromatic heterocyclic or aryl group (carbocyclic and heteroaryl) are those which do not substantially interfere with the ability of the disclosed compounds to have one or more of the properties disclosed

herein. A substituent substantially interferes with the properties of a compound when the magnitude of the property is reduced by more than about 50% in a compound with the substituent compared with a compound without the substituent. Examples of suitable substituents include -OH, halogen (-Br, -Cl, -I and -F), -OR^a, -O-COR^a, -COR^a, -C(O)R^a, -CN, -NO², -COOH, -COOR^a, -OCO₂R^a, -C(O)NR^aR^b, -OC(O)NR^aR^b, -SO₃H, -NH₂, -NHR^a, -N(R^aR^b), -COOR^a, -CHO, -CONH₂, -CONHR^a, -CON(R^aR^b), -NHCOR^a, -NRCOR^a, -NHCONH₂, -NHCONR^aH, -NHCON(R^aR^b), -NR^cCONH₂, -NR^cCONR^aH, -NR^cCON(R^aR^b), -C(=NH)-NH₂, -C(=NH)-NHR^a, -C(=NH)-N(R^aR^b), -C(=NR^c)-NH₂, -C(=NR^c)-NHR^a, -C(=NR^c)-N(R^aR^b), -NH-C(=NH)-NH₂, -NH-C(=NH)-NHR^a, -NH-C(=NH)-N(R^aR^b), -NH-C(=NR^c)-NH₂, -NH-C(=NR^c)-NHR^a, -NH-C(=NR^c)-N(R^aR^b), -NR^dH-C(=NH)-NH₂, -NR^d-C(=NH)-NHR^a, -NR^d-C(=NH)-N(R^aR^b), -NR^d-C(=NR^c)-NH₂, -NR^d-C(=NR^c)-NHR^a, -NR^d-C(=NR^c)-N(R^aR^b), -NHNH₂, -NHNHR^a, -NHR^aR^b, -SO₂NH₂, -SO₂NHR^a, -SO₂NR^aR^b, -CH=CHR^a, -CH=CR^aR^b, -CR^c=CR^aR^b, CR^c=CHR^a, -CR^c=CR^aR^b, -CCR^a, -SH, -SO_kR^a (k is 0, 1 or 2), -S(O)_kOR^a (k is 0, 1 or 2) and -NH-C(=NH)-NH₂. R^a-R^d are each independently an optionally substituted group selected from an aliphatic, benzyl, or aromatic group, preferably an alkyl, benzylic or aryl group. Optional substituents on R^a-R^d are selected from NH₂, NH(C₁₋₄aliphatic), N(C₁₋₄aliphatic)₂, halogen, C₁₋₄aliphatic, OH, O(C₁₋₄aliphatic), NO₂, CN, CO₂H, CO₂(C₁₋₄aliphatic), O(haloC₁₋₄ aliphatic), or haloC₁₋₄aliphatic, wherein each of the foregoing C₁₋₄aliphatic groups of is unsubstituted. In addition, -NR^aR^b, taken together, can also form a substituted or unsubstituted non-aromatic heterocyclic group. A non-aromatic heterocyclic group, benzylic group or aryl group can also have an aliphatic or substituted aliphatic group as a substituent. A substituted aliphatic group can also have a non-aromatic heterocyclic ring, a substituted a non-aromatic heterocyclic ring, benzyl, substituted benzyl, aryl or substituted aryl group as a substituent. A substituted aliphatic, non-aromatic heterocyclic group, substituted aryl, or substituted benzyl group can have more than one substituent.

Typical substituents on an aryl ring are selected from a solubilizing group, halogen; -R^o; -OR^o; -SR^o; 1,2-methylenedioxy; 1,2-ethylenedioxy; phenyl (Ph) optionally substituted with R^o; -O(Ph) optionally substituted with R^o; -(CH₂)₁₋₂(Ph), optionally substituted with R^o; -CH=CH(Ph), optionally substituted with R^o; -NO₂; -

CN; -N(R^o)₂; -C(O)C(O)R^o; -C(O)CH₂C(O)R^o; -CO₂R^o; -C(O)R^o; -S(O)₂R^o; -SO₂N(R^o)₂; -S(O)R^o; -NR^oSO₂N(R^o)₂; -NR^oSO₂R^o; -C(=S)N(R^o)₂; or -C(=NH)-N(R^o)₂; or wherein each independent occurrence of R^o is selected from hydrogen, optionally substituted C₁₋₆ aliphatic, an unsubstituted 5-6 membered heteroaryl or heterocyclic ring, phenyl, -O(Ph), or -CH₂(Ph), or, notwithstanding the definition above, two independent occurrences of R^o, on the same substituent or different substituents, taken together with the atom(s) to which each R^o group is bound, form a 3-8-membered cycloalkyl, heterocyclyl, aryl, or heteroaryl ring having 0-3 heteroatoms independently selected from nitrogen, oxygen, or sulfur. Optional substituents on the aliphatic group of R^o are selected from NH₂, NH(C₁₋₄aliphatic), N(C₁₋₄aliphatic)₂, halogen, C₁₋₄aliphatic, OH, O(C₁₋₄aliphatic), NO₂, CN, CO₂H, CO₂(C₁₋₄aliphatic), O(haloC₁₋₄ aliphatic), or haloC₁₋₄aliphatic, wherein each of the foregoing C₁₋₄aliphatic groups of R^o is unsubstituted

Combinations of substituents and variables envisioned by this invention are only those that result in the formation of stable compounds. As used herein, the term "stable" refers to compounds that possess stability sufficient to allow manufacture and that maintain the integrity of the compound for a sufficient period of time to be useful for the purposes detailed herein.

As used herein, a "solubilizing group" is a moiety that has hydrophilic character sufficient to improve or increase the water-solubility of the compound in which it is included, as compared to an analog compound that does not include the group. The hydrophilic character can be achieved by any means, such as by the inclusion of functional groups that ionize under the conditions of use to form charged moieties (e.g., carboxylic acids, sulfonic acids, phosphoric acids, amines, etc.); groups that include permanent charges (e.g., quaternary ammonium groups); and/or heteroatoms or heteroatomic groups (e.g., O, S, N, NH, N-(CH₂)_y-R^a, N-(CH₂)_y-C(O)R^a, N-(CH₂)_y-C(O)OR^a, N-(CH₂)_y-S(O)₂R^a, N-(CH₂)_y-S(O)₂OR^a, N-(CH₂)_y-C(O)NR^aR^a, etc., wherein R^a is selected from hydrogen, lower alkyl, lower cycloalkyl, (C₆-C₁₄) aryl, phenyl, naphthyl, (C₇-C₂₀) arylalkyl and benzyl, wherein R^a is optionally substituted; and y is an integer ranging from 0 to 6), optionally substituted heterocyclic groups (e.g., -(CH₂)_n-R^b, -(CH₂)_n-C(O)-R^b, -(CH₂)_n-O-(CH₂)_n-R^b, wherein R^b is selected from an optionally substituted saturated

monocyclic heterocycle, an optionally substituted saturated bicyclic fused heterocycle, an optionally substituted saturated bicyclic spiro heterocycle, an optionally substituted heteroaryl and an optionally substituted partially substituted non-aryl heterocycle; and n is an integer ranging from 0 to 2). It should be understood that substituents present on R^a or R^b need not improve or increase water solubility over their unsubstituted counterparts to be within the scope of this definition. All that is required is that such substituents do not significantly reverse the improvement in water-solubility afforded by the unsubstituted R^a or R^b moiety.

In one embodiment, the solubilizing group increases the water-solubility of the corresponding compound lacking the solubilizing group at least 5-fold, preferably at least 10-fold, more preferably at least 20-fold and most preferably at least 50-fold.

In one preferred embodiment, the solubilizing group is a moiety of the formula:

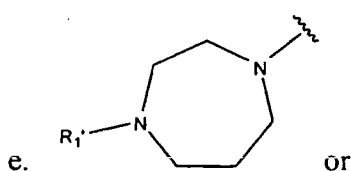
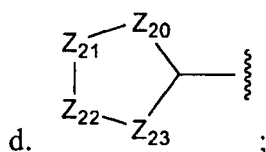
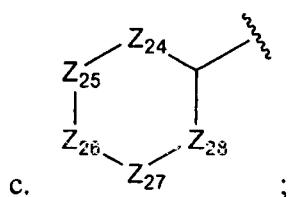
-(CH₂)_n-R¹⁰⁰-N(R¹⁰¹)(R¹⁰¹), wherein:

n is selected from 0, 1 or 2;

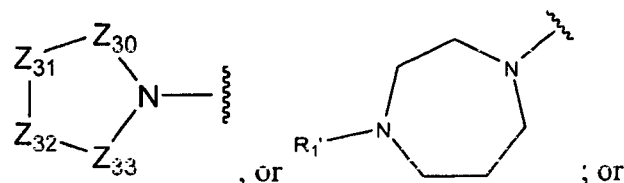
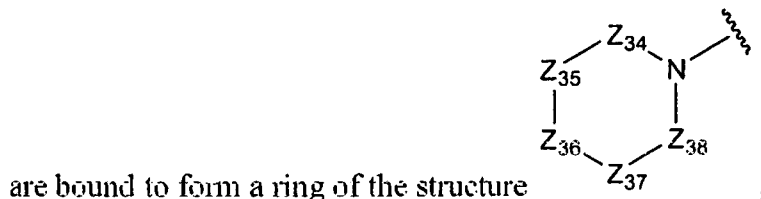
R¹⁰⁰ is selected from a bond, -C(O)-, or -O(CH₂)_n; and

each R¹⁰¹ is independently selected from:

- a. hydrogen;
- b. C₁-C₄ straight or branched alkyl, wherein said alkyl is optionally substituted with halo, CN, OH, O-(C₁-C₄ straight or branched alkyl), N(R₁')(R₁'), or =O;



f. both R^{101} moieties are taken together with the nitrogen atom to which they



g. both R^{101} moieties are taken together with the nitrogen atom to which they
 5 are bound to form a 5-membered heteroaryl ring containing 1 to 3 additional
 N atoms, wherein said heteroaryl ring is optionally substituted with R_1' ;

wherein:

each Z is independently selected from -O-, -S-, -NR $_1'$ -, or -C(R 50)(R 50)-,

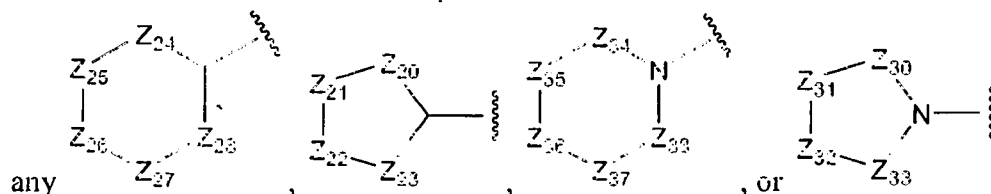
wherein:

- 10 at least three of Z $_{20}$, Z $_{21}$, Z $_{22}$, and Z $_{23}$ are -C(R 50)(R 50)-;
 at least three of Z $_{24}$, Z $_{25}$, Z $_{26}$, Z $_{27}$, and Z $_{28}$ are -C(R 50)(R 50)-;
 at least four of Z $_{30}$, Z $_{31}$, Z $_{32}$, and Z $_{33}$ are -C(R 50)(R 50)-; and
 at least four of Z $_{34}$, Z $_{35}$, Z $_{36}$, Z $_{37}$, and Z $_{38}$ are -C(R 50)(R 50)-;

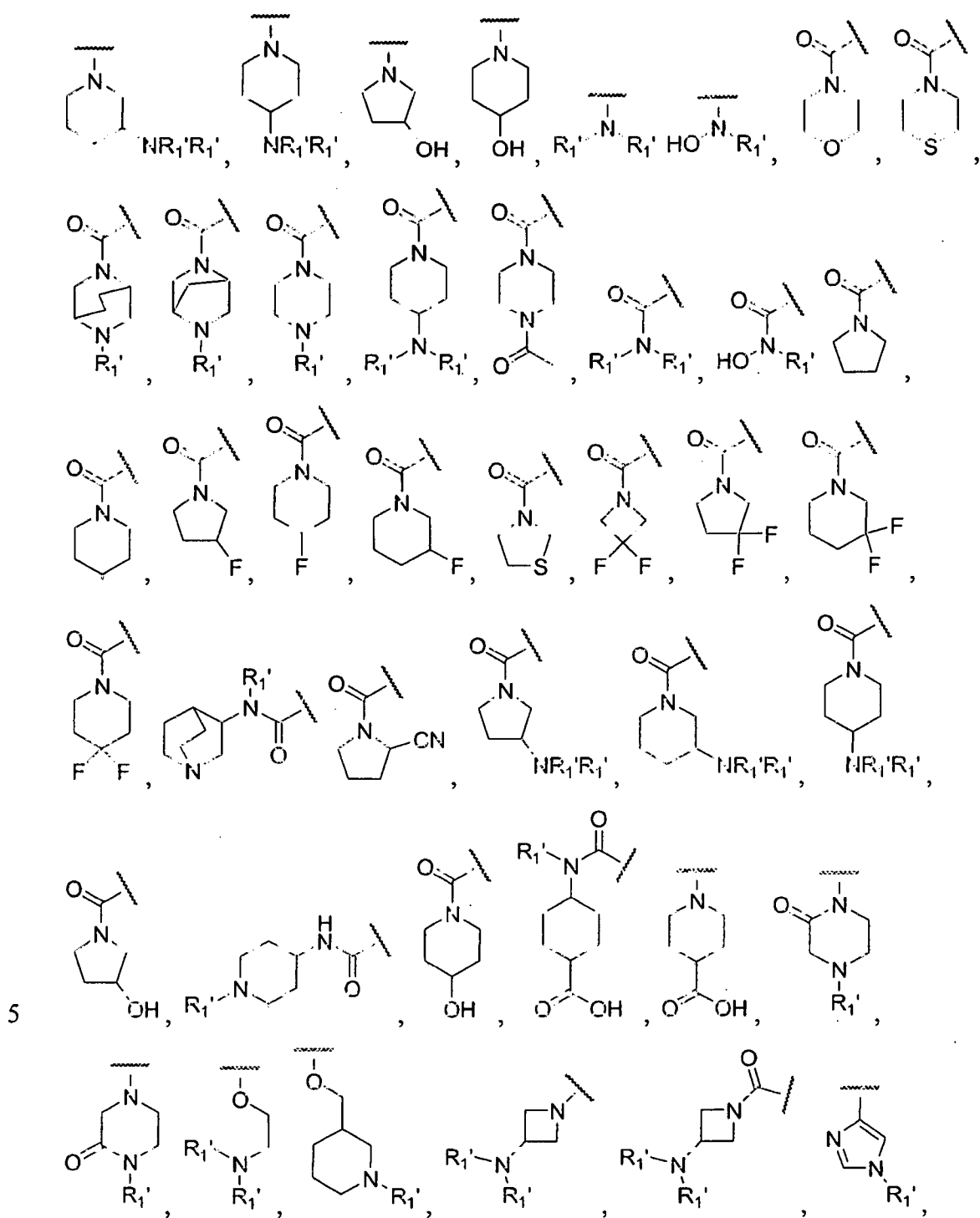
- each R_1' is independently selected from hydrogen or a C $_1$ -C $_3$ straight or
 15 branched alkyl optionally substituted with one or more substituent independently
 selected from halo, -CN, -OH, -OCH $_3$, -NH $_2$, -NH(CH $_3$), -N(CH $_3$) $_2$, or =O;

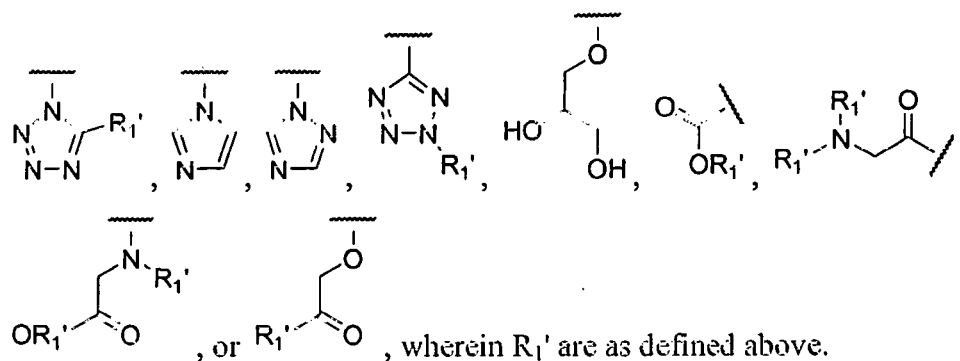
each R 50 is independently selected from R_1' , halo, CN, OH, O-(C $_1$ -C $_4$ straight
 or branched alkyl), N(R $_1'$)(R $_1'$), =CR $_1'$, SR $_1'$, =NR $_1'$, =NOR $_1'$, or =O;

- any two suitable non-cyclic R 50 are optionally bound to one another directly
 20 or via a C $_1$ to C $_2$ alkylene, alkenylene or alkanediylidene bridge to produce a
 bicyclic fused or spiro ring; and



ring structure is optionally benzofused or fused to a monocyclic heteroaryl to
 produce a bicyclic ring.





In an even more preferred embodiment, a solubilizing group is selected from 2-dimethylaminoethylcarbonyl, piperazin-1-ylcarbonyl, piperazinylmethyl, dimethylaminomethyl, 4-methylpiperazin-1-ylmethyl, 4-aminopiperidin-1-ylmethyl, 4-fluoropiperidin-1-yl-methyl, morpholinomethyl, pyrrolidin-1-ylmethyl, 2-oxo-4-benzylpiperazin-1-ylmethyl, 4-benzylpiperazin-1-ylmethyl, 3-oxopiperazin-1-ylmethyl, piperidin-1-ylmethyl, piperazin-1-ylethyl, 2,3-dioxopropylaminomethyl, thiazolidin-3-ylmethyl, 4-acetyl piperazin-1-ylmethyl, 4-acetyl piperazin-1-yl, morpholino, 3,3-difluoroazetidin-1-ylmethyl, 2*H*-tetrazol-5-ylmethyl, thiomorpholin-4-ylmethyl, 1-oxothiomorpholin-4-ylmethyl, 1,1-dioxothiomorpholin-4-ylmethyl, 1*H*-imidazol-1-ylmethyl, 3,5-dimethylpiperazin-1ylmethyl, 4-hydroxypiperidin-1-ylmethyl, *N*-methyl(1-acetyl piperidin-4-yl)-aminomethyl, *N*-methylquinuclidin-3-ylaminomethyl, 1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl, 1-methylpiperidin-3-yl-oxymethyl, or 4-fluoropiperidin-1-yl.

To the extent not included within any of the definitions set forth above, the term “solubilizing group” also includes moieties disclosed as being attached to the 7-position of 1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid (ciprofloxacin) and its derivatives, as disclosed in PCT publications WO 2005026165, WO 2005049602, and WO 2005033108, and European Patent publications EP 0343524, EP 0683772, EP 0153163, EP 0159174; as well as “water-solubilizing groups” described in United States patent publication 2006/0035891. The disclosure of each of these patent publications is incorporated herein by reference.

25 The compounds disclosed herein also include partially and fully deuterated variants. In certain embodiments, one or more deuterium atoms are present for

kinetic studies. One of ordinary skill in the art can select the sites at which such deuterium atoms are present.

Also included in the present invention are salts, particularly pharmaceutically acceptable salts, of the sirtuin-modulating compounds described herein. The compounds of the present invention that possess a sufficiently acidic, a sufficiently basic, or both functional groups, can react with any of a number of inorganic bases, and inorganic and organic acids, to form a salt. Alternatively, compounds that are inherently charged, such as those with a quaternary nitrogen, can form a salt with an appropriate counterion (e.g., a halide such as bromide, chloride, or fluoride, particularly bromide).

The compounds and salts thereof described herein also include the hydrates (e.g., hemihydrate, monohydrate, dihydrate, trihydrate, tetrahydrate) and solvates of the compounds and salts thereof. Suitable solvents for preparation of solvates and hydrates can generally be selected by a skilled artisan.

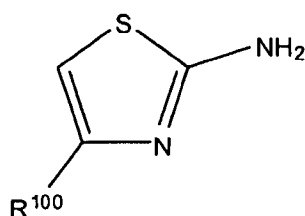
The compounds and salts thereof can be present in amorphous or crystalline (including co-crystalline and polymorph) forms.

Acids commonly employed to form acid addition salts are inorganic acids such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, hydroiodic acid, sulfuric acid, phosphoric acid, and the like, and organic acids such as p-toluenesulfonic acid, methanesulfonic acid, oxalic acid, p-bromophenyl-sulfonic acid, carbonic acid, succinic acid, citric acid, benzoic acid, acetic acid, and the like. Examples of such salts include the sulfate, pyrosulfate, bisulfate, sulfite, bisulfite, phosphate, monohydrogenphosphate, dihydrogenphosphate, metaphosphate, pyrophosphate, chloride, bromide, iodide, acetate, propionate, decanoate, caprylate, acrylate, formate, isobutyrate, caproate, heptanoate, propiolate, oxalate, malonate, succinate, suberate, sebacate, fumarate, maleate, butyne-1,4-dioate, hexyne-1,6-dioate, benzoate, chlorobenzoate, methylbenzoate, dinitrobenzoate, hydroxybenzoate, methoxybenzoate, phthalate, sulfonate, xylenesulfonate, phenylacetate, phenylpropionate, phenylbutyrate, citrate, lactate, gamma-hydroxybutyrate, glycolate, tartrate, methanesulfonate, propanesulfonate, naphthalene-1-sulfonate, naphthalene-2-sulfonate, mandelate, and the like.

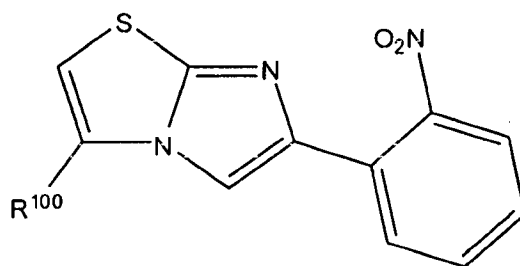
Base addition salts include those derived from inorganic bases, such as ammonium or alkali or alkaline earth metal hydroxides, carbonates, bicarbonates, and the like. Such bases useful in preparing the salts of this invention thus include sodium hydroxide, potassium hydroxide, ammonium hydroxide, potassium carbonate, and the like.

According to another embodiment, the present invention provides methods of producing the above-defined sirtuin-modulating compounds. The compounds may be synthesized using conventional techniques. Advantageously, these compounds are conveniently synthesized from readily available starting materials.

In one embodiment, certain compounds of the invention are prepared according to the following method. First, a compound of the following formula:

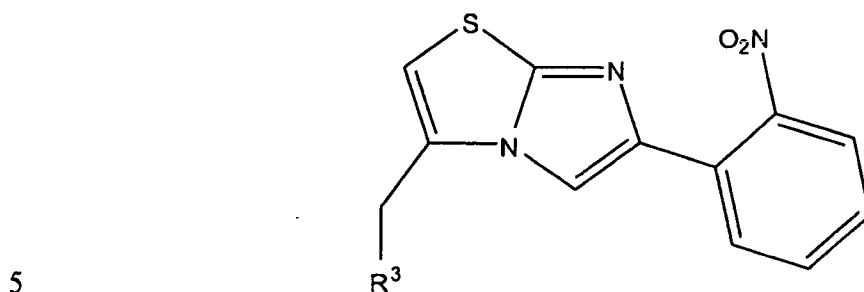


where R¹⁰⁰ is a group that can be transformed into an alkyl (e.g., methyl) group substituted with a leaving group, such as an alkoxycarbonyl (e.g., ethoxycarbonyl), is reacted with a 2'-leaving group, 2'-nitroacetophenone (e.g., 2-halo, 2'-nitroacetophenone where halo is typically bromo or chloro) to form the following compound:

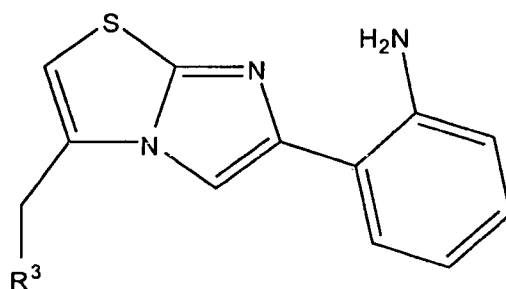


This compound is then reacted to convert -R¹⁰⁰ into -R¹. In embodiments where -R¹⁰⁰ is an alkoxycarbonyl, then group is typically first converted into a carboxylic acid (e.g., using base such as an alkali metal hydroxide like NaOH or KOH) and then reduced to hydroxymethyl using an appropriate reducing agent (e.g., NaBH₄). The group is then transformed into R¹ by reacting the hydroxymethyl group with R³ and, if needed, through an intermediate step to increase the reactivity of the

hydroxymethyl group (e.g., by transforming hydroxymethyl into chloromethyl using SOCl_2 or methane sulfonyl chloride) prior to reaction with R^3 . Exemplary values of R^3 include morpholine and 1H-1,2,4-triazole. The compound following these steps is represented by the following structure:



The nitro group is reduced through reaction with a suitable reducing agent, such as Pd/H_2 or sodium hydrosulfide, to form the following compound:



This compound is reacted with the desired R_2, R_3 -substituted thiazole carboxylic acid (e.g., 4-methyl-2-pyridyl-3-yl thiazole carboxylic acid), typically in the presence of a catalyzing agent (e.g., SOCl_2) to form the product compound.

Synthetic chemistry transformations and methodologies useful in synthesizing the sirtuin-modulating compounds described herein are known in the art and include, for example, those described in R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations* (1989); T. W. Greene and P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2d. Ed. (1991); L. Fieser and M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis* (1994); and L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* (1995).

In an exemplary embodiment, a sirtuin-modulating compound may traverse the cytoplasmic membrane of a cell. For example, a compound may have a cell-permeability of at least about 20%, 50%, 75%, 80%, 90% or 95%.

Sirtuin-modulating compounds described herein may also have one or more of the following characteristics: the compound may be essentially non-toxic to a

cell or subject; the sirtuin-modulating compound may be an organic molecule or a small molecule of 2000 amu or less, 1000 amu or less; a compound may have a half-life under normal atmospheric conditions of at least about 30 days, 60 days, 120 days, 6 months or 1 year; the compound may have a half-life in solution of at least about 30 days, 60 days, 120 days, 6 months or 1 year; a sirtuin-modulating compound may be more stable in solution than resveratrol by at least a factor of about 50%, 2 fold, 5 fold, 10 fold, 30 fold, 50 fold or 100 fold; a sirtuin-modulating compound may promote deacetylation of the DNA repair factor Ku70; a sirtuin-modulating compound may promote deacetylation of RelA/p65; a compound may increase general turnover rates and enhance the sensitivity of cells to TNF-induced apoptosis.

In certain embodiments, a sirtuin-modulating compound does not have any substantial ability to inhibit a histone deacetylase (HDACs) class I, a HDAC class II, or HDACs I and II, at concentrations (e.g., in vivo) effective for modulating the deacetylase activity of the sirtuin. For instance, in preferred embodiments the sirtuin-modulating compound is a sirtuin-activating compound and is chosen to have an EC_{50} for activating sirtuin deacetylase activity that is at least 5 fold less than the EC_{50} for inhibition of an HDAC I and/or HDAC II, and even more preferably at least 10 fold, 100 fold or even 1000 fold less. Methods for assaying HDAC I and/or HDAC II activity are well known in the art and kits to perform such assays may be purchased commercially. See e.g., BioVision, Inc. (Mountain View, CA; world wide web at biovision.com) and Thomas Scientific (Swedesboro, NJ; world wide web at tomassci.com).

In certain embodiments, a sirtuin-modulating compound does not have any substantial ability to modulate sirtuin homologs. In one embodiment, an activator of a human sirtuin protein may not have any substantial ability to activate a sirtuin protein from lower eukaryotes, particularly yeast or human pathogens, at concentrations (e.g., in vivo) effective for activating the deacetylase activity of human sirtuin. For example, a sirtuin-activating compound may be chosen to have an EC_{50} for activating a human sirtuin, such as SIRT1 and/or SIRT3, deacetylase activity that is at least 5 fold less than the EC_{50} for activating a yeast sirtuin, such as Sir2 (such as *Candida*, *S. cerevisiae*, etc.), and even more preferably at least 10

fold, 100 fold or even 1000 fold less. In another embodiment, an inhibitor of a sirtuin protein from lower eukaryotes, particularly yeast or human pathogens, does not have any substantial ability to inhibit a sirtuin protein from humans at concentrations (e.g., in vivo) effective for inhibiting the deacetylase activity of a sirtuin protein from a lower eukaryote. For example, a sirtuin-inhibiting compound may be chosen to have an IC_{50} for inhibiting a human sirtuin, such as SIRT1 and/or SIRT3, deacetylase activity that is at least 5 fold less than the IC_{50} for inhibiting a yeast sirtuin, such as Sir2 (such as *Candida*, *S. cerevisiae*, etc.), and even more preferably at least 10 fold, 100 fold or even 1000 fold less.

10 In certain embodiments, a sirtuin-modulating compound may have the ability to modulate one or more sirtuin protein homologs, such as, for example, one or more of human SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, or SIRT7. In one embodiment, a sirtuin-modulating compound has the ability to modulate both a SIRT1 and a SIRT3 protein.

15 In other embodiments, a SIRT1 modulator does not have any substantial ability to modulate other sirtuin protein homologs, such as, for example, one or more of human SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, or SIRT7, at concentrations (e.g., in vivo) effective for modulating the deacetylase activity of human SIRT1. For example, a sirtuin-modulating compound may be chosen to have an ED_{50} for modulating human SIRT1 deacetylase activity that is at least 5 fold less than the ED_{50} for modulating one or more of human SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, or SIRT7, and even more preferably at least 10 fold, 100 fold or even 1000 fold less. In one embodiment, a SIRT1 modulator does not have any substantial ability to modulate a SIRT3 protein.

25 In other embodiments, a SIRT3 modulator does not have any substantial ability to modulate other sirtuin protein homologs, such as, for example, one or more of human SIRT1, SIRT2, SIRT4, SIRT5, SIRT6, or SIRT7, at concentrations (e.g., in vivo) effective for modulating the deacetylase activity of human SIRT3. For example, a sirtuin-modulating compound may be chosen to have an ED_{50} for modulating human SIRT3 deacetylase activity that is at least 5 fold less than the ED_{50} for modulating one or more of human SIRT1, SIRT2, SIRT4, SIRT5, SIRT6, or SIRT7, and even more preferably at least 10 fold, 100 fold or even 1000 fold

less. In one embodiment, a SIRT3 modulator does not have any substantial ability to modulate a SIRT1 protein.

In certain embodiments, a sirtuin-modulating compound may have a binding affinity for a sirtuin protein of about 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M or less.

- 5 A sirtuin-modulating compound may reduce (activator) or increase (inhibitor) the apparent K_m of a sirtuin protein for its substrate or NAD⁺ (or other cofactor) by a factor of at least about 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 50 or 100. In certain embodiments, K_m values are determined using the mass spectrometry assay described herein. Preferred activating compounds reduce the K_m of a sirtuin for its substrate or
- 10 cofactor to a greater extent than caused by resveratrol at a similar concentration or reduce the K_m of a sirtuin for its substrate or cofactor similar to that caused by resveratrol at a lower concentration. A sirtuin-modulating compound may increase the V_{max} of a sirtuin protein by a factor of at least about 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 50 or 100. A sirtuin-modulating compound may have an ED50 for modulating the
- 15 deacetylase activity of a SIRT1 and/or SIRT3 protein of less than about 1 nM, less than about 10 nM, less than about 100 nM, less than about 1 μ M, less than about 10 μ M, less than about 100 μ M, or from about 1-10 nM, from about 10-100 nM, from about 0.1-1 μ M, from about 1-10 μ M or from about 10-100 μ M. A sirtuin-modulating compound may modulate the deacetylase activity of a SIRT1 and/or
- 20 SIRT3 protein by a factor of at least about 5, 10, 20, 30, 50, or 100, as measured in a cellular assay or in a cell based assay. A sirtuin-activating compound may cause at least about 10%, 30%, 50%, 80%, 2 fold, 5 fold, 10 fold, 50 fold or 100 fold greater induction of the deacetylase activity of a sirtuin protein relative to the same concentration of resveratrol. A sirtuin-modulating compound may have an ED50
- 25 for modulating SIRT5 that is at least about 10 fold, 20 fold, 30 fold, 50 fold greater than that for modulating SIRT1 and/or SIRT3.

3. Exemplary Uses

- 30 In certain aspects, the invention provides methods for modulating the level and/or activity of a sirtuin protein and methods of use thereof.

In certain embodiments, the invention provides methods for using sirtuin-modulating compounds wherein the sirtuin-modulating compounds activate a sirtuin protein, e.g., increase the level and/or activity of a sirtuin protein. Sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein
 5 may be useful for a variety of therapeutic applications including, for example, increasing the lifespan of a cell, and treating and/or preventing a wide variety of diseases and disorders including, for example, diseases or disorders related to aging or stress, diabetes, obesity, neurodegenerative diseases, cardiovascular disease, blood clotting disorders, inflammation, cancer, and/or flushing, etc. The methods
 10 comprise administering to a subject in need thereof a pharmaceutically effective amount of a sirtuin-modulating compound, e.g., a sirtuin-activating compound.

While Applicants do not wish to be bound by theory, it is believed that activators of the instant invention may interact with a sirtuin at the same location within the sirtuin protein (e.g., active site or site affecting the K_m or V_{max} of the
 15 active site). It is believed that this is the reason why certain classes of sirtuin activators and inhibitors can have substantial structural similarity.

In certain embodiments, the sirtuin-modulating compounds described herein may be taken alone or in combination with other compounds. In one embodiment, a mixture of two or more sirtuin-modulating compounds may be administered to a
 20 subject in need thereof. In another embodiment, a sirtuin-modulating compound that increases the level and/or activity of a sirtuin protein may be administered with one or more of the following compounds: resveratrol, butein, fisetin, piceatannol, or quercetin. In an exemplary embodiment, a sirtuin-modulating compound that increases the level and/or activity of a sirtuin protein may be administered in
 25 combination with nicotinic acid. In another embodiment, a sirtuin-modulating compound that decreases the level and/or activity of a sirtuin protein may be administered with one or more of the following compounds: nicotinamide (NAM), suranim; NF023 (a G-protein antagonist); NF279 (a purinergic receptor antagonist); Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid); (-)-
 30 epigallocatechin (hydroxy on sites 3,5,7,3',4', 5'); (-)-epigallocatechin gallate (Hydroxy sites 5,7,3',4',5' and gallate ester on 3); cyanidin chloride (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavylium chloride); delphinidin chloride (3,5,7,3',4',5'-

hexahydroxyflavylium chloride); myricetin (cannabiscetin; 3,5,7,3',4',5'-hexahydroxyflavone); 3,7,3',4',5'-pentahydroxyflavone; gossypetin (3,5,7,8,3',4'-hexahydroxyflavone), sirtinol; and splitomicin. In yet another embodiment, one or more sirtuin-modulating compounds may be administered with one or more
5 therapeutic agents for the treatment or prevention of various diseases, including, for example, cancer, diabetes, neurodegenerative diseases, cardiovascular disease, blood clotting, inflammation, flushing, obesity, ageing, stress, etc. In various embodiments, combination therapies comprising a sirtuin-modulating compound may refer to (1) pharmaceutical compositions that comprise one or more sirtuin-
10 modulating compounds in combination with one or more therapeutic agents (e.g., one or more therapeutic agents described herein); and (2) co-administration of one or more sirtuin-modulating compounds with one or more therapeutic agents wherein the sirtuin-modulating compound and therapeutic agent have not been formulated in the same compositions (but may be present within the same kit or package, such as a
15 blister pack or other multi-chamber package; connected, separately sealed containers (e.g., foil pouches) that can be separated by the user; or a kit where the sirtuin modulating compound(s) and other therapeutic agent(s) are in separate vessels). When using separate formulations, the sirtuin-modulating compound may be administered at the same, intermittent, staggered, prior to, subsequent to, or
20 combinations thereof, with the administration of another therapeutic agent.

In certain embodiments, methods for reducing, preventing or treating diseases or disorders using a sirtuin-modulating compound may also comprise increasing the protein level of a sirtuin, such as human SIRT1, SIRT2 and/or SIRT3, or homologs thereof. Increasing protein levels can be achieved by introducing into a
25 cell one or more copies of a nucleic acid that encodes a sirtuin. For example, the level of a sirtuin can be increased in a mammalian cell by introducing into the mammalian cell a nucleic acid encoding the sirtuin, e.g., increasing the level of SIRT1 by introducing a nucleic acid encoding the amino acid sequence set forth in GenBank Accession No. NP_036370 and/or increasing the level of SIRT3 by
30 introducing a nucleic acid encoding the amino acid sequence set forth in GenBank Accession No. AAH01042.

A nucleic acid that is introduced into a cell to increase the protein level of a sirtuin may encode a protein that is at least about 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, or 99% identical to the sequence of a sirtuin, e.g., SIRT1 and/or SIRT3 protein. For example, the nucleic acid encoding the protein may be at least about 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, or 99% identical to a nucleic acid encoding a SIRT1 (e.g. GenBank Accession No. NM_012238) and/or SIRT3 (e.g., GenBank Accession No. BC001042) protein. The nucleic acid may also be a nucleic acid that hybridizes, preferably under stringent hybridization conditions, to a nucleic acid encoding a wild-type sirtuin, e.g., SIRT1 and/or SIRT3 protein. Stringent hybridization conditions may include hybridization and a wash in 0.2 x SSC at 65 °C. When using a nucleic acid that encodes a protein that is different from a wild-type sirtuin protein, such as a protein that is a fragment of a wild-type sirtuin, the protein is preferably biologically active, e.g., is capable of deacetylation. It is only necessary to express in a cell a portion of the sirtuin that is biologically active. For example, a protein that differs from wild-type SIRT1 having GenBank Accession No. NP_036370, preferably contains the core structure thereof. The core structure sometimes refers to amino acids 62-293 of GenBank Accession No. NP_036370, which are encoded by nucleotides 237 to 932 of GenBank Accession No. NM_012238, which encompasses the NAD binding as well as the substrate binding domains. The core domain of SIRT1 may also refer to about amino acids 261 to 447 of GenBank Accession No. NP_036370, which are encoded by nucleotides 834 to 1394 of GenBank Accession No. NM_012238; to about amino acids 242 to 493 of GenBank Accession No. NP_036370, which are encoded by nucleotides 777 to 1532 of GenBank Accession No. NM_012238; or to about amino acids 254 to 495 of GenBank Accession No. NP_036370, which are encoded by nucleotides 813 to 1538 of GenBank Accession No. NM_012238. Whether a protein retains a biological function, e.g., deacetylation capabilities, can be determined according to methods known in the art.

In certain embodiments, methods for reducing, preventing or treating diseases or disorders using a sirtuin-modulating compound may also comprise decreasing the protein level of a sirtuin, such as human SIRT1, SIRT2 and/or SIRT3, or homologs thereof. Decreasing a sirtuin protein level can be achieved

according to methods known in the art. For example, an siRNA, an antisense nucleic acid, or a ribozyme targeted to the sirtuin can be expressed in the cell. A dominant negative sirtuin mutant, e.g., a mutant that is not capable of deacetylating, may also be used. For example, mutant H363Y of SIRT1, described, e.g., in Luo et al. (2001)

5 Cell 107:137 can be used. Alternatively, agents that inhibit transcription can be used.

Methods for modulating sirtuin protein levels also include methods for modulating the transcription of genes encoding sirtuins, methods for stabilizing/destabilizing the corresponding mRNAs, and other methods known in the art.

10 ***Aging/Stress***

In one embodiment, the invention provides a method extending the lifespan of a cell, extending the proliferative capacity of a cell, slowing aging of a cell, promoting the survival of a cell, delaying cellular senescence in a cell, mimicking the effects of calorie restriction, increasing the resistance of a cell to stress, or
15 preventing apoptosis of a cell, by contacting the cell with a sirtuin-modulating compound of the invention that increases the level and/or activity of a sirtuin protein. In an exemplary embodiment, the methods comprise contacting the cell with a sirtuin-activating compound.

The methods described herein may be used to increase the amount of time
20 that cells, particularly primary cells (i.e., cells obtained from an organism, e.g., a human), may be kept alive in a cell culture. Embryonic stem (ES) cells and pluripotent cells, and cells differentiated therefrom, may also be treated with a sirtuin-modulating compound that increases the level and/or activity of a sirtuin protein to keep the cells, or progeny thereof, in culture for longer periods of time.
25 Such cells can also be used for transplantation into a subject, e.g., after *ex vivo* modification.

In one embodiment, cells that are intended to be preserved for long periods of time may be treated with a sirtuin-modulating compound that increases the level and/or activity of a sirtuin protein. The cells may be in suspension (e.g., blood cells,
30 serum, biological growth media, etc.) or in tissues or organs. For example, blood collected from an individual for purposes of transfusion may be treated with a sirtuin-modulating compound that increases the level and/or activity of a sirtuin

protein to preserve the blood cells for longer periods of time. Additionally, blood to be used for forensic purposes may also be preserved using a sirtuin-modulating compound that increases the level and/or activity of a sirtuin protein. Other cells that may be treated to extend their lifespan or protect against apoptosis include cells
5 for consumption, e.g., cells from non-human mammals (such as meat) or plant cells (such as vegetables).

Sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may also be applied during developmental and growth phases in mammals, plants, insects or microorganisms, in order to, e.g., alter, retard or
10 accelerate the developmental and/or growth process.

In another embodiment, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be used to treat cells useful for transplantation or cell therapy, including, for example, solid tissue grafts, organ transplants, cell suspensions, stem cells, bone marrow cells, etc. The cells or tissue
15 may be an autograft, an allograft, a syngraft or a xenograft. The cells or tissue may be treated with the sirtuin-modulating compound prior to administration/implantation, concurrently with administration/implantation, and/or post administration/implantation into a subject. The cells or tissue may be treated prior to removal of the cells from the donor individual, *ex vivo* after removal of the
20 cells or tissue from the donor individual, or post implantation into the recipient. For example, the donor or recipient individual may be treated systemically with a sirtuin-modulating compound or may have a subset of cells/tissue treated locally with a sirtuin-modulating compound that increases the level and/or activity of a sirtuin protein. In certain embodiments, the cells or tissue (or donor/recipient
25 individuals) may additionally be treated with another therapeutic agent useful for prolonging graft survival, such as, for example, an immunosuppressive agent, a cytokine, an angiogenic factor, etc.

In yet other embodiments, cells may be treated with a sirtuin-modulating compound that increases the level and/or activity of a sirtuin protein *in vivo*, e.g., to
30 increase their lifespan or prevent apoptosis. For example, skin can be protected from aging (e.g., developing wrinkles, loss of elasticity, etc.) by treating skin or epithelial cells with a sirtuin-modulating compound that increases the level and/or

activity of a sirtuin protein. In an exemplary embodiment, skin is contacted with a pharmaceutical or cosmetic composition comprising a sirtuin-modulating compound that increases the level and/or activity of a sirtuin protein. Exemplary skin afflictions or skin conditions that may be treated in accordance with the methods described herein include disorders or diseases associated with or caused by inflammation, sun damage or natural aging. For example, the compositions find utility in the prevention or treatment of contact dermatitis (including irritant contact dermatitis and allergic contact dermatitis), atopic dermatitis (also known as allergic eczema), actinic keratosis, keratinization disorders (including eczema), epidermolysis bullosa diseases (including penfigus), exfoliative dermatitis, seborrheic dermatitis, erythemas (including erythema multiforme and erythema nodosum), damage caused by the sun or other light sources, discoid lupus erythematosus, dermatomyositis, psoriasis, skin cancer and the effects of natural aging. In another embodiment, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be used for the treatment of wounds and/or burns to promote healing, including, for example, first-, second- or third-degree burns and/or a thermal, chemical or electrical burns. The formulations may be administered topically, to the skin or mucosal tissue.

Topical formulations comprising one or more sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may also be used as preventive, e.g., chemopreventive, compositions. When used in a chemopreventive method, susceptible skin is treated prior to any visible condition in a particular individual.

Sirtuin-modulating compounds may be delivered locally or systemically to a subject. In one embodiment, a sirtuin-modulating compound is delivered locally to a tissue or organ of a subject by injection, topical formulation, etc.

In another embodiment, a sirtuin-modulating compound that increases the level and/or activity of a sirtuin protein may be used for treating or preventing a disease or condition induced or exacerbated by cellular senescence in a subject; methods for decreasing the rate of senescence of a subject, e.g., after onset of senescence; methods for extending the lifespan of a subject; methods for treating or preventing a disease or condition relating to lifespan; methods for treating or

preventing a disease or condition relating to the proliferative capacity of cells; and methods for treating or preventing a disease or condition resulting from cell damage or death. In certain embodiments, the method does not act by decreasing the rate of occurrence of diseases that shorten the lifespan of a subject. In certain
5 embodiments, a method does not act by reducing the lethality caused by a disease, such as cancer.

 In yet another embodiment, a sirtuin-modulating compound that increases the level and/or activity of a sirtuin protein may be administered to a subject in order to generally increase the lifespan of its cells and to protect its cells against
10 stress and/or against apoptosis. It is believed that treating a subject with a compound described herein is similar to subjecting the subject to hormesis, i.e., mild stress that is beneficial to organisms and may extend their lifespan.

 Sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be administered to a subject to prevent aging and aging-related
15 consequences or diseases, such as stroke, heart disease, heart failure, arthritis, high blood pressure, and Alzheimer's disease. Other conditions that can be treated include ocular disorders, e.g., associated with the aging of the eye, such as cataracts, glaucoma, and macular degeneration. Sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein can also be administered to
20 subjects for treatment of diseases, e.g., chronic diseases, associated with cell death, in order to protect the cells from cell death. Exemplary diseases include those associated with neural cell death, neuronal dysfunction, or muscular cell death or dysfunction, such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease, multiple sclerosis, amniotropic lateral sclerosis, and muscular dystrophy; AIDS; fulminant hepatitis;
25 diseases linked to degeneration of the brain, such as Creutzfeld-Jakob disease, retinitis pigmentosa and cerebellar degeneration; myelodysplasia such as aplastic anemia; ischemic diseases such as myocardial infarction and stroke; hepatic diseases such as alcoholic hepatitis, hepatitis B and hepatitis C; joint-diseases such as osteoarthritis; atherosclerosis; alopecia; damage to the skin due to UV light;
30 lichen planus; atrophy of the skin; cataract; and graft rejections. Cell death can also be caused by surgery, drug therapy, chemical exposure or radiation exposure.

Sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein can also be administered to a subject suffering from an acute disease, e.g., damage to an organ or tissue, e.g., a subject suffering from stroke or myocardial infarction or a subject suffering from a spinal cord injury. Sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may also be used to repair an alcoholic's liver.

Cardiovascular Disease

In another embodiment, the invention provides a method for treating and/or preventing a cardiovascular disease by administering to a subject in need thereof a sirtuin-modulating compound that increases the level and/or activity of a sirtuin protein.

Cardiovascular diseases that can be treated or prevented using the sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein include cardiomyopathy or myocarditis; such as idiopathic cardiomyopathy, metabolic cardiomyopathy, alcoholic cardiomyopathy, drug-induced cardiomyopathy, ischemic cardiomyopathy, and hypertensive cardiomyopathy. Also treatable or preventable using compounds and methods described herein are atheromatous disorders of the major blood vessels (macrovascular disease) such as the aorta, the coronary arteries, the carotid arteries, the cerebrovascular arteries, the renal arteries, the iliac arteries, the femoral arteries, and the popliteal arteries. Other vascular diseases that can be treated or prevented include those related to platelet aggregation, the retinal arterioles, the glomerular arterioles, the vasa nervorum, cardiac arterioles, and associated capillary beds of the eye, the kidney, the heart, and the central and peripheral nervous systems. The sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may also be used for increasing HDL levels in plasma of an individual.

Yet other disorders that may be treated with sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein include restenosis, e.g., following coronary intervention, and disorders relating to an abnormal level of high density and low density cholesterol.

In one embodiment, a sirtuin-modulating compound that increases the level and/or activity of a sirtuin protein may be administered as part of a combination

therapeutic with another cardiovascular agent. In one embodiment, a sirtuin-modulating compound that increases the level and/or activity of a sirtuin protein may be administered as part of a combination therapeutic with an anti-arrhythmia agent. In another embodiment, a sirtuin-modulating compound that increases the level and/or activity of a sirtuin protein may be administered as part of a combination therapeutic with another cardiovascular agent.

Cell Death/Cancer

Sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be administered to subjects who have recently received or are likely to receive a dose of radiation or toxin. In one embodiment, the dose of radiation or toxin is received as part of a work-related or medical procedure, e.g., administered as a prophylactic measure. In another embodiment, the radiation or toxin exposure is received unintentionally. In such a case, the compound is preferably administered as soon as possible after the exposure to inhibit apoptosis and the subsequent development of acute radiation syndrome.

Sirtuin-modulating compounds may also be used for treating and/or preventing cancer. In certain embodiments, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be used for treating and/or preventing cancer. Calorie restriction has been linked to a reduction in the incidence of age-related disorders including cancer. Accordingly, an increase in the level and/or activity of a sirtuin protein may be useful for treating and/or preventing the incidence of age-related disorders, such as, for example, cancer. Exemplary cancers that may be treated using a sirtuin-modulating compound are those of the brain and kidney; hormone-dependent cancers including breast, prostate, testicular, and ovarian cancers; lymphomas, and leukemias. In cancers associated with solid tumors, a modulating compound may be administered directly into the tumor. Cancer of blood cells, e.g., leukemia, can be treated by administering a modulating compound into the blood stream or into the bone marrow. Benign cell growth, e.g., warts, can also be treated. Other diseases that can be treated include autoimmune diseases, e.g., systemic lupus erythematosus, scleroderma, and arthritis, in which autoimmune cells should be removed. Viral infections such as herpes, HIV, adenovirus, and HTLV-1 associated malignant and benign disorders can also be

treated by administration of sirtuin-modulating compound. Alternatively, cells can be obtained from a subject, treated ex vivo to remove certain undesirable cells, e.g., cancer cells, and administered back to the same or a different subject.

Chemotherapeutic agents may be co-administered with modulating
5 compounds described herein as having anti-cancer activity, e.g., compounds that induce apoptosis, compounds that reduce lifespan or compounds that render cells sensitive to stress. Chemotherapeutic agents may be used by themselves with a sirtuin-modulating compound described herein as inducing cell death or reducing lifespan or increasing sensitivity to stress and/or in combination with other
10 chemotherapeutics agents. In addition to conventional chemotherapeutics, the sirtuin-modulating compounds described herein may also be used with antisense RNA, RNAi or other polynucleotides to inhibit the expression of the cellular components that contribute to unwanted cellular proliferation.

Combination therapies comprising sirtuin-modulating compounds and a
15 conventional chemotherapeutic agent may be advantageous over combination therapies known in the art because the combination allows the conventional chemotherapeutic agent to exert greater effect at lower dosage. In a preferred embodiment, the effective dose (ED₅₀) for a chemotherapeutic agent, or combination of conventional chemotherapeutic agents, when used in combination
20 with a sirtuin-modulating compound is at least 2 fold less than the ED₅₀ for the chemotherapeutic agent alone, and even more preferably at 5 fold, 10 fold or even 25 fold less. Conversely, the therapeutic index (TI) for such chemotherapeutic agent or combination of such chemotherapeutic agent when used in combination with a sirtuin-modulating compound described herein can be at least 2 fold greater
25 than the TI for conventional chemotherapeutic regimen alone, and even more preferably at 5 fold, 10 fold or even 25 fold greater.

Neuronal Diseases/Disorders

In certain aspects, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein can be used to treat patients suffering from
30 neurodegenerative diseases, and traumatic or mechanical injury to the central nervous system (CNS), spinal cord or peripheral nervous system (PNS). Neurodegenerative disease typically involves reductions in the mass and volume of

the human brain, which may be due to the atrophy and/or death of brain cells, which are far more profound than those in a healthy person that are attributable to aging. Neurodegenerative diseases can evolve gradually, after a long period of normal brain function, due to progressive degeneration (e.g., nerve cell dysfunction and death) of specific brain regions. Alternatively, neurodegenerative diseases can have a quick onset, such as those associated with trauma or toxins. The actual onset of brain degeneration may precede clinical expression by many years. Examples of neurodegenerative diseases include, but are not limited to, Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), Huntington's disease (HD), amyotrophic lateral sclerosis (ALS; Lou Gehrig's disease), diffuse Lewy body disease, chorea-acanthocytosis, primary lateral sclerosis, ocular diseases (ocular neuritis), chemotherapy-induced neuropathies (e.g., from vincristine, paclitaxel, bortezomib), diabetes-induced neuropathies and Friedreich's ataxia. Sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein can be used to treat these disorders and others as described below.

AD is a CNS disorder that results in memory loss, unusual behavior, personality changes, and a decline in thinking abilities. These losses are related to the death of specific types of brain cells and the breakdown of connections and their supporting network (e.g. glial cells) between them. The earliest symptoms include loss of recent memory, faulty judgment, and changes in personality. PD is a CNS disorder that results in uncontrolled body movements, rigidity, tremor, and dyskinesia, and is associated with the death of brain cells in an area of the brain that produces dopamine. ALS (motor neuron disease) is a CNS disorder that attacks the motor neurons, components of the CNS that connect the brain to the skeletal muscles.

HD is another neurodegenerative disease that causes uncontrolled movements, loss of intellectual faculties, and emotional disturbance. Tay-Sachs disease and Sandhoff disease are glycolipid storage diseases where GM2 ganglioside and related glycolipidssubstrates for β -hexosaminidase accumulate in the nervous system and trigger acute neurodegeneration.

It is well-known that apoptosis plays a role in AIDS pathogenesis in the immune system. However, HIV-1 also induces neurological disease, which can be treated with sirtuin-modulating compounds of the invention.

Neuronal loss is also a salient feature of prion diseases, such as Creutzfeldt-Jakob disease in human, BSE in cattle (mad cow disease), Scrapie Disease in sheep and goats, and feline spongiform encephalopathy (FSE) in cats. Sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be useful for treating or preventing neuronal loss due to these prior diseases.

In another embodiment, a sirtuin-modulating compound that increases the level and/or activity of a sirtuin protein may be used to treat or prevent any disease or disorder involving axonopathy. Distal axonopathy is a type of peripheral neuropathy that results from some metabolic or toxic derangement of peripheral nervous system (PNS) neurons. It is the most common response of nerves to metabolic or toxic disturbances, and as such may be caused by metabolic diseases such as diabetes, renal failure, deficiency syndromes such as malnutrition and alcoholism, or the effects of toxins or drugs. Those with distal axonopathies usually present with symmetrical glove-stocking sensori-motor disturbances. Deep tendon reflexes and autonomic nervous system (ANS) functions are also lost or diminished in affected areas.

Diabetic neuropathies are neuropathic disorders that are associated with diabetes mellitus. Relatively common conditions which may be associated with diabetic neuropathy include third nerve palsy; mononeuropathy; mononeuritis multiplex; diabetic amyotrophy; a painful polyneuropathy; autonomic neuropathy; and thoracoabdominal neuropathy.

Peripheral neuropathy is the medical term for damage to nerves of the peripheral nervous system, which may be caused either by diseases of the nerve or from the side-effects of systemic illness. Major causes of peripheral neuropathy include seizures, nutritional deficiencies, and HIV, though diabetes is the most likely cause.

In an exemplary embodiment, a sirtuin-modulating compound that increases the level and/or activity of a sirtuin protein may be used to treat or prevent multiple sclerosis (MS), including relapsing MS and monosymptomatic MS, and other

demyelinating conditions, such as, for example, chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP), or symptoms associated therewith.

In yet another embodiment, a sirtuin-modulating compound that increases the level and/or activity of a sirtuin protein may be used to treat trauma to the nerves, including trauma due to disease, injury (including surgical intervention), or environmental trauma (e.g., neurotoxins, alcoholism, etc.).

Sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may also be useful to prevent, treat, and alleviate symptoms of various PNS disorders. The term “peripheral neuropathy” encompasses a wide range of disorders in which the nerves outside of the brain and spinal cord—peripheral nerves—have been damaged. Peripheral neuropathy may also be referred to as peripheral neuritis, or if many nerves are involved, the terms polyneuropathy or polyneuritis may be used.

PNS diseases treatable with sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein include: diabetes, leprosy, Charcot-Marie-Tooth disease, Guillain-Barré syndrome and Brachial Plexus Neuropathies (diseases of the cervical and first thoracic roots, nerve trunks, cords, and peripheral nerve components of the brachial plexus).

In another embodiment, a sirtuin activating compound may be used to treat or prevent a polyglutamine disease. Exemplary polyglutamine diseases include Spinobulbar muscular atrophy (Kennedy disease), Huntington’s Disease (HD), Dentatorubral-pallidoluysian atrophy (Haw River syndrome), Spinocerebellar ataxia type 1, Spinocerebellar ataxia type 2, Spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease), Spinocerebellar ataxia type 6, Spinocerebellar ataxia type 7, and Spinocerebellar ataxia type 17.

In certain embodiments, the invention provides a method to treat a central nervous system cell to prevent damage in response to a decrease in blood flow to the cell. Typically the severity of damage that may be prevented will depend in large part on the degree of reduction in blood flow to the cell and the duration of the reduction. In one embodiment, apoptotic or necrotic cell death may be prevented. In still a further embodiment, ischemic-mediated damage, such as cytotoxic edema or

central nervous system tissue anoxemia, may be prevented. In each embodiment, the central nervous system cell may be a spinal cell or a brain cell.

Another aspect encompasses administering a sirtuin activating compound to a subject to treat a central nervous system ischemic condition. A number of central nervous system ischemic conditions may be treated by the sirtuin activating compounds described herein. In one embodiment, the ischemic condition is a stroke that results in any type of ischemic central nervous system damage, such as apoptotic or necrotic cell death, cytotoxic edema or central nervous system tissue anoxia. The stroke may impact any area of the brain or be caused by any etiology commonly known to result in the occurrence of a stroke. In one alternative of this embodiment, the stroke is a brain stem stroke. In another alternative of this embodiment, the stroke is a cerebellar stroke. In still another embodiment, the stroke is an embolic stroke. In yet another alternative, the stroke may be a hemorrhagic stroke. In a further embodiment, the stroke is a thrombotic stroke.

In yet another aspect, a sirtuin activating compound may be administered to reduce infarct size of the ischemic core following a central nervous system ischemic condition. Moreover, a sirtuin activating compound may also be beneficially administered to reduce the size of the ischemic penumbra or transitional zone following a central nervous system ischemic condition.

In one embodiment, a combination drug regimen may include drugs or compounds for the treatment or prevention of neurodegenerative disorders or secondary conditions associated with these conditions. Thus, a combination drug regimen may include one or more sirtuin activators and one or more anti-neurodegeneration agents.

25 *Blood Coagulation Disorders*

In other aspects, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein can be used to treat or prevent blood coagulation disorders (or hemostatic disorders). As used interchangeably herein, the terms "hemostasis", "blood coagulation," and "blood clotting" refer to the control of bleeding, including the physiological properties of vasoconstriction and coagulation. Blood coagulation assists in maintaining the integrity of mammalian circulation after injury, inflammation, disease, congenital defect, dysfunction or other disruption.

Further, the formation of blood clots does not only limit bleeding in case of an injury (hemostasis), but may lead to serious organ damage and death in the context of atherosclerotic diseases by occlusion of an important artery or vein. Thrombosis is thus blood clot formation at the wrong time and place. \

5 Accordingly, the present invention provides anticoagulation and antithrombotic treatments aiming at inhibiting the formation of blood clots in order to prevent or treat blood coagulation disorders, such as myocardial infarction, stroke, loss of a limb by peripheral artery disease or pulmonary embolism.

 As used interchangeably herein, “modulating or modulation of hemostasis”
10 and “regulating or regulation of hemostasis” includes the induction (e.g., stimulation or increase) of hemostasis, as well as the inhibition (e.g., reduction or decrease) of hemostasis.

 In one aspect, the invention provides a method for reducing or inhibiting hemostasis in a subject by administering a sirtuin-modulating compound that
15 increases the level and/or activity of a sirtuin protein. The compositions and methods disclosed herein are useful for the treatment or prevention of thrombotic disorders. As used herein, the term “thrombotic disorder” includes any disorder or condition characterized by excessive or unwanted coagulation or hemostatic activity, or a hypercoagulable state. Thrombotic disorders include diseases or disorders involving
20 platelet adhesion and thrombus formation, and may manifest as an increased propensity to form thromboses, e.g., an increased number of thromboses, thrombosis at an early age, a familial tendency towards thrombosis, and thrombosis at unusual sites.

 In another embodiment, a combination drug regimen may include drugs or
25 compounds for the treatment or prevention of blood coagulation disorders or secondary conditions associated with these conditions. Thus, a combination drug regimen may include one or more sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein and one or more anti-coagulation or anti-thrombosis agents.

30 ***Weight Control***

 In another aspect, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be used for treating or preventing weight gain

or obesity in a subject. For example, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be used, for example, to treat or prevent hereditary obesity, dietary obesity, hormone related obesity, obesity related to the administration of medication, to reduce the weight of a subject, or to reduce or
5 prevent weight gain in a subject. A subject in need of such a treatment may be a subject who is obese, likely to become obese, overweight, or likely to become overweight. Subjects who are likely to become obese or overweight can be identified, for example, based on family history, genetics, diet, activity level, medication intake, or various combinations thereof.

10 In yet other embodiments, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be administered to subjects suffering from a variety of other diseases and conditions that may be treated or prevented by promoting weight loss in the subject. Such diseases include, for example, high blood pressure, hypertension, high blood cholesterol, dyslipidemia, type 2 diabetes, insulin
15 resistance, glucose intolerance, hyperinsulinemia, coronary heart disease, angina pectoris, congestive heart failure, stroke, gallstones, cholecystitis and cholelithiasis, gout, osteoarthritis, obstructive sleep apnea and respiratory problems, some types of cancer (such as endometrial, breast, prostate, and colon), complications of pregnancy, poor female reproductive health (such as menstrual irregularities,
20 infertility, irregular ovulation), bladder control problems (such as stress incontinence); uric acid nephrolithiasis; psychological disorders (such as depression, eating disorders, distorted body image, and low self esteem). Finally, patients with AIDS can develop lipodystrophy or insulin resistance in response to combination therapies for AIDS.

25 In another embodiment, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be used for inhibiting adipogenesis or fat cell differentiation, whether in vitro or in vivo. Such methods may be used for treating or preventing obesity.

In other embodiments, sirtuin-modulating compounds that increase the level
30 and/or activity of a sirtuin protein may be used for reducing appetite and/or increasing satiety, thereby causing weight loss or avoidance of weight gain. A subject in need of such a treatment may be a subject who is overweight, obese or a

subject likely to become overweight or obese. The method may comprise administering daily or, every other day, or once a week, a dose, e.g., in the form of a pill, to a subject. The dose may be an "appetite reducing dose."

In an exemplary embodiment, sirtuin-modulating compounds that increase
5 the level and/or activity of a sirtuin protein may be administered as a combination therapy for treating or preventing weight gain or obesity. For example, one or more sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be administered in combination with one or more anti-obesity agents.

In another embodiment, sirtuin-modulating compounds that increase the
10 level and/or activity of a sirtuin protein may be administered to reduce drug-induced weight gain. For example, a sirtuin-modulating compound that increases the level and/or activity of a sirtuin protein may be administered as a combination therapy with medications that may stimulate appetite or cause weight gain, in particular, weight gain due to factors other than water retention.

15 ***Metabolic Disorders/Diabetes***

In another aspect, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be used for treating or preventing a metabolic disorder, such as insulin-resistance, a pre-diabetic state, type II diabetes, and/or complications thereof. Administration of a sirtuin-modulating compounds that
20 increases the level and/or activity of a sirtuin protein may increase insulin sensitivity and/or decrease insulin levels in a subject. A subject in need of such a treatment may be a subject who has insulin resistance or other precursor symptom of type II diabetes, who has type II diabetes, or who is likely to develop any of these conditions. For example, the subject may be a subject having insulin resistance, e.g.,
25 having high circulating levels of insulin and/or associated conditions, such as hyperlipidemia, dyslipogenesis, hypercholesterolemia, impaired glucose tolerance, high blood glucose sugar level, other manifestations of syndrome X, hypertension, atherosclerosis and lipodystrophy.

In an exemplary embodiment, sirtuin-modulating compounds that increase
30 the level and/or activity of a sirtuin protein may be administered as a combination therapy for treating or preventing a metabolic disorder. For example, one or more

sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be administered in combination with one or more anti-diabetic agents.

Inflammatory Diseases

In other aspects, sirtuin-modulating compounds that increase the level
5 and/or activity of a sirtuin protein can be used to treat or prevent a disease or disorder associated with inflammation. Sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be administered prior to the onset of, at, or after the initiation of inflammation. When used prophylactically, the compounds are preferably provided in advance of any inflammatory response or
10 symptom. Administration of the compounds may prevent or attenuate inflammatory responses or symptoms.

In another embodiment, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be used to treat or prevent allergies and respiratory conditions, including asthma, bronchitis, pulmonary fibrosis, allergic
15 rhinitis, oxygen toxicity, emphysema, chronic bronchitis, acute respiratory distress syndrome, and any chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The compounds may be used to treat chronic hepatitis infection, including hepatitis B and hepatitis C.

Additionally, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or
20 activity of a sirtuin protein may be used to treat autoimmune diseases and/or inflammation associated with autoimmune diseases such as organ-tissue autoimmune diseases (e.g., Raynaud's syndrome), scleroderma, myasthenia gravis, transplant rejection, endotoxin shock, sepsis, psoriasis, eczema, dermatitis, multiple sclerosis, autoimmune thyroiditis, uveitis, systemic lupus erythematosus, Addison's
25 disease, autoimmune polyglandular disease (also known as autoimmune polyglandular syndrome), and Grave's disease.

In certain embodiments, one or more sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be taken alone or in combination with other compounds useful for treating or preventing inflammation.
30 ***Flushing***

In another aspect, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be used for reducing the incidence or severity

of flushing and/or hot flashes which are symptoms of a disorder. For instance, the subject method includes the use of sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein, alone or in combination with other agents, for reducing incidence or severity of flushing and/or hot flashes in cancer patients.

- 5 In other embodiments, the method provides for the use of sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein to reduce the incidence or severity of flushing and/or hot flashes in menopausal and post-menopausal woman.

- In another aspect, sirtuin-modulating compounds that increase the level
10 and/or activity of a sirtuin protein may be used as a therapy for reducing the incidence or severity of flushing and/or hot flashes which are side-effects of another drug therapy, e.g., drug-induced flushing. In certain embodiments, a method for treating and/or preventing drug-induced flushing comprises administering to a patient in need thereof a formulation comprising at least one flushing inducing
15 compound and at least one sirtuin-modulating compound that increases the level and/or activity of a sirtuin protein. In other embodiments, a method for treating drug induced flushing comprises separately administering one or more compounds that induce flushing and one or more sirtuin-modulating compounds, e.g., wherein the sirtuin-modulating compound and flushing inducing agent have not been formulated
20 in the same compositions. When using separate formulations, the sirtuin-modulating compound may be administered (1) at the same as administration of the flushing inducing agent, (2) intermittently with the flushing inducing agent, (3) staggered relative to administration of the flushing inducing agent, (4) prior to administration of the flushing inducing agent, (5) subsequent to administration of the flushing
25 inducing agent, and (6) various combination thereof. Exemplary flushing inducing agents include, for example, niacin, faloixifene, antidepressants, anti-psychotics, chemotherapeutics, calcium channel blockers, and antibiotics.

- In one embodiment, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be used to reduce flushing side effects of a
30 vasodilator or an antilipemic agent (including anticholesteremic agents and lipotropic agents). In an exemplary embodiment, a sirtuin-modulating compound

that increases the level and/or activity of a sirtuin protein may be used to reduce flushing associated with the administration of niacin.

In another embodiment, the invention provides a method for treating and/or preventing hyperlipidemia with reduced flushing side effects. In another
5 representative embodiment, the method involves the use of sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein to reduce flushing side effects of raloxifene. In another representative embodiment, the method involves the use of sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein to reduce flushing side effects of antidepressants
10 or anti-psychotic agent. For instance, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein can be used in conjunction (administered separately or together) with a serotonin reuptake inhibitor, or a 5HT₂ receptor antagonist.

In certain embodiments, sirtuin-modulating compounds that increase the
15 level and/or activity of a sirtuin protein may be used as part of a treatment with a serotonin reuptake inhibitor (SRI) to reduce flushing. In still another representative embodiment, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be used to reduce flushing side effects of chemotherapeutic agents, such as cyclophosphamide and tamoxifen.

20 In another embodiment, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be used to reduce flushing side effects of calcium channel blockers, such as amlodipine.

In another embodiment, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be used to reduce flushing side effects
25 of antibiotics. For example, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein can be used in combination with levofloxacin.

Ocular Disorders

One aspect of the present invention is a method for inhibiting, reducing or otherwise treating vision impairment by administering to a patient a therapeutic
30 dosage of sirtuin modulator selected from a compound disclosed herein, or a pharmaceutically acceptable salt, prodrug or a metabolic derivative thereof.

In certain aspects of the invention, the vision impairment is caused by damage to the optic nerve or central nervous system. In particular embodiments, optic nerve damage is caused by high intraocular pressure, such as that created by glaucoma. In other particular embodiments, optic nerve damage is caused by
 5 swelling of the nerve, which is often associated with an infection or an immune (e.g., autoimmune) response such as in optic neuritis.

In certain aspects of the invention, the vision impairment is caused by retinal damage. In particular embodiments, retinal damage is caused by disturbances in blood flow to the eye (e.g., arteriosclerosis, vasculitis). In particular embodiments,
 10 retinal damage is caused by disruption of the macula (e.g., exudative or non-exudative macular degeneration).

Exemplary retinal diseases include Exudative Age Related Macular Degeneration, Nonexudative Age Related Macular Degeneration, Retinal Electronic Prosthesis and RPE Transplantation Age Related Macular Degeneration, Acute
 15 Multifocal Placoid Pigment Epitheliopathy, Acute Retinal Necrosis, Best Disease, Branch Retinal Artery Occlusion, Branch Retinal Vein Occlusion, Cancer Associated and Related Autoimmune Retinopathies, Central Retinal Artery Occlusion, Central Retinal Vein Occlusion, Central Serous Chorioretinopathy, Eales Disease, Epimacular Membrane, Lattice Degeneration, Macroaneurysm, Diabetic
 20 Macular Edema, Irvine-Gass Macular Edema, Macular Hole, Subretinal Neovascular Membranes, Diffuse Unilateral Subacute Neuroretinitis, Nonpseudophakic Cystoid Macular Edema, Presumed Ocular Histoplasmosis Syndrome, Exudative Retinal Detachment, Postoperative Retinal Detachment, Proliferative Retinal Detachment, Rhegmatogenous Retinal Detachment, Tractional Retinal Detachment, Retinitis
 25 Pigmentosa, CMV Retinitis, Retinoblastoma, Retinopathy of Prematurity, Birdshot Retinopathy, Background Diabetic Retinopathy, Proliferative Diabetic Retinopathy, Hemoglobinopathies Retinopathy, Purtscher Retinopathy, Valsalva Retinopathy, Juvenile Retinoschisis, Senile Retinoschisis, Terson Syndrome and White Dot Syndromes.

30 Other exemplary diseases include ocular bacterial infections (e.g. conjunctivitis, keratitis, tuberculosis, syphilis, gonorrhea), viral infections (e.g. Ocular Herpes Simplex Virus, Varicella Zoster Virus, Cytomegalovirus retinitis,

Human Immunodeficiency Virus (HIV)) as well as progressive outer retinal necrosis secondary to HIV or other HIV-associated and other immunodeficiency-associated ocular diseases. In addition, ocular diseases include fungal infections (e.g. Candida choroiditis, histoplasmosis), protozoal infections (e.g. toxoplasmosis) and others
5 such as ocular toxocariasis and sarcoidosis.

One aspect of the invention is a method for inhibiting, reducing or treating vision impairment in a subject undergoing treatment with a chemotherapeutic drug (e.g., a neurotoxic drug, a drug that raises intraocular pressure such as a steroid), by administering to the subject in need of such treatment a therapeutic dosage of a
10 sirtuin modulator disclosed herein.

Another aspect of the invention is a method for inhibiting, reducing or treating vision impairment in a subject undergoing surgery, including ocular or other surgeries performed in the prone position such as spinal cord surgery, by administering to the subject in need of such treatment a therapeutic dosage of a
15 sirtuin modulator disclosed herein. Ocular surgeries include cataract, iridotomy and lens replacements.

Another aspect of the invention is the treatment, including inhibition and prophylactic treatment, of age related ocular diseases include cataracts, dry eye, age-related macular degeneration (AMD), retinal damage and the like, by administering
20 to the subject in need of such treatment a therapeutic dosage of a sirtuin modulator disclosed herein.

Another aspect of the invention is the prevention or treatment of damage to the eye caused by stress, chemical insult or radiation, by administering to the subject in need of such treatment a therapeutic dosage of a sirtuin modulator disclosed
25 herein. Radiation or electromagnetic damage to the eye can include that caused by CRT's or exposure to sunlight or UV.

In one embodiment, a combination drug regimen may include drugs or compounds for the treatment or prevention of ocular disorders or secondary conditions associated with these conditions. Thus, a combination drug regimen may
30 include one or more sirtuin activators and one or more therapeutic agents for the treatment of an ocular disorder.

In one embodiment, a sirtuin modulator can be administered in conjunction with a therapy for reducing intraocular pressure. In another embodiment, a sirtuin modulator can be administered in conjunction with a therapy for treating and/or preventing glaucoma. In yet another embodiment, a sirtuin modulator can be administered in conjunction with a therapy for treating and/or preventing optic neuritis. In one embodiment, a sirtuin modulator can be administered in conjunction with a therapy for treating and/or preventing CMV Retinopathy. In another embodiment, a sirtuin modulator can be administered in conjunction with a therapy for treating and/or preventing multiple sclerosis.

10 ***Mitochondrial-Associated Diseases and Disorders***

In certain embodiments, the invention provides methods for treating diseases or disorders that would benefit from increased mitochondrial activity. The methods involve administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a sirtuin activating compound. Increased mitochondrial activity refers to increasing activity of the mitochondria while maintaining the overall numbers of mitochondria (e.g., mitochondrial mass), increasing the numbers of mitochondria thereby increasing mitochondrial activity (e.g., by stimulating mitochondrial biogenesis), or combinations thereof. In certain embodiments, diseases and disorders that would benefit from increased mitochondrial activity include diseases or disorders associated with mitochondrial dysfunction.

In certain embodiments, methods for treating diseases or disorders that would benefit from increased mitochondrial activity may comprise identifying a subject suffering from a mitochondrial dysfunction. Methods for diagnosing a mitochondrial dysfunction may involve molecular genetic, pathologic and/or biochemical analyses. Diseases and disorders associated with mitochondrial dysfunction include diseases and disorders in which deficits in mitochondrial respiratory chain activity contribute to the development of pathophysiology of such diseases or disorders in a mammal. Diseases or disorders that would benefit from increased mitochondrial activity generally include for example, diseases in which free radical mediated oxidative injury leads to tissue degeneration, diseases in which cells inappropriately undergo apoptosis, and diseases in which cells fail to undergo apoptosis.

In certain embodiments, the invention provides methods for treating a disease or disorder that would benefit from increased mitochondrial activity that involves administering to a subject in need thereof one or more sirtuin activating compounds in combination with another therapeutic agent such as, for example, an agent useful for treating mitochondrial dysfunction or an agent useful for reducing a symptom associated with a disease or disorder involving mitochondrial dysfunction.

In exemplary embodiments, the invention provides methods for treating diseases or disorders that would benefit from increased mitochondrial activity by administering to a subject a therapeutically effective amount of a sirtuin activating compound. Exemplary diseases or disorders include, for example, neuromuscular disorders (e.g., Friedreich's Ataxia, muscular dystrophy, multiple sclerosis, etc.), disorders of neuronal instability (e.g., seizure disorders, migraine, etc.), developmental delay, neurodegenerative disorders (e.g., Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, amyotrophic lateral sclerosis, etc.), ischemia, renal tubular acidosis, age-related neurodegeneration and cognitive decline, chemotherapy fatigue, age-related or chemotherapy-induced menopause or irregularities of menstrual cycling or ovulation, mitochondrial myopathies, mitochondrial damage (e.g., calcium accumulation, excitotoxicity, nitric oxide exposure, hypoxia, etc.), and mitochondrial deregulation.

Muscular dystrophy refers to a family of diseases involving deterioration of neuromuscular structure and function, often resulting in atrophy of skeletal muscle and myocardial dysfunction, such as Duchenne muscular dystrophy. In certain embodiments, sirtuin activating compounds may be used for reducing the rate of decline in muscular functional capacities and for improving muscular functional status in patients with muscular dystrophy.

In certain embodiments, sirtuin modulating compounds may be useful for treatment mitochondrial myopathies. Mitochondrial myopathies range from mild, slowly progressive weakness of the extraocular muscles to severe, fatal infantile myopathies and multisystem encephalomyopathies. Some syndromes have been defined, with some overlap between them. Established syndromes affecting muscle include progressive external ophthalmoplegia, the Kearns-Sayre syndrome (with ophthalmoplegia, pigmentary retinopathy, cardiac conduction defects, cerebellar

ataxia, and sensorineural deafness), the MELAS syndrome (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes), the MERFF syndrome (myoclonic epilepsy and ragged red fibers), limb-girdle distribution weakness, and infantile myopathy (benign or severe and fatal).

5 In certain embodiments, sirtuin activating compounds may be useful for treating patients suffering from toxic damage to mitochondria, such as, toxic damage due to calcium accumulation, excitotoxicity, nitric oxide exposure, drug induced toxic damage, or hypoxia.

10 In certain embodiments, sirtuin activating compounds may be useful for treating diseases or disorders associated with mitochondrial deregulation.

Muscle Performance

 In other embodiments, the invention provides methods for enhancing muscle performance by administering a therapeutically effective amount of a sirtuin activating compound. For example, sirtuin activating compounds may be useful for
15 improving physical endurance (e.g., ability to perform a physical task such as exercise, physical labor, sports activities, etc.), inhibiting or retarding physical fatigues, enhancing blood oxygen levels, enhancing energy in healthy individuals, enhance working capacity and endurance, reducing muscle fatigue, reducing stress, enhancing cardiac and cardiovascular function, improving sexual ability, increasing
20 muscle ATP levels, and/or reducing lactic acid in blood. In certain embodiments, the methods involve administering an amount of a sirtuin activating compound that increase mitochondrial activity, increase mitochondrial biogenesis, and/or increase mitochondrial mass.

 Sports performance refers to the ability of the athlete's muscles to perform
25 when participating in sports activities. Enhanced sports performance, strength, speed and endurance are measured by an increase in muscular contraction strength, increase in amplitude of muscle contraction, shortening of muscle reaction time between stimulation and contraction. Athlete refers to an individual who participates in sports at any level and who seeks to achieve an improved level of strength, speed
30 and endurance in their performance, such as, for example, body builders, bicyclists, long distance runners, short distance runners, etc. Enhanced sports performance in

manifested by the ability to overcome muscle fatigue, ability to maintain activity for longer periods of time, and have a more effective workout.

In the arena of athlete muscle performance, it is desirable to create conditions that permit competition or training at higher levels of resistance for a prolonged
5 period of time.

It is contemplated that the methods of the present invention will also be effective in the treatment of muscle related pathological conditions, including acute sarcopenia, for example, muscle atrophy and/or cachexia associated with burns, bed rest, limb immobilization, or major thoracic, abdominal, and/or orthopedic surgery.

10 In certain embodiments, the invention provides novel dietary compositions comprising sirtuin modulators, a method for their preparation, and a method of using the compositions for improvement of sports performance. Accordingly, provided are therapeutic compositions, foods and beverages that have actions of improving physical endurance and/or inhibiting physical fatigues for those people involved in
15 broadly-defined exercises including sports requiring endurance and labors requiring repeated muscle exertions. Such dietary compositions may additionally comprise electrolytes, caffeine, vitamins, carbohydrates, etc.

Other Uses

Sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a
20 sirtuin protein may be used for treating or preventing viral infections (such as infections by influenza, herpes or papilloma virus) or as antifungal agents. In certain embodiments, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be administered as part of a combination drug therapy with another therapeutic agent for the treatment of viral diseases. In another
25 embodiment, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be administered as part of a combination drug therapy with another anti-fungal agent.

Subjects that may be treated as described herein include eukaryotes, such as mammals, e.g., humans, ovines, bovines, equines, porcines, canines, felines, non-
30 human primate, mice, and rats. Cells that may be treated include eukaryotic cells, e.g., from a subject described above, or plant cells, yeast cells and prokaryotic cells,

e.g., bacterial cells. For example, modulating compounds may be administered to farm animals to improve their ability to withstand farming conditions longer.

Sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may also be used to increase lifespan, stress resistance, and resistance to apoptosis in plants. In one embodiment, a compound is applied to plants, e.g., on a periodic basis, or to fungi. In another embodiment, plants are genetically modified to produce a compound. In another embodiment, plants and fruits are treated with a compound prior to picking and shipping to increase resistance to damage during shipping. Plant seeds may also be contacted with compounds described herein, e.g., to preserve them.

In other embodiments, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may be used for modulating lifespan in yeast cells. Situations in which it may be desirable to extend the lifespan of yeast cells include any process in which yeast is used, e.g., the making of beer, yogurt, and bakery items, e.g., bread. Use of yeast having an extended lifespan can result in using less yeast or in having the yeast be active for longer periods of time. Yeast or other mammalian cells used for recombinantly producing proteins may also be treated as described herein.

Sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may also be used to increase lifespan, stress resistance and resistance to apoptosis in insects. In this embodiment, compounds would be applied to useful insects, e.g., bees and other insects that are involved in pollination of plants. In a specific embodiment, a compound would be applied to bees involved in the production of honey. Generally, the methods described herein may be applied to any organism, e.g., eukaryote, that may have commercial importance. For example, they can be applied to fish (aquaculture) and birds (e.g., chicken and fowl).

Higher doses of sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein may also be used as a pesticide by interfering with the regulation of silenced genes and the regulation of apoptosis during development. In this embodiment, a compound may be applied to plants using a method known in the art that ensures the compound is bio-available to insect larvae, and not to plants.

At least in view of the link between reproduction and longevity, sirtuin-modulating compounds that increase the level and/or activity of a sirtuin protein can be applied to affect the reproduction of organisms such as insects, animals and microorganisms.

5

4. Assays

Various types of assays to determine sirtuin activity have been described. For example, sirtuin activity may be determined using a fluorescence based assay such as the assay commercially available from Biomol, e.g., the SIRT1 Fluorimetric
10 Drug Discovery Kit (AK-555), SIRT2 Fluorimetric Drug Discovery Kit (AK-556), or SIRT3 Fluorimetric Drug Discovery Kit (AK-557) (Biomol International, Plymouth Meeting, PA). Other suitable sirtuin assays include a nicotinamide release assay (Kaeberlein et al., J. Biol. Chem. 280(17): 17038 (2005)), a FRET assay (Marcotte et al., Anal. Biochem. 332: 90 (2004)), and a C¹⁴ NAD boron resin
15 binding assay (McDonagh et al., Methods 36: 346 (2005)). Yet other suitable sirtuin assays include radioimmunoassays (RIA), scintillation proximity assays, HPLC based assays, and reporter gene assays (e.g., for transcription factor targets).

An exemplary assay for determining sirtuin activity is a fluorescence polarization assay. Fluorescence polarization assays are described herein and are
20 also described in PCT Publication No. WO 2006/094239. In other embodiments, sirtuin activity may be determined using a mass spectrometry based assays. Examples of mass spectrometry based assays are described herein and are also described in PCT Publication No. WO 2007/064902. Cell based assays may also be used to determine sirtuin activity. Examples of cell based assays for determining
25 sirtuin activity are described in PCT Publication Nos. WO 2007/064902 and WO 2008/060400.

Yet other methods contemplated herein include screening methods for identifying compounds or agents that modulate sirtuins. An agent may be a nucleic acid, such as an aptamer. Assays may be conducted in a cell based or cell free
30 format. For example, an assay may comprise incubating (or contacting) a sirtuin with a test agent under conditions in which a sirtuin can be modulated by an agent known to modulate the sirtuin, and monitoring or determining the level of

modulation of the sirtuin in the presence of the test agent relative to the absence of the test agent. The level of modulation of a sirtuin can be determined by determining its ability to deacetylate a substrate. Exemplary substrates are acetylated peptides which can be obtained from BIOMOL (Plymouth Meeting, PA). Preferred substrates include peptides of p53, such as those comprising an acetylated K382. A particularly preferred substrate is the Fluor de Lys-SIRT1 (BIOMOL), i.e., the acetylated peptide Arg-His-Lys-Lys. Other substrates are peptides from human histones H3 and H4 or an acetylated amino acid. Substrates may be fluorogenic. The sirtuin may be SIRT1, Sir2, SIRT3, or a portion thereof. For example, recombinant SIRT1 can be obtained from BIOMOL. The reaction may be conducted for about 30 minutes and stopped, e.g., with nicotinamide. The HDAC fluorescent activity assay/drug discovery kit (AK-500, BIOMOL Research Laboratories) may be used to determine the level of acetylation. Similar assays are described in Bitterman et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:45099. The level of modulation of the sirtuin in an assay may be compared to the level of modulation of the sirtuin in the presence of one or more (separately or simultaneously) compounds described herein, which may serve as positive or negative controls. Sirtuins for use in the assays may be full length sirtuin proteins or portions thereof. Since it has been shown herein that activating compounds appear to interact with the N-terminus of SIRT1, proteins for use in the assays include N-terminal portions of sirtuins, e.g., about amino acids 1-176 or 1-255 of SIRT1; about amino acids 1-174 or 1-252 of Sir2.

In one embodiment, a screening assay comprises (i) contacting a sirtuin with a test agent and an acetylated substrate under conditions appropriate for the sirtuin to deacetylate the substrate in the absence of the test agent ; and (ii) determining the level of acetylation of the substrate, wherein a lower level of acetylation of the substrate in the presence of the test agent relative to the absence of the test agent indicates that the test agent stimulates deacetylation by the sirtuin, whereas a higher level of acetylation of the substrate in the presence of the test agent relative to the absence of the test agent indicates that the test agent inhibits deacetylation by the sirtuin.

Methods for identifying an agent that modulates, e.g., stimulates, sirtuins *in vivo* may comprise (i) contacting a cell with a test agent and a substrate that is

capable of entering a cell in the presence of an inhibitor of class I and class II HDACs under conditions appropriate for the sirtuin to deacetylate the substrate in the absence of the test agent, and (ii) determining the level of acetylation of the substrate, wherein a lower level of acetylation of the substrate in the presence of the test agent relative to the absence of the test agent indicates that the test agent stimulates deacetylation by the sirtuin, whereas a higher level of acetylation of the substrate in the presence of the test agent relative to the absence of the test agent indicates that the test agent inhibits deacetylation by the sirtuin. A preferred substrate is an acetylated peptide, which is also preferably fluorogenic, as further described herein. The method may further comprise lysing the cells to determine the level of acetylation of the substrate. Substrates may be added to cells at a concentration ranging from about 1 μ M to about 10mM, preferably from about 10 μ M to 1mM, even more preferably from about 100 μ M to 1mM, such as about 200 μ M. A preferred substrate is an acetylated lysine, e.g., ϵ -acetyl lysine (Fluor de Lys, FdL) or Fluor de Lys-SIRT1. A preferred inhibitor of class I and class II HDACs is trichostatin A (TSA), which may be used at concentrations ranging from about 0.01 to 100 μ M, preferably from about 0.1 to 10 μ M, such as 1 μ M. Incubation of cells with the test compound and the substrate may be conducted for about 10 minutes to 5 hours, preferably for about 1-3 hours. Since TSA inhibits all class I and class II HDACs, and that certain substrates, e.g., Fluor de Lys, is a poor substrate for SIRT2 and even less a substrate for SIRT3-7, such an assay may be used to identify modulators of SIRT1 *in vivo*.

5. Pharmaceutical Compositions

The sirtuin-modulating compounds described herein may be formulated in a conventional manner using one or more physiologically acceptable carriers or excipients. For example, sirtuin-modulating compounds and their physiologically acceptable salts and solvates may be formulated for administration by, for example, injection (e.g. SubQ, IM, IP), inhalation or insufflation (either through the mouth or the nose) or oral, buccal, sublingual, transdermal, nasal, parenteral or rectal administration. In one embodiment, a sirtuin-modulating compound may be

administered locally, at the site where the target cells are present, i.e., in a specific tissue, organ, or fluid (e.g., blood, cerebrospinal fluid, etc.).

Sirtuin-modulating compounds can be formulated for a variety of modes of administration, including systemic and topical or localized administration.

- 5 Techniques and formulations generally may be found in Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA. For parenteral administration, injection is preferred, including intramuscular, intravenous, intraperitoneal, and subcutaneous. For injection, the compounds can be formulated in liquid solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hank's
10 solution or Ringer's solution. In addition, the compounds may be formulated in solid form and redissolved or suspended immediately prior to use. Lyophilized forms are also included.

- For oral administration, the pharmaceutical compositions may take the form of, for example, tablets, lozenges, or capsules prepared by conventional means with
15 pharmaceutically acceptable excipients such as binding agents (e.g., pregelatinised maize starch, polyvinylpyrrolidone or hydroxypropyl methylcellulose); fillers (e.g., lactose, microcrystalline cellulose or calcium hydrogen phosphate); lubricants (e.g., magnesium stearate, talc or silica); disintegrants (e.g., potato starch or sodium starch glycolate); or wetting agents (e.g., sodium lauryl sulphate). The tablets may be
20 coated by methods well known in the art. Liquid preparations for oral administration may take the form of, for example, solutions, syrups or suspensions, or they may be presented as a dry product for constitution with water or other suitable vehicle before use. Such liquid preparations may be prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable additives such as suspending agents (e.g., sorbitol
25 syrup, cellulose derivatives or hydrogenated edible fats); emulsifying agents (e.g., lecithin or acacia); non-aqueous vehicles (e.g., ationd oil, oily esters, ethyl alcohol or fractionated vegetable oils); and preservatives (e.g., methyl or propyl-p-hydroxybenzoates or sorbic acid). The preparations may also contain buffer salts, flavoring, coloring and sweetening agents as appropriate. Preparations for oral
30 administration may be suitably formulated to give controlled release of the active compound.

For administration by inhalation (e.g., pulmonary delivery), sirtuin-modulating compounds may be conveniently delivered in the form of an aerosol spray presentation from pressurized packs or a nebuliser, with the use of a suitable propellant, e.g., dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, 5 dichlorotetrafluoroethane, carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurized aerosol the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges of e.g., gelatin, for use in an inhaler or insufflator may be formulated containing a powder mix of the compound and a suitable powder base such as lactose or starch.

10 Sirtuin-modulating compounds may be formulated for parenteral administration by injection, e.g., by bolus injection or continuous infusion. Formulations for injection may be presented in unit dosage form, e.g., in ampoules or in multi-dose containers, with an added preservative. The compositions may take such forms as suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles, and 15 may contain formulatory agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents. Alternatively, the active ingredient may be in powder form for constitution with a suitable vehicle, e.g., sterile pyrogen-free water, before use.

Sirtuin-modulating compounds may also be formulated in rectal compositions such as suppositories or retention enemas, e.g., containing 20 conventional suppository bases such as cocoa butter or other glycerides.

In addition to the formulations described previously, sirtuin-modulating compounds may also be formulated as a depot preparation. Such long acting formulations may be administered by implantation (for example subcutaneously or intramuscularly) or by intramuscular injection. Thus, for example, sirtuin- 25 modulating compounds may be formulated with suitable polymeric or hydrophobic materials (for example as an emulsion in an acceptable oil) or ion exchange resins, or as sparingly soluble derivatives, for example, as a sparingly soluble salt. Controlled release formula also includes patches.

In certain embodiments, the compounds described herein can be formulated 30 for delivery to the central nervous system (CNS) (reviewed in Begley, Pharmacology & Therapeutics 104: 29-45 (2004)). Conventional approaches for drug delivery to the CNS include: neurosurgical strategies (e.g., intracerebral

injection or intracerebroventricular infusion); molecular manipulation of the agent (e.g., production of a chimeric fusion protein that comprises a transport peptide that has an affinity for an endothelial cell surface molecule in combination with an agent that is itself incapable of crossing the BBB) in an attempt to exploit one of the
5 endogenous transport pathways of the BBB; pharmacological strategies designed to increase the lipid solubility of an agent (e.g., conjugation of water-soluble agents to lipid or cholesterol carriers); and the transitory disruption of the integrity of the BBB by hyperosmotic disruption (resulting from the infusion of a mannitol solution into the carotid artery or the use of a biologically active agent such as an angiotensin
10 peptide).

Liposomes are a further drug delivery system which is easily injectable. Accordingly, in the method of invention the active compounds can also be administered in the form of a liposome delivery system. Liposomes are well-known by a person skilled in the art. Liposomes can be formed from a variety of
15 phospholipids, such as cholesterol, stearylamine or phosphatidylcholines. Liposomes being usable for the method of invention encompass all types of liposomes including, but not limited to, small unilamellar vesicles, large unilamellar vesicles and multilamellar vesicles.

Another way to produce a formulation, particularly a solution, of a sirtuin
20 modulator such as resveratrol or a derivative thereof, is through the use of cyclodextrin. By cyclodextrin is meant α -, β -, or γ -cyclodextrin. Cyclodextrins are described in detail in Pitha et al., U.S. Pat. No. 4,727,064, which is incorporated herein by reference. Cyclodextrins are cyclic oligomers of glucose; these compounds form inclusion complexes with any drug whose molecule can fit into the lipophile-
25 seeking cavities of the cyclodextrin molecule.

Rapidly disintegrating or dissolving dosage forms are useful for the rapid absorption, particularly buccal and sublingual absorption, of pharmaceutically active agents. Fast melt dosage forms are beneficial to patients, such as aged and pediatric patients, who have difficulty in swallowing typical solid dosage forms, such as
30 caplets and tablets. Additionally, fast melt dosage forms circumvent drawbacks associated with, for example, chewable dosage forms, wherein the length of time an active agent remains in a patient's mouth plays an important role in determining the

amount of taste masking and the extent to which a patient may object to throat
grittiness of the active agent.

Pharmaceutical compositions (including cosmetic preparations) may
comprise from about 0.00001 to 100% such as from 0.001 to 10% or from 0.1% to
5 5% by weight of one or more sirtuin-modulating compounds described herein.

In one embodiment, a sirtuin-modulating compound described herein, is
incorporated into a topical formulation containing a topical carrier that is generally
suited to topical drug administration and comprising any such material known in
the art. The topical carrier may be selected so as to provide the composition in the
10 desired form, e.g., as an ointment, lotion, cream, microemulsion, gel, oil, solution,
or the like, and may be comprised of a material of either naturally occurring or
synthetic origin. It is preferable that the selected carrier not adversely affect the
active agent or other components of the topical formulation. Examples of suitable
topical carriers for use herein include water, alcohols and other nontoxic organic
15 solvents, glycerin, mineral oil, silicone, petroleum jelly, lanolin, fatty acids,
vegetable oils, parabens, waxes, and the like.

Formulations may be colorless, odorless ointments, lotions, creams,
microemulsions and gels.

Sirtuin-modulating compounds may be incorporated into ointments, which
20 generally are semisolid preparations which are typically based on petrolatum or
other petroleum derivatives. The specific ointment base to be used, as will be
appreciated by those skilled in the art, is one that will provide for optimum drug
delivery, and, preferably, will provide for other desired characteristics as well, e.g.,
emolliency or the like. As with other carriers or vehicles, an ointment base should
25 be inert, stable, nonirritating and nonsensitizing.

Sirtuin-modulating compounds may be incorporated into lotions, which
generally are preparations to be applied to the skin surface without friction, and are
typically liquid or semiliquid preparations in which solid particles, including the
active agent, are present in a water or alcohol base. Lotions are usually suspensions
30 of solids, and may comprise a liquid oily emulsion of the oil-in-water type.

Sirtuin-modulating compounds may be incorporated into creams, which
generally are viscous liquid or semisolid emulsions, either oil-in-water or water-in-

oil. Cream bases are water-washable, and contain an oil phase, an emulsifier and an aqueous phase. The oil phase is generally comprised of petrolatum and a fatty alcohol such as cetyl or stearyl alcohol; the aqueous phase usually, although not necessarily, exceeds the oil phase in volume, and generally contains a humectant.

- 5 The emulsifier in a cream formulation, as explained in Remington's, *supra*, is generally a nonionic, anionic, cationic or amphoteric surfactant.

Sirtuin-modulating compounds may be incorporated into microemulsions, which generally are thermodynamically stable, isotropically clear dispersions of two immiscible liquids, such as oil and water, stabilized by an interfacial film of surfactant molecules (Encyclopedia of Pharmaceutical Technology (New York: Marcel Dekker, 1992), volume 9).

- 10 Sirtuin-modulating compounds may be incorporated into gel formulations, which generally are semisolid systems consisting of either suspensions made up of small inorganic particles (two-phase systems) or large organic molecules distributed substantially uniformly throughout a carrier liquid (single phase gels). Although gels commonly employ aqueous carrier liquid, alcohols and oils can be used as the carrier liquid as well.

Other active agents may also be included in formulations, e.g., other anti-inflammatory agents, analgesics, antimicrobial agents, antifungal agents, antibiotics, vitamins, antioxidants, and sunblock agents commonly found in sunscreen formulations including, but not limited to, anthranilates, benzophenones (particularly benzophenone-3), camphor derivatives, cinnamates (e.g., octyl methoxycinnamate), dibenzoyl methanes (e.g., butyl methoxydibenzoyl methane), p-aminobenzoic acid (PABA) and derivatives thereof, and salicylates (e.g., octyl salicylate).

- 25 In certain topical formulations, the active agent is present in an amount in the range of approximately 0.25 wt. % to 75 wt. % of the formulation, preferably in the range of approximately 0.25 wt. % to 30 wt. % of the formulation, more preferably in the range of approximately 0.5 wt. % to 15 wt. % of the formulation, and most preferably in the range of approximately 1.0 wt. % to 10 wt. % of the formulation.

- Conditions of the eye can be treated or prevented by, e.g., systemic, topical, intraocular injection of a sirtuin-modulating compound, or by insertion of a sustained release device that releases a sirtuin-modulating compound. A sirtuin-modulating compound that increases the level and/or activity of a sirtuin protein
- 5 may be delivered in a pharmaceutically acceptable ophthalmic vehicle, such that the compound is maintained in contact with the ocular surface for a sufficient time period to allow the compound to penetrate the corneal and internal regions of the eye, as for example the anterior chamber, posterior chamber, vitreous body, aqueous humor, vitreous humor, cornea, iris/ciliary, lens, choroid/retina and sclera.
- 10 The pharmaceutically-acceptable ophthalmic vehicle may, for example, be an ointment, vegetable oil or an encapsulating material. Alternatively, the compounds of the invention may be injected directly into the vitreous and aqueous humour. In a further alternative, the compounds may be administered systemically, such as by intravenous infusion or injection, for treatment of the eye.
- 15 Sirtuin-modulating compounds described herein may be stored in oxygen free environment. For example, resveratrol or analog thereof can be prepared in an airtight capsule for oral administration, such as Capsugel from Pfizer, Inc.
- Cells, e.g., treated *ex vivo* with a sirtuin-modulating compound, can be administered according to methods for administering a graft to a subject, which
- 20 may be accompanied, e.g., by administration of an immunosuppressant drug, e.g., cyclosporin A. For general principles in medicinal formulation, the reader is referred to Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, by G. Morstyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996; and Hematopoietic Stem Cell Therapy, E. D. Ball, J. Lister & P. Law,
- 25 Churchill Livingstone, 2000.
- Toxicity and therapeutic efficacy of sirtuin-modulating compounds can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals. The LD₅₀ is the dose lethal to 50% of the population. The ED₅₀ is the dose therapeutically effective in 50% of the population. The dose ratio between toxic and
- 30 therapeutic effects (LD₅₀/ED₅₀) is the therapeutic index. Sirtuin-modulating compounds that exhibit large therapeutic indexes are preferred. While sirtuin-modulating compounds that exhibit toxic side effects may be used, care should be

taken to design a delivery system that targets such compounds to the site of affected tissue in order to minimize potential damage to uninfected cells and, thereby, reduce side effects.

The data obtained from the cell culture assays and animal studies can be used in formulating a range of dosage for use in humans. The dosage of such compounds may lie within a range of circulating concentrations that include the ED₅₀ with little or no toxicity. The dosage may vary within this range depending upon the dosage form employed and the route of administration utilized. For any compound, the therapeutically effective dose can be estimated initially from cell culture assays. A dose may be formulated in animal models to achieve a circulating plasma concentration range that includes the IC₅₀ (i.e., the concentration of the test compound that achieves a half-maximal inhibition of symptoms) as determined in cell culture. Such information can be used to more accurately determine useful doses in humans. Levels in plasma may be measured, for example, by high performance liquid chromatography.

6. Kits

Also provided herein are kits, e.g., kits for therapeutic purposes or kits for modulating the lifespan of cells or modulating apoptosis. A kit may comprise one or more sirtruin-modulating compounds, e.g., in premeasured doses. A kit may optionally comprise devices for contacting cells with the compounds and instructions for use. Devices include syringes, stents and other devices for introducing a sirtruin-modulating compound into a subject (e.g., the blood vessel of a subject) or applying it to the skin of a subject.

In yet another embodiment, the invention provides a composition of matter comprising a sirtruin modulator of this invention and another therapeutic agent (the same ones used in combination therapies and combination compositions) in separate dosage forms, but associated with one another. The term "associated with one another" as used herein means that the separate dosage forms are packaged together or otherwise attached to one another such that it is readily apparent that the separate dosage forms are intended to be sold and administered as part of the same regimen. The agent and the sirtruin modulator are preferably packaged together in a

blister pack or other multi-chamber package, or as connected, separately sealed containers (such as foil pouches or the like) that can be separated by the user (e.g., by tearing on score lines between the two containers).

In still another embodiment, the invention provides a kit comprising in
5 separate vessels, a) a sirtruin modulator of this invention; and b) another another therapeutic agent such as those described elsewhere in the specification.

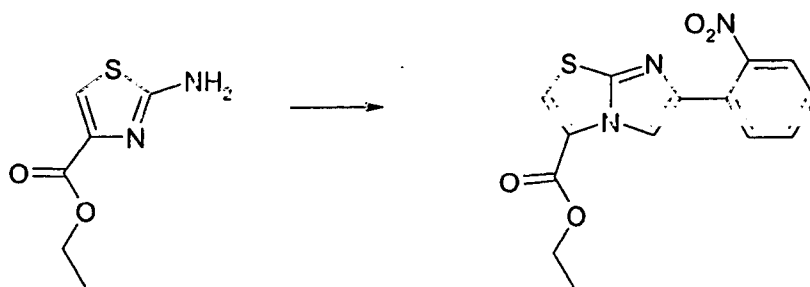
The practice of the present methods will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of cell biology, cell culture, molecular biology, transgenic biology, microbiology, recombinant DNA, and immunology, which are within the
10 skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, for example, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. U.S. Patent No: 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B.
15 D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H.
20 Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor
25 Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

EXEMPLIFICATION

The invention now being generally described, it will be more readily understood by reference to the following examples which are included merely for
30 purposes of illustration of certain aspects and embodiments of the present invention, and are not intended to limit the invention in any way.

EXAMPLE 1: Preparation of 4-methyl-N-(2-(3-(morpholinomethyl)imidazo[2,1-b]thiazol-6-yl)phenyl)-2-(pyridin-3-yl)thiazole-5-carboxamide (Compound 1)

Preparation of 6-(2-Nitro-phenyl)-imidazo[2,1-b]thiazole-3-carboxylic acid ethyl ester

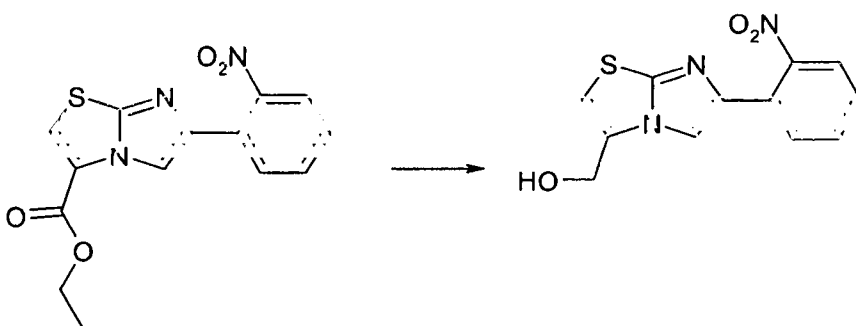


5

In a typical run, 2.1 g of ethyl 2-aminothiazole-4-carboxylate (Combi-Blocks, 0.0123 mol) was mixed with 25 mL of methyl ethyl ketone along with 2-bromo-2'-nitroacetophenone (3.0 g, 0.0123 mol). The reaction mixture was stirred under reflux for 18 hours. It was then cooled to room temperature and filtered to remove some of the solids. The filtrate was concentrated to afford 3.10 g of 6-(2-nitro-phenyl)-imidazo[2,1-b]thiazole-3-carboxylic acid ethyl ester (MS, $M^+ + H = 318$).

10

Preparation of [6-(2-nitro-phenyl)-imidazo[2,1-b]thiazol-3-yl]-methanol:



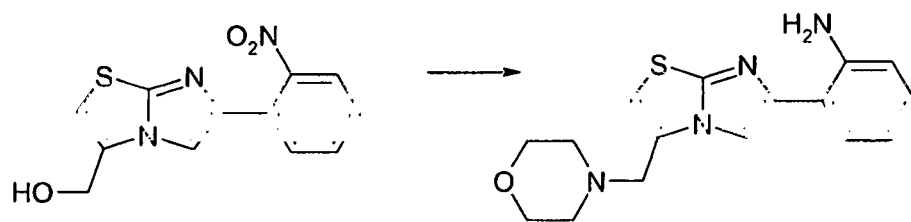
15

6-(2-Nitro-phenyl)-imidazo[2,1-b]thiazole-3-carboxylic acid ethyl ester (14.50 g, 0.0458 mol) was mixed with 100 mL of THF and 100 mL of water containing 7.3 g of NaOH (4 eq). The reaction mixture was stirred at room temperature for 18 hours. It was then concentrated. The aqueous layer was washed once with CH_2Cl_2 and then acidified with 6 N HCl. The solids were collected by filtration and dried to afford 7.4 g of the acid intermediate. This material (7.4 g, 0.0256 mol) was mixed with 200 mL of anhydrous THF along with N-

20

methymorpholine (NMM) (2.8 mL, 0.0256 mol) and cooled to 0 °C. Isobutyl chloroformate (3.35 mL, 0.0256 mol) was added and the reaction mixture was stirred in the ice bath for 3 hours. NaBH₄ (0.97 g, 0.0256 mol) was added as a solution in 30 mL of water. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 45 min. It was then warmed to room temperature and concentrated. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were dried with Na₂SO₄ and concentrated to afford the crude product. Purification by chromatography (Isco, using a mixture of pentane/ethyl acetate) afforded 5.20 g of [6-(2-nitro-phenyl)-imidazo[2,1-b]thiazol-3-yl]-methanol (74% yield).

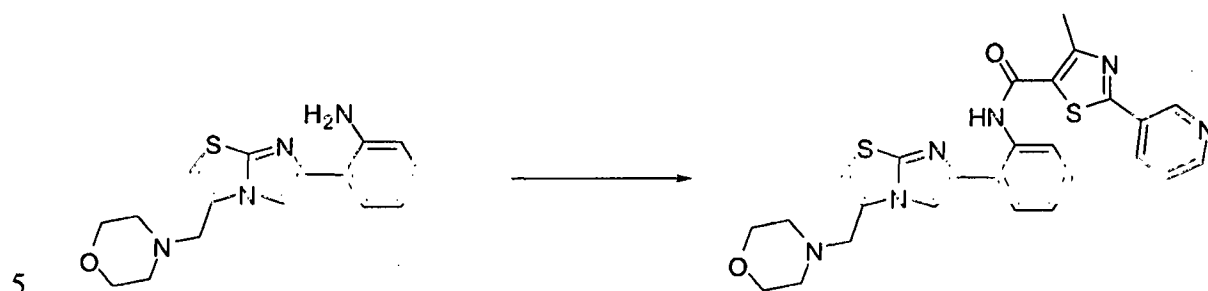
Preparation of 2-(3-morpholin-4-ylmethyl-imidazo[2,1-b]thiazol-6-yl)-phenylamine:



[6-(2-Nitro-phenyl)-imidazo[2,1-b]thiazol-3-yl]-methanol (435 mg, 1.58 mmol) was dissolved in 25 mL of CH₂Cl₂ along with 1 eq of triethylamine (0.330 mL). Methanesulfonyl chloride (1 eq, 0.12 mL) was added and the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 15 min. It was then quenched with brine and extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were dried with Na₂SO₄ and concentrated to afford the mesylate intermediate. This material was mixed with 6 mL of CH₃CN along with 0.33 mL of triethylamine and 0.14 mL of morpholine. The reaction mixture was stirred at room temperature for 18 hours. The next day, it was concentrated and the resulting residue was partitioned between CH₂Cl₂ and water. The organic layer was dried (Na₂SO₄) and concentrated to afford essentially quantitative yield of the product. This material was mixed with 6 mL of methanol and 1 mL of water along with 200 mg of sodium hydrosulfide hydrate. The resulting reaction mixture was stirred under reflux for 6 hours. It was then cooled to room temperature, diluted with 100 mL of absolute ethanol and concentrated. The resulting residue was mixed with 20 mL of 9:1 CH₂Cl₂/methanol

and filtered. The filtrate was concentrated to afford 2-(3-morpholin-4-ylmethyl-imidazo[2,1-b]thiazol-6-yl)-phenylamine.

Preparation of Compound 1:



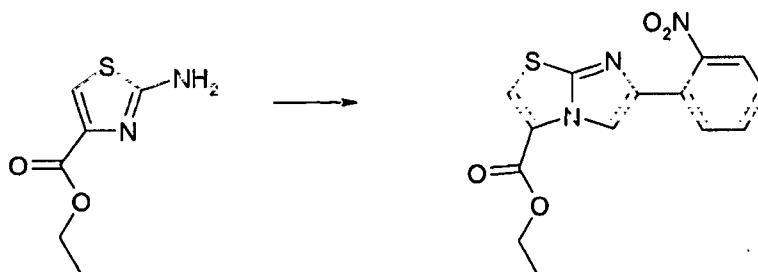
2-(3-Pyridyl)-4-methylthiazole-5-carboxylic acid (0.61 g, 2.8 mmol) was dissolved in thionyl chloride (2 mL) and the mixture was stirred with heating (82 °C, 3 hours). Upon cooling, the solvent was removed and the residue was dried under high vac. The acid chloride was then suspended in 5 mL of pyridine and added to a microwave vial charged with 2-(3-morpholinomethyl)imidazo[2,1-b]thiazol-6-yl)aniline (0.87 g, 2.8 mmol). The reaction was subjected to microwave irradiation (160 °C, 15 min). The solution was triturated with methanol, and the resulting solid was filtered and washed with additional methanol. The solid was dried to afford 0.97 g (68%) of 4-methyl-N-(2-(3-morpholinomethyl)imidazo[2,1-b]thiazol-6-yl)phenyl)-2-(pyridin-3-yl)thiazole-5-carboxamide.

The HCl salt form of 4-methyl-N-(2-(3-morpholinomethyl)imidazo[2,1-b]thiazol-6-yl)phenyl)-2-(pyridin-3-yl)thiazole-5-carboxamide was prepared by dissolving the product (0.16 g) in 10% HCl/CH₃CN (4 mL). The solution was then freeze-dried to afford the salt (0.17 g) as a yellow-orange solid. Other salts (sulfuric acid, methanesulfonic acid, maleic acid, phosphoric acid, L-tartaric acid, citric acid, and malic acid) were prepared in an analogous manner.

25

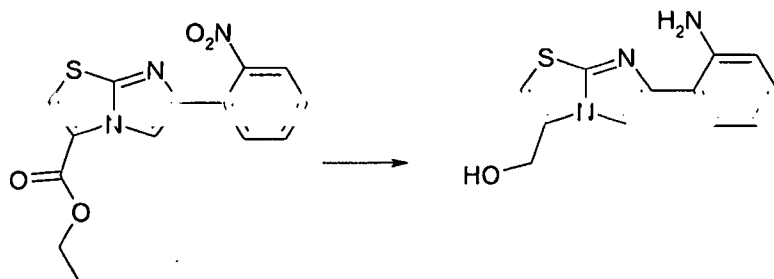
Example 2: Synthesis of N-(2-(3-(piperazin-1-ylmethyl)imidazo[2,1-b]thiazol-6-yl)phenyl)quinoxaline-2-carboxamide (Compound 2)

Preparation of 6-(2-Nitro-phenyl)-imidazo[2,1-b]thiazole-3-carboxylic acid ethyl ester:



In a typical run, ethyl 2-aminothiazole-4-carboxylate (2.1 g, 0.0123 mol) was taken up in methyl ethyl ketone (25 mL) along with 2-bromo-2'-nitroacetophenone (3.0 g, 0.0123 mol). The reaction mixture was stirred under reflux for 18 hours. It was then cooled to room temperature and filtered to remove some of the solids. The filtrate was concentrated to afford 3.10 g of 6-(2-nitro-phenyl)-imidazo[2,1-b]thiazole-3-carboxylic acid ethyl ester (Calc'd for $C_{14}H_{12}N_3O_4S$: 318.3, [M+H]⁺ found: 319).

Preparation of [6-(2-nitro-phenyl)-imidazo[2,1-b]thiazol-3-yl]-methanol:

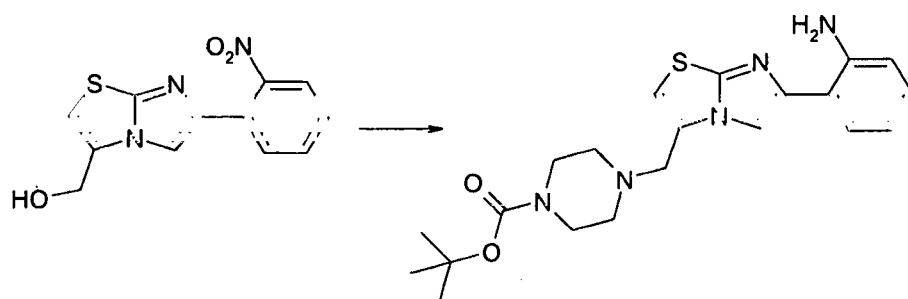


6-(2-Nitro-phenyl)-imidazo[2,1-b]thiazole-3-carboxylic acid ethyl ester (14.50 g, 0.0458 mol) was taken up in THF (100 mL) and water (100 mL) containing NaOH (7.3 g, 4 eq). The reaction mixture was stirred at room temperature for 18 hours. It was then concentrated. The aqueous layer was washed once with CH_2Cl_2 and then acidified with 6 N HCl. The solids were collected by filtration and dried to afford 7.4 g of the acid intermediate. This material (7.4 g, 0.0256 mol) was taken up in anhydrous THF (200 mL) along with N-methylmorpholine (2.8 mL, 0.0256 mol) and cooled to 0° C. Isobutyl chloroformate (3.35 mL, 0.0256 mol) was added and the reaction mixture was stirred in the ice bath for 3 hours. $NaBH_4$ (0.97 g, 0.0256 mol) was added as a solution in water (30 mL). The reaction mixture was stirred at 0° C for 45 min. It was then warmed to room temperature and concentrated. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 .

The combined organic layers were dried with Na_2SO_4 and concentrated to afford the crude product. Purification by chromatography (Isco, using a mixture of pentane/ethyl acetate) afforded 5.20 g of [6-(2-nitro-phenyl)-imidazo[2,1-b]thiazol-3-yl]-methanol (74% yield) (Calc'd for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{OS}$: 245.3, $[\text{M}+\text{H}]^+$ found: 246).

5

Preparation of 4-[6-(2-amino-phenyl)-imidazo[2,1-b]thiazol-3-ylmethyl]-piperazine-1-carboxylic acid tert-butyl ester:

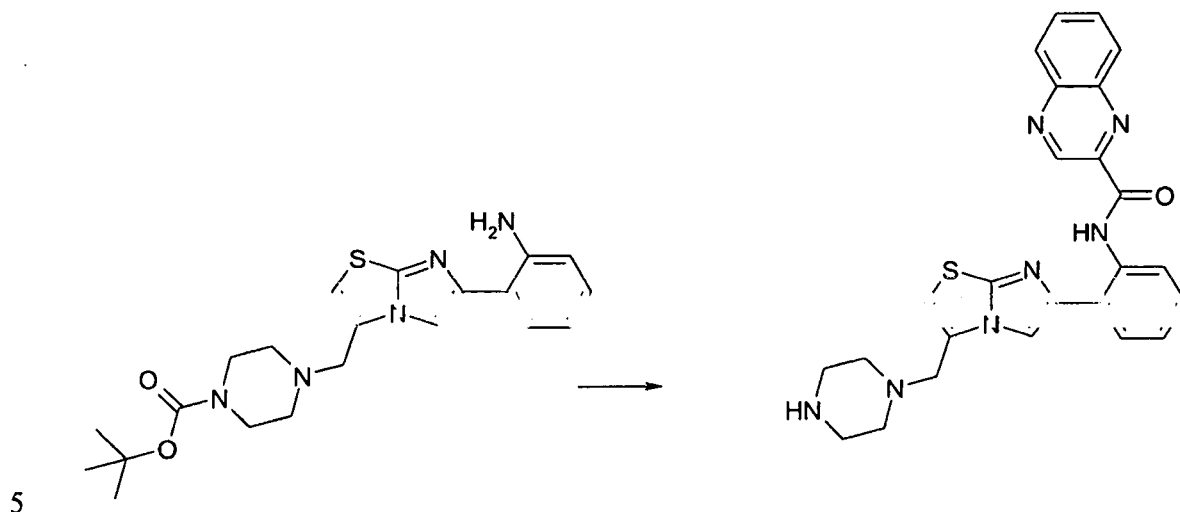


10

[6-(2-Nitro-phenyl)-imidazo[2,1-b]thiazol-3-yl]-methanol (1.0 g, 3.64 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (100 mL) along with triethylamine (0.51 mL, 3.64 mmol). Methanesulfonyl chloride (1 eq, 0.28 mL) was added and the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 15 min. It was then quenched with
 15 brine and extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were dried with Na_2SO_4 and concentrated to afford the mesylate intermediate. This material was taken up with CH_3CN (4 mL) along with triethylamine (0.51 mL, 3.64 mmol) and Boc-piperazine (680 mg, 3.64 mmol) and stirred at room temperature for 1 day. The reaction mixture was concentrated and the resulting residue was partitioned between
 20 CH_2Cl_2 and water. The organic layer was dried with Na_2SO_4 and concentrated to afford essentially quantitative yield of the product. This material was taken up in methanol (6 mL) and water (1 mL) along with sodium hydrosulfide hydrate (200 mg). The resulting reaction mixture was stirred under reflux for 24 hours. It was then cooled to room temperature and concentrated. The resulting residue was diluted
 25 with water (2 mL) and extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were dried with Na_2SO_4 and concentrated to afford 0.90 g of 4-[6-(2-amino-phenyl)-

imidazo[2,1-b]thiazol-3-ylmethyl]-piperazine-1-carboxylic acid tert-butyl ester
(Calc'd for $C_{21}H_{27}N_5O_2S$: 413.5, $[M+H]^+$ found: 414).

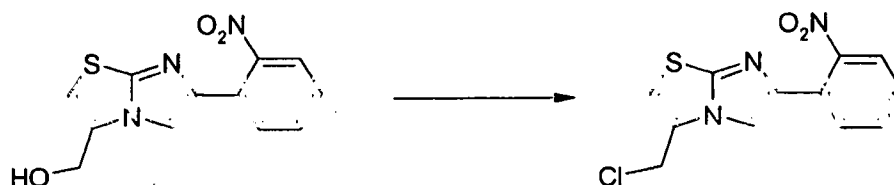
Preparation of Compound 2:



4-[6-(2-Amino-phenyl)-imidazo[2,1-b]thiazol-3-ylmethyl]-piperazine-1-carboxylic acid tert-butyl ester (0.25 mmol) was taken up in 1 mL of pyridine along
10 with 1 eq (50 mg) of 2-quinoxaloyl chloride. The reaction mixture was heated in a Biotage microwave reactor (160 °C for 10 min). It was then cooled to room temperature and concentrated. The resulting crude product was purified by chromatography (Isco, gradient elution, CH_2Cl_2 to 95% CH_2Cl_2 , 4% methanol and 1% triethylamine). The purified product was then treated with a solution containing
15 25% trifluoroacetic acid (TFA) in CH_2Cl_2 (2 mL) for 2 hours. It was then concentrated and the resulting residue was triturated with ethyl ether to afford the desired product as the TFA salt (Calc'd for $C_{23}H_{23}N_7OS$: 469.5, $[M+H]^+$ found: 470). 1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 13.9 (br s, 1 H), 9.8 (br s, 1 H), 9.6 (br s, 1 H) 8.9 – 7.2 (m, 11 H), 4.3 (br s, 2 H). The analytical HPLC was performed on an
20 Agilent 1100 Series HPLC equipped with a 3.5 μ m Eclipse XDB-C18 (4.6 mm x 100 mm) column with the following conditions: CH_3CN/H_2O , modified with 0.1 % Formic acid mobile phase. Gradient elution: 5% hold (2 min), 5% to 95% gradient (11 min), 95% to 5% gradient (0.3 min), 5% hold (2.7 min), 15 min. total run time. Flow rate: 0.8 ml/min. Retention time = 3.04 min.

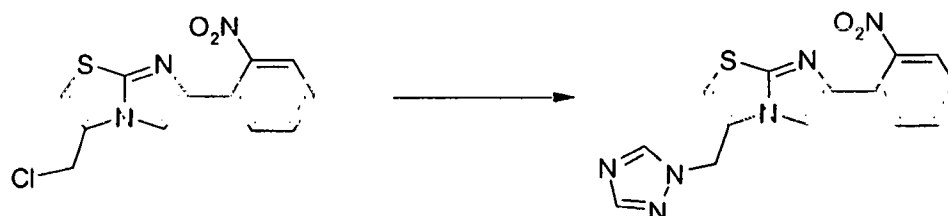
Example 3: Preparation of 4-Methyl-2-pyridin-3-yl-thiazole-5-carboxylic acid [2-(3-[1,2,4]triazol-1-ylmethyl-imidazo[2,1-b]thiazol-6-yl)-phenyl]-amide

5 Preparation of 3-Chloromethyl-6-(2-nitro-phenyl)-imidazo[2,1-b]thiazole:



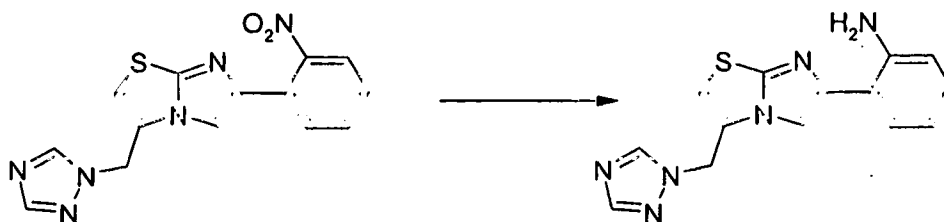
To a solution of [6-(2-nitro-phenyl)-imidazo[2,1-b]thiazol-3-yl]-methanol (165 g, 0.6 mol) in dichloromethane (1.65 L) was added SOCl_2 (400 mL, 5.5 mol) at room temperature. DMF (0.3 mL) was added and the reaction mixture was stirred at
 10 30°C (2 h). The reaction mixture was cooled to 0°C , and the precipitate was collected by filtration and dried in vacuo to give 3-chloromethyl-6-(2-nitro-phenyl)-imidazo[2,1-b]thiazole as a white solid (174 g, 99% yield).

15 Preparation of 6-(2-Nitro-phenyl)-3-[1,2,4]triazol-1-ylmethyl-imidazo[2,1-b]thiazole:



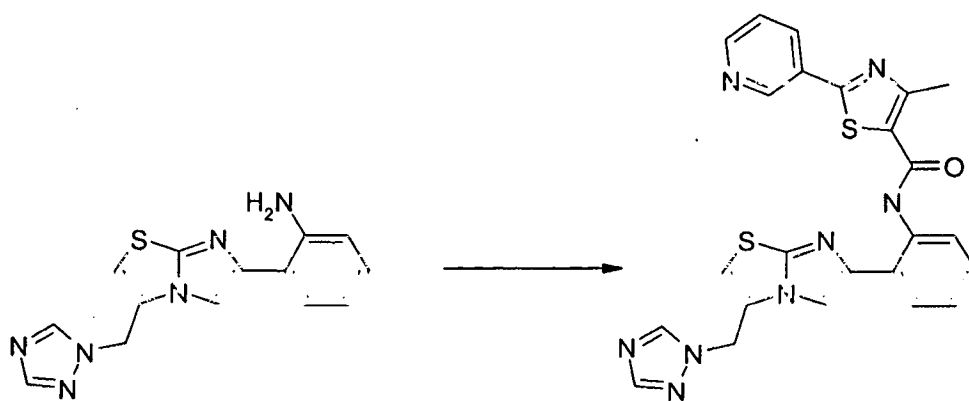
3-Chloromethyl-6-(2-nitro-phenyl)-imidazo[2,1-b]thiazole (64.0 g, 0.22 mol) was dissolved in DMF (600 mL), followed by the addition of 1H-[1,2,4]triazole (30.4 g, 0.44 mol), K_2CO_3 (91.0 g, 0.66 mol) and NaI (20 mg). The reaction mixture
 20 was stirred at room temperature overnight, and then at 35°C (8 h). The mixture was passed through a silica gel pad, and the filtrate was concentrated in vacuo to give a yellow solid. The solid was washed with ethyl acetate to give 6-(2-nitro-phenyl)-3-[1,2,4]triazol-1-ylmethyl-imidazo[2,1-b]thiazole as a yellow solid (54 g, 75% yield).
 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 400 MHz): δ 5.75 (s, 2H), 7.40 (s, 1H), 7.52 (m, 1H), 7.68 (m, 1H), 7.79 (m, 2H), 8.05 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.83 (s, 1H).
 25

Preparation of 2-(3-[1,2,4]Triazol-1-ylmethyl-imidazo[2,1-b]thiazol-6-yl)-phenylamine:



6-(2-Nitro-phenyl)-3-[1,2,4]triazol-1-ylmethyl-imidazo[2,1-b]thiazole (54 g, 165 mmol) was dissolved in ethanol (2.0 L). Pd/C (10%, 20 g) was added, and the flask was evacuated and backfilled with H₂. The reaction mixture was stirred under H₂ at room temperature (2 days). The reaction mixture was then passed through a silica gel pad, and the filtrate was concentrated in vacuo to give a yellow solid. The solid was washed with ethanol to give 2-(3-[1,2,4]triazol-1-ylmethyl-imidazo[2,1-b]thiazol-6-yl)-phenylamine as a yellow solid (46 g, 94% yield).

Preparation of 4-Methyl-2-pyridin-3-yl-thiazole-5-carboxylic acid [2-(3[1,2,4]triazol-1-ylmethyl-imidazo[2,1-b]thiazol-6-yl)-phenyl]-amide:



A mixture of 2-(3-[1,2,4]triazol-1-ylmethyl-imidazo[2,1-b]thiazol-6-yl)-phenylamine (60 g, 202 mmol), 4-methyl-2-pyridin-3-yl-thiazole-5-carboxylic acid (54 g, 245 mmol), HATU (154 g, 405 mmol), and DIEA (132 mL, 800 mol) in DMF (850 mL) was stirred at room temperature overnight. TLC indicated that the reaction was complete. The precipitate was collected by filtration, washed with a large quantity of water, acetone, methanol and DCM to give a white solid (79 g, 79 % yield). The solid was recrystallized from acetic acid, washed with a sat. Na₂CO₃ solution (1.0 L x 2), water (2 L) and ethanol (1.0 L), and dried in a vacuum oven at

45°C overnight to give 4-methyl-2-pyridin-3-yl-thiazole-5-carboxylic acid [2-(3[1,2,4]triazol-1-ylmethyl-imidazo[2,1-b]thiazol-6-yl)-phenyl]-amide as a white solid (62 g, 62% yield). ¹HNMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 2.79 (s, 3H), 5.78 (s, 2H), 7.22 (m, 1H), 7.36 (m, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.60 (m, 1H), 7.79 (d, *J*=6.4Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 8.38 (m, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.54 (d, *J*=8.0Hz, 1H), 8.75 (m, 1H), 8.86 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 12.78 (s, 1H). ESI-MS: 499.3(M+1), 521.4(M+23(Na)).

The HCl salt of 4-methyl-2-pyridin-3-yl-thiazole-5-carboxylic acid [2-(3[1,2,4]triazol-1-ylmethyl-imidazo[2,1-b]thiazol-6-yl)-phenyl]-amide was prepared by suspending 5.20 g of the free base in methanol (350 mL). To this was added 4N HCl (35 mL), and the mixture was heated until dissolution. The solution was cooled to -78 °C and dried via lyophilization to afford 4-methyl-2-pyridin-3-yl-thiazole-5-carboxylic acid [2-(3[1,2,4]triazol-1-ylmethyl-imidazo[2,1-b]thiazol-6-yl)-phenyl]-amide- HCl salt (7.49 g) as a yellow solid.

Example 4: Salt Formation, Screening and Characterization

Eight acceptable (Regulatory and pKa) salts were made of Compound 1, namely with hydrochloric acid, sulfuric acid, methanesulfonic acid, maleic acid, phosphoric acid, L-tartaric acid, citric acid, and malic acid. The resulting salts or the free base were then screened on:

- 1) Processing, morphology, polymorphs;
- 2) Crystal shape, single stable polymorph;
- 3) Physical stability;
- 4) Open dish accelerated stability (40 °C/75% RH); and
- 5) Biorelevant dissolution.

Figure 1 displays the Differential Scanning Calorimetry (DSC) results on the HCl salt form of Compound 1, which show small endothermic transitions around 111°C and 192°C. The Thermogravimetric Analysis (TGA) results indicate a general loss of weight on heating, potentially associated with loss of solvents (most likely due to water loss based on the hygroscopic nature of the this HCl salt), but no weight loss events correspond to the identified DSC transition temperatures at

111°C and 192°C. Therefore, these two DSC thermal events appear to be associated with molecular level phase changes, and would suggest transitions between polymorphic forms of the Compound 1 salt on heating. Above 200°C, the DSC results indicate the decomposition of Compound 1 salt.

5 Figure 2 demonstrates that the free base form of Compound 1 has a single endothermic event at 236°C which is associated with a single, crystalline melting point. Since no other thermal transitions are observed in the DSC or TGA results, it appears Compound 1 exists only as a single phase (i.e. no polymorphs) over the thermal range evaluated.

10 Potential polymorphic phase changes over the thermal range of 0 - 125°C, as seen in Figure 1 above for the HCl salt, could lead to changes to the drug substance under common storage and processing conditions. Since the polymorphic transitions can have significant effects on dissolution and bioavailability of the drug substance, it is practical to select forms of the drug substance that minimize or
15 eliminate the potential for phase transitions. Therefore, the results from Figures 1 and 2 taken together indicate the the free base form of the drug is superior as a drug substance based on its apparent single crystalline form of Compound 1.

Example 5: In Vivo Testing

20 The purpose of this example was to compare the efficacy of Compound 1 in salt and free base formulations in two different mouse models of diabetes, a diet induced obesity model (DIO) and the Ob/ob mouse. Blood glucose was the main determinant through the experiment of efficacy.

 For the diet induced obesity model, six week old C57BL/6 male mice
25 (Charles River Labs) were fed a high fat diet (60% calories from fat; Research Diets) for approximately 6 weeks until their body weight reached approximately 40 g. Test compounds were administered daily via oral gavage at the indicated doses. The vehicle used was 2% HPMC and 0.2% DOSS. Individual mouse body weights were measured twice weekly. Every 2 weeks throughout the study, mice from each
30 group were bled via the tail vein for determination of blood glucose. Statistical analysis was completed using the JMP program (Version 6). Data were analyzed by

a one way ANOVA with comparison to control using a Dunnett's Test. A p value < 0.05 indicated a significant difference between groups.

Ob/ob mice are genetically manipulated knockout mice that lack leptin, an important satiety protein that neurologically signals the end of hunger. The leptin
5 mutation is homozygous and a heterozygous strain is included as a control (Ob/+); this group should not show increased weight or blood glucose, aside from the normal effects of being on a high fat diet.

Compound 1 in the free base form was then tested in the DIO model. The results of the blood glucose test for the free base of Compound 1 at 100 mg/kg/day
10 was similar to that of resveratrol at 1000 mg/kg/day, metformin at 400 mg/kg/day and Compound 2 at 100 mg/kg/day, which all exhibited significant reductions in blood glucose from week 2 onwards (Figures 3-5). The results of the blood glucose test for Compound 1 was similar to that of resveratrol, metformin and Compound 2, which all exhibited significant reductions in blood glucose from week 2 onwards
15 (Figures 3-5). For the Compound 1 group at weeks 2 and 3, the p value was less than .01, a significant decrease from the vehicle group. While the blood glucose remained lower than the vehicle for the week 4 fed glucose test, the significance was lost for Compound 2 and resveratrol.

Compound 1 dosed at 100 mg/kg as the free base showed improved potency
20 in the ob/ob model, as evidenced by Figures 6-8. During week 1, there is already a decrease in blood glucose of almost 60 mg/dL from the vehicle group. This trend continued for the fasted glucose at week 2 (Figure 7) as the Compound 1 group had 158.3 mg/dL glucose compared to 235.3 mg/dL glucose in the vehicle group. According to ANOVA tests, the p value was less than .0001, which demonstrated a
25 highly significant reduction from the vehicle group. Although the blood glucose values increased in week 3, there is a significant (p<.01) decrease relative to the vehicle groups.

A second ob/ob experiment directly comparing Compound 1 as the free base vs. HCl as well as Compound 2 all at 100 mg/kg was performed. The one week and
30 two week fasted blood glucose data is shown in Figures 9 and 10 respectively.

EQUIVALENTS

The present invention provides among other things sirtuin-activating compounds and methods of use thereof. While specific embodiments of the subject invention have been discussed, the above specification is illustrative and not restrictive. Many variations of the invention will become apparent to those skilled in the art upon review of this specification. The full scope of the invention should be determined by reference to the claims, along with their full scope of equivalents, and the specification, along with such variations.

INCORPORATION BY REFERENCE

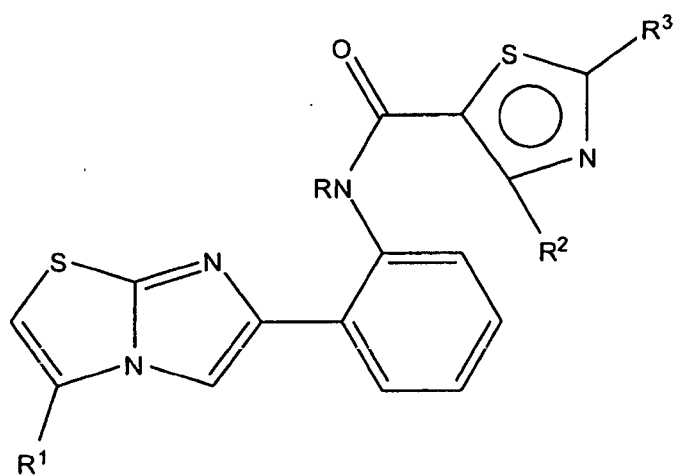
All publications and patents mentioned herein, including those items listed below, are hereby incorporated by reference in their entirety as if each individual publication or patent was specifically and individually indicated to be incorporated by reference. In case of conflict, the present application, including any definitions herein, will control.

Also incorporated by reference in their entirety are any polynucleotide and polypeptide sequences which reference an accession number correlating to an entry in a public database, such as those maintained by The Institute for Genomic Research (TIGR) (www.tigr.org) and/or the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Also incorporated by reference are the following: PCT Publications WO 2005/002672; 2005/002555; and 2004/016726.

CLAIMS:

1. A compound represented by Structural Formula (III):



(III),

or a salt thereof, wherein:

R is $-H$ or $-CH_3$;

R^1 is a substituted or unsubstituted nitrogen-containing heterocyclylmethyl group;

R^2 is $-H$ or $-CH_3$; and

R^3 is an unsubstituted pyridyl group.

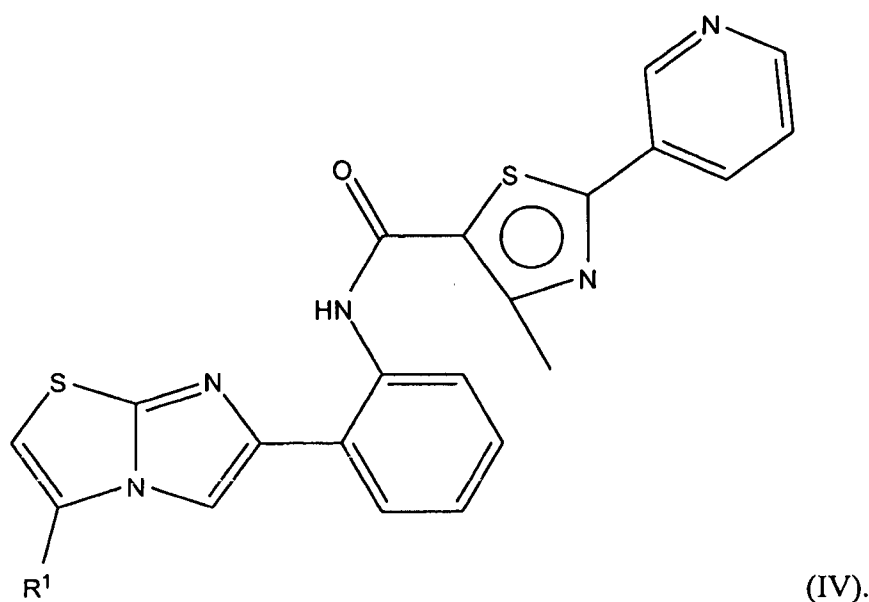
2. The compound of claim 1, wherein R^1 is a heterocyclylmethyl group containing a nitrogen atom and optionally a second heteroatom selected from nitrogen and oxygen.

3. The compound of claim 2, wherein R^1 is a (substituted or unsubstituted non-aromatic heterocyclic)methyl group.

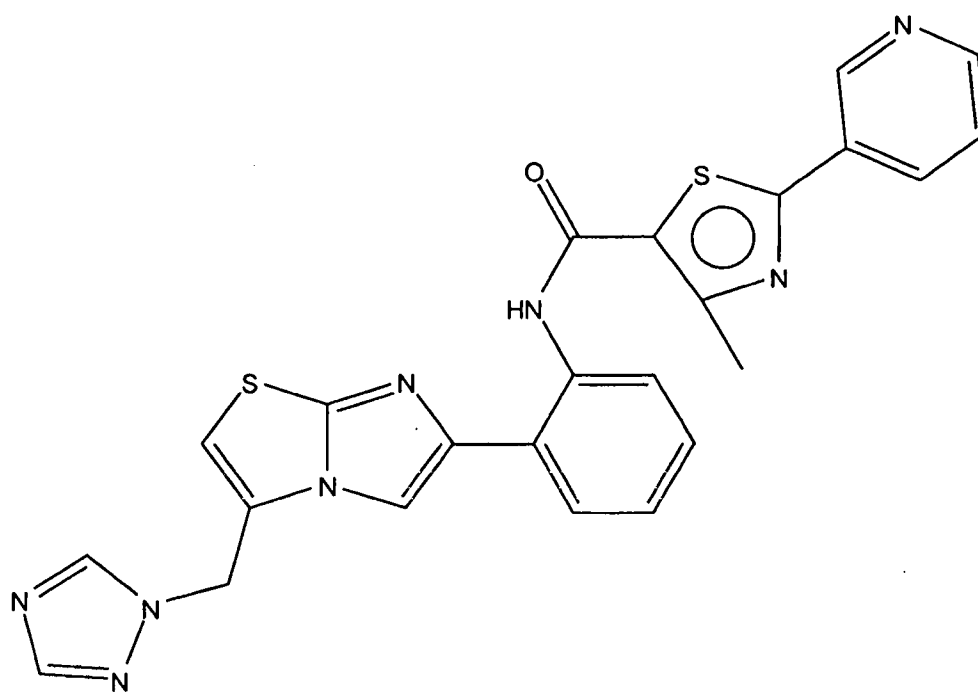
4. The compound of claim 3, wherein R^1 is a morpholinomethyl group.

5. The compound of claim 1, wherein R^1 is a 1,2,4-triazolylmethyl group.

6. The compound of claim 1, wherein the compound is represented by Structural Formula (IV):

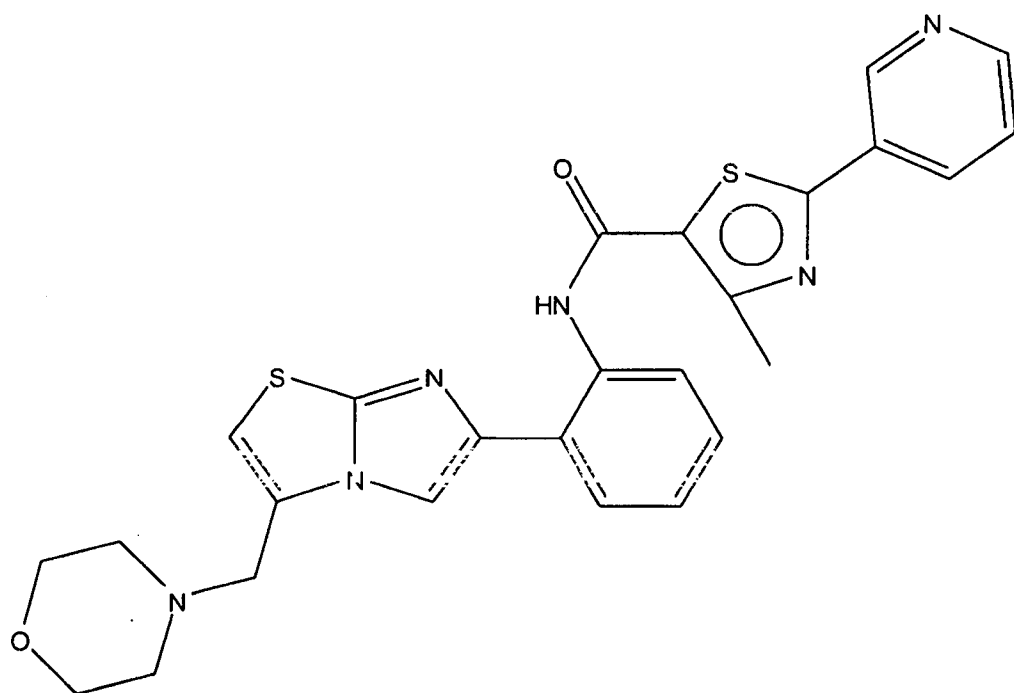


7. The compound of claim 6, wherein R¹ is a heterocyclylmethyl group containing a nitrogen atom and optionally a second heteroatom selected from
5 nitrogen and oxygen.
3. The compound of claim 7, wherein R¹ is a (substituted or unsubstituted non-aromatic heterocyclic)methyl group.
- 10 9. The compound of claim 6, wherein the compound is represented by Structural Formula (VI):



(VI).

10. A compound represented by Structural Formula (V):



(V),

5 or a salt thereof.

11. The compound of claim 10, wherein the compound is a free base.

12. The compound of claim 10, wherein the compound is a salt.

13. A pharmaceutical composition comprising a compound or a pharmaceutically acceptable salt of any one of the preceding claims and a pharmaceutically acceptable carrier.
- 5
14. The composition of claim 13, wherein the pharmaceutical composition is pyrogen-free.
15. The composition of claim 13, further comprising an additional active agent.
- 10
16. A method for treating or preventing insulin resistance, a metabolic syndrome, diabetes, or complications thereof, or for increasing insulin sensitivity in a subject, comprising administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of at least one pharmaceutical composition of claim 13.
- 15
17. The method of any one of claims 16, wherein said compound increases at least one of the level or activity of a sirtuin protein.
18. The method of claim 17, wherein the compound increases deacetylase activity of the sirtuin protein.
- 20
19. The method of claim 17, wherein the sirtuin protein is a mammalian protein.
20. The method of claim 17, wherein the sirtuin protein is human SIRT1.
- 25
21. The method of claim 17, wherein the compound does not substantially have one or more of the following activities: inhibition of PI3-kinase, inhibition of aldoreductase, inhibition of tyrosine kinase, transactivation of EGFR tyrosine kinase, coronary dilation, or spasmolytic activity, at concentrations of the compound that are effective for increasing the deacetylation activity of a SIRT1 and/or SIRT3 protein.
- 30

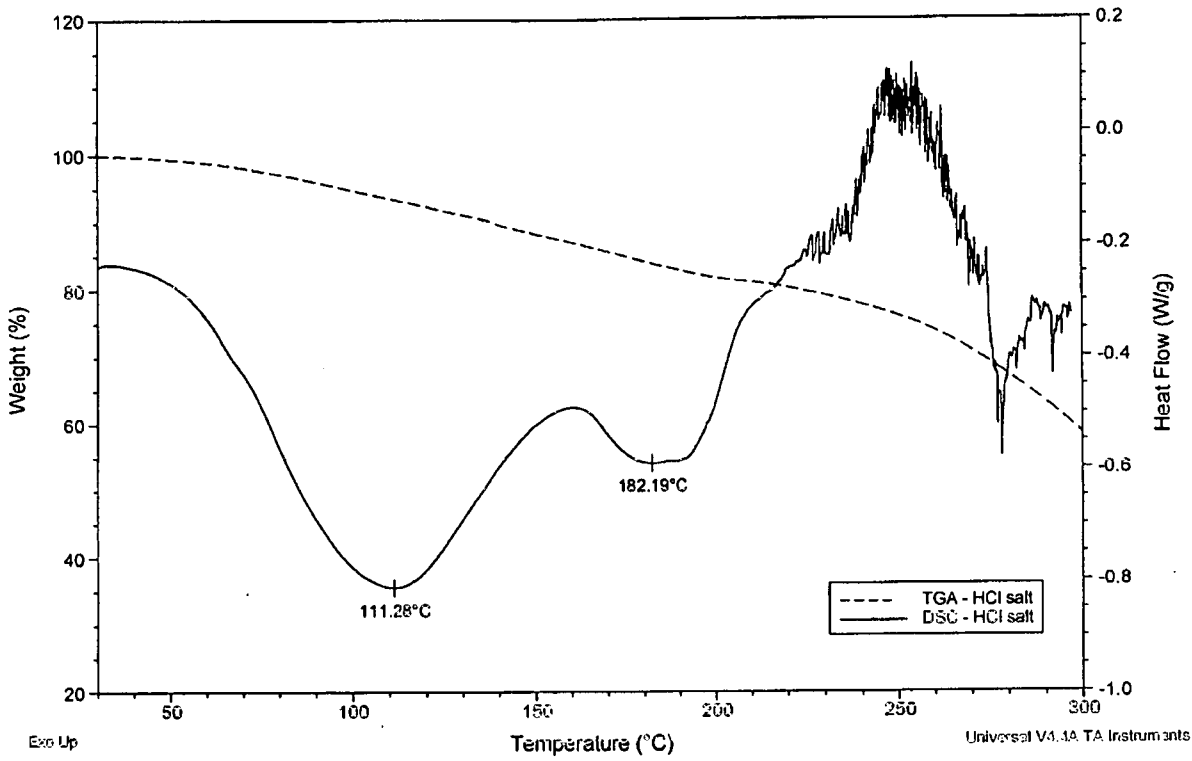


Figure 1

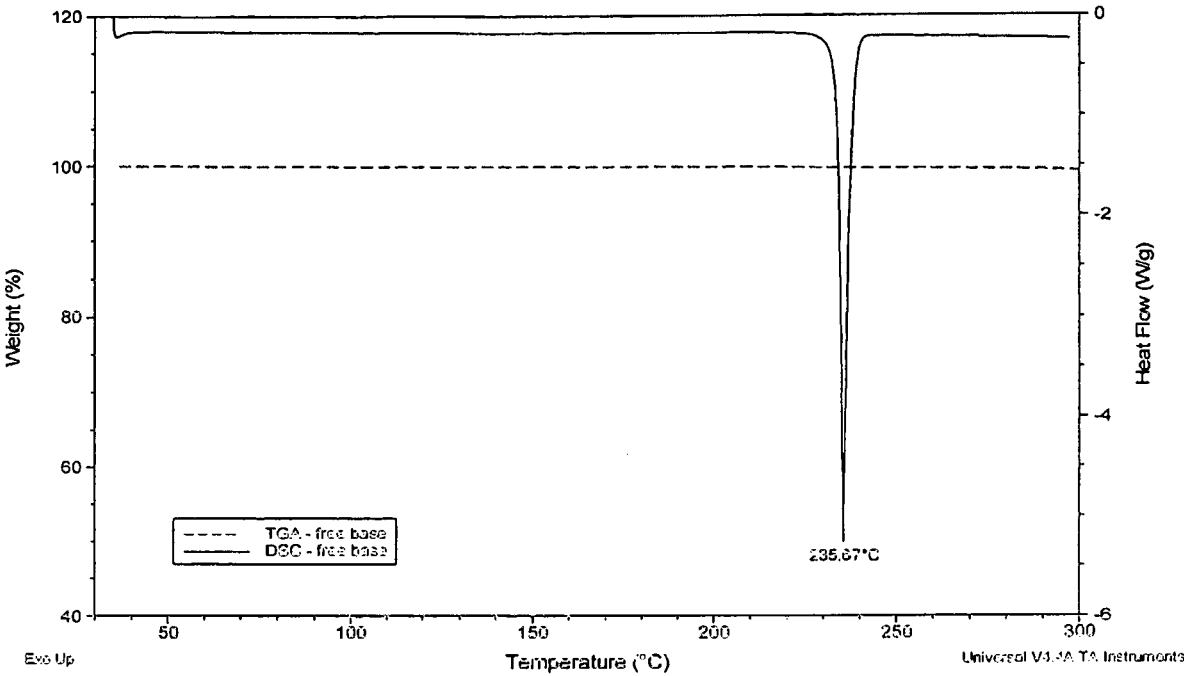


Figure 2

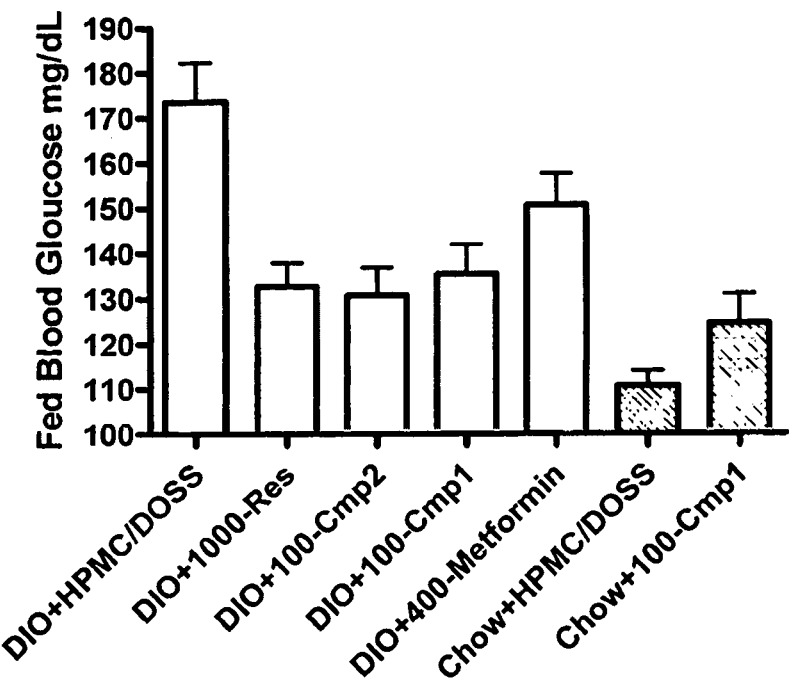


Figure 3

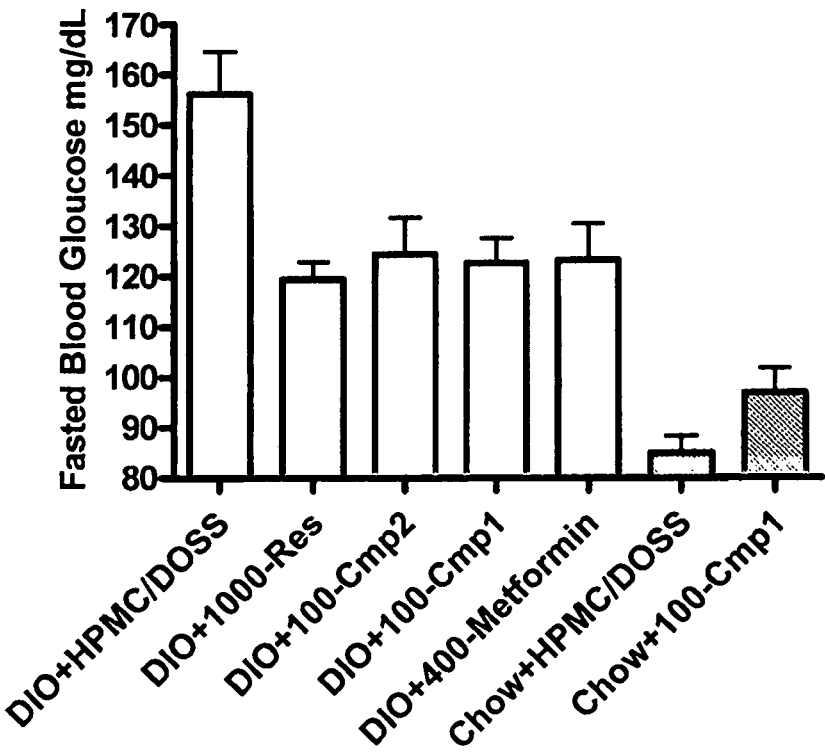


Figure 4

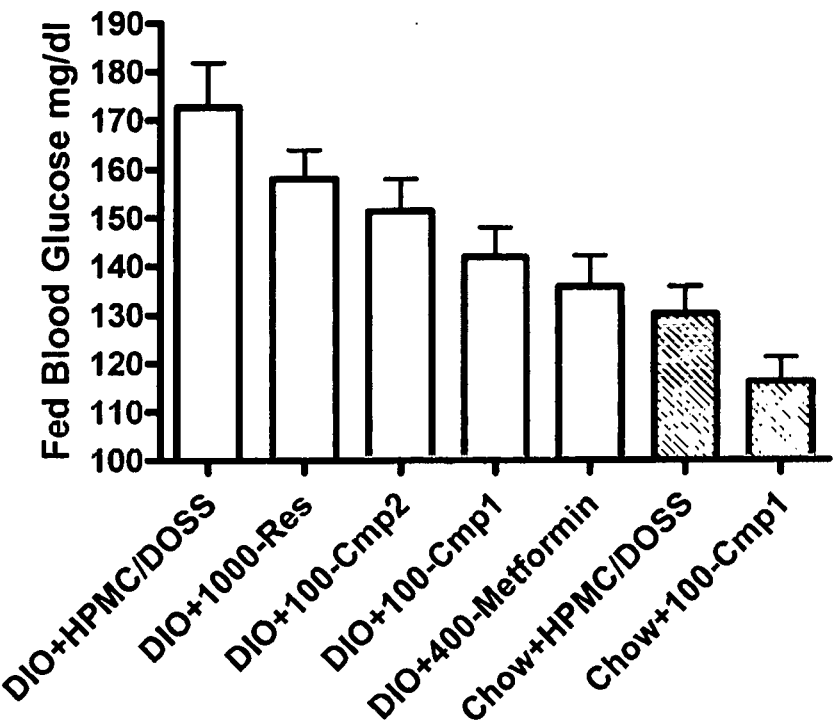


Figure 5

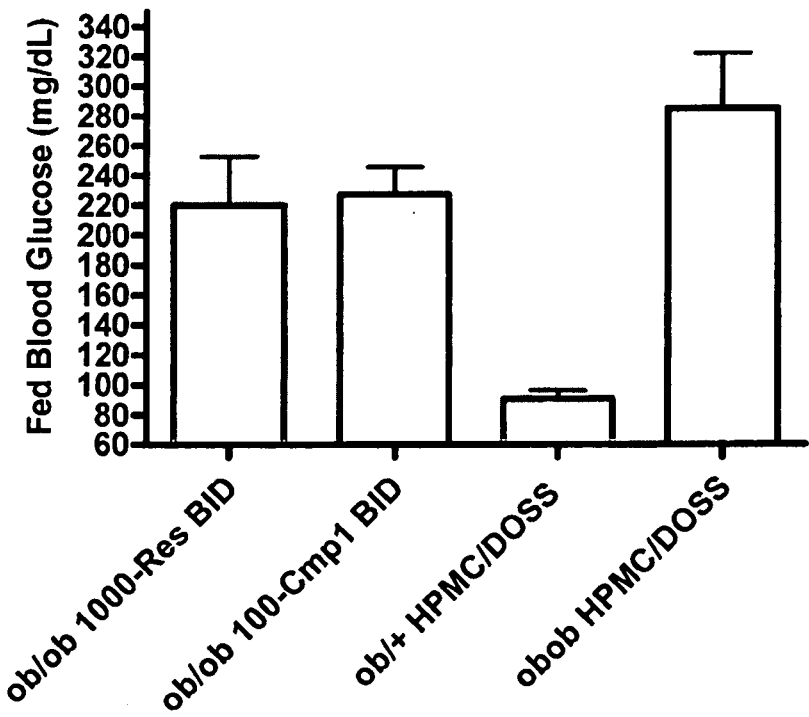


Figure 6

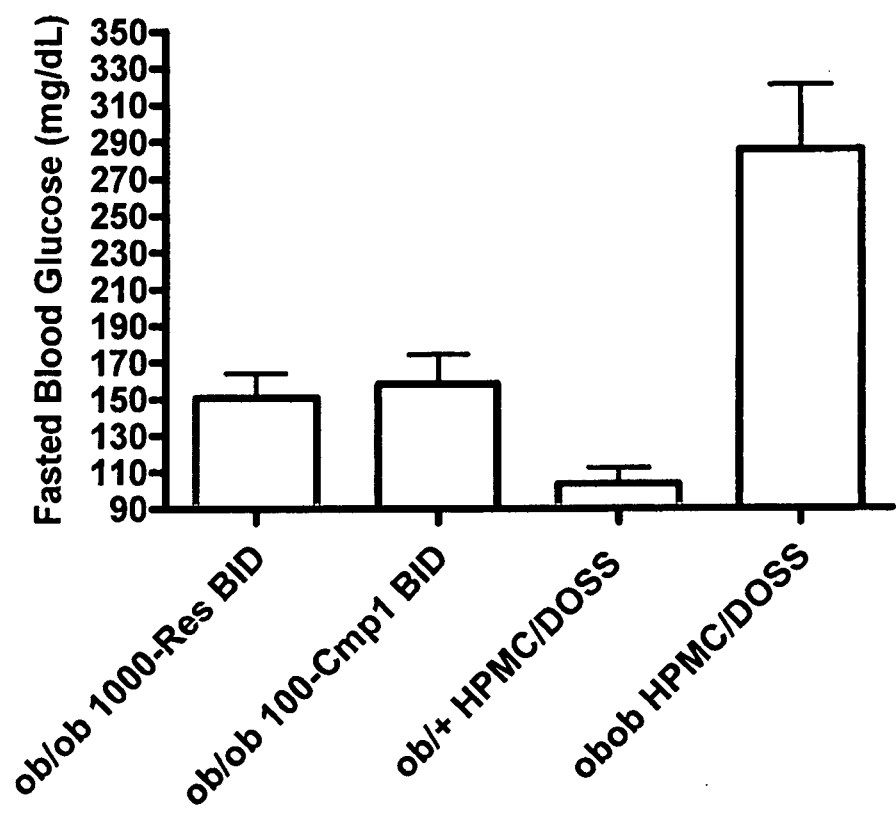


Figure 7

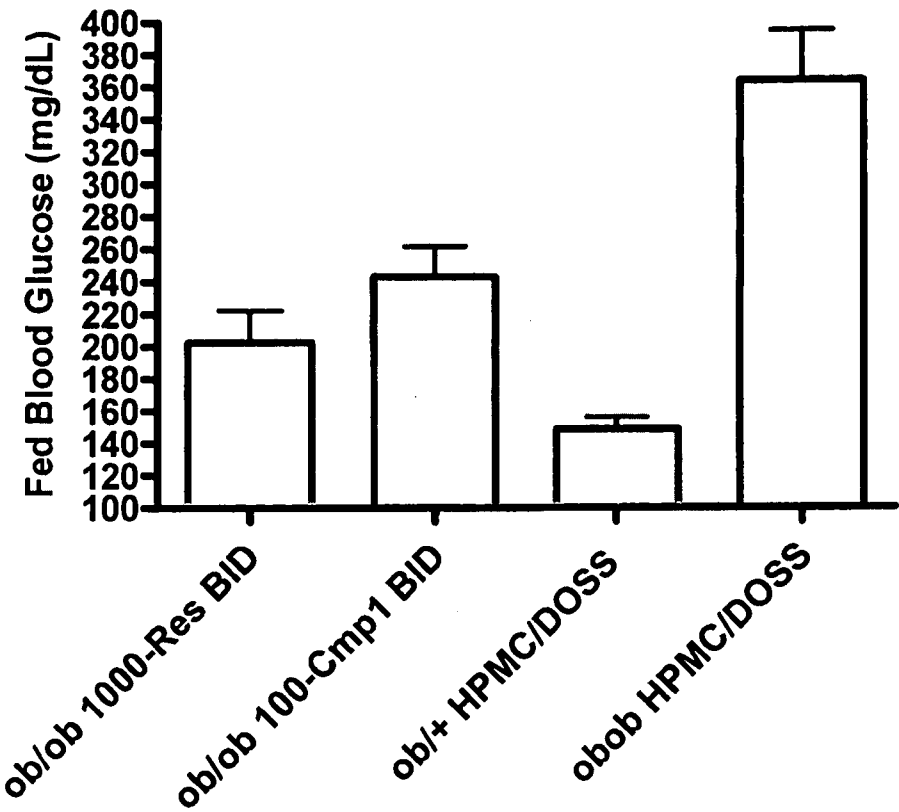


Figure 8

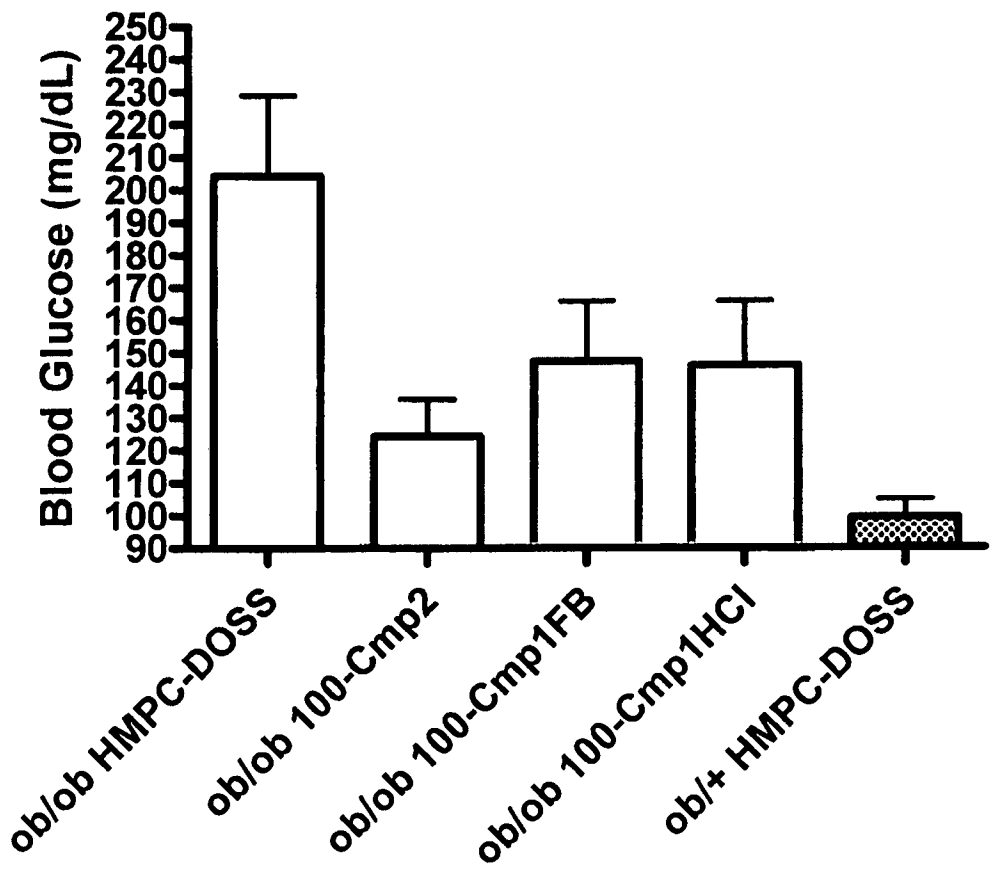


Figure 9

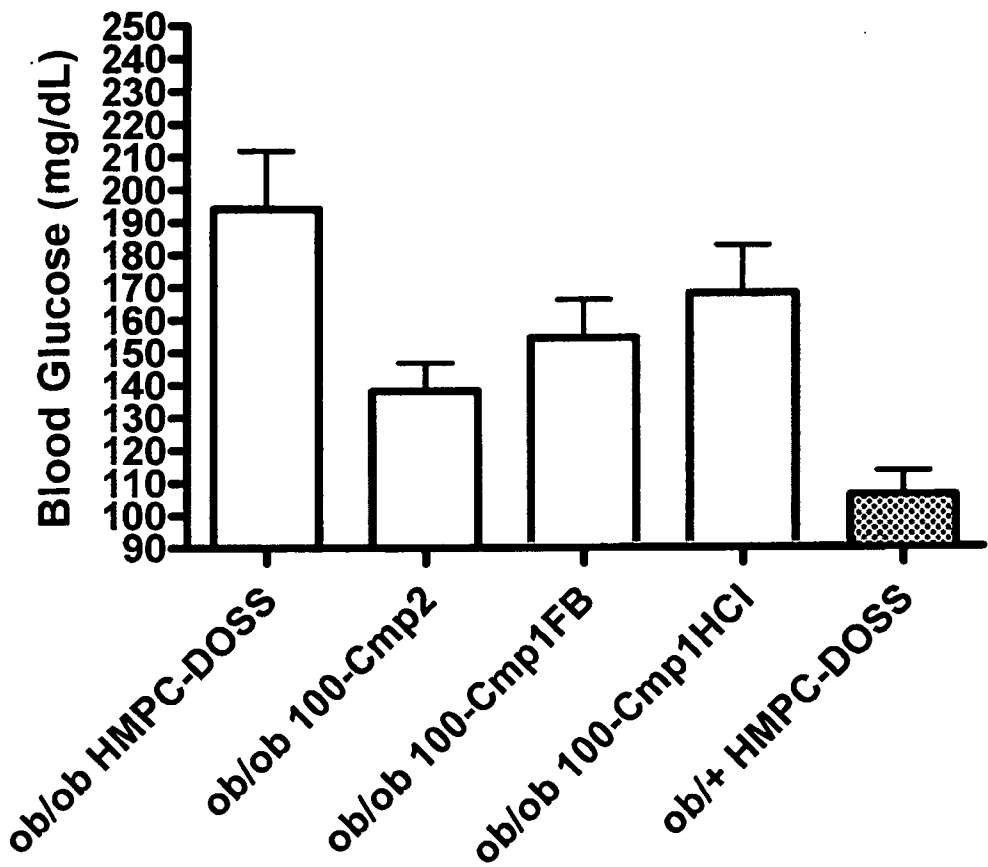


Figure 10

COMPUESTOS MODULADORES DE SIRTUINA

ANTECEDENTES

5 La familia de genes *Silent Information Regulator* (SIR) representa un grupo de genes altamente conservado presente en los genomas de organismos en rangos que van desde arqueobacterias hasta una variedad de eucariotas (Frye, 2000). Las proteínas SIR codificadas están involucradas en diversos procesos, desde la regulación de silenciamiento de genes hasta reparación de DNA. Las
10 proteínas codificadas por miembros de la familia de genes SIR muestran una alta conservación de secuencia en un dominio de núcleo de 250 amino ácidos. Un gen de esta familia bien caracterizado es el *S. cerevisiae* SIR2, el cual está involucrado en el silenciamiento del HM loci que contiene información especificando el tipo de apareamiento de la levadura, los efectos de la posición
15 del telómero y el envejecimiento celular (Guarente, 1999; Kaerberlein et al., 1999; Shore, 2000). La proteína Sir 2 de levadura pertenece a una familia de histona - des-acetilasas (reseñadas por (Guarente, 2000, Shore, 2000). La homóloga de Sir2, CobB, en *Salmonella tifiimurio*, funciona como una NAD (nicotinamida adenina dinucleótido)-dependiente ADP - ribosil transferasa ,
20 (Tsang y Escalante-Semerena, 1998).

La proteína Sir2 es una des - acetilasa clase III que usa NAD como un co - sustrato (Imai et al., 2000; Moazed, 2001; Smith et al., 2000; Tanner et al., 2000; Tanny y Moazed, 2001). A diferencia de otras des-acetilasas, muchas de las cuales están involucradas en el silenciamiento de genes, Sir2 es insensible a
25 los inhibidores de des-acetilasas clase I y clase II, como la tricostatina A (TSA) (Imai et al., 2000; Landry et al., 2000a; Smith et al., 2000).

La des-acetilación de la acetil-lisina por Sir2 está estrechamente acoplada a la hidrólisis de NAD, produciendo nicotinamida y un nuevo compuesto acetil-

ADP ribosa (Tanner et al., 2000; Landry et al., 2000b; Tanny y Moazed, 2001). La actividad NAD-dependiente des-acetilasa de Sir2 es esencial por su función, la cual puede conectar su rol biológico con el metabolismo celular en levadura. (Guarente, 2000; Imai et al., 2000; Lin et al., 2000; Smith et al., 2000).

- 5 Homólogos en mamíferos de Sir2 tienen actividad histona des-acetilasa NAD-dependiente (Imai et al., 2000; Smith et al., 2000). Más información sobre las funciones mediadas por Sir2 provienen de los estudios en levaduras (Gartenberg, 2000; Gottschling, 2000).

Estudios bioquímicos han mostrado que Sir2 puede rápidamente des-
 10 acetilar las colas amino-terminales de las histonas H3 y H4, dando como resultado la formación de 1-O-acetil – ADP – ribosa y nicotinamida. Cepas con copias adicionales de Sir2 despliegan un incrementado silenciamiento rDNA y un período de vida 30% más largo. Recientemente se ha demostrado que copias adicionales de *C. elegans* SIR2 homólogo, sir-2.1, y el gen *D. melanogaster* dSir2 extienden en una gran extensión el período de vida en
 15 estos organismos. Esto implica que la ruta regulatoria Sir2-dependiente para el envejecimiento se inició en forma temprana en la evolución y ha sido bien conservada. Hoy, los genes Sir2 se cree que han evolucionado para realzar la salud de un organismo y su resistencia al estrés para aumentar el chance de
 20 sobrevivir a la adversidad.

SIRT3 es un homólogo de SIRT1 que está conservado en procariotas y eucariotas (P. Onyango et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 13653-13653 (2002)). La proteína SIRT3 es destinada al cristae mitocondrial por un dominio único localizado en la N-terminación. SIRT3 tiene NAD + proteino – dependiente
 25 actividad des-acetilasa y es expresada ubicuamente, particularmente en los tejidos activos metabólicamente. Luego de la transferencia a la mitocondria, se cree que SIRT3 es dividida en una forma activa más pequeña por una peptidasa de procesamiento matricial mitocondrial. (MPP) (E. Schwer et al., J. Cell Biol. 158: 647-657 (2002)).

Se ha conocido desde hace más de 70 años que la restricción calórica mejora la salud y prolonga el período de vida de los mamíferos (Masoro, 2000). El período de vida de levaduras, como el de los metazoarios, es también prolongado por intervenciones que semejan restricción calórica, tales como baja glucosa. El descubrimiento de que tanto las moscas como las levaduras que carecen del gen SIR2 no viven más tiempo cuando están restringidas en calorías, evidencia que los genes SIR2 son mediadores de los efectos benéficos sobre la salud de esta dieta (Anderson et al., 2003; Helfand y Rogina, 2004). Aún más, las mutaciones que reducen la actividad de la ruta PKA glucosa-sensible cAMP (adenosina 3',5'-monofosfato)- dependiente de levaduras prolongan el período de vida de células tipo-salvaje, pero no de cepas SIR2 mutantes, demostrando que SIR2 es probablemente un componente clave corriente debajo de la ruta de restricción calórica (Lin et al., 2001).

SUMARIO

Son aquí proporcionados novedosos compuestos sirtuina-moduladores y métodos para su uso.

En un aspecto, la invención proporciona compuestos sirtuina-moduladores de Fórmula I hasta VI como es descrito en detalle más adelante.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para usar los compuestos sirtuina-moduladores o composiciones comprendiendo compuestos sirtuina-moduladores. En ciertas incorporaciones, compuestos sirtuina-moduladores que aumentan el nivel y /o actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados en una variedad de aplicaciones terapéuticas, incluyendo, por ejemplo, aumentar el período de vida de una célula y tratar y/o prevenir una amplia variedad de enfermedades y desórdenes, incluyendo, por ejemplo, enfermedades o desórdenes relacionados al envejecimiento o al estrés, diabetes, obesidad, enfermedades neuro – degenerativas, neuropatías inducidas por quimioterapia, neuropatías asociadas a un evento isquémico, enfermedades

oculares y /o desórdenes, enfermedad cardio – vascular, desórdenes de la coagulación de la sangre, inflamaciones y /o rubicundez, etc.

Los compuestos sirtuina-moduladores que incrementan el nivel y/o actividad de una proteína sirtuina pueden también ser usados para tratar una enfermedad o desorden en un sujeto que pudiera beneficiarse de una actividad mitocondrial incrementada, para realzar el performance muscular, para incrementar los niveles de ATP en los músculos o para tratar o prevenir daños al tejido muscular asociados a hipoxia o isquemia. En otras incorporaciones, los compuestos sirtuina-moduladores que disminuyen el nivel y/o actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados para una variedad de aplicaciones terapéuticas incluyendo, por ejemplo, aumentar la sensibilidad celular al estrés, incrementar la apoptosis, tratamiento del cáncer, estimulación del apetito, y/o estimulación de la ganancia de peso, etc. Como se describirá más adelante, los métodos comprenden la administración a un sujeto en necesidad de ello, de una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto sirtuina-modulador.

En ciertos aspectos, los compuestos sirtuina-moduladores pueden ser administrados solos o en combinación con otros compuestos, incluyendo otros compuestos sirtuina-moduladores u otros agentes terapéuticos.

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra la forma de sal cloruro del Compuesto 1 caracterizada por Análisis termo – gravimétrico (TGA) y Calorimetría de Escaneo Diferencial (DSC) .

25 La Figura 2 muestra la forma de base libre del Compuesto 1 caracterizada por Análisis termo – gravimétrico (TGA) y Calorimetría de Escaneo Diferencial (DSC).

La Figura 3 muestra la glucosa sanguínea de la segunda semana de alimentación en un modelo de ratón DIO administrando la base libre del Compuesto 1.

La Figura 4 muestra la glucosa sanguínea de la semana 3 de alimentación en un modelo de ratón DIO administrando la base libre del Compuesto 1.

La Figura 5 muestra la glucosa sanguínea de la semana 4 de alimentación en un modelo de ratón DIO administrando la base libre del Compuesto 1.

La Figura 6 muestra la glucosa sanguínea de la semana 1 de alimentación en un modelo de ratón Ob/ob administrando la base libre del Compuesto 1.

La Figura 7 muestra la glucosa sanguínea de la semana 2 de ayuno en un modelo de ratón Ob/ob administrando la base libre del Compuesto 1.

La Figura 8 muestra la glucosa sanguínea de la semana 3 de alimentación en un modelo de ratón Ob/ob administrando la base libre del Compuesto 1.

La Figura 9 muestra la glucosa sanguínea de la semana 1 de ayuno en un modelo de ratón Ob/ob administrando la base libre del Compuesto 1.

La Figura 10 muestra la glucosa sanguínea de la semana 2 de ayuno en un modelo de ratón Ob/ob administrando la base libre del Compuesto 1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

1. Definiciones

Como es aquí usado, los siguientes términos y frases deben tener los significados establecidos más adelante. A menos que se defina de

otra forma, todos los términos técnicos y científicos aquí usados tienen el mismo significado que el que es conocido comúnmente por alguien de calificaciones ordinarias en el arte.

Las formas singulares “un” y “el” incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

El término “agente” es aquí usado para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica (tal como un ácido nucleico, un anticuerpo, una proteína o una porción de ella, e.g., un péptido) o un extracto hecho de materiales biológicos tales como células o tejidos de bacterias, plantas, hongos o animales (particularmente mamíferos).

La actividad de tales agentes puede convertirlos en adecuados “agentes terapéuticos”, que significa una sustancia (o sustancias) activa biológica, fisiológica o farmacológicamente que actúa en forma local o sistémica en un sujeto.

El término “biodisponible” cuando se refiere a un compuesto es reconocido en el arte, y se refiere a una forma de un compuesto que permite que él, o una porción de la cantidad de compuesto administrado, sea absorbida por, incorporada a, o sea de otra forma fisiológicamente disponible para un sujeto o paciente al cual le es administrada.

“Porción biológicamente activa de una sirtuina” se refiere a una porción de una proteína sirtuina que tiene actividad biológica, tal como la habilidad para des – acetilar.

Porciones biológicamente activas de una sirtuina pueden comprender el dominio nuclear de sirtuinaes.

Porciones biológicamente activas de SIRT1 teniendo el N° de Acceso GenBank: NP_036370 que comprende el NAD + dominio de enlace y el dominio de enlace de sustrato, por ejemplo, pueden incluir, sin limitaciones, amino ácidos 62-293 de N° de Acceso GenBank: NP_036370 que son codificados por nucleótidos 237 a 932 de N° de

Acceso GenBank NM_012238. Por lo tanto, esta región es a veces referida como el dominio núcleo. Otras porciones biológicamente activas de SIRT1, también referidas a veces como dominios núcleo, incluyen los amino – ácidos alrededor de 261 a 447 de N° de Acceso GenBank

NP_036370 que son codificados por los nucleótidos 834 a 1394 de N° de Acceso GenBank NP_036370 que son codificados por los nucleótidos 777 a 1532 de N° de Acceso GenBank NM_012238; o amino ácidos alrededor de 254 a 495 de N° de Acceso GenBank

NP_036370 que son codificados por los nucleótidos 813 a 1533 de N° de Acceso GenBank NM_012238.

El término “animales de compañía” se refiere a perros y gatos. Como aquí se usa, el término “perro (s)” denota a cualquier miembro de la especie canis familiaris, de la cual existen un gran número de razas diferentes. El término “gato (s)” se refiere a un animal felino incluyendo gatos domésticos y otros miembros de la familia Felidae, genus Felis.

Los términos “comprende” y “comprendiendo” son usados en el sentido inclusivo, abierto, significando que elementos adicionales pueden ser incluidos.

“Diabetes” se refiere a una elevada glucosa sanguínea o cetoacidosis, así como también anomalías resultantes de un estado prolongado de elevada glucosa sanguínea o una tolerancia a la glucosa disminuida. “Diabetes” comprende ambos tipos, Tipo I y Tipo II (Diabetes Mellitus no insulino dependiente o NIDDM), de la enfermedad. Los factores de riesgo para la diabetes incluyen los siguientes: medidas de cintura de más de 40 pulgadas para los hombres o 35 pulgadas para las mujeres, presión arterial de 130/85 mmHg o mayor; triglicéridos por encima de 150 mg/dl, glicemia en ayunas mayor de 100 mg/dl o lipo – proteínas de alta densidad menores de 40 mg/dl en hombres o 50 mg/dl en mujeres.

Un “activador directo” de una sirtuina es una molécula que activa una sirtuina enlazándose a ella. Un “inhibidor directo” de una sirtuina es una molécula que inhibe una sirtuina enlazándose a ella.

5 El término “ED₅₀” es reconocido en el arte. En ciertas incorporaciones, “ED₅₀” significa la dosis de una droga que produce 50% de su máxima respuesta o efecto, o alternativamente, la dosis que produce una respuesta predeterminada en el 50% de los sujetos de prueba o preparaciones.

10 El término “LD₅₀” es reconocido en el arte. En ciertas incorporaciones, “LD₅₀” significa la dosis de una droga que es letal en el 50% de los sujetos de prueba. El término “índice terapéutico” es reconocido en el arte refiriéndose al índice terapéutico de una droga, definido como “LD₅₀/“ED₅₀”

15 El término “hiperinsulinemia” se refiere a un estado de un individuo en el cual el nivel de insulina en sangre es mayor que el normal.

El término “incluyendo” es usado para significar “incluyendo pero no limitado a”. “Incluyendo” e “incluyendo pero no limitado a” son usados en forma intercambiable.

20 El término “resistencia a la insulina” se refiere a un estado en el cual una cantidad normal de insulina produce una respuesta biológica subnormal en un sujeto que la padece, en relación a la respuesta biológica de un sujeto que no tiene resistencia a la insulina.

25 Un “desorden insulino – resistente”, como aquí se discute, se refiere a cualquier enfermedad o condición que es causada o coadyuvada por la resistencia a la insulina. Ejemplos incluyen: diabetes, obesidad, síndrome metabólico, síndromes insulino – resistentes, síndrome X, resistencia a la insulina, alta presión sanguínea, hipertensión, alto colesterol en sangre, dislipidemia, hiperlipidemia, enfermedades ateroscleróticas, incluyendo ataque súbito, enfermedad de las
30 arterias coronarias o infarto al miocardio, hiperglicemia, hiper

insulinemia y / o hiper pro insulinemia, tolerancia a la glucosa deteriorada, liberación de insulina demorada, complicaciones diabéticas, incluyendo enfermedad cardíaca coronaria, angina de pecho, falla cardíaca congestiva, infarto, funciones cognitivas en demencia, retinopatía, neuropatía periférica, nefropatía, glomérulo nefritis, glomérulo esclerosis, síndrome nefrótico, nefro esclerosis hipertensiva, algunos tipos de cáncer (tales como cáncer de endometrio, senos, próstata y colon), complicaciones del embarazo, pobre salud reproductiva femenina (tales como irregularidades de la menstruación, infertilidad, ovulación irregular, síndrome de ovario poliquístico (PCOS)), lipodistrofia, desórdenes relacionados con el colesterol, tales como piedras en la vesícula biliar, colecistitis y colelitiasis, gota, apnea del sueño obstructiva y problemas respiratorios, osteoartritis, y prevención y tratamiento de pérdidas óseas, e.g., osteoporosis.

El término "animal ganado" se refiere a cuadrúpedos domesticados incluyendo aquellos criados por su carne y varios subproductos, e.g., un animal bovino incluyendo reses y otros miembros del género Bos, un animal porcino incluyendo cerdos domésticos y otros miembros del género Sus, un animal ovino incluyendo ovejas y otros miembros del género Ovis, cabras domésticas y otros miembros del género Capra, cuadrúpedos domesticados criados para tareas especializada, tales como para ser usados como bestias de carga, e.g., animales equinos incluyendo caballos domésticos y otros miembros de la familia Equidae, género Equus.

El término "mamífero" es conocido en el arte, y mamíferos ejemplares incluyen humanos, primates, animal ganado (incluyendo bovinos, porcinos, etc.), animales de compañía (e.g., caninos, felinos, etc.) y roedores (e.g., ratones y ratas) .

Individuos "obesos" o individuos que sufren de obesidad son generalmente individuos teniendo un índice de masa corporal (BMI)

de al menos 25 o mayor. La obesidad puede o no estar asociada con la resistencia a la insulina.

Los términos "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" son reconocidos en el arte y se refieren a modos de administración diferentes a la administración tópica o entérica, usualmente por inyección, incluyendo, sin limitarse a, intravenosa, intramuscular, intra – arterial, intratecal, intra- capsular, intra – orbital, intra – cardíaca, intra – dérmica, intra-peritoneal, transtraqueal, subcutánea, sub-cuticular, intra – articular, sub – capsular, sub-aracnoidea, intra – espinal, o inyección intra-esternal e infusión.

Un "paciente", "sujeto", "individuo" o "huésped" se refiere a un animal bien sea o no humano.

El término "portador farmacéuticamente aceptable" es reconocido en el arte y se refiere a una material farmacéuticamente aceptable, composición o vehículo, tal como un relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente, solvente o material de encapsulado, involucrado en llevar o transportar cualquier composición sujeto o componente de ésta. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con la composición sujeto y sus componentes y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sucrosa, (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de papa, (3) celulosa y sus derivados, tales como carboxi metil celulosa, etil celulosa y celulosa acetato; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorios; (9) aceites, tales como aceite de maní, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soya, (10) glicoles, tales como propilén glicol, (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol, y poli etilén glicol; (12) ésteres, tales como etil oleato y etil laureato, (13) agar; (14) agentes amortiguadores tales como

hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones amortiguadoras de fosfatos y (21) otras sustancias compatibles no-tóxicas usadas en las formulaciones farmacéuticas.

El término tratamiento "profiláctico" o "terapéutico" es reconocido en el arte y se refiere a la administración de una droga a un huésped. Si se administra antes de la manifestación clínica de la condición no deseada (e.g., enfermedad u otro estado no deseado del huésped animal) entonces el tratamiento es profiláctico, i.e., protege al huésped contra el desarrollo de una condición no deseada, mientras que si es administrada después de manifestarse la condición no deseada, el tratamiento es terapéutico (i.e., está entendido a disminuir, aminorar o mantener la condición no deseada existente o sus efectos secundarios).

El término "libre de pirógenos", en referencia a una composición, se refiere a una composición que no contiene un pirógeno en una cantidad que pueda conducir a un efecto adverso (e.g., irritación, fiebre, inflamación, diarrea, distrés respiratorio, shock endotóxico, etc.) en un sujeto al cual se le ha administrado la solución. Por ejemplo, el término es entendido a comprender composiciones que están libres, o sustancialmente libres de, una endotoxina, tal como, por ejemplo, un lipo polisacárido(LPS).

"Duración de vida replicativa" de una célula se refiere al número de células hijas producidas por una individual "célula madre". "Envejecimiento cronológico" o "duración de vida cronológica", por otra parte, se refiere al tiempo que una población de células no-dividiéndose permanece viable cuando está desprovista de nutrientes, "Incrementando la duración de vida de una célula" o "extendiendo la duración de vida de una célula", como se aplica a células u organismos, se refiere a incrementar el número de células hijas

producidas por una célula, incrementando la habilidad de las células u organismos para sobrevivir y existir en estado viviente por más tiempo bajo una condición particular, e.g., estrés (por ejemplo, shock térmico, estrés osmótico, radiación de alta energía, estrés químicamente inducido, daño al DNA, inadecuado nivel salino, inadecuado nivel de nitrógeno, o inadecuado nivel de nutrientes). La duración de vida puede ser aumentada en al menos alrededor de 20%, 30%, 40%, 50%, 60% o entre 20% y 70%, 30% y 60%, 40% y 60%

o entre 20% y 70%, 30% y 60%, 40% y 60% o más usando los métodos aquí descritos.

"Compuesto sirtuina-activante" se refiere a un compuesto que aumenta el nivel de una proteína sirtuina y/o aumenta al menos una actividad de una proteína sirtuina. En una incorporación ejemplar, un compuesto sirtuina-activante puede incrementar al menos una actividad biológica de una proteína sirtuina en alrededor del 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, o más. Actividades biológicas ejemplares de proteínas sirtuina incluyen des-acetilación, e.g., de histonas y p53; extensión de la duración de vida; incremento de la actividad genómica, silenciamiento de la transcripción, y control de la segregación de proteínas oxidadas entre la célula madre y las células hijas.

"Compuesto sirtuina-inhibidor" se refiere a un compuesto que disminuye el nivel de una proteína sirtuina y/o disminuye al menos una actividad de una proteína sirtuina. En una incorporación ejemplar, un Compuesto sirtuina-inhibidor puede disminuir al menos una actividad biológica de una proteína sirtuina en al menos alrededor de 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, o más. Actividades biológicas ejemplares de proteínas sirtuina incluyen des-acetilación, e.g., de histonas y p53; extensión de la duración de vida; incremento de la actividad genómica, silenciamiento de la transcripción, y control de la segregación de proteínas oxidadas entre la célula madre y las células hijas.

“Compuesto sirtuina-modulador” se refiere a un compuesto de Fórmula (I) – (VI) como aquí se describe. En incorporaciones ejemplares, un compuesto sirtuina-modulador pueden bien sea regular hacia arriba (e.g., activar o estimular) o regular hacia abajo (e.g., inhibir o suprimir) o cambiar de cualquier otra forma una propiedad funcional o una actividad biológica de una proteína sirtuina. Compuestos sirtuina-moduladores pueden actuar modulando una proteína sirtuina bien sea directamente o indirectamente. En ciertas incorporaciones, un compuesto sirtuina-modulador puede ser un compuesto sirtuina-activante o un compuesto sirtuina-inhibidor.

“Proteína sirtuina” se refiere a un miembro de la familia proteína desacetilasa, o preferiblemente a la familia Sir2 que incluye levadura Sir2 (Nº de Acceso GenBank P53685), *C. elegans* Sir-2.1 (Nº de Acceso GenBank NP_501912) y SIRT1 humano (Nº de Acceso GenBank NM_012238 y proteínas NP_036370 (o AF083106)) y SIRT2 (GenBank Acceso No. NM_012237, NM_030593, NP_036309, NP_085096, y AF083107). Otros miembros de la familia incluyen los cuatro genes adicionales de levaduras Sir2-similes denominados “genes HST” (homólogos de Sir dos) HST1, HST2, HST3 y HST4, y los otros cinco homólogos humanos hSIRT3, hSIRT4, hSIRT5, hSIRT6 y hSIRT7 (Brachmann et al. (1995) Genes Dev. 9:2888 y Frye et al. (1999) BBRC 260:273). Sirtuinas preferenciales son aquellas que comparten mas similitudes con SIRT1, i.e., hSIRT1, y/o Sir2 que con SIRT2, tales como aquellos miembros teniendo al menos parte de la secuencia N-terminal presente en SIRT1 y ausente en SIRT2 tal como tiene SIRT3

“Proteína SIRT1” se refiere a un miembro de las sirtuina desacetilasas. En una incorporación, una proteína SIRT1 incluye levadura Sir2 (Nº de Acceso GenBank P53685), *C. elegans* Sir-2.1 (Nº de Acceso GenBank NP_501912), SIRT1 humano (Nº de Acceso GenBank NM_012238 o NP_036370 (o AF083106 y SIRT2 humano (Nº de Acceso GenBank NM_012237,

NM_030593, NP_036369, NP_035096, o AF083107) proteínas, y equivalentes o fragmentos de éstos. En otra incorporación, una proteína SIRT1 incluye un polipéptido comprendiendo una secuencia consistente de, o consistiendo esencialmente de, la secuencia de amino ácidos establecida en los Nos. de Acceso GenBank NP_036370, NP_501912, NP_035096, NP_036369, o P53685. Proteínas SIRT1 incluyen polipéptidos comprendiendo toda o una porción de una secuencia de aminoácidos establecida en los Nos. de Acceso GenBank NP_036370, NP_501912, NP_035096, NP_036369, o P53685; la secuencia de amino ácidos establecida en los Nos. de Acceso . NP_036370, NP_501912, NP_035096, NP_036369, o P53685 con 1 hasta alrededor de 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 75 o sustituciones conservadoras de amino – ácidos; una secuencia de amino- ácidos que es al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a los Nos. de Acceso GenBank . NP_036370, NP_501912, NP_035096, NP_036369, o P53685, y fragmentos funcionales de estos. Polipéptidos de la invención también incluyen homólogos (e.g., ortólogos y parálogos) variantes o fragmentos de Nos. de Acceso GenBank NP_036370, NP_501912, NP_035096, NP_036369, o P53685.

“Proteína SIRT3” se refiere a un miembro de la familia de proteínas sirtuina desacetilasas y/o a un homólogo de una proteína SIRT1. En una incorporación, una proteína SIRT3 incluye proteínas SIRT3 humana (No. de Acceso GenBank AAH01042, NP_036371, o NP_001017524) y SIRT3 de ratón (No. de Acceso GenBank . NP_071878) y equivalentes y equivalentes o fragmentos de estos. En otra incorporación, una proteína SIRT3 incluye un polipéptido comprendiendo una secuencia consistente en, o consistiendo esencialmente en, la secuencia de amino ácidos establecida en los Nos. de Acceso Gen Bank . AAH01042, NP_036371, NP_001017524, o NP_071878. Proteínas SIRT3 incluyen polipéptidos comprendiendo toda o una porción de la secuencia de amino ácidos establecida en el No. de Acceso GenBank AAH01042, NP_036371, NP_001017524, o NP_071878; la secuencia de amino ácidos establecida en el No. de Acceso GenBank . AAH01042, NP_036371, NP_001017524, o NP_071878 con 1 hasta alrededor de 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20,

30, 50, 75 o más sustituciones conservadoras de amino ácidos; una secuencia de amino – ácidos que es al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a los Nos. de Acceso GenBank: AAH01042, NP_036371, NP_001017524, o NP_071378, y fragmentos funcionales de estos. Polipéptidos de la invención también incluyen homólogos (e.g., ortólogos y parálogos), variantes, o fragmentos, de Nos. de Acceso GenBank: AAH01042, NP_036371, NP_001017524, o NP_071378. En una incorporación, una proteína SIRT3 incluye un fragmento de proteína SIRT3 que es producido por desdoblamiento con una peptidasa de procesamiento matricial mitocondrial (MPP) y / o una peptidasa intermedia mitocondrial (MIP).

Los términos “administración sistémica”, “administrados sistémicamente”, “administración periférica” y “administrados periféricamente” son reconocidos en el arte y se refieren a la administración de una composición sujeto, terapéutica u otro material distinto a directamente en el sistema nervioso central, de tal forma que entre al sistema del paciente y se sujete al metabolismo y a otros procesos similares.

El término “agente terapéutico” es reconocido en el arte y se refiere a cualquier mitad química que es biológica, fisiológica o farmacológicamente sustancia activa que actúa local o sistémicamente en un sujeto. El término también significa cualquier sustancia entendida para su uso en el diagnóstico, curación, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades o en el realce de un deseable desarrollo físico o mental y/o condiciones en un animal o humano.

El término “efecto terapéutico” es reconocido en el arte y se refiere a un efecto local o sistémico en animales, particularmente en mamíferos, y más particularmente en humanos, causado por una sustancia farmacológicamente activa. La frase “cantidad terapéuticamente efectiva” significa que la cantidad de tal sustancia que produce algún efecto deseado local o sistémico a una relación razonable riesgo / beneficio aplicable a cualquier tratamiento. La cantidad terapéuticamente efectiva de tal sustancia variará dependiendo del sujeto y de la

enfermedad o condición siendo tratada, el peso y la edad del sujeto, la severidad de la enfermedad o condición, la manera de administración y similares, que pueden ser rápidamente determinados por alguien de habilidades ordinarias en el arte. Por ejemplo, ciertas composiciones aquí descritas pueden ser administradas en una cantidad suficiente para producir un efecto deseado a una relación aceptable riesgo / beneficio aplicable a tal tratamiento.

“Tratamiento” de una condición o enfermedad se refiere a curar así como también a mejorar al menos un síntoma de la condición o enfermedad.

El término “deterioro de la visión” se refiere a visión disminuida, que a menudo es solo reversible parcialmente o irreversible con el tratamiento (e.g., cirugía). Particularmente, el deterioro severo de la visión es denominado “ceguera” o “pérdida de la visión”, la cual se refiere a una pérdida completa de la visión, una visión peor que 20 / 2000 que no pueda ser mejorada con lentes correctivos, o un campo visual de menos de 20 grados de diámetro (radio de 10 grados).

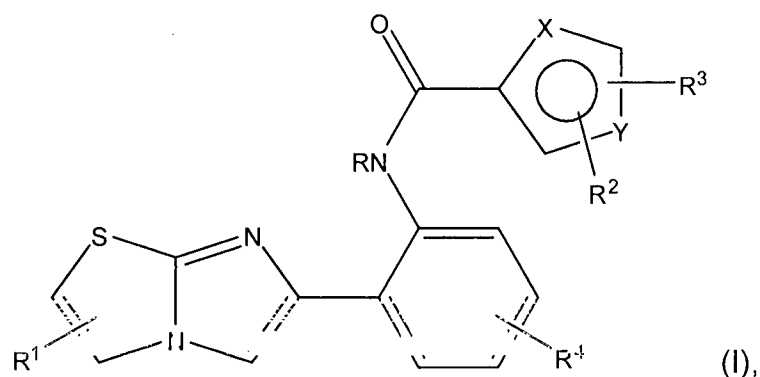
2. MODULADORES DE SIRTUINA

En un aspecto, la invención proporciona compuestos novedosos sirtuina-moduladores para el tratamiento y/o prevención de una amplia variedad de enfermedades y desórdenes, incluyendo, por ejemplo, enfermedades o desórdenes relacionados al envejecimiento o al estrés, diabetes, obesidad, enfermedades neuro – degenerativas, enfermedades oculares y desórdenes, enfermedad cardio – vascular, desórdenes de la coagulación de la sangre, inflamación, cáncer y/o rubicundez, etc.

Compuestos sirtuina-moduladores que aumentan el nivel y/o actividad de una proteína sirtuina pueden también ser usados para el tratamiento de una enfermedad o desorden en un sujeto que se beneficiaría de una actividad mitocondrial incrementada, para realzar el performance muscular, para aumentar los niveles de ATP muscular

o para tratar o prevenir daño muscular asociado con hipoxia o isquemia. Otros compuestos aquí presentados pueden ser adecuados para ser usados en una composición farmacéutica y/o uno o más de los métodos aquí presentados.

5 En una incorporación, los compuestos sirtuina-moduladores de la invención son representados por la Fórmula Estructural (I)



10 o una sal de éste, donde:

X es N o S;

Y es S cuando X es N o Y es N cuando X es S;

R es -H o un grupo sustituido o no sustituido alquilo;

15 R¹ es un grupo solubilizante; o un grupo sustituido o no sustituido alquilo;

R² es -H o un grupo sustituido o no sustituido alquilo;

R³ o un grupo sustituido o no sustituido aril monocíclico;

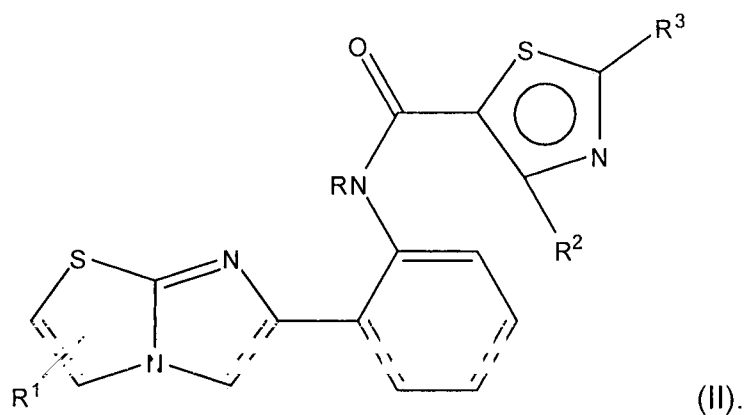
R⁴ es -H, un halógeno o un grupo sustituido o no sustituido alquilo;

En ciertas incorporaciones, R es -H o -CH₃.

En ciertas incorporaciones, R² es -H o -CH₃.

En ciertas incorporaciones, R⁴ es -H, un halógeno o -CH₃.

En ciertas incorporaciones, el compuesto de Formula Estructural (I) es representado por la Formula Estructural (II):



En ciertas incorporaciones, R y R² son cada uno independientemente -H o -CH₃.

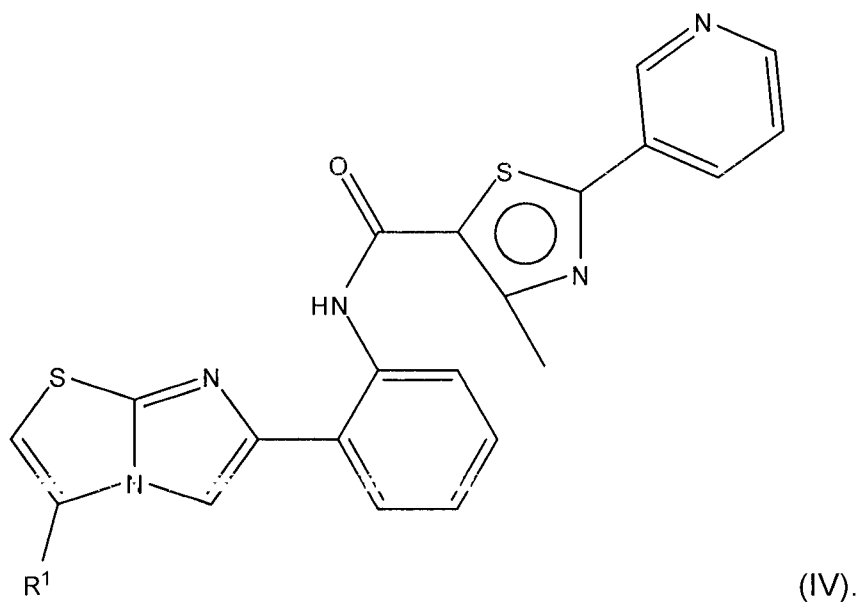
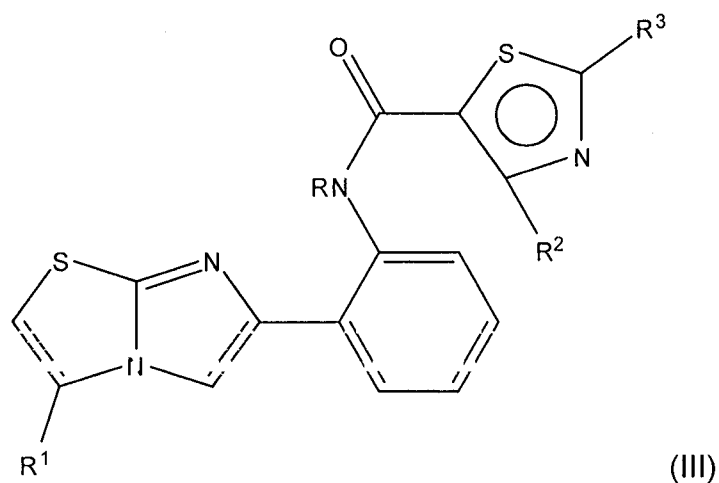
En ciertas incorporaciones, R³ es un grupo sustituido o no sustituido hetero aril, tal como un sustituido o no sustituido grupo hetero aril, tal como un sustituido o no sustituido grupo hetero aril conteniendo nitrógeno, particularmente un grupo piridil sustituido o no sustituido. (e.g., piridil no sustituido).

En ciertas incorporaciones, R³ es un grupo fenil sustituido o no sustituido tal como un metil fenil, un halo fenil o un sustituido o no sustituido grupo fenil,

En ciertas incorporaciones, R¹ es un grupo hetero ciclo alquil sustituido o no sustituido, típicamente donde la mitad hetero cíclica está unida a la mitad alquilo por un hetero átomo. En ciertas incorporaciones, R¹ es un sustituido o no sustituido grupo hetero ciclo metil tal como un sustituido o no sustituido grupo hetero ciclo

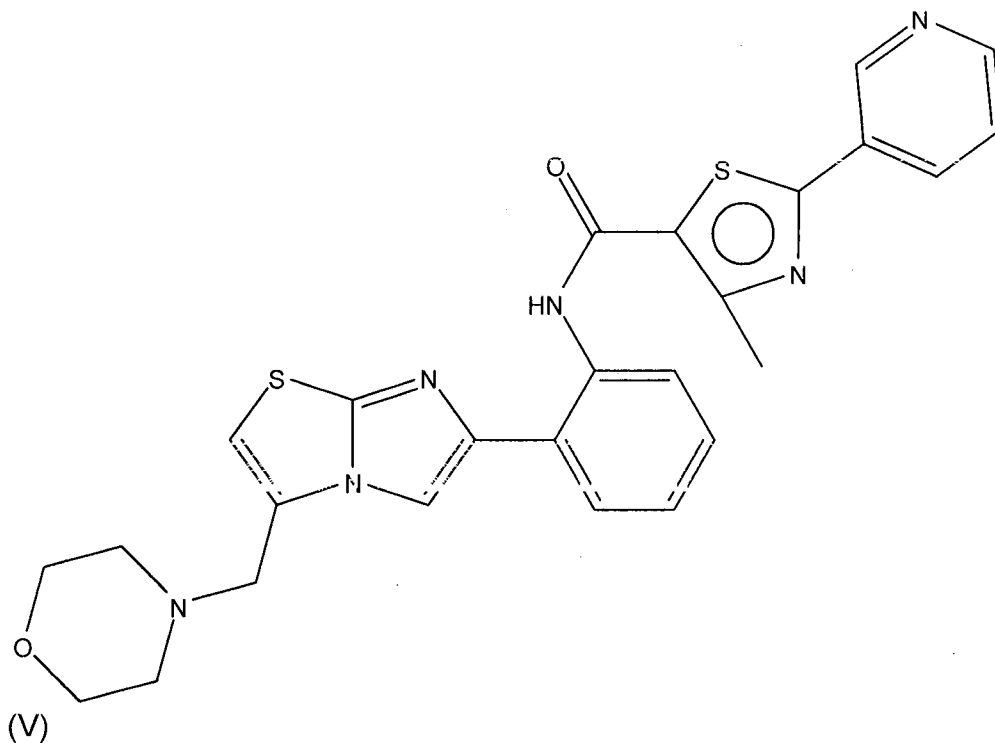
metil conteniendo nitrógeno, el cual por ejemplo incluye un grupo hetero ciclo metil conteniendo un átomo de nitrógeno y opcionalmente un segundo hetero átomo, seleccionado de nitrógeno y oxígeno. Particulares grupos heterociclo alquilo incluyen grupos morfolinometil y 1,2,4-triazolilmetil. Sustitutos ejemplares para las mitades hetero cíclicas en R^1 incluyen uno o más grupos hidroxilo, halo o metilo. .

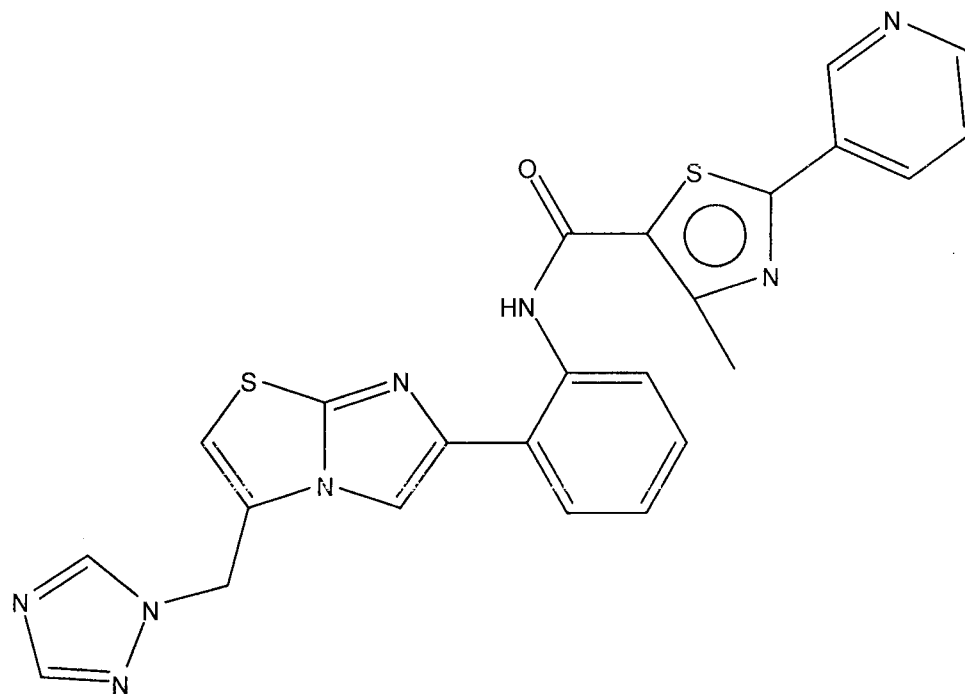
En ciertas incorporaciones, los compuestos de la Fórmula Estructural (I) son representados por la Fórmula Estructural (III) o (IV):



Valores adecuados de R y R¹-R³ son como los descritos arriba.

Ejemplos de compuestos representados por la Formula Estructural (I) incluyen aquellos representados por las Fórmulas Estructurales (V) y (VI):





I).

Compuestos de la invención, incluyendo los novedosos compuestos de la invención, pueden también ser usados en los métodos aquí descritos.

Los compuestos Sirtuina-moduladores de la invención ventajosamente modulan el nivel y/o actividad de una proteína sirtuina, en particular la actividad des-acetilasa de la proteína sirtuina..

Separadamente, o en adición a las propiedades de arriba, ciertos compuestos sirtuina-moduladores de la invención no tienen sustancialmente una o más de las siguientes actividades: inhibición de la PI3-quinasa, inhibición de la aldo - reductasa , inhibición de la tirosino - quinasa, transactivación de la EGFR tirosino - quinasa, dilatación coronaria o actividad espasmolítica, a concentraciones del compuesto efectivas para modular la actividad de des- acetilación de una proteína sirtuina (e.g., tal como una proteína SIRT1 y/o una proteína SIRT3).

Un grupo alquil es un hidrocarburo no aromático de cadena recta, ramificada o cíclica que está completamente saturado. Típicamente, un grupo alquil de cadena recta de cadena recta o ramificada tiene de 1 hasta alrededor de 20 átomos de carbono, preferiblemente de 1 hasta alrededor de 19 y un grupo alquil cíclico tiene desde 3 hasta alrededor de 19 átomos de carbono, preferiblemente desde 3 hasta alrededor de 8. Ejemplos de grupos alquil de cadena recta y ramificada incluyen metil, etil, n-propil, iso-propil, n-butil, sec-butil, tert-butil, pentil, hexil, pentil y octil. Un grupo alquil C1-C4 de cadena recta o ramificada es también referido como un grupo "alquil inferior"

Grupos aromáticos (aril) incluyen grupos aromáticos carbo cíclicos tales como fenil, naftil, y antracil, y grupos hetero aril tales como imidazolil, tienil, furil, piridil, pirimidil, piranil, pirazolil, pirroil, pirazinil, tiazolil, oxazolil, y tetrazolil.

Los grupos aromáticos también incluyen sistemas de anillos aromáticos policíclicos fusionados en los cuales un anillo carbocíclico aromático o anillo heteroaril es fusionado con uno o más anillos heteroaril. Ejemplos incluyen benzotienil, benzofuril, indolil, quinolinil, benzotiazol, benzoxazol, benzimidazol, quinolinil, isoquinolinil e isoindolil.

Anillos heterocíclicos no-aromáticos son anillos carbocíclicos no-aromáticos que incluyen uno o más hetero átomos tales como nitrógeno, oxígeno o sulfuro en el anillo. El anillo puede tener cinco, seis, siete u ocho miembros. Ejemplos incluyen tetrahidrofuril, tetra hidro tiofenil, morfolino, tio - morfolino, pirrolidinil, piperazinil, piperidinil, y tiazolidinil, junto a la forma cíclica de los azúcares.

Un anillo fusionado a un segundo anillo comparte al menos un enlace común..

Sustitutos adecuados de un alquil, grupos no-aromáticos heterocíclicos o grupo aril (carbocíclico y heteroaril) son aquellos que no interfieren sustancialmente con la habilidad de los compuestos presentados para tener una o más de las propiedades aquí presentadas. Un sustituto sustancialmente interfiere con las

propiedades de un compuesto cuando la magnitud de las propiedades de un compuesto es reducida por más de alrededor de un 50% en un compuesto con sustituto comparado a un compuesto sin sustituto. Ejemplos de sustitutos adecuados incluyen -OH,

halógeno (-Br, -Cl, -I y -F), -OR^a, -O-COR^a, -COR^a, -C(O)R^a, -CN, -NO², -COOH, -COOR^a, -OCO₂R^a, -C(O)NR^aR^b, -OC(O)NR^aR^b, -SO₃H, -NH₂, -NHR^a, -N(R^aR^b), -COOR^a, -CHO, -CONH₂, -CONHR^a, -CON(R^aR^b), -NHCOR^a, -NRCOR^a, -NHCONH₂, -NHCONR^aH, -NHCON(R^aR^b), -NR^cCONH₂, -NR^cCONR^aH, -NR^cCON(R^aR^b),

-C(=NH)-NH₂, -C(=NH)-NHR^a, -C(=NH)-N(R^aR^b), -C(=NR^c)-NH₂, -C(=NR^c)-NHR^a, -C(=NR^c)-N(R^aR^b), -NH-C(=NH)-NH₂, -NH-C(=NH)-NHR^a, -NH-C(=NH)-N(R^aR^b), -NH-C(=NR^c)-NH₂, -NH-C(=NR^c)-NHR^a, -NH-C(=NR^c)-N(R^aR^b), -NR^dH-C(=NH)-NH₂, -NR^d-C(=NH)-NHR^a, -NR^d-C(=NH)-N(R^aR^b), -NR^d-C(=NR^c)-NH₂, -NR^d-C(=NR^c)-NHR^a,

-NR^d-C(=NR^c)-N(R^aR^b), -NHNH₂, -NHNHR^a, -NHR^aR^b, -SO₂NH₂, -SO₂NHR^a, -SO₂NR^aR^b, -CH=CHR^a, -CH=CR^aR^b, -CR^c=CR^aR^b, -CR^c=CHR^a, -CR^c=CR^aR^b, -CCR^a, -SH, -SO_kR^a (k es 0, 1 o 2), -S(O)_kOR^a (k es 0, 1 o 2) y -NH-C(=NH)-NH₂. R^a-R^d son cada uno independientemente sustituidos y un grupo opcionalmente sustituido

seleccionado de un grupo alifático bencil o un grupo aromático, preferiblemente un grupo alquil. bencilico o aromático preferiblemente un grupo alquil, bencil o aril. Opcionales sustitutos en R^a-R^d son seleccionados de NH₂, NH(C₁₋₄alifático), N(C₁₋₄alifático)₂, halógeno, C₁₋₄ alifático, OH, O(C₁₋₄alifático), NO₂, CN, CO₂H, CO₂(C₁₋₄alifático), O (haloC₁₋₄ alifático), o haloC₁₋₄alifático,

donde cada uno de los anteriores grupos C₁₋₄alifáticos es no

sustituido. En adición, $-NR^aR^b$, tomados juntos, pueden también formar un grupo hetero cíclico no aromático sustituido o no sustituido. Un grupo hetero cíclico no aromático, grupo bencílico o grupo aril pueden también tener un grupo alifático o un grupo alifático sustituido como sustituto. Un grupo alifático sustituido puede también tener un anillo hetero cíclico no-aromático, un anillo hetero cíclico no aromático sustituido, benzil, benzil sustituido, grupo aril o aril sustituido, como sustituto. Un grupo hetero cíclico no-aromático alifático sustituido, un grupo aril sustituido o un grupo bencil sustituido pueden tener más de un sustituto.

Típicos sustitutos de un anillo aril son seleccionados de un grupo solubilizante, halógeno; $-R^\circ$; $-OR^\circ$; $-SR^\circ$; 1,2-metilenodiox; 1,2-etilenodiox; fenil (Ph) opcionalmente sustituido con R° ; $-O(Ph)$ opcionalmente sustituido con R° ; $-(CH_2)_{1-2}(Ph)$, opcionalmente sustituido con R° ; $-CH=CH(Ph)$, opcionalmente sustituido con R° ; $-NO_2$; $-CN$; $-N(R^\circ)_2$; $-C(O)C(O)R^\circ$; $-C(O)CH_2C(O)R^\circ$; $-CO_2R^\circ$; $-C(O)R^\circ$; $-S(O)_2R^\circ$; $-SO_2N(R^\circ)_2$; $-S(O)R^\circ$; $-NR^\circ SO_2N(R^\circ)_2$; $-NR^\circ SO_2R^\circ$; $-C(=S)N(R^\circ)_2$; o $-C(=NH)-N(R^\circ)_2$; o donde cada ocurrencia independiente de R° es seleccionada de hidrógeno, un opcionalmente sustituido C_{1-6} alifático, un anillo no sustituido de 5-6- miembros heterocíclico o hetero aril, fenil, $-O(Ph)$, o $-CH_2(Ph)$, o, no obstante la definición de arriba, dos ocurrencias independientes de R° , en el mismo sustituto o en diferentes sustitutos, tomados conjuntamente con el átomo(s) al cual está unido cada grupo R° para formar un anillo de 3-8-miembros cicloalquil, heterociclil, aril, o heteroaril teniendo 0-3 hetero átomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, o sulfuro. Sustitutos opcionales del grupo alifático de R° son seleccionados de NH_2 , $NH(C_{1-4}$ alifático), $N(C_{1-4}$ alifático) $_2$, halógeno, C_{1-4} alifático, OH , $O(C_{1-4}$ alifático), NO_2 , CN , CO_2H , $CO_2(C_{1-4}$ alifático), $O(haloC_{1-4}$ alifático), o

haloC₁₋₄, alifático donde cada uno de los anteriores grupos C₁₋₄ alifáticos de R° es no sustituido.

Combinaciones de sustitutos y variables contempladas por esta invención son aquellas que resultan en la formación de compuestos estables. Como es aquí usado, el término " se refiere a compuestos que poseen la estabilidad suficiente para permitir la manufactura y que mantienen la integridad del compuesto por un período de tiempo suficiente para ser útil a los propósitos aquí detallados.

Como aquí se usa, un "grupo solubilizante" es una mitad que tiene caracter hidrófilo suficiente para mejorar o incrementar la solubilidad en agua del compuesto en el cual está incluida, en comparación a un compuesto análogo que no incluye el grupo. El carácter hidrófilo puede ser logrado por cualquier medio, tal como por la inclusión de grupos funcionales que ionizan bajo las condiciones de uso para formar mitades cargadas (e.g., ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, ácidos, fosfóricos, aminas, etc.); grupos que incluyen cargas permanentes (e.g., grupos amonio cuaternario); y/o hetero átomos o grupos hetero atómicos (e.g., O, S, N, NH, N-(CH₂)_y-R^a, N-(CH₂)_y-C(O)R^a, N-(CH₂)_y-C(O)OR^a, N-(CH₂)_y-S(O)₂R^a, N-(CH₂)_y-S(O)₂OR^a, N-(CH₂)_y-C(O)NR^aR^a, etc., donde R^a es seleccionado de hidrógeno, alquil inferior, ciclo alquil inferior, (C6-C14) aril, fenil naftil, (C7-C20) arilalquil y bencil, donde R^a es opcionalmente sustituido e y es un entero en el rango de 0 a 6), grupos hetero cíclicos opcionalmente sustituidos (e.g., -(CH₂)_n-R^b, -(CH₂)_n-C(O)-R^b, -(CH₂)_n-O-(CH₂)_n-R^b, donde R^b es seleccionado de un opcionalmente sustituido heterociclo monocíclico saturado, un opcionalmente sustituido saturado bicíclico fusionado heterociclo, un opcionalmente sustituido saturado bicíclico espiral heterociclo, un opcionalmente sustituido hetero aril y un opcionalmente sustituido parcialmente sustituido no-aril heterociclo; y n es un entero en el

rango de 0 a 2). Debe entenderse que los sustitutos presentes en R^a o R^b no necesitan mejorar o aumentar la solubilidad en agua sobre sus contrapartes no sustituidas para estar dentro del ámbito de esta definición. Todo lo que es requerido es que dichos sustitutos no reviertan significativamente la mejora en solubilidad en agua proporcionada por la mitad no sustituida R^a o R^b .

En una incorporación, el grupo solubilizante aumenta la solubilidad en agua del compuesto correspondiente careciendo de grupos solubilizantes en al menos 5 veces, preferiblemente al menos 10-veces, más preferiblemente al menos 20-veces y aún más preferiblemente al menos 50-veces..

En una incorporación preferencial, el grupo solubilizante es una mitad de la fórmula:

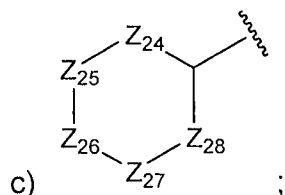
$-(CH_2)_n-R^{100}-N(R^{101})(R^{101})$, donde:

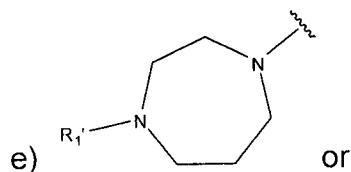
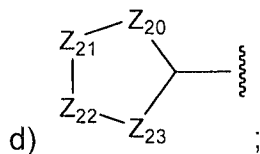
n es seleccionada de 0, 1 o 2;

R^{100} es seleccionada de un enlace $-C(O)-$, o $-O(CH_2)_m-$ y cada R^{101} es independientemente seleccionada de :

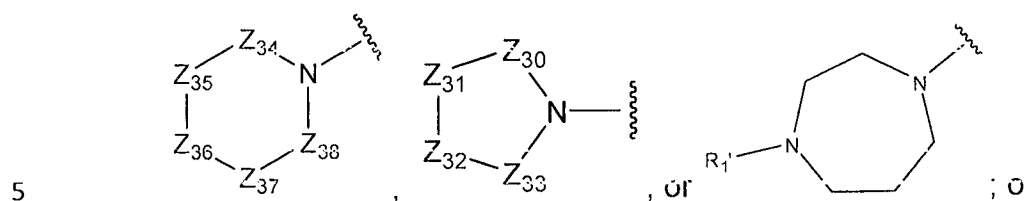
a) hidrógeno;

b) C_1 - C_4 recto o ramificado alquil, donde dicho alquil es opcionalmente sustituido con halo, CN, OH, $O-(C_1-C_4$ alquil recto o ramificado), $N(R_1')(R_1')$, o $=O$;





f) ambas mitades R^{101} son tomadas conjuntamente con el átomo de nitrógeno al que están unidas para formar un anillo de estructura



g) ambas mitades R^{101} son tomadas conjuntamente con el átomo de nitrógeno al que están unidas para formar un anillo hetero aril de 5- miembros conteniendo de 1 a 3 átomos adicionales N , donde dicho anillo hetero aril es opcionalmente sustituido con R_1' ;

10 donde

cada Z es independientemente seleccionada de -O-, -S-, -NR_{1'}-, o -C(R⁵⁰)(R⁵⁰)-, donde:

al menos tres de Z₂₀, Z₂₁, Z₂₂, y Z₂₃ son -C(R⁵⁰)(R⁵⁰)-;

al menos tres de Z₂₄, Z₂₅, Z₂₆, Z₂₇, y Z₂₈ son -C(R⁵⁰)(R⁵⁰)-;

15 al menos cuatro de Z₃₀, Z₃₁, Z₃₂, and Z₃₃ son -C(R⁵⁰)(R⁵⁰)-; y

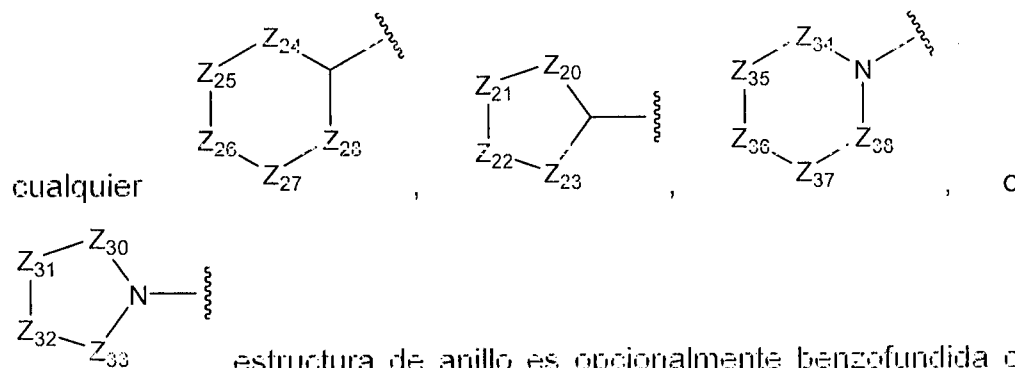
al menos cuatro de Z₃₄, Z₃₅, Z₃₆, Z₃₇, y Z₃₈ son -C(R⁵⁰)(R⁵⁰)-;

cada R_{1'} es independientemente seleccionada de hidrógeno o un C₁-C₃ recto o ramificado alquilo opcionalmente sustituido con uno o más sustitutos independientemente seleccionados con uno o más

sustitutos independientemente seleccionados de halo, -CN, -OH, -OCH₃, -NH₂, -NH(CH₃), -N(CH₃)₂, o =O;

cada R⁵⁰ es independientemente seleccionado de R₁', halo, CN, OH, O-(C₁-C₄ alquil recto o ramificado), N(R₁')(R₁'), =CR₁', SR₁', =NR₁', =NOR₁', o =O;

cualquiera de los dos adecuados no-cíclicos R⁵⁰ están opcionalmente unidos uno a otro directamente o por vía de un puente C₁ to C₂ alquileno, alquenileno o alcanodilideno para producir un anillo bicíclico o espiral; y

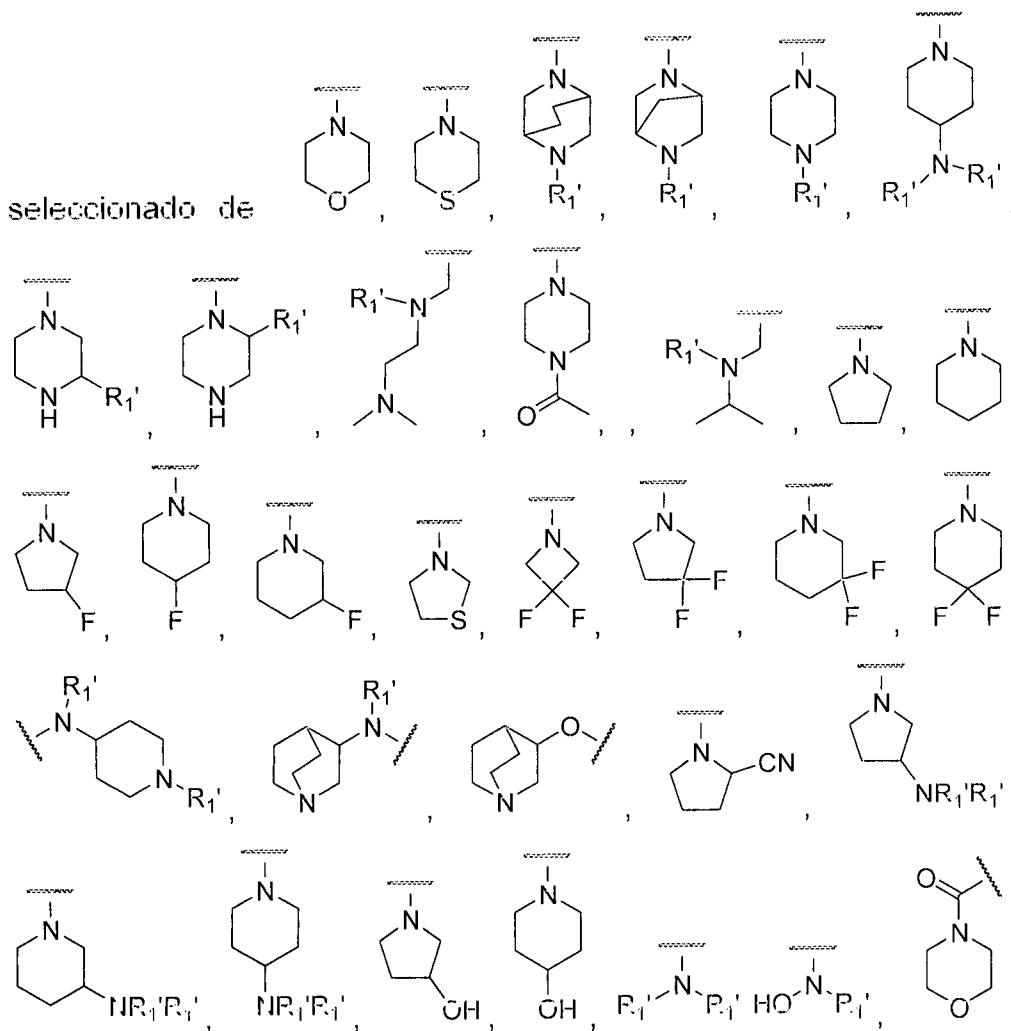


Para claridad, el término "puente C₁ a C₂ alquileno, alquenileno o alcanodilideno" significa las estructuras multivalentes -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH=, =CH-, -CH=CH-, o =CH-CH=. Las dos mitades R⁵⁰ que están opcionalmente unidas una a otra pueden estar bien en el mismo carbono o en diferentes átomos de carbono. lo anterior produce un anillo espiral bicíclico, mientras que el posterior produce un anillo bicíclico fundido. Será obvio para aquellos calificados en el arte que cuando dos R⁵⁰ están unidos uno a otro para formar un anillo bien sea directamente o a través de uno de los puentes descritos), uno o más átomos de hidrógeno terminales en cada R⁵⁰ se perderá. De acuerdo con esto, una "adecuada" mitad no-cíclica

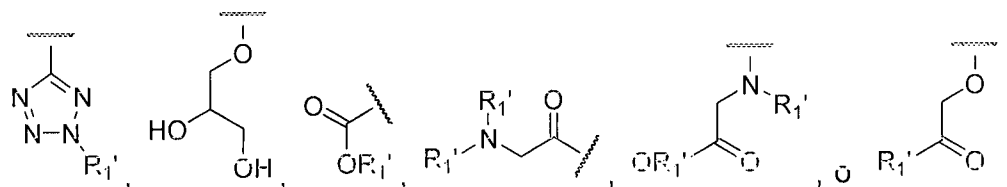
•

•

seleccionado de







donde R_1' es como se definió anteriormente..

En una aún más preferencial incorporación, un grupo solubilizante es seleccionado de 2-dimetil amino etil carbamoil, piperazin-1-ilcarbonil, piperazinil metil, dimetil amino metil, 4-metil piperazin-1-ilmetil, 4-amino piperidin-1-il-metil, 4-fluoro piperidin-1-il-metil, morfolino metil, pirrolidin-1-ilmetil, 2-oxo-4-benzil piperazin-1-ilmetil, 4-benzil piperazina-1-ilmetil, 3-oxo piperazina-1-ilmetil, piperidina-1-ilmetil, piperazin-1-iletal, 2,3-dioxo propel amino metil, tiazolidin-3-ilmetil, 4-acetil piperazina-1-ilmetil, 4-acetil piperazina-1-il, morfolino, 3,3-difluoro acetidina-1-ilmetil, 2*H*-tetrazol-5-ilmetil, tiomorfolina-4-ilmetil, 1-oxo tio morfolin-4-ilmetil, 1,1-dioxo tio morfolin-4-ilmetil, 1*H*-imidazol-1-ilmetil, 3,5-dimetil piperazina-1-ilmetil, 4-hidroxi piperidina-1-ilmetil, *N*-metil(1-acetil piperidin-4-il)-amino metil, *N*-metil quinuclidin-3-ilamino metil, 1*H*-1,2,4-triazol-1-ilmetil, 1-metil piperidin-3-il-oximetil, o 4-fluoropiperidin-1-il.

En la extensión no incluida en ninguna de las definiciones anteriores el término "grupo solubilizante" también incluye mitades presentadas como estando unidas en la posición-7 de 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxoquinolina-3-ácido carboxílico (ciprofloxacina) y sus derivados como se presenta en las publicaciones PCT WO 2005026165, WO 2005049602, y WO 2005033108, y publicaciones de Patentes Europeas EP 0343524, EP 0688772, EP 0153163, EP 0159174; así como también "grupos solubilizantes de aguas" descritos en la publicación de Patentes de los Estados Unidos 2006/0035891. La declaración de cada una de estas publicaciones está aquí incorporada a modo de referencia. .

Los compuestos aquí presentados también incluyen variantes total y parcialmente deuteradas. En ciertas incorporaciones uno o más átomos de deuterio están presentes para estudios cinéticos. Alguien de habilidades ordinarias en el arte puede seleccionar los sitios en los cuales están presentes dichos átomos de deuterio.

También se incluyen en la presente invención las sales, particularmente las sales farmacéuticamente aceptables, de los compuestos sirtuina-moduladores aquí descritos. Los compuestos de la presente invención que poseen suficientes ácidos, suficientes básicos, o ambos grupos funcionales, pueden reaccionar con cualquier número de bases inorgánicas y ácidos inorgánicos y orgánicos, para formar una sal. Alternativamente, los compuestos que están cargados inherentemente, tales como aquellos con un nitrógeno cuaternario, pueden formar una sal con un apropiado contra-ión (e.g., una halida tal como bromuro, cloruro, o fluoruro, particularmente bromuro).

Los compuestos y sales de éstos aquí descritos también incluyen los hidratos (e.g., semi hidratos, mono hidratos, bihidratos, trihidratos, tetrahidratos) y solvatos de los compuestos y sus sales. Solventes adecuados para la preparación de solvatos e hidratos pueden generalmente ser seleccionados por un artesano calificado.

Los compuestos y sus sales pueden estar presentes en formas amorfas o cristalinas (incluyendo co-cristalinas y polimorfas).

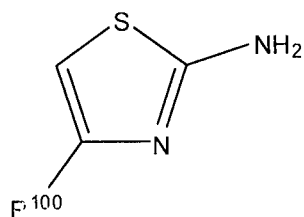
Los ácidos comúnmente empleados para formar sales de adición ácida son ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido p-tolueno sulfónico, ácido metano sulfónico, ácido oxálico, ácido p - bromofenil - sulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido

benzoico, ácido acético, y similares. Ejemplos de dichas sales incluyen sulfato, piro-sulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, fosfato, monohidrogenfosfato, dihidrogenfosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, propionato, decanoato, caprilato, acrilato, formato, isobutirato, caproato, heptanoato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, buti-1-4-dioato, hexin-1-6- dioato, benzoato, clorobenzoato, metil benzoato, dinitro benzoato, hidroxí benzoato, metoxi benzoato, ptalato, sulfonato, xileno sulfonato, fenil acetato, fenil propionato, fenil butirato, citrato, lactato, gamma – hidroxí – butirato, glicolato, tartrato, metano sulfonato, propano sulfonato, naftaleno- 1- sulfonato, naftaleno – 2- sulfonato, mandelato y similares.

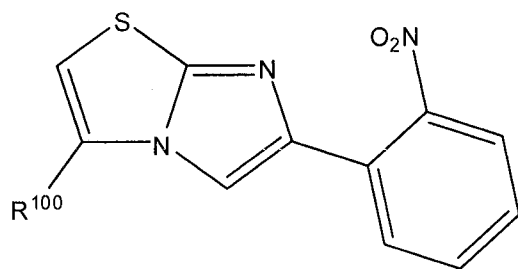
Sales de adición básica incluyen aquellas derivadas de bases inorgánicas, tales como amonio o álcalis o hidróxidos metálicos de tierras alcalinas, carbonatos, bicarbonatos, y similares. Tales bases útiles en la preparación de las sales de esta invención incluyen hidróxido de sodio, hidróxido de potasio,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

De acuerdo con otra incorporación, la presente invención proporciona métodos de producir los arriba definidos compuestos sirtuina – moduladores. los compuestos pueden ser sintetizados a partir de materiales fácilmente disponibles en el mercado.

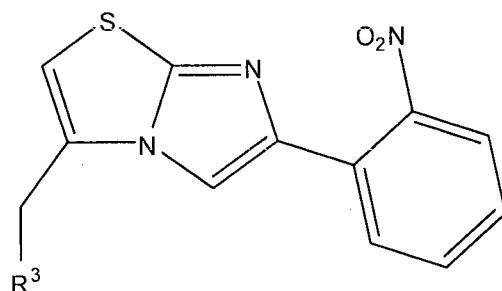
En una incorporación, ciertos compuestos de la invención son preparados de acuerdo con el siguiente método, Primero, el compuesto de la siguiente fórmula:



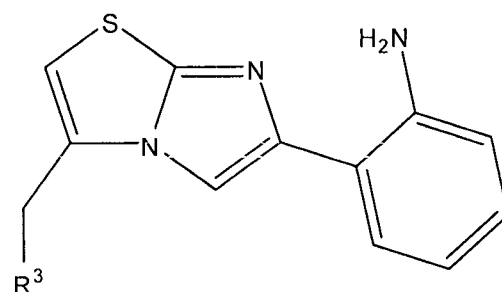
donde R^{100} es un grupo que puede ser transformado en un grupo alquilo (e.g., metil) sustituido con un grupo saliente, tal como un alcoxi carbonil (e.g., etoxi carbonil) es hecho reaccionar con un grupo 2-saliente, 2"-nitro aceto fenona (e.g. 2-halo, 2"-nitro aceto fenona donde halo es típicamente bromo o cloro) para formar el siguiente compuesto:



Este compuesto es reaccionado para convertir - R^{100} en R^1 . En incorporaciones donde R^{100} es un alcoxicarbonil, entonces el grupo es típicamente primeramente convertido a un ácido carboxílico (e.g., usando una base tal como un hidróxido de metal alcalino como NaOH o KOH) y luego reduciendo a hidroximetil usando un agente reductor apropiado (e.g., NaBH_4). El grupo es entonces transformado a R^1 haciendo reaccionar el grupo hidroximetil con R^3 y, si es necesario, a través de un paso intermedio para aumentar la reactividad del grupo hidroximetil (e.g., transformando hidroximetil en cloro metil usando SOCl_2 o metano sulfonyl cloruro) antes de la reacción con R^3 . Valores ejemplares de R^3 incluyen morfolina y 1H-1,2,4-triazol. El compuesto siguiendo estos pasos es representado por la siguiente estructura:



El grupo nitro es reducido a través de la reacción con un agente reductor adecuado, tal como Pd/H₂ o hidrosulfuro de sodio, para formar el siguiente compuesto:



5

Este compuesto es reaccionado con el deseado R₂,R₃-substituido tiazol ácido carboxílico (e.g., 4-metil-2-piridil-3-il tiazol ácido carboxílico), típicamente en presencia de un agente catalizador (e.g., SOCl₂) para formar el producto compuesto.

10

Las transformaciones químicas sintéticas y las metodologías útiles en la síntesis de los compuestos sirtuina- moduladores aquí descritos son conocidas en el arte e incluyen, por ejemplo, las descritas en R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations* (1989); T. W. Greene and P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2d. Ed. (1991); L. Fieser and M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis* (1994); and L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* (1995).

15

En una incorporación ejemplar, un compuesto sirtuina-modulador puede atravesar la membrana citoplasmática de la célula. Por ejemplo, un compuesto puede tener una permeabilidad celular de al menos alrededor de 20%, 50%,
5 75%, 80%, 90% o 95%.

Los compuestos sirtuina- moduladores aquí descritos pueden también tener una o más de las siguientes características: el compuesto debe ser esencialmente no tóxico para una célula o un sujeto, el compuesto sirtuina-modulador puede ser una molécula orgánica o una pequeña molécula de 2000
10 amu o menos, un compuesto debe tener una vida media bajo condiciones atmosféricas normales de al menos alrededor de 30 días, 60 días, 120 días, 6 meses o un año; un compuesto sirtuina – modulador debe ser más estable en solución que el resveratrol por al menos un factor de alrededor de 50%, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 30 veces o 100 veces; un compuesto sirtuina –
15 modulador debe promover la des-acetilación del factor de reparación DNA Ku70, un compuesto sirtuina-modulador debe promover la des – acetilación de RelA/p65; un compuesto sirtuina-modulador debe incrementar las tasas de rotación general y realzar la sensibilidad de las células a la apoptosis TNF-inducida.

En ciertas incorporaciones, un compuesto sirtuina-modulador no tiene
20 habilidad sustancial alguna para inhibir una histina des-acetilasa (HDACs) clase I, una HDAC clase II, o HDACs I y II, a concentraciones (e.g., in vivo) efectivas para modular la actividad des-acetilasa de la sirtuina. Por ejemplo, en incorporaciones preferenciales, el compuesto sirtuina-modulador es un
25 compuesto sirtuina-activador y es escogido para tener un EC_{50} para activar la actividad sirtuina – des- acetilasa que es al menos 5 veces menos que la EC_{50} para la inhibición de una HDAC I y/o HDAC II y aún más preferiblemente al menos 10 veces, 100 veces, o hasta 1000 veces menos. Métodos para ensayar la actividad HDAC I y/o HDAC II son bien conocidos en el arte y kits para
30 realizar dichos ensayos pueden ser adquiridos comercialmente en el mercado.

Ver, e.g., BioVision, Inc. (Mountain View, CA; www.biovision.com) and Thomas Scientific (Swedesboro, NJ; www.tomassci.com).

En ciertas incorporaciones, un compuesto sirtuina-modulador no tiene ninguna habilidad sustancial para modular homólogos sirtuina. En una
5 incorporación, un activador de una proteína sirtuina humana puede no tener ninguna habilidad sustancial para activar una proteína sirtuina de eucariotas inferiores, particularmente levaduras o patógenos humanos, a concentraciones (e.g., in vivo) efectivas para activar la actividad des-acetilasa de la sirtuina humana. Por ejemplo, un compuesto sirtuina - activador puede ser escogido
10 para tener un EC_{50} para activar una sirtuina humana, tal como SIRT1 y/o SIRT3, actividad des-acetilasa que es al menos 5 veces menor que la EC_{50} para activar una sirtuina de levadura tal como una Sir2 (tal como *Candida*, *S. cerevisiae*, etc) y aún más preferiblemente al menos 10 veces, 100 veces o hasta 1000 veces menos.

15 En otra incorporación, un inhibidor de una proteína sirtuina de eucariotas inferiores, particularmente de levadura o de patógenos humanos, no tiene habilidad sustancial alguna para inhibir una proteína sirtuina de humanos a concentraciones (e.g., in vivo) efectivas para inhibir la actividad des-acetilasa de una proteína sirtuina de un eucariota inferior. Por ejemplo, un compuesto
20 sirtuina- inhibidor puede ser escogido para tener un IC_{50} para inhibir una sirtuina humana, , tal como SIRT1 y/o SIRT3, actividad des- acetilasa qué es al menos 5 veces menos que la IC_{50} para la inhibición de una sirtuina de levadura , tal como Sir2 (tal como *Candida*, *S. cerevisiae*, etc) y aún más preferiblemente al menos 10 veces, 100 veces o hasta 1000 veces menos.

25 En ciertas incorporaciones, un compuesto sirtuina-modulador puede tener la habilidad de modular uno o más homólogos de proteínas sirtuina, tales como, por ejemplo, una o más de humana SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, o SIRT7. En una incorporación, un compuesto sirtuina-modulador tiene la habilidad para modular ambas, una proteína SIRT1 y una SIRT3.

En otras incorporaciones, un modulador SIRT1 no tiene habilidad sustancial alguna para modular otros homólogos de proteínas sirtuina, tales como por ejemplo, uno o más de SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, o SIRT7 humanos

5

SIRT7 a concentraciones (e.g., in vivo), efectivas para modular la actividad desacetilasa de SIRT1 humano. Por ejemplo, un compuesto modulador de sirtuina puede ser elegido para que tenga un ED_{50} para modular la actividad desacetilasa de SIRT1 humano de al menos 5 veces menos que el ED_{50} para modular uno o más SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 o SIRT7 humanos, y de forma aún más preferible de al menos 10 veces, 100 veces, o incluso 100 veces menos. En una incorporación, un modulador SIRT1 no tiene ninguna habilidad sustancial para modular una proteína SIRT3.

15 En otras incorporaciones, un modulador SIRT3 no tiene ninguna habilidad sustancial para modular otros homólogos de proteína sirtuina, como, por ejemplo, uno o más SIRT1, SIRT2, SIRT4, SIRT5, SIRT6, o SIRT7 humanos a concentraciones (e.g., in vivo), efectivas para modular la actividad desacetilasa de SIRT3 humano. Por ejemplo, un compuesto modulador de sirtuina puede ser
20 elegido para tener un ED_{50} para modular una actividad desacetilasa de SIRT3 humano que sea al menos 5 veces menos que el ED_{50} para modular una o más SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT6, o SIRT7 humana, y aún más preferible al menos 10 veces, 100 veces o incluso 1000 veces menos. En una incorporación, un modulador SIRT3 no tiene ninguna habilidad sustancial para
25 modular una proteína SIRT1.

En ciertas incorporaciones, un compuesto modulador de sirtuina puede tener una afinidad de unión a una proteína sirtuina de unos $10^{-9}M$, $10^{-10}M$, $10^{-11}M$, $10^{-12}M$ o menos. Un compuesto modulador de sirtuina puede reducir (activador) o incrementar (inhibidor) el K_m aparente de una proteína sirtuina para su sustrato o

NAD + (u otro cofactor), el Km aparente de una proteína sirtuina para su sustrato o NAD + (u otro cofactor) por un factor de al menos 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 50, o 100. En ciertas incorporaciones, los valores Km son determinados usando el ensayo de espectometría de masa descrito en este documento. Los compuestos preferidos de activación reducen el Km de un sirtuina por su sustrato o cofactor a un grado superior que el causado por el resveratrol a una concentración comparativamente inferior. Un compuesto modulador de sirtuina puede incrementar el Vmax de una proteína sirtuina por un factor de al menos 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 50 o 100. Un compuesto modulador de sirtuina puede tener un ED50 para modular la actividad des – acetilasa de un SIRT1 y / o proteína SIRT3 de menos de unos nM, menos de unos 10 nM, menos de unos 100 nM, menos de unos 1 µM, menos de unos 10 µM, menos de unos 100 µM, o a partir de unos 1-10 nM, a partir de unos 10 - 100 nM, a partir de unos 0,1 - 1 µM, a partir de unos 1-10 µM o a partir de unos 10 - 100 µM. Un compuesto modulador de sirtuina puede modular la actividad des – acetilasa de una proteína SIRT1 y / o SIRT3 por un factor de al menos 5, 10, 20, 30, 50, o 100, como se mide en un ensayo celular o en un ensayo basado en células. Un compuesto activador de sirtuina puede causar al menos una inducción superior de la actividad des – acetilasa de una proteína sirtuina por un factor del 10 %, 30 %, 50 %, u 80 %, así como un factor dos veces superior, cinco veces superior, 10 veces superior, 50 veces superior o 100 veces superior de la actividad des - acetilasa de una proteína sirtuina relativa a la misma concentración de resveratrol. Un compuesto modulador de sirtuina puede tener un ED50 para modular SIRT5 que sea superior al menos 10 veces, 20 veces, 30 veces, 50 veces que aquel para modular SIRT1 y / o SIRT3.

Usos Ejemplares

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

En ciertas incorporaciones, la invención provee métodos para usar compuestos moduladores de sirtuina donde los compuestos moduladores de sirtuina activan una proteína sirtuina, e.g., incrementan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina. Los compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina puede ser útiles para una variedad de aplicaciones terapéuticas incluyendo, por ejemplo, incrementar la longevidad de una célula, y tratar y / o prevenir una amplia gama de enfermedades o desórdenes, incluyendo, por ejemplo, enfermedades o desórdenes relativos al envejecimiento, estrés, diabetes, obesidad, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad cardiovascular, desórdenes del flujo sanguíneo, inflamación, cáncer, etc. Los métodos comprenden la administración a un sujeto en necesidad de ello, una cantidad farmacéuticamente eficiente de un compuesto modulador de sirtuina, e.g., un compuesto activador de sirtuina.

Aunque los Aplicantes no desean ser restringidos por teoría, se cree los activadores de la invención instantáneamente pueden interactuar con una sirtuina en la misma locación dentro de la proteína sirtuina (e.g. sitio activo o sitio afectando el K_m o V_{max} del sitio activo). Se cree que esta es la razón por la que ciertas clases de activadores sirtuina e inhibidores pueden tener una similitud estructural sustancial.

En ciertas incorporaciones, los compuestos moduladores de sirtuina descritos aquí pueden ser tomados solos o en combinación de otros compuestos. En una incorporación, una mezcla de dos o más compuestos moduladores de sirtuina puede ser administrada a un sujeto en necesidad de la misma. En otra incorporación, un compuesto modulador de sirtuina que incrementa el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina puede ser administrado con uno o más de los siguientes compuestos: resveratrol, buteina, fisetin, piceatanol o quercetina. En una incorporación ejemplar, un compuesto modulador de sirtuina que incrementa el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina puede ser administrado en combinación con ácido nicotínico. En otra incorporación, un compuesto modulador de sirtuina que reduce el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina

puede ser administrado con uno o más de los siguientes compuestos: nicotinamida (NAM), suramina; NF023 (un antagonista de proteína G); NF279 (un antagonista de receptor purinérgico); Trolox (6 – hidroxí – 2, 5,7,8, tetrametilcroman – 2 carboxílico ácido); (-) epigallocatequina (hidroxí en los sitios

5 3, 5, 7, 3', 4', 5'); (-) - galato epigallocatequino (sitios Hidroxí 5, 7, 3', 4', 5' y ester galato en 6); cloruro cianurino (3,5,7,3',4'- cloruro pentahidroxiflavilio); cloruro delfinidino (3,5,7,3',4',5'-hexahidroxiflavilio cloruro); miricetina (cannabicoetina; 3,5,7,3',4',5'-hexahidroxiflavona); 3,7,3',4',5'-pentahidroxiflavona gossipetina (3,5,7,8,3',4'-hexahidroxiflavona), sirtinol; y esplitomicina. En otra incorporación

10 más, uno o más compuestos moduladores de sirtuina pueden ser administrados con uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento o prevención de varias enfermedades, incluyendo, por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad cardiovascular, bloqueo del flujo sanguíneo, inflamación, obesidad, estrés, envejecimiento, etc. En varias incorporaciones, las

15 terapias de combinación comprendiendo un compuesto modulador de sirtuina pueden referirse a (1) composiciones farmacéuticas que comprendan uno o más compuestos moduladores de sirtuina en combinación con uno o más agentes terapéuticos (e.g., uno o más agentes terapéuticos descritos aquí); y (2) co –

20 administración de uno o más compuestos moduladores de sirtuina con uno o más agentes terapéuticos donde el compuesto modulador de sirtuina y el agente terapéutico no han sido formulados en las mismas composiciones (pero pueden estar presentes en el mismo conjunto o paquete, como una paquete con cámaras, contenedores conectados sellados de forma separada) que puedan ser separadas por el usuario, o un kit donde el (los) compuestos sirtuina y otro (s)

25 agente (s) terapéutico (s) estén en vasija (s) separada (s). Cuando se usen formulaciones separadas, el compuesto modulador de sirtuina puede ser administrado simultáneamente, luego, antes de, o en combinación con la administración de otro agente terapéutico.

En ciertas incorporaciones, los métodos para reducir, prevenir o tratar las

30 enfermedades o desórdenes usando un compuesto modulador de sirtuina pueden también comprender incrementar el nivel de proteína de un sirtuina, tal

como los SIRT1, SIRT2 y / o SIRT3 humanos, u homólogos de los mismos. El incremento de los niveles de proteínas puede ser logrado introduciendo una célula en una o más copias de un ácido nucleico que codifique una sirtuina. Por ejemplo, el nivel de una sirtuina puede ser incrementado en una célula de mamífero introduciendo en la célula de mamífero un ácido nucleico que codifique la sirtuina, e.g., incrementando el nivel de SIRT1 introduciendo un ácido nucleico codificando la secuencia de amino ácidos mencionada en GenBank Acceso No. NP_036370 y / o incrementando el nivel de SIRT3 introduciendo un ácido nucleico codificando la secuencia de amino ácidos mencionada en GenBank Acceso No. AAH01042.

Un ácido nucleico que sea introducido a una célula para incrementar el nivel de proteína de una sirtuina puede codificar una proteína que sea al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 % idéntica a la secuencia de una sirtuina, e.g., proteína SIRT1 y / o SIRT3. Por ejemplo, el ácido nucleico codificando la proteína puede tener al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o

99 % idéntico a un ácido nucleico codificando una proteína SIRT1 (e.g. GenBank Acceso No. NM_012238) y / o SIRT3 (e.g., GenBank Acceso No. BC001042). El ácido nucleico también puede ser un ácido nucleico que hidridice, preferiblemente, condiciones de hibridación estrictas, a un ácido nucleico codificando un tipo comodín de sirtuina, e.g., proteína SIRT1 y / o SIRT3. Las condiciones de hibridización estrictas pueden incluir la hibridización y una limpieza en 0.2 x SSC a 65 ° C. Cuando se usa un ácido nucleico que codifique una proteína que sea diferente a una proteína sirtuina de tipo comodín, tal como una proteína que sea un fragmento de un tipo comodín de sirtuina, la proteína es, de forma preferible, biológicamente activa, e.g, es capaz de des - acetilación. No es necesario expresar en una célula una porción de la sirtuina que sea biológicamente activa. Por ejemplo, una proteína que difiera del tipo comodín SIRT1 teniendo GenBank Acceso No. NP_036370, preferiblemente contiene la estructura núcleo del mismo. La estructura núcleo a veces se refiere a los amino

– ácidos 62-293 de GenBank Acceso No. NP_036370, los cuales son codificados por los nucleótidos 237 al 932 of GenBank Acceso No. NM_012238, que comprende la atadura NAD así como los dominios de atadura de sustratos. El dominio núcleo de SIRT1 puede también referirse a los amino ácidos 261 a 447 de GenBank Acceso No. NP_036370, los cuales son codificados por los nucleótidos 834 a 1394 de GenBank Acceso No. NM_012238; hasta los amino ácidos 242 a 493 de GenBank Acceso No. NP_036370, que son codificados por los nucleótidos 777 a 1532 de GenBank Acceso No. NM_012238; o hasta los amino ácidos 254 a 495 de GenBank Acceso No. NP_036370, que son codificados por los nucleótidos 813 a 1538 de GenBank Acceso No. NM_012238. Si una proteína retiene una función biológica, e.g., capacidades de des – acetilación, puede ser determinado de acuerdo a métodos conocidos en el arte.

En ciertas incorporaciones, los métodos para reducir, prevenir, o tratar las enfermedades o desórdenes usando un compuesto modulador de sirtuina pueden también comprender reducir el nivel de proteína de una sirtuina, como la SIRT1, o SIRT2 humana y / o SIRT3, u homólogos de las mismas. Reducir un nivel de proteína sirtuina puede ser logrado de acuerdo a métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, un siRNA, un ácido nucleico antisentido, o un ribosoma apuntado a la sirtuina puede ser expresado en la célula. Una sirtuina negativa mutante, e.g., una mutante que no es capaz de des – acetilar, puede también ser producida. Por ejemplo la mutación H363V de SIRT1, descrita, e.g., en Luo et al. (2004) Cell 107:137 puede ser usada. De forma alternativa, agentes que inhiban la transcripción pueden ser usados.

Los métodos para modular los niveles de proteína sirtuina pueden también incluir métodos para modular la transcripción de genes codificando sirtuinas, métodos para estabilizar / desestabilizar los mRNAs correspondientes, y otros métodos conocidos en el arte.

Envejecimiento / Estrés

En una incorporación, la invención provee un método para extender el tiempo de vida de una célula, extendiendo la capacidad proliferativa de una célula, haciendo más lento el envejecimiento de una célula, promoviendo la supervivencia de una célula, postergando la senilidad de una célula, imitando los efectos de la restricción calórica, incrementando la resistencia de la célula al estrés, o previniendo la apoptosis de una célula, contactando la célula con un compuesto modulador de sirtuina de la invención que incrementa el nivel y / o la actividad de una proteína sirtuina. En una incorporación ejemplar, los métodos comprenden contactar la célula con un compuesto activador de sirtuina.

Los métodos descritos aquí pueden ser usados para aumentar la cantidad de tiempo que las células, de forma particular, las células primarias (i.e., células obtenidas a partir de un organismo, por ejemplo, un humano), puedan ser mantenidas con vida en un cultivo de células. Las células madre embrionarias (ES) y las células pluri potenciales, y las células diferenciadas de las mismas, también pueden ser tratadas con un compuesto modulador de sirtuina que incrementa el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina para mantener las células, o la progenie de las mismas, en cultivo por períodos más largos de tiempo. Dichas células también pueden ser usadas para ser trasplantadas a un sujeto, e.g., posterior modificación ex vivo.

En una incorporación, las células que se pretende preservar por períodos largos de tiempo pueden ser tratadas con un compuesto modulador de sirtuina que incrementa el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina. Las células pueden estar en suspensión (e.g., células sanguíneas, suero, medio de crecimiento biológico, etc.) o en tejidos u órganos. Por ejemplo, la sangre recolectada de un individuo para propósitos de transfusión puede ser tratada con un compuesto modulador de sirtuina que incrementa el nivel y / o la actividad de una proteína sirtuina para preservar las células sanguíneas por períodos más largos de

tiempo. De forma adicional, la sangre a ser usada para propósitos forenses también puede ser preservada usando un compuesto modulador de sirtuina que incrementa el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina. Otras células que pueden ser tratadas para extender su período de vida o para ser protegidas
5 contra la apoptosis incluyen a las células para consumo, e.g., células de mamíferos no humanos (tal como carne) o células de plantas (tales como vegetales).

Los compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden también ser aplicados durante el desarrollo y las
10 fases de crecimiento en mamíferos, plantas, insectos o micro – organismos, en orden de, e.g. alterar, retardar o acelerar los procesos de desarrollo y / o crecimiento.

En otra incorporación, los compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o la actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados para tratar
15 células útiles para el trasplante o la terapia celular, incluyendo, por ejemplo, injertos de tejidos sólidos, trasplantes de órganos, suspensiones de células, células de médula ósea, etc. Las células o tejido pueden ser un auto - injerto, un alo - injerto, un injerto sintético o un xeno – injerto. Las células o tejido pueden ser tratadas con el compuesto modulador de sirtuina antes de la administración /
20 implantación de forma concurrente con la administración / implantación, y / o post – administración / implantación en un sujeto. Las células o tejido pueden ser tratadas antes de la remoción de las células del individuo donante, ex vivo, luego de la remoción de las células o tejidos a partir del individuo donante, o post implantación al recipiente. Por ejemplo, el donante o individuo recipiente puede
25 ser tratado de forma sistemática con un compuesto modulador de sirtuina o puede tener un subconjunto de células / tejidos tratados de forma local con un compuesto modulador de sirtuina que incrementa el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina. En ciertas incorporaciones, las células o tejido (o individuos donantes / recipientes) pueden, de forma adicional, ser tratados con otro agente

terapéutico útil para prolongar la supervivencia del injerto, tal como, por ejemplo, un agente inmunosupresor, una citoquina, un agente angiogénico, etc.

En otras incorporaciones más, las células pueden ser tratadas con un compuesto modulador de sirtuina que incremente el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina in vivo, e.g., para incrementar su período de vida o prevenir la apoptosis. Por ejemplo, la piel puede ser protegida del envejecimiento (e.g., se puede evitar el desarrollo de arrugas, prevenir la pérdida de elasticidad, etc.), tratando la piel o las células epiteliales con un compuesto modulador de sirtuina que incremente el nivel y / o la actividad de una proteína sirtuina. En una incorporación ejemplar, la piel es contactada con una composición farmacéutica o cosmética comprendiendo un compuesto modulador de sirtuina que incremente el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina. Las afecciones de piel ejemplares o las condiciones de piel que puedan ser tratadas en concordancia con los métodos descritos aquí incluyen desórdenes o enfermedades asociadas con o causadas por inflamación, daño causado por el sol o envejecimiento natural. Por ejemplo, las composiciones encuentran utilidad en la prevención o tratamiento de la dermatitis por contacto (incluyendo la dermatitis de contacto irritante y la dermatitis de contacto alérgico), la dermatitis atópica (también conocida como eczema alérgico), la queratosis actínica, desórdenes de queratinización (incluyendo eczema), enfermedades de epidermolisis bulosa (incluyendo el eritema multiforme y el eritema nodoso), daño causado por el sol u otras fuentes de luz, lupus discoide eritematoso, psoriasis, dermatomiositis, cáncer de piel y los efectos del envejecimiento natural. En otra incorporación, los compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados para el tratamiento de heridas y / o quemaduras para promover la sanación, incluyendo, por ejemplo, quemaduras de primer, segundo o tercer grado y / o quemaduras térmicas, químicas o eléctricas. Las formulaciones pueden ser administradas de forma tópica, a la piel o tejido mucoso. Las formulaciones tópicas comprendiendo uno o más compuestos

144

moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden también ser usados como composiciones preventivas, e.g. quemo – preventivas. Cuando son usadas en un método quemo – preventivo, la piel susceptible es tratada antes para cualquier condición visible en un individuo particular.

Los compuestos moduladores de sirtuina pueden ser administrados de forma local o de forma sistemática a un sujeto. En una incorporación, un compuesto modulador de sirtuina es administrado de forma local a un tejido u órgano de un sujeto por medio de inyección, formulación tópica, etc.

En otra incorporación, un compuesto modulador de sirtuina que incremente el nivel y / o la actividad de una proteína sirtuina puede ser usado para tratar o prevenir una enfermedad o condición inducida o exacerbada por la senilidad celular en un sujeto; los métodos para reducir la tasa de senilidad de un sujeto, e.g., luego de ocurrir la senilidad; métodos para extender el período de vida de un sujeto; métodos para tratar o prevenir una enfermedad o condición relacionada con el período de vida; métodos para tratar o prevenir una enfermedad o condición relacionada con la capacidad proliferativa de las células; y métodos para tratar o prevenir una enfermedad o condición resultante a partir de daño o muerte celular. En ciertas incorporaciones, el método no actúa reduciendo la rata de ocurrencia que disminuya el período de vida de un sujeto. En ciertas incorporaciones, un método no actúa reduciendo la letalidad causada por una enfermedad, tal como el cáncer.

25

En otra incorporación más, un compuesto modulador de sirtuina que aumente el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina puede ser administrado a un sujeto para incrementar, de forma general, el período de vida de sus células y para

proteger sus células contra el estrés y / o contra la apoptosis. Se cree que tratar a un sujeto compuesto descrito aquí es similar a exponer al sujeto a hormesis, i.e., un estrés leve que beneficioso para los organismos y que puede extender su período de vida.

5

Los compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser administrados a un sujeto para prevenir la senilidad y consecuencias relacionadas a la vejez o enfermedades, tal como infarto, enfermedad cardíaca, falla cardíaca, artritis, alta presión sanguínea, y la enfermedad de Alzheimer. Otras condiciones que pueden ser tratadas incluyen a los desórdenes oculares, e.g., asociados con la senilidad del ojo, tal como las cataratas, glaucoma y degeneración macular.

10

Los compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o la actividad de una proteína sirtuina también pueden ser administrados a sujetos para el tratamiento de enfermedades, e.g., enfermedades crónicas, asociadas con la muerte celular, en orden de proteger a las células de la muerte celular. Enfermedades ejemplares incluyen aquellas asociadas con la muerte de células neuronales, disfunción neuronal, o muerte o disfunción de células musculares, tal como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica, y la distrofia muscular; SIDA, hepatitis fulminante, enfermedades relacionadas con la degeneración del cerebro, tal como la enfermedad de Creutzfeld – Jakob, retinitis pigmentosa, y degeneración cerebelar; mielodisplasias tal como la anemia aplásica, enfermedades isquémicas tal como el infarto al miocardio; enfermedades hepáticas tal como la hepatitis alcohólica, hepatitis B y hepatitis C; enfermedades en las articulaciones como la osteoartritis, arterosclerosis, alopecia; daño a la piel debido a la luz ultravioleta; liquen plano; atrofia de la piel; catarata; y rechazos de injertos. La

15

20

25

muerte celular también puede ser causada por cirugía, terapia de drogas, exposición química o exposición a la radiación.

Los compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina también pueden ser administrados a un sujeto sufriendo de un enfermedad aguda, e.g., daño a un tejido u órgano, e.g., un sujeto sufriendo un infarto al miocardio o un sujeto sufriendo una lesión a la médula ósea. Los compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina también pueden ser usados para reparar el hígado de un alcohólico.

10

Enfermedad Cardiovascular

En otra incorporación, la invención provee un método para tratar y / o prevenir una enfermedad cardiovascular administrando a un sujeto en necesidad del mismo un compuesto modulador de sirtuina que incremente el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina.

15

Las enfermedades cardiovasculares que pueden ser tratadas o prevenidas usando los compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina incluyen la cardiomiopatía o miocarditis; tal como la cardiomiopatía idiopática, la cardiomiopatía metabólica, la cardiomiopatía alcohólica, la cardiomiopatía inducida por drogas, la cardiomiopatía isquémica, y la cardiomiopatía hipertensiva. También tratables o prevenibles usando compuestos y métodos descritos aquí son los desórdenes ateromatosos de las principales vías sanguíneas (enfermedad macrovascular) como la aorta, las arterias coronarias, las arterias carótidas, las arterias cerebrovasculares, las arterias renales, las arterias ilíacas, las arterias femorales y las arterias politeales. Otras enfermedades vasculares que pueden ser tratadas o prevenidas incluyen aquellas relacionadas con la agregación de

20
25

plaquetas, las arteriolas retinianas, las arteriolas glomerulares, los vasos nervorum, las arteriolas cardíacas, y los lechos capilares asociados del ojo, el riñón, el corazón, y los sistemas nerviosos periféricos y centrales. Los compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden también ser usados para incrementar el nivel de HDL en el plasma sanguíneo de un individuo.

Otros desórdenes más que pueden ser tratados con compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o la actividad de una proteína sirtuina incluyen la estenosis, e.g., siguiendo una intervención coronaria, y los desórdenes relativos a un nivel anormal de colesterol de alta y baja densidad.

En una incorporación, un compuesto modulador de sirtuina que aumente el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina puede ser administrado como parte de una combinación terapéutica con otro agente cardiovascular. En otra incorporación, un compuesto modulador de sirtuina que incremente el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina puede ser administrado como parte de una combinación terapéutica con un agente anti - arritmia. En otra incorporación, un compuesto modulador de sirtuina que incremente el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina puede ser administrado como parte de una combinación terapéutica con otro agente cardiovascular.

Muerte Celular / Cáncer

Los compuestos moduladores de sirtuina que aumenten el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser administrados a sujetos que hayan recibido, de forma reciente, o tengan alta probabilidad de recibir una dosis de radiación o toxina. En una incorporación, la dosis de radiación o toxina es recibida como parte de un procedimiento médico o relacionado al trabajo, e.g., administrada

como una medida profiláctica. En otra incorporación, la exposición a toxina o radiación es recibida de forma no intencional. En dicho caso, el compuesto es administrado, de forma preferible, tan pronto como sea posible luego de la exposición para inhibir la apoptosis y el desarrollo subsecuente del síndrome de radiación aguda.

Los compuestos moduladores de sirtuina también pueden ser usados para tratar y / o prevenir el cáncer. En ciertas incorporaciones, los compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados para tratar y / o prevenir el cáncer. La restricción de calorías ha sido relacionada a la reducción en la incidencia de desórdenes relativos a la edad, incluyendo el cáncer.

De acuerdo con esto, un incremento en el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina puede ser útil para tratar y / o prevenir la incidencia de desórdenes relacionados con la edad, tal como, por ejemplo, el cáncer. Cánceres ejemplares que pueden ser tratados usando un compuesto modulador de sirtuina son aquellos del cerebro y riñón; cánceres dependientes de hormonas incluyendo el cáncer de mamas, cáncer de próstata, cáncer testicular y cáncer ovárico, linfomas y leucemias. En los cánceres asociados con tumores sólidos, un compuesto modulador puede ser administrado de forma directa al tumor: el cáncer de células sanguíneas, e.g. la leucemia, puede ser tratada administrando un compuesto modulador al flujo sanguíneo o a la médula ósea. El crecimiento benigno de células, e.g., las verrugas, también puede ser tratado. Otras enfermedades que pueden ser tratadas incluyen a las enfermedades autoinmunes, e.g. el lupus sistémico eritematoso, la escleroderma y la artritis, en las cuales las células autoinmunes deben ser removidas. Las infecciones virales como el herpes, HIV, los adenovirus, y los desórdenes malignos asociados con el HTLV -1 y los desórdenes benignos también pueden ser tratados por administración de un compuesto modulador de sirtuina. De forma alternativa, las células pueden ser obtenidas a partir de un sujeto, tratado *ex vivo* para remover

ciertas células no deseables, e.g., células cancerosas, y administradas de nuevo al mismo o a un sujeto diferente.

Los agente quimioterapéuticos pueden ser co - administrados con los
5 compuestos moduladores descritos aquí como teniendo actividad anti -
cancerígena, e.g., compuestos que inducen apoptosis, compuestos que reducen
el período de vida o compuestos que hacen a las células sensibles al estrés. Los
agentes quemo - terapéuticos pueden ser usados por si mismos con un
compuesto modulador de sirtuina descrito aquí como inductor de la muerte
10 celular o reductor del período de vida o capaz de incrementar la sensibilidad al
estrés y / o en combinación con otros agentes terapéuticos. De forma adicional a
los quimioterapéuticos convencionales, los compuestos moduladores de sirtuina
descritos aquí también pueden ser usados con RNA antisentido, RNAi u otros
polinucleotidos para inhibir la expresión de los componentes celulares que
15 contribuyen con la proliferación celular no deseada.

Las terapias de combinación comprendiendo compuestos moduladores de
sirtuina y un agente convencional de quimioterapia pueden ser ventajosas sobre
las terapias de combinación conocidas en el arte porque la combinación permite
al agente quimio - terapéutico convencional ejercer un mayor efecto a una dosis
20 menor. En una incorporación preferida, la dosis efectiva (ED_{50}) para un agente
quimioterapéutico, o una combinación de agentes quimioterapéuticos, cuando es
usada en combinación con un compuesto modulador de sirtuina es al menos 2
veces menos que el ED_{50} para el agente quimioterapéutico sólo, e incluso más
preferible a 5 veces, 10 veces, o incluso 25 veces. De forma inversa, el índice
25 terapéutico (TI) para dicho agente quimio - terapéutico o combinación de dicho
agente quimio - terapéutico cuando es usado en combinación con un compuesto
modulador de sirtuina descrito aquí puede ser al menos 2 veces mayor que el TI
para el régimen quimioterapéutico convencional sólo, e incluso más preferible a
5 veces, 10 veces o 25 veces más.

Enfermedades / Desórdenes Neuronales

En ciertos aspectos, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados para tratar

5 pacientes sufriendo enfermedades neurodegenerativas, y lesión traumática o mecánica al sistema nervioso central (CNS), a la médula espinal o el sistema nervioso periférico (PNS). La enfermedad neurodegenerativa involucra, de forma típica, reducciones en la masa y volumen del cerebro humano, que puede ser debido a la atrofia y / o muerte de células cerebrales, que sean mucho más

10 profundas que las que pueden ser atribuidas a una persona saludable que haya sufrido envejecimiento. Las enfermedades neurodegenerativas pueden evolucionar de forma rápida, luego de un período normal de función cerebral normal, debido a degeneración progresiva (e.g., disfunción y muerte de las células nerviosas) de regiones específicas del cerebro. De forma alternativa, las

15 enfermedades neurodegenerativas pueden tener un efecto inmediato, como aquellos atribuibles a los traumas y las toxinas. El efecto de la degeneración cerebral puede preceder la expresión clínica por muchos años.

Ejemplos de enfermedades neurodegenerativas incluyen, pero no están limitadas a, Mal de Alzheimer (AD), Mal de Parkinson (PD), enfermedad de

20 Huntington (HD), esclerosis amiotrófica lateral (ALS, enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad de Lewy difusa en el cuerpo. Corea – acantocitosis, esclerosis primaria lateral, enfermedades oculares (neuritis ocular), neuropatías inducidas por quimioterapia (e.g. a partir de vincristina, paclitaxel, bortezomib), las neuropatías inducidas por diabetes y la ataxia de Friedreich. Los compuestos

25 moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados para tratar estos desórdenes y otros, como se describe abajo.

El mal de Alzheimer es un desorden del sistema nervioso central que resulta en la pérdida de la memoria, comportamiento errático, cambios de personalidad y

una reducción de las habilidades cognitivas. Estas pérdidas están relacionadas con la muerte de un tipo específico de células nerviosas y la ruptura de conexiones y su red conectora (e.g, células gliales) entre ellas. Los primeros síntomas incluyen la pérdida de la memoria a corto plazo, fallas de juicio y cambios en la personalidad. El mal de Parkinson es un desorden del sistema nervioso central que resulta en movimientos del cuerpo descontrolados, rigidez, temblores, y disquinesia, y es asociado con la muerte de células cerebrales en un área del cerebro que produce dopamina. La esclerosis amiotrófica (una enfermedad de las neuronas motoras) es un desorden del sistema nervioso central que ataca las células neuronales motoras, componentes del sistema nervioso central que conectan el cerebro a los músculos.

El mal de Huntington es otra enfermedad neurodegenerativa que causa movimientos no controlados, pérdida de facultades intelectuales, y perturbaciones emocionales. La enfermedad de Tay – Sachs y la enfermedad de Sandhoff son enfermedades de almacenamiento de glicolípidos donde la GM2 gangliósida y los glico – lipídisustratos para la Hexosaminidasa se acumulan en el sistema nervioso y causan una neuro – degeneración aguda.

Es bien sabido que la apoptosis juega un rol en la patogénesis del SIDA en el sistema inmune. Sin embargo, el HIV – 1 también induce la enfermedad neurológica, que puede ser tratada con los compuestos moduladores de sirtuina de la invención.

La pérdida neuronal también es una característica dominante en las enfermedades de prion, como la enfermedad de Creutzfeldt – Jacob en los seres humanos, la enfermedad de las vacas locas en el ganado, la enfermedad de Scrapie en las cabras y chivos, y la encefalopatía felina espongiiforme (FSE) en gatos. Los compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser útiles para tratar o prevenir la pérdida neuronal debido a estas enfermedades previas.

En otra incorporación, un compuesto modulador de sirtuina que incrementa el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina puede ser usado para tratar o prevenir cualquier enfermedad o desorden que involucre la axonopatía. La axonopatía distal es un tipo de neuropatía periférica que resulta en algún desorden metabólico o tóxico de las neuronas del sistema nervioso periférico. Es la respuesta común de los nervios a la ocurrencia de perturbaciones metabólicas o tóxicas, y como tal puede ser causada por enfermedades metabólicas tales como la diabetes, la falla renal, síndromes de deficiencia como malnutrición y alcoholismo, o los efectos de toxinas o drogas. Aquellos con axonopatías distales a menudo presentan perturbaciones de los sensores motores simétricos en forma de guante. Los reflejos en los tendones profundos y las funciones autonómicas del sistema nervioso son también perdidas o disminuidas en las regiones afectadas.

Las neuropatías diabéticas son desórdenes neuropáticos asociados con la diabetes mellitus. Condiciones que son comunes, de forma relativa, que pueden ser asociadas con la neuropatía diabética incluyen la parálisis del tercer nervio, mononeuropatía, mononeuritis múltiple, amiotropía diabética, una polineuropatía dolorosa, neuropatía autonómica, y neuropatía toracoabdominal.

La neuropatía periférica es el término médico para el daño a los nervios del sistema nervioso periférico, que puede ser causado por enfermedades del nervio o por efectos secundarios de enfermedades sistémicas. Las mayores causas de neuropatía periférica incluyen los espasmos, las deficiencias nutricionales, y el HIV, aunque la diabetes es la causa más común.

En una incorporación ejemplar, un compuesto modulador de sirtuina que incrementa el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina puede ser usado para tratar o prevenir la esclerosis múltiple (MS), incluyendo la esclerosis múltiple regresiva, y la esclerosis múltiple monosintomática, y otras condiciones

desmielinisantes, como por ejemplo, la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), o síntomas asociados a la misma.

- En otra incorporación más, un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina puede ser usado para tratar traumas a los nervios, incluyendo trauma debido a enfermedad, lesión (incluyendo intervención quirúrgica), o lesión ambiental (e.g, neurotoxinas, alcoholismo, etc.).

- Los compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina puede también ser útiles para prevenir, tratar y aliviar síntomas de varios desórdenes del sistema nervioso periférico. El término "neuropatía periférica" abarca una amplia gama de desórdenes en los cuales los nervios fuera del cerebro y la médula espinal – nervios periféricos – han sido dañados. La neuropatía periférica también puede ser referida como neuritis periférica, o si muchos nervios están involucrados, los términos polineuropatía o polineuritis pueden ser usados.

- Las enfermedades del sistema nervioso periférico tratables con compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina incluyen a: la diabetes, la lepra, la enfermedad de Charcot – Marie – Tooth, el síndrome de Guillain – Barré y las Neuropatías del Plexo Braquial (enfermedades de la cervical y primeras raíces torácicas, troncos de nervios, y componentes de nervios periféricos del plexo braquial).

- En otra incorporación, un compuesto activador de sirtuina puede ser usado para tratar o prevenir una enfermedad poli – glutamina. Enfermedades poliglutaminas ejemplares incluyen la atrofia muscular Espinobulbar (enfermedad de Kennedy), enfermedad de Huntington (HD), atrofia Dentatorubral – palidoluisana (Síndrome de Haw River), ataxia Espinocerebelar del tipo 1, ataxia Espinocerebelar de tipo 2, ataxia Espinocerebelar de tipo 3 (enfermedad de Joseph - Machado), ataxia Espinocerebelar de tipo 7 y ataxia Espinocerebelar de tipo 17.

En ciertas incorporaciones, la invención provee un método para tratar una célula del sistema nervioso central para prevenir daño en respuesta a una reducción de flujo sanguíneo a la célula. De forma típica, el grado de severidad del daño que puede ser prevenido dependerá en gran parte del grado de reducción en flujo sanguíneo a la célula y la duración de la reducción. En una incorporación, la muerte celular por apoptosis o necrosis puede ser prevenida. En una incorporación más, el daño isquémico, tal como el presente en un edema citotóxico o en la anoxemia de los tejidos del sistema nervioso, puede ser prevenido. En cada incorporación, la célula del sistema nervioso puede ser una célula nerviosa o una célula cerebral.

Otro aspecto involucra la administración de un compuesto activador de sirtuina a un sujeto para tratar una condición isquémica del sistema nervioso central. Un número de condiciones isquémicas del sistema nervioso central pueden ser tratadas por los compuestos activados por sirtuina descritos aquí. En una incorporación, la condición isquémica es un derrame que resulta en cualquier tipo de daño isquémico al sistema nervioso central, tal como muerte celular apoptótica o necrótica, edema citotóxico o anoxia a tejido del sistema nervioso central. El derrame puede impactar cualquier área del cerebro o ser causado por cualquier etiología comúnmente conocida a resultar en la ocurrencia de un derrame. En una alternativa a esta incorporación, el derrame es un derrame del tallo cerebral. En otra alternativa a esta incorporación, el derrame es un derrame cerebelar. En otra incorporación más, el derrame es un derrame embólico. En otra alternativa más, el derrame puede ser un derrame hemorrágico. En una incorporación más, el derrame es un derrame trombótico.

En otro aspecto más, un compuesto activador de sirtuina puede ser activado para reducir el tamaño de infarto del núcleo isquémico siguiendo una condición isquémica del sistema nervioso central. Aún más, un compuesto activador de sirtuina puede también resultar beneficioso al ser administrado con la intención de reducir el tamaño de la penumbra isquémica o la zona transicional siguiendo una condición isquémica del sistema nervioso central.

En una incorporación, un régimen de combinación de drogas puede incluir drogas o compuestos para el tratamiento o prevención de desórdenes neurodegenerativos o condiciones secundarias asociadas a estas condiciones. Así, un régimen de combinación puede incluir uno o más activadores de sirtuina y uno o más agentes anti – neurodegeneración.

Desórdenes de Coagulación Sanguínea

En otros aspectos, los compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados para tratar o prevenir desórdenes de coagulación sanguínea (o desórdenes hemostáticos).

Como se usan de forma intercambiable en este documento, los términos “hemostasis”, “coagulación sanguínea”, y “coagulación de la sangre” se refieren al control del sangramiento, incluyendo las propiedades fisiológicas de la vasoconstricción y coagulación. La coagulación sanguínea asiste en mantener la integridad de la circulación de los mamíferos luego de ser lastimados, sufrir inflamación, enfermedad, defectos congénitos, disfunción u otros problemas. Además, la formación de coágulos sanguíneos no sólo limita el sangrado en el caso de una lesión (hemostasis), sino que también puede llegar a daño serio de los órganos y muerte en el contexto de las enfermedades ateroescleróticas por oclusión de una vena o arteria importante. La trombosis es pues la formación de coágulos sanguíneos en el momento y lugar equivocado.

De acuerdo con esto, la presente invención provee tratamientos anticoagulación y antitrombóticos dirigidos a inhibir la formación de coágulos sanguíneos para prevenir o tratar los desórdenes de coagulación sanguínea, como el infarto al miocardio, derrame, o pérdida de una extremidad por enfermedad arterial periférica o embolismo pulmonar.

Como se usa aquí, de forma intercambiable, “modular o modulación de hemostasis” y “regular o regulación de hemostasis” incluye la inducción (e.g., estimulación o aumento) de hemostasis, así como la inhibición (e.g., reducción o decremento) de hemostasis.

En un aspecto, la invención provee un método para reducir o inhibir la hemostasis en un sujeto administrando un compuesto modulador de sirtuina que incrementa el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina. Las composiciones y métodos discutidas aquí son útiles para el tratamiento o prevención de los desórdenes trombóticos. Como se usa aquí, el término "desorden trombótico" incluye cualquier desorden o condición caracterizada por coagulación excesiva o no deseada o actividad hemostática, o un estado hipercoagulable.

Los desórdenes trombóticos incluyen enfermedades o desórdenes que involucren la adhesión de plaquetas y formación de trombos, y pueden manifestarse como un propensión aumentada a formar trombosis, e.g., un número incrementado de trombosis, trombosis a una edad temprana, tendencia familiar a la trombosis, y trombosis en locaciones inusuales.

En otra incorporación, un régimen de combinación de drogas puede incluir drogas o compuestos para el tratamiento o prevención de desórdenes de coagulación sanguínea o condiciones secundarias asociadas con estas condiciones. Así, un régimen de combinación de drogas puede incluir uno o más compuestos moduladores de sirtuina que aumente el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina y uno o más agentes anti - coagulación o anti - trombosis.

Control de Peso

En otro aspecto, compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados para tratar o prevenir el aumento de peso o la obesidad en un sujeto. Por ejemplo, compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados, por ejemplo, para tratar o prevenir la obesidad hereditaria, la obesidad producto de la dieta, la obesidad relacionada con hormonas, la obesidad relacionada con la administración de medicación, para reducir el peso de un sujeto, o para reducir o prevenir el aumento de peso en un sujeto. Un sujeto en necesidad de dicho tratamiento puede ser un sujeto que se encuentre obeso, tenga probabilidad de volverse obeso, con sobrepeso, o con

probabilidad de tener sobrepeso. Los sujetos que tienen posibilidad de volverse obesos o tener sobrepeso pueden ser identificados, por ejemplo, basándose en historia familiar, genética, dieta, nivel de actividad, toma de medicamentos, o varias combinaciones de estos factores.

- 5 En otras incorporaciones más, los compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser administrados a sujetos sufriendo de una variedad de otras enfermedades y condiciones que pueden ser tratadas o prevenidas promoviendo la pérdida de peso en el sujeto. Dichas enfermedades incluyen, por ejemplo, la alta presión
- 10 sanguínea, la hipertensión, nivel alto de colesterol en la sangre, dislipidemia, diabetes de tipo 2, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, enfermedad coronaria del corazón, angina pectoris, falla congestiva del corazón, derrame, piedras en los riñones, colescistitis y colelitiiasis, gota, osteoartritis, apnea obstructiva del sueño y problemas respiratorios, algunos tipos de cáncer (como el endometrial, de mama, próstata y
- 15 colon), complicaciones de embarazo, pobre salud reproductiva femenina (tal como irregularidad de ciclo, infertilidad, ovulación irregular), problemas de control de la vejiga (como incontinencia por estrés); nefrolitiasis de ácido úrico; desórdenes psicológicos (como depresión, desórdenes de alimentación, imagen corporal distorsionada, y baja auto - estima). Finalmente, los pacientes con SIDA
- 20 pueden desarrollar lipodistrofia o resistencia a la insulina en respuesta a las terapias de combinación para el SIDA.

- En otra incorporación, compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados para inhibir la
- 25 adipogénesis o diferenciación de células grasas, sea in vitro o in vivo. Dichos métodos pueden ser usados para tratar o prevenir la obesidad.

- En otras incorporaciones, los compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados para reducir el apetito y / o incrementar la saciedad, contribuyendo así a evitar
- 30 una ganancia de peso o causando pérdida de peso. Un sujeto en necesidad de

dicho tratamiento puede ser un sujeto que sufre de sobrepeso, es obeso o es un sujeto con alta probabilidad de volverse obeso o presentar sobrepeso. El método puede comprender la administración diaria o interdiaria, semanal, de una dosis, e.g., en forma de una pastilla, a un sujeto. La dosis puede ser una “dosis reductora del apetito”.

En una incorporación ejemplar, compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel o actividad de una proteína sirtuina pueden ser administrados como una terapia de combinación para tratar o prevenir la ganancia de peso o la obesidad. Por ejemplo, uno o más compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o la actividad de una proteína sirtuina pueden ser administrados en combinación con uno o más agentes anti – obesidad.

En otra incorporación, los compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser administrados para reducir una ganancia de peso inducida por drogas. Por ejemplo, un compuesto modulador de sirtuina que incremente el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina puede ser administrado como una terapia de combinación con medicaciones que puedan estimular el apetito o causar ganancia de peso, en particular, ganancia de peso debido a factores distintos a la retención de agua.

20 **Desórdenes Metabólicos / Diabetes**

En otro aspecto, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y / o la actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados para tratar o prevenir un desorden metabólico, como la resistencia a la insulina, un estado pre – diabético, la diabetes de tipo II , y / o complicaciones de los mismos. La administración de un compuesto modulador de sirtuina que incremente el nivel y / o la actividad de una proteína sirtuina puede incrementar la sensibilidad a la insulina y / o reducir los niveles de insulina en un sujeto.

Un sujeto en necesidad de dicho tratamiento puede ser un sujeto que tenga resistencia a la insulina u otro síntoma precursor de la diabetes de tipo II, que

tiene diabetes de tipo II, o que presenta la probabilidad de desarrollar cualquiera de estas condiciones. Por ejemplo, el sujeto puede ser un sujeto teniendo resistencia a la insulina, e.g., teniendo altos niveles de insulina circulante y / o condiciones asociadas, tales como hiperlipidemia, dislipogénesis, 5 hipercolesterolemia, tolerancia a la glucosa disminuida, altos niveles de azúcar en sangre, otras manifestaciones del síndrome X, hipertensión, aterosclerosis y lipodistrofia.

En una incorporación ejemplar, los compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser 10 administrados como una terapia de combinación para tratar o prevenir un desorden metabólico. Por ejemplo, uno o más compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o actividad de una proteína insulina puede ser administrados en combinación con uno o más agentes anti – diabéticos.

15 **Enfermedades Inflamatorias**

En otros aspectos, los compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados para tratar o prevenir una enfermedad o desorden asociado con la inflamación. Los compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o la actividad 20 de una proteína sirtuina pueden ser administrados antes de la ocurrencia, al momento, o luego de la iniciación de la inflamación. Cuando se usan de forma profiláctica, los compuestos son provistos, de forma preferible, antes de cualquier respuesta o síntoma inflamatorio.

La administración de los compuestos puede prevenir o atenuar las respuestas 25 inflamatorias o sus síntomas.

En otra incorporación, los compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o la actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados para prevenir alergias y condiciones respiratorias, incluyendo asma, bronquitis,

fibrosis pulmonar, rinitis alérgica, toxicidad al oxígeno, enfisema, bronquitis crónica, síndrome de estrés respiratorio agudo, y cualquier enfermedad pulmonar crónica obstructiva (COPD). Los compuestos pueden ser usados para tratar la infección crónica por hepatitis, incluyendo la hepatitis B y la hepatitis C.

- 5 De forma adicional, los compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y /o actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados para tratar enfermedades auto – inmunes y / o inflamación asociada con enfermedades auto – inmunes tales como las enfermedades de tejido – órgano autoinmune (e.g. síndrome de Raynaud), esclerodema, miastenia grave, rechazo de
- 10 trasplantes, shock endotóxico, sepsis, psoriasis, eczema, dermatitis, esclerosis múltiple, tiroiditis autoinmune, uveinitis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Addison, enfermedad poli – glandular auto - inmune (también conocida como síndrome auto – inmune poli – glandular), y la enfermedad de Grave.

- En ciertas incorporaciones, uno o más compuestos moduladores de sirtuina que
- 15 incrementan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser tomados solos o en combinación con otros compuestos útiles para tratar o prevenir la inflamación.

Rubicundez

- En otro aspecto, compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y
- 20 / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados para reducir la incidencia o severidad de la rubicundez y / o los calentones que son síntomas de un desorden. Por ejemplo, el método sujeto incluye el uso de compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina, sólo o en combinación con otros agentes, para reducir la incidencia o
- 25 severidad de la rubicundez y / o calentones en pacientes de cáncer. En otras incorporaciones, el método provee el uso de compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina para reducir la incidencia o severidad de la rubicundez y / o los calentones en mujeres menopáusicas y post – menopáusicas.

En otro aspecto, los compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados como una terapia para reducir la incidencia o severidad de la rubicundez y / o los calentones que son efectos secundarios de otra terapia de drogas, e.g. rubicundez inducida por drogas. En ciertas incorporaciones, un método para tratar y / o prevenir rubicundez inducida por drogas incluye la administración a un paciente que la necesite, de una formulación comprendiendo al menos un compuesto que induzca la rubicundez y al menos un compuesto modulador de sirtuina que incremente el nivel y / o la actividad de una proteína sirtuina. En otras incorporaciones, un método para tratar la rubicundez inducida por drogas comprende la administración separada de uno o más compuestos que induzcan la rubicundez y uno o más compuestos de modulación de la rubicundez, e.g., donde el compuesto de modulación de sirtuina y el agente inducción de rubicundez no han sido formulados en las mismas composiciones. Cuando usamos formulaciones separadas, el compuesto modulador de sirtuina puede ser administrado (1) al mismo momento que se administra el agente que induce la rubicundez, (2) de forma intermitente con el agente de inducción de rubicundez, (3) de forma distante relativa a la administración del agente de inducción de rubicundez, (4) de forma previa a la administración al agente de inducción de rubicundez, (5) de forma subsecuente a la administración del agente de inducción de rubicundez, y (6) varias combinaciones de lo mismo. Los agentes de inductores de rubicundez ejemplares incluyen, por ejemplo, la niacina, falocefeno, antidepresivos, anti - psicóticos, quimioterapias, bloqueadores de canales de calcio, y antibióticos.

En una incorporación, los compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o la actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados para reducir los efectos secundarios de rubicundez de un vasodilatador o un agente antilipémico (incluyendo agente antiolesterolémicos y agentes lipotrópicos). En una incorporación ejemplar, un compuesto modulador de sirtuina que incremente el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina puede ser usado para reducir la rubicundez asociada con la administración de niacina.

En otra incorporación, la invención provee un método para tratar y / o prevenir la hiperlipidemia con efectos de rubicundez reducidos. En otra incorporación representativa, el método involucra el uso de compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina para

5 reducir los efectos secundarios de rubicundez de los anti – depresivos o un agente anti – psicótico. Por ejemplo, compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados en conjunción (administrados de forma separada o junta) con un inhibidor de reabsorción de serotonina, o un antagonista de receptor 5HT₂.

- 10 En ciertas incorporaciones, los compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados como parte de un tratamiento con un inhibidor de reabsorción de serotonina (SRI) para reducir la rubicundez. En otra incorporación representativa mas, los compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o actividad de
- 15 una proteína sirtuina pueden ser usados para reducir los efectos de rubicundez secundarios de los agentes de quimioterapia, como la ciclo – fosfamida y el tamoxifen.

En otra incorporación, los compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados para reducir los

20 efectos secundarios de rubicundez de bloqueadores de canales de calcio , como la amlodipina.

En otra incorporación, los compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados para reducir los efectos secundarios de rubicundez de los antibióticos. Por ejemplo, los

25 compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados en combinación con levofloxacin.

Desórdenes Oculares

Un aspecto de la presente invención es un método para inhibir, reducir o tratar la reducción de visión administrando a un paciente una dosis terapéutica de un

modulador de sirtuina seleccionado a partir de un compuesto mencionado aquí, o una sal farmacéuticamente aceptable, prodroga, o metabolito derivado de la misma.

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

En ciertos aspectos de la invención, el desmejoramiento de la visión es causado por daño retiniano. En incorporaciones particulares, el daño retiniano es causado por perturbaciones en el flujo sanguíneo al ojo (e.g., arteriosclerosis, vasculitis). En incorporaciones particulares, el daño retiniano es causado por disrupción de la mácula (e.g., degeneración macular exudativa o no exudativa).

Enfermedades retinianas ejemplares incluyen la Degeneración Macular Relacionada a la Edad, Exudativa, Degeneración Macular Relacionada con la Edad No Exudativa, Prótesis Retiniana Electrónica y Degeneración Macular Relacionada a Edad de Trasplante RPE, Epiteliopatía Aguda Multifocal de Pigmento Flacoide, Necrosis Retiniana Aguda, Enfermedad de Best, Oclusión de la Rama de la Arteria Retiniana, Oclusión de la Rama de la Vena Retiniana, Cáncer Asociado y Retinopatías Auto - inmunes Relacionadas, Oclusión de la Arteria Retiniana Central, Oclusión de la Vena Retiniana Central, Corioretinopatía Serosa Central, Enfermedad de Eales, Membrana Epimacular, Degeneración de Capilares, Macro - aneurisma, Edema Macular Diabético, Edema Macular Irvine - Gass, Hueco Macular, Membranas Neovasculares Subretinianas, Neuro - retinitis Difusa Unilateral Subaguda, Edema Macular Cistoide No - pseudofaquico, Síndrome de Histoplasmosis Ocular Presumida, Despegue Retiniano Exudativo, Despegue Retiniano Post - operativo, Despegue Retiniano Proliferativo, Despegue Retiniano Regmatógeno, Despegue

RetinianoTraccional, Retinitis Pigmentosa, Retinitis CMV, Retinoblastoma, Retinopatía de Premadurez, Retinopatía causada por Antecedentes Diabéticos, Retinopatía Diabética Proliferativa, Retinopatía Hemoglobinopática, Retinopatía de Pursthoer, Retinopatía de Valsalva, Retinosquiasis Juvenil, Retinosquiasis Senil,
 5 Síndrome de Terson y Síndromes de Punto Blanco.

Otras enfermedades ejemplares incluyen las infecciones de bacterias oculares (e.g., conjuntivitis, queratitis, tuberculosis, sífilis, gonorrea), infecciones virales (e.g. Virus del Herpes Ocular Simplex, Virus Varicella Zoster, Retinitis Citomegalovirus, Virus de Inmuno – deficiencia Humana (VIH)) así como
 10 necrosis retiniana externa progresiva secundaria al VIH u otras enfermedades asociadas al VIH u otras enfermedades asociadas a la inmunodeficiencia ocular. De forma adicional, las enfermedades oculares incluyen a las infecciones de hongos (e.g. Candida coroiditis, histoplasmosis), infecciones protozoarias (e.g. toxo plasmosis) y otras tales como la toxocariasis y la sarcoidosis.

15 Un aspecto de la invención es un método para inhibir, reducir o tratar la reducción de la visión en un sujeto que está en medio de tratamiento con una droga quimioterapéutica (e.g., una droga neurotóxica, una droga que aumente la presión intra – ocular, tal como un esteroide), administrándola al sujeto en necesidad de dicho tratamiento una dosis terapéutica de un modulador de
 20 sirtuina mostrado aquí.

Otro aspecto de la invención es un método para inhibir, reducir o tratar el desmejoramiento de la visión en un sujeto que esté siendo sometido a terapia, incluyendo cirugía ocular u otras relacionadas en la posición recostada con la cabeza hacia abajo como la cirugía de médula espinal, administrando al sujeto
 25 en necesidad de dicho tratamiento una dosis terapéutica de un modulador de sirtuina mostrado aquí. Las cirugías oculares incluyen la catarata, la iridotomía y el reemplazo de lentes.

Otro aspecto de la invención es el tratamiento, incluyendo la inhibición y el tratamiento profiláctico, de enfermedades relacionadas al ojo incluye a las

165

cataratas, la sequedad de ojos, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), daño retiniano y los similares, por administración del sujeto en necesidad de dicho tratamiento, de una dosis terapéutica de un modulador de sirtuina mostrado aquí.

- 5 Otra aspecto de la invención es la prevención o tratamiento de daño al ojo causado por estrés, efecto químico o radiación, administrando al sujeto en necesidad de dicho tratamiento una dosis terapéutica de un modulador de sirtuina descrito aquí. La radiación o el daño electromagnético al ojo puede incluir aquel causado por CRT o por la exposición a la luz del sol o a luz ultravioleta.
- 10 En una incorporación, un régimen de combinación de drogas puede incluir drogas o compuestos para el tratamiento o prevención de desórdenes oculares o condiciones secundarias asociadas con estas condiciones. Así, un régimen de combinación de drogas puede incluir uno o más activadores sirtuina y uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento de un desorden ocular.
- 15 En una incorporación, un modulador sirtuina puede ser administrado en conjunción con una terapia para reducir la presión intra – ocular. En otra incorporación, un modulador sirtuina puede ser administrado en conjunción con una terapia para el tratamiento y / o la prevención del glaucoma. En otra incorporación más, un modulador de sirtuina puede ser administrado en
- 20 conjunción con una terapia para el tratamiento y / o la prevención de la neuritis óptica. En una incorporación, un modulador sirtuina puede ser administrado en conjunción con una terapia para tratar y / o prevenir la Retinopatía CMV. En otra incorporación más, un modulador de sirtuina puede ser administrado en conjunción con una terapia para el tratamiento y / o la prevención de la
- 25 esclerosis múltiple.

Enfermedades y Desórdenes Asociados a las Mitocondrias

En ciertas incorporaciones, la invención provee métodos para tratar enfermedades o desórdenes que se beneficiarían de una actividad mitocondrial aumentada. Los métodos involucran la administración a un sujeto en necesidad del mismo de una cantidad efectiva, de forma terapéutica, de un compuesto activador de sirtuina. Una actividad mitocondrial aumentada se refiere a una actividad incrementada de la mitocondria mientras se mantienen los números generales de mitocondria (e.g., masa mitocondrial), aumentando el número de mitocondrias por tanto aumentando la actividad mitocondrial (e.g. estimulando la biogénesis mitocondrial), o combinaciones de los mismos. En ciertas incorporaciones, las enfermedades y desórdenes que se beneficiarían de una actividad mitocondrial elevada incluye a las enfermedades o desórdenes asociados con la disfunción mitocondrial.

En ciertas incorporaciones, los métodos para tratar enfermedades o desórdenes que se beneficiarían de una actividad mitocondrial aumentada pueden comprender la identificación de un sujeto sufriendo de disfunción mitocondrial. Los métodos para diagnosticar una disfunción mitocondrial pueden involucrar análisis genéticos, patológicos y / o bioquímicos. Las enfermedades y desórdenes asociados con la disfunción mitocondrial incluyen a enfermedades y desórdenes en los que déficits en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial contribuyen al desarrollo de la patofisiología de dichas enfermedades o desórdenes en un mamífero. Las enfermedades o desórdenes que se beneficiarían de la actividad mitocondrial aumentada en general incluyen, por ejemplo, enfermedades en las que las lesiones mediadas por radicales libres llevan a la degeneración de tejidos, enfermedades en las que las células entran en apoptosis de forma inapropiada, y enfermedades en las que las células fallan en entrar en apoptosis.

En ciertas incorporaciones, la invención provee métodos para tratar una enfermedad o desorden que se beneficiaría de una actividad mitocondrial elevada que involucre la administración a un sujeto en necesidad del mismo uno o más compuestos activadores de sirtuina en combinación con otro agente

terapéutico tal como, por ejemplo, un agente útil para tratar la disfunción mitocondrial o un agente útil para reducir un síntoma asociado con una enfermedad o desorden involucrando la disfunción mitocondrial.

En incorporaciones ejemplares, la invención provee métodos para tratar enfermedades o desórdenes que se beneficiarían de un incremento de actividad mitocondrial administrando al sujeto una cantidad que resulte terapéuticamente efectiva de un compuesto activador de sirtuina. Enfermedades o desórdenes ejemplares incluyen, por ejemplo, desórdenes neuromusculares (e.g., Ataxia de Friedreich's, Distrofia Muscular, Esclerosis Múltiple, etc.), desórdenes de inestabilidad neuronal (e.g., desórdenes de espasmos, migrañas, etc.), retrasos del desarrollo, desórdenes neurodegenerativos (e.g., Mal de Alzheimer, Mal de Parkinson, Esclerosis Amiotrófica Lateral, etc.), isquemia, acidosis tubular renal, neuro – degeneración relacionada con la edad y reducción de la capacidad cognitiva, fatiga producto de la quimioterapia, menopausia causada por la edad o inducida por la quimioterapia o irregularidades de ciclo menstrual u ovulación, miopatías mitocondriales, daño mitocondrial (e.g., acumulación de calcio, excitotoxicidad, exposición al óxido nítrico, hipoxia, etc.), y desregulación mitocondrial.

La distrofia muscular se refiere a una familia de enfermedades que involucran el deterioro de la estructura neuro – muscular y la función de la misma, a menudo resultando en la atrofia del músculo esquelético y la disfunción del miocardio, tal como la distrofia muscular de Duchenne. En ciertas incorporaciones, los compuestos activadores de sirtuina pueden ser usados para reducir la tasa de reducción de capacidades musculares y para mejorar el estatus de funcionamiento muscular en pacientes con distrofia muscular.

En ciertas incorporaciones, los compuestos moduladores de sirtuina pueden ser útiles para el tratamiento de miopatías mitocondriales. Las miopatías mitocondriales pueden estar en el rango de debilidad moderada, lentamente

progresiva de los músculos extra – oculares a miopatías severas, o fatales infantiles y encefalomiopatías multisistema. Algunos síndromes han sido definidos, con algo de solapamiento entre ellos. Los síndromes establecidos afectando al músculo incluyen la oftalmoplegia externa progresiva, el síndrome

5 Kearns – Sayre (con oftalmoplegia, retinopatía pigmentaria, defectos de conducción cardíaca, ataxia cerebelar, y sordera sensorineural), el síndrome MELAS (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica, y episodios similares al derrame), el síndrome MERFF (epilepsia mioclónica y fibras rojas desgastadas),

En ciertas incorporaciones, los compuestos activadores de sirtuina pueden ser

10 útiles para tratar pacientes sufriendo de daño tóxico a las mitocondrias, tal como, daño tóxico debido a la acumulación de calcio, excitotoxicidad, exposición a óxido nítrico, daño tóxico inducido por drogas, o hipoxia.

En ciertas incorporaciones, los compuestos activadores de sirtuina pueden ser útiles para tratar enfermedades o desórdenes asociados con la des-regulación

15 mitocondrial.

Performance muscular

En otras incorporaciones, la invención proporciona métodos para realzar el performance muscular administrando una cantidad terapéuticamente efectiva de

20 un compuesto sirtuina activador. Por ejemplo, los compuestos sirtuina – activadores pueden ser útiles para mejorar la resistencia física (e.g., habilidad para realizar una tarea física tal como ejercicio, labor física, actividades deportivas, etc.), inhibiendo o retardando la fatiga física, mejorando los niveles de oxígeno en la sangre, aumentando la energía en individuos sanos, mejorando

25 la capacidad de trabajo y resistencia, reduciendo la fatiga muscular, reduciendo el estrés, mejorando la función cardíaca y cardiovascular, aumentando la habilidad sexual, aumentando los niveles de ATP en músculo, y / o reduciendo el ácido láctico en la sangre. En ciertas incorporaciones, los métodos involucran la administración de un compuesto activador de sirtuina que aumente la actividad

mitocondrial, aumente la biogénesis mitocondrial y / o aumente la masa mitocondrial.

El performance en los deportes se refiere a la habilidad de los músculos del atleta para desempeñarse cuando participe en actividades deportivas. Una mejora en la habilidad deportiva, fuerza, velocidad y resistencia son medidas por un incremento en la fuerza de contracción muscular, un incremento en la amplitud de contracción muscular, una disminución del tiempo de reacción muscular entre la estimulación y la contracción. El término atleta se refiere a un individuo que participa en deportes a cualquier nivel y que busca lograr un nivel mejorado de fuerza, velocidad y resistencia en su performance, como por ejemplo, fisiculturistas, ciclistas, corredores de larga distancia, corredores de corta distancia, etc. El performance mejorado en los deportes es manifestado por la habilidad para superar la fatiga muscular, la habilidad para mantenerse en actividad por períodos prolongados de tiempo y tener un entrenamiento más efectivo.

En la arena del performance muscular del atleta, se desea crear condiciones que permitan la competición o entrenamiento a niveles más altos de resistencia por un período prolongado de tiempo.

Se contempla que los métodos de la presente invención también serán efectivos en el tratamiento de condiciones patológicas relacionadas con los músculos, incluyendo la sarcopenia aguda, por ejemplo, la atrofia muscular y / o la caquexia asociada con quemaduras, descanso en cama, inmovilización de extremidades, o cirugía torácica, abdominal y / u ortopédica.

En ciertas incorporaciones, la invención provee composiciones dietéticas novedosas comprendiendo moduladores de sirtuina, un método para su preparación y un método de usar las composiciones para mejorar el performance deportivo. De acuerdo con esto, se proveen composiciones terapéuticas, comidas y bebidas que tengan la acción de mejorar el desempeño físico y / o inhibir las fatigas físicas para aquellas personas involucradas en

ejercicios ampliamente definidos incluyendo deportes que requieran resistencia y labores que requieran actividad muscular repetida. Dichas composiciones dietéticas pueden además comprender electrolitos, cafeína, vitaminas, carbohidratos, etc.

5

Otros Usos

Los compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados para tratar o prevenir las infecciones virales (tales como las infecciones por influenza, herpes o virus papiloma) o como agentes anti hongos. En ciertas incorporaciones, los compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser administrados como parte de una combinación de terapia de drogas con otro agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades virales. En otra incorporación, los compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser administrados como parte de una terapia de combinación de drogas con otro agente antimicótico.

Los sujetos pueden ser tratados como se describe aquí usando eucariotas, tales como mamíferos, e.g., humanos, ovinos, bovinos, equinos, porcinos, caninos, felinos, primates no humanos, ratones y ratas. Las células que pueden ser tratadas incluyen a las células eucariotas, e.g., a partir de un sujeto descrito arriba, o células de plantas, células de levadura y células procarióticas, e.g., células bacterianas. Por ejemplo, compuestos moduladores pueden ser administrados a animales de granja para mejorar su habilidad de soportar condiciones de agricultura por más tiempo.

Compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina también pueden ser usados para aumentar el período de vida, resistencia al estrés, y resistencia a la apoptosis en plantas. En una incorporación, las plantas son modificadas de forma genética para producir un compuesto. En otra incorporación, las plantas y frutas son tratadas con un

compuesto antes de la cosecha y el transporte para incrementar la resistencia a daño durante el transporte. Las semillas de plantas también pueden ser contactadas con los compuestos descritos aquí, e.g., para preservarlas.

5 En otras incorporaciones, los compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser usados para modular el período de vida en las células de la levadura. Situaciones en las cuales pueda ser deseable extender el período de vida de las células de levadura incluyen cualquier proceso en el cual la levadura sea usada, e.g., la creación de cerveza, yogurt e ítems de panadería, e.g., pan. El uso de levadura
10 que presente un ciclo de vida expandido puede resultar en un uso menor de levadura o en la obtención de levadura que pueda permanecer activa por períodos más largos de tiempo. La levadura u otras células de mamíferos usadas para producir proteínas que se re-combinen también pueden ser tratadas como se describe aquí.

15 Los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina también pueden ser usados para aumentar el período de vida, la resistencia al estrés y resistencia a la apoptosis en insectos. En esta incorporación, los compuestos podrían ser aplicados a insectos útiles, e.g., abejas y otros insectos que estén involucrados en la polinización de plantas. En
20 una incorporación específica, un compuesto podría ser aplicado a abejas involucradas en la producción de miel. De forma general, los métodos descritos aquí pueden ser aplicados a cualquier organismo, e.g., eucariota, que pueda tener importancia comercial. Por ejemplo, pueden ser aplicados a peces (acuicultura) y aves (e.g., pollos y aves).

25 Dosis más altas de compuestos moduladores de sirtuina que incrementen el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina también pueden ser usados como un pesticida interfiriendo con la regulación de genes silenciados y la regulación de apoptosis durante el desarrollo. En esta incorporación, un compuesto puede ser aplicado a las plantas usando un método conocido en el arte que asegura que el

compuesto tenga disponibilidad biológica para las larvas de insectos, y no para las plantas.

Al menos, en vista de la conexión entre reproducción y longevidad, los compuestos moduladores de sirtuina que aumenten el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina pueden ser aplicados para afectar la reproducción de organismos como insectos, animales y micro – organismos.

4. Ensayos

Varias formas de ensayos para determinar la actividad sirtuina han sido descritos. Por ejemplo, la actividad sirtuina puede ser determinada usando un ensayo basado en fluorescencia tal como el ensayo disponible de forma comercial a partir de Biomol, e.g., el SIRT1 Kit de Descubrimiento de Droga Fluorimétrico (AK-555), SIRT2 Kit de Descubrimiento de Droga Fluorimétrico (AK-556), o SIRT3 Kit de Descubrimiento de Droga Fluorimétrico (AK-557) (Biomol International, Plymouth Meeting, PA). Otros ensayos sirtuina apropiados incluyen un ensayo de liberación de nicotinamida (Kaeberlein et al., J. Biol. Chem. 280(17): 17038 (2005)), un ensayo FRET (Marcotte et al., Anal. Biochem. 332: 90 (2004)), y un ensayo de atadura de C^{14} NAD boro resina (McDonagh et al., Methods 36: 3-46 (2005)). Aunque otros ensayos de sirtuina apropiados incluyen ensayos radio – inmunes (RIA), ensayos de proximidad de chispa, ensayos basados en HPLC, y ensayos de gen de reporte (e.g., para transcripción de blancos factores).

Un ensayo ejemplar para determinar la actividad sirtuina es un ensayo de polarización fluorescente. Los ensayos de polarización fluorescente son descritos aquí y también son provistos en la Publicación PCT No. WO 2006/094239. En otras incorporaciones, la actividad sirtuina puede ser determinada usando ensayos basados en espectrometría de masa. Ejemplos de ensayos basados en espectrometría de masa son descritos aquí y también son descritos en la Publicación PCT No. WO 2007/064902. Los ensayos basados en

células también pueden ser usados para determinar actividad sirtuina. Ejemplos de ensayos basados en células para determinar la actividad sirtuina son descritos en las publicaciones PCT Nos. WO 2007/064902 y WO 2008/060400.

Otros métodos adicionales contemplados aquí incluyen métodos de detección para identificar compuestos o agentes que modulen sirtuinas. Un agente puede ser un ácido nucleico, como un aptámero. Ensayos pueden ser realizados en un formato basado en célula o libre de células. Por ejemplo, un ensayo puede comprender incubar (o contactar) una sirtuina con un agente de prueba bajo condiciones en que una sirtuina pueda ser modulada por un agente conocido para modular sirtuina, y monitorear o determinar el nivel de modulación de sirtuina en presencia del agente de prueba relativo a la ausencia de un agente de prueba. El nivel de modulación de una sirtuina puede ser determinado determinando su habilidad de des - acetilar un sustrato. Sustratos ejemplares son los péptidos acetilados que pueden ser obtenidos a partir de BIOMOL (Plymouth Meeting, PA). Los sustratos preferidos incluyen péptidos de p53, tales como aquellos comprendiendo un K382 acetilado. Un sustrato preferido de forma particular es el Fluor de Lys - SIRT1 (BIOMOL), i.e., el péptido acetilado Arg - His - Lys - Lys. Otros sustratos son péptido a partir de histonas humanas H3 y H4 o un amino ácido acetilado. Los sustratos pueden ser fluorogénicos. La sirtuina puede ser SIRT1, Sir2, SIRT3, o una porción de los mismos. Por ejemplos, un SIRT1 recombinante puede ser obtenido a partir de BIOMOL. La reacción puede ser conducida por unos 30 minutos y detenida, e.g., con nicotinamida. El kit de descubrimiento de drogas / ensayo de actividad fluorescente HDAC (AK - 500, BIOMOL Research Laboratories) puede ser usado para determinar el nivel de acetilación. Ensayos similares han sido descritos en Bittman et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:45099. El nivel de modulación de sirtuina in un ensayo puede ser comparado al nivel de modulación de sirtuina en la presencia de uno o más (de forma separada o simultánea) de compuestos descritos aquí, que puedan servir como controles positivos o negativos. Sirtuinas para ser usados en los ensayos pueden ser proteínas sirtuinas de longitud completa o porciones de las mismas. Debido que se ha

mostrado aquí, que la activación de compuestos parece interactuar con el término N de SIRT1, las proteínas para ser usadas incluyen las porciones N-terminales de sirtuinas, e.g., alrededor de los aminoácidos 1-176 o 1-255 de SIRT1; alrededor de los aminoácidos 1-174 o 1-252 de Sir2.

- 5 En una incorporación, un ensayo de identificación comprende (i) contactar una sirtuina con un agente de prueba y un sustrato acetilado bajo condiciones apropiadas para que la sirtuina desacetile el sustrato en la ausencia del agente de prueba; y (ii) determinar el nivel de acetilación del sustrato, donde un nivel inferior de acetilación del sustrato en presencia del agente de prueba relativo a la ausencia del agente de prueba indica que el agente de prueba estimula la des-
10 acetilación por la sirtuina, donde un nivel más alto de acetilación del sustrato en la presencia del agente de prueba relativo a la ausencia del agente de prueba indica que el agente de prueba inhibe la des- acetilación por la sirtuina.

- Los métodos para identificar un agente que module, e.g., estimule sirtuinas in vivo, pueden comprender (i) contactar una célula con un agente de prueba y un sustrato que sea capaz de entrar en una célula en presencia de un inhibidor de clase I y HDACs de clase II bajo condiciones apropiadas para la sirtuina para des - acetilar el sustrato en la ausencia del agente de prueba; y (ii) determinar el nivel de acetilación del sustrato, donde un nivel menor de acetilación del sustrato
20 en la presencia del agente de prueba relativo a la ausencia del agente de prueba indica que el agente de prueba estimula la des - acetilación por la sirtuina, donde un nivel más alto de acetilación del sustrato en la presencia del agente de prueba relativo a la ausencia del agente de prueba indica que el agente de prueba inhibe la des -acetilación por la sirtuina. Un sustrato preferido es un péptido acetilado, que también es, de forma preferible, fluorogénico, como se describe a continuación. El método puede además comprender lisar las células para determinar el nivel de acetilación del sustrato. Los sustratos pueden ser
25 añadidos a las células a una concentración en el rango entre 1µM hasta unos 10mM, de forma preferible a partir de unos 10µM a 1mM, aún más preferible a partir de unos 100µM hasta 1mM, así como unos 200µM. Un sustrato preferido
30

es una lisina acetilada, e.g., ϵ -acetil lisina (Fluor de Lys, FdL) o Fluor de Lys-SIRT1. Un inhibidor preferido de clase I y clase II HDAC es trichostatina A (TSA), que puede ser usada a una concentración en el rango entre 0,01 hasta 100 μ M, de forma preferible a partir de 0,1 hasta 10 μ M, tal como 1 μ M. Las células de incubación, el compuesto de prueba y el sustrato pueden conducidas por unos 10 minutos hasta 5 horas, de forma preferible por unas 1 – 3 horas. Debido que TSA inhibe todos los HDAC de clase I y clase II, que ciertos sustratos, e.g., Fluor de Lys, es un pobre sustrato para SIRT2 y aún inferior para SIRT3 – 7, dicho ensayo puede ser usado para identificar a los moduladores de SIRT1 in vivo.

5. Composiciones Farmacéuticas

Los compuestos moduladores de sirtuina descritos aquí pueden ser formulados en una forma convencional usando uno o más portadores aceptables, desde un punto de vista fisiológico, o excipientes. Por ejemplo, los compuestos moduladores de sirtuina y sus sales fisiológicamente aceptables y solvatos pueden ser formulados para ser administrados, por ejemplo, por inyección (e.g. SubQ, IM, IP), inhalación o insuflación (sea a través de la boca o la nariz) o administración oral, bucal, sublingual, transdermal, nasal, parenteral o rectal. En una incorporación, un compuesto modificador de sirtuina puede ser administrado de forma local, en el sitio donde las células objetivo estén presentes, i.e., en un tejido específico, órgano o fluido (e.g., sangre, fluido cerebro – espinal, etc.)

Los compuestos moduladores de sirtuina pueden ser formulados para una variedad de modos de administración, incluyendo la administración sistémica y la administración tópica o localizada. Las técnicas y formulaciones pueden ser encontradas, de forma general, en las Ciencias Farmacéuticas de Remington, Meade Publishing Co., Easton, PA. Para administración parenteral, la inyección es preferida, incluyendo las inyecciones intramusculares, intravenosas, intra – peritoneal y subcutáneas. Para la inyección, los compuestos pueden ser formulados en soluciones líquidas, de forma preferible en amortiguadores

compatibles, de forma fisiológica, como la solución de Hank o la solución de Ringer. De forma adicional, los compuestos pueden ser formulados en forma sólida y re-disueltos o suspendidos de forma inmediata previa al uso. Las formas liofilizadas también son incluidas.

- 5 Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, tabletas, pastillas o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables como agentes de atadura (e.g., almidón pregelatinizado, poli - vinilpirrolidina o hidroxí - propil metil celulosa); rellenos (e.g., lactosa, celulosa microcristalina, o fosfato de
- 10 hidrógeno de calcio); lubricantes (e.g., estearato de magnesio, talco o silicio), desintegrantes (e.g., almidón de papa o sodio glicolato de almidón); o agentes humectantes (e.g., sulfato lauril de sodio). Las tablas pueden ser cubiertas a través de métodos bien conocidos en el arte. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, siropes o
- 15 suspensiones, o pueden estar presentes como un producto seco para la re-constitución con agua u otro vehículo apropiado antes del uso. Dichas preparaciones líquidas pueden ser preparadas por medios convencionales con aditivos aceptables, desde un punto de vista farmacéutico, tales como agentes de suspensión (e.g., sirope sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles
- 20 hidrogenadas); agentes emulsificantes (e.g., lecitina o acacia); vehículos no acuosos (e.g., aceite ationdo, esteres aceitosos, alcohol etil, o aceites vegetales fraccionados); y preservantes (e.g. metil o propil - p - hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales amortiguadoras, saborizadores, colorantes y agentes endulzantes según sea apropiado. Las
- 25 preparaciones para la administración oral pueden ser formuladas de forma apropiada para dar una liberación controlada del compuesto activo.

Para la administración por inhalación (e.g. entrega pulmonar), compuestos moduladores de sirtuina que puedan ser entregados de forma conveniente en la forma de una presentación aerosol para paquetes presurizados o un

30 nebulizador, con el uso de un propelente apropiado, e.g. dicloro difluoro metano,

triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas apropiado. En el caso del aerosol presurizado, la unidad de dosis puede ser determinada proveyendo una válvula para entregar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de e.g., gelatina, para ser usada en un inhalador o insuflador pueden ser formuladas conteniendo una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo apropiada tal como la lactosa o el almidón.

Los compuestos moduladores de sirtuina pueden ser formulados para administración parenteral por inyección, e.g., por inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para la inyección pueden ser presentadas en forma de dosis unitaria, e.g., en ampollas o contenedores de múltiples dosis, con un preservante añadido. Las composiciones pueden tomar dichas formas como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos acuosos o aceitosos, y pueden contener agentes de formulación, como agentes de suspensión, estabilización y / o dispersión. De forma alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo apropiado, e.g. agua estéril libre de pirógenos, antes del uso.

Los compuestos moduladores de sirtuina también pueden ser formulados en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, e.g., conteniendo bases estándar para supositorios como manteca de cacao u otros glicéridos.

De forma adicional a las formulaciones descritas previamente, los compuestos moduladores de sirtuina pueden también ser formulados como una preparación de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden ser administradas por implante (por ejemplo, de forma subcutánea o intra - muscularmente) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos moduladores de sirtuina pueden ser formulados con materiales poliméricos o hidrófobos apropiados (por ejemplo, como una emulsión con un aceite aceptable) o resinas de intercambio de iones, o como derivados parcialmente solubles, por ejemplo, como una sal parcialmente soluble. La fórmula de liberación controlada también incluye parches.

En ciertas incorporaciones, los compuestos descritos aquí pueden ser formulados para entrega del sistema nervioso central (CNS) (reseñada en Begley, *Pharmacology & Therapeutics* 104: 29-45 (2004)). Las formas convencionales para entrega de drogas al sistema nervioso central incluyen:

5 estrategias neuro – quirúrgicas (e.g. inyección intra – cerebral o infusión intra – cerebroventricular); manipulación molecular del agente (e.g., producción de una proteína de fusión quimérica que comprende un péptido de transporte que tiene afinidad por una superficie de molécula de célula endotelial en combinación con un agente que es por si mismo capaz de cruzar la barrera de sangre al cerebro)

10 en un intento de explotar las vías de transporte endógenas de la barrera de sangre al cerebro; las estrategias farmacológicas diseñadas para incrementar la solubilidad en lípidos de un agente (e.g., la conjugación de agentes solubles en agua a portadores lípidos o de colesterol); y la interrupción transitoria de la integridad de la barrera de sangre al cerebro por alteración hiper – osmótica (resultando en la infusión

15 de una solución de manitol a la arteria carótida o el uso de un agente biológicamente activo como un péptido angiotensivo. Los liposomas son un sistema posterior de entrega de drogas que es fácilmente inyectable. De acuerdo con esto, en el método de la invención los compuestos activos también pueden ser administrados en la forma de un sistema de entrega de liposomas. Los liposomas son bien conocidos por una persona

20 que posea destreza en el arte. Los liposomas pueden ser formados a partir de una variedad de fosfolípidos, como el colesterol, la estearyl amina o las fosfatidil colinas. Los liposomas que son usables con el método de invención comprenden todo tipo de liposomas incluyendo, pero sin limitarse a, vesículas pequeñas unilamelares, vesículas grandes unilamelares y vesículas multilamelares.

25 Otra forma de producir una formulación, de forma particular una solución, de un modulador de sirtuina tal como un reseratrol o un derivado del mismo, es a través del uso de ciclodextrinas.. Las ciclodextrinas son descritas en detalle en Pittha et al., . Pat de EE.UU.. No. 4,727,064 la cual es incorporada aquí por referencia. Las ciclodextrinas son oligómeros cíclicos de glucosa; estos compuestos forman complejos de inclusión

30 con cualquier droga cuya molécula pueda caber en las cavidades que buscan lipófilos de la molécula de ciclodextrina.

Las formas de dosis que se desintegran o disuelven rápidamente son útiles para la absorción rápida, particularmente la absorción bucal y sublingual, o los agentes farmacéuticamente activos. Las formas de dosificación de rápida absorción son beneficiosas para los pacientes, como los pacientes ancianos y pediátricos que tienen dificultad en tragar las formas sólidas típicas, tales como las pastillas y tabletas. De forma adicional, las fórmulas de rápida absorción evitan las desventajas asociadas con, por ejemplo, las formas de dosificación masticables, donde la cantidad de tiempo que un agente activo permanece en la boca del paciente juega un papel importante determinando la cantidad de sabor que se pierde y la extensión en la cual un paciente puede objetar debido a la sensación en la garganta del agente activo.

Las composiciones farmacéuticas (incluyendo las preparaciones cosméticas) pueden comprender entre un 0,00001 % hasta 100 % como a partir de 0,001 % hasta 10 % o a partir de 0,1 % hasta 5 % por peso de uno o más compuestos de modulación de sirtuina como se describe aquí.

En una incorporación, un compuesto modulador de sirtuina como se describe aquí, es incorporado en una formulación tópica conteniendo un portador tópico que es apropiado, de forma general, para la administración tópica y comprende cualquiera de dichos materiales conocidos en el arte. El cargador tópico puede ser seleccionado de forma que provea a la composición la forma deseada, e.g., como un ungüento, una loción, crema, micro – emulsión, gel, aceite, solución, o similares, y puede estar comprendido de un material de origen natural o sintético. Es preferible que el portador seleccionado no afecte de forma adversa el agente activo u otros componentes de la formulación activa. Ejemplos de portadores tópicos apropiados para ser usados aquí incluyen el agua, alcoholes, y otros solventes no – tóxicos orgánicos, glicerina, aceite mineral, silicón, jalea de petróleo, lanolina, ácidos grasos, aceites vegetales, ceras, y similares.

Las formulaciones pueden carecer de olor, carecer de color, y presentarse en forma de lociones, cremas, micro – emulsiones y geles.

Los compuestos moduladores de sirtuina pueden ser incorporados en ungüentos, que, de forma general, son preparaciones semi – sólidas que están basadas, de forma típica en petrolato u otros derivados del petróleo. La base de ungüento a ser usada, y que será apreciada por aquellos con destreza en el arte, es una que proveerá una entrega

óptima de la droga, y, de forma preferible, proveerá otras características deseables también, e.g., emolencia o similar. Así como con otros portadores o vehículos, una base de ungüento puede ser inerte, estable, no – irritante y no – sensibilizante.

5 Los compuestos moduladores de sirtuina pueden ser incorporados en lociones, las cuales, de forma general son preparaciones para ser aplicadas en la superficie de la piel sin fricción, y son preparaciones típicamente líquidas o semi – líquidas en las cuales partículas sólidas, incluyendo el agente activo, están presentes en una base de agua o alcohol. Las lociones son usualmente suspensiones de sólidos, y pueden comprender una emulsión aceitosa líquida del tipo de agua – en – aceite.

10 Los compuestos moduladores de sirtuina pueden ser incorporados en cremas, las cuales, generalmente son líquido viscosos o emulsiones semisólidas, sea aceite – en – agua o agua – en – aceite. Las bases de crema son removibles con agua, y contienen una fase acuosa, un emulsificador y una fase acuosa. La fase acuosa está comprendida, de forma general de un petrolato y un alcohol graso tal como alcohol cetil
15 o estearil; la fase acuosa, de forma usual, aunque no necesariamente, excede a la fase aceitosa en volumen, y, de forma general contiene un humectante. El emulsificador en una formulación de crema, como se explica en el supra de Remington, es generalmente un surfactante no-iónico, aniónico, catiónico o anfotérico.

20 Los compuestos moduladores de sirtuina pueden ser incorporados en microemulsiones, las cuales, de forma general, son termodinámicamente estables, dispersiones isotrópicamente dispersas de dos líquidos inmiscibles, tales como aceite y agua, estabilizados por una película interfacial de moléculas surfactantes (Enciclopedia de Tecnología Farmacéutica (New York: Marcel Dekker, 1992) volumen 9).

25 Los compuestos moduladores de sirtuina pueden ser incorporados en formulaciones de gel, las cuales son, de forma general, sistemas semisólidos consistentes de suspensiones hechas de partículas inorgánicas (sistemas de dos fases) o moléculas orgánicas grandes distribuidas de forma sustancialmente uniforme a través de un líquido portador (geles de única fase). Aunque los geles emplean de forma común un portador líquido acuoso, los alcoholes y los aceites pueden también ser usados como el
30 líquido portador.

Otros ingredientes activos pueden también ser usados en las formulaciones, e.g., otros agentes anti – inflamatorios, analgésicos, agentes anti – microbianos, agentes anti – micóticos, antibióticos, vitaminas, antioxidantes y agentes de bloqueo solar comúnmente encontrados en formulaciones de protectores solares incluyendo, pero sin limitarse a, antralinatos, benzofenonas (de forma particular la benzofenona -3), derivados canfor, cinamatos (e.g., octil metoxicinamato), metanos dibenzoil (e.g., butil metoxidibenzil metano), ácido p – aminobenzoico (PABA) y derivados de los mismos, y salicilatos (e.g., octil salicilato).

En ciertas formulaciones tópicas, el agente activo está presente en una cantidad en el rango aproximado entre 0,25 % del peso total a 75 % del peso total de la formulación, de forma preferible en el rango de aproximadamente 0,25 % del peso total a 30 % del peso de la formulación, más preferiblemente en el rango de aproximadamente 0,5 % del peso total a 15 % del peso total de la formulación y más preferiblemente en el rango de aproximadamente 1,0 % del peso total a 10 % del peso total de la formulación.

Las condiciones del ojo pueden ser tratadas o prevenidas por, e.g., inyección intraocular, sistémica, tópica de un compuesto modulador de sirtuina, o por inyección de un compuesto de liberación sostenida que libere un compuesto modulador de sirtuina. Un compuesto modulador de sirtuina que aumente el nivel y / o actividad de una proteína sirtuina puede ser administrado en un vehículo oftálmico viable, desde un punto de vista farmacéutico, de forma tal que el compuesto sea mantenido en contacto con la superficie ocular por un período de tiempo suficiente para permitir al compuesto penetrar la córnea y las regiones internas del ojo, como por ejemplo, la cámara anterior, la cámara posterior, el cuerpo vítreo, el humor acuoso, el humor vítreo, la cornea, el iris / ciliar, el lente, la retina / coroides y la esclerótica. El vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable puede, por ejemplo, ser un ungüento, un aceite vegetal o un material encapsulante. De forma alternativa, los compuestos de la invención pueden ser inyectados de forma directa en el humor vítreo y en el humor acuoso. En una alternativa posterior, los compuestos pueden ser administrados de forma sistémica, tal como por infusión intravenosa o inyección, para el tratamiento del ojo.

Los compuestos moduladores de sirtuina descritos aquí pueden ser guardados en un ambiente libre de oxígeno. Por ejemplo, el resveratrol o un análogo del mismo puede

ser preparado en una cápsula sellada al aire para la administración oral, tal como Capsugel de Pfizer, Inc.

Las células, e.g., tratadas *ex vivo*, con un compuesto modulador de sirtuina, pueden ser administradas de acuerdo a métodos para administrar un injerto en un sujeto, los cuales pueden ser acompañados, e.g., de la administración de una droga inmunosupresora, e.g., ciclosporina A. Para propósitos generales en la formulación médica, el lector es referido a *Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, & Cellular Immunotherapy*, por G. Morstyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996; y *Hematopoietic Stem Cell Therapy*, E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000

La toxicidad y la efectividad terapéutica de compuestos moduladores de sirtuina puede ser determinada por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos de células o en animales experimentales. El LD₅₀ es la dosis letal al 50 por ciento de la población ED₅₀ es la dosis efectiva, desde un punto de vista terapéutico, en el 50 por ciento de la población. La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos (LD₅₀/ED₅₀) es el índice terapéutico. Los compuestos moduladores de sirtuina que exhiben grandes índices terapéuticos son preferidos. Aunque los compuestos moduladores de sirtuina que exhiben efectos secundarios tóxicos pueden ser usados, se debe tener cuidado de diseñar un sistema de entrega que apunte a dichos compuestos al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por tanto, reducir los efectos secundarios no deseados.

La data obtenida de los ensayos de cultivo de células y los estudios animales puede ser usada para formular un rango de dosis para ser usadas en humanos. Las dosis de dichos compuestos pueden estar dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyan al ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración usada. Para cualquier componente, la dosis efectiva terapéuticamente puede ser estimada inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Una dosis puede ser formulada en modelos animales para lograr un rango de concentración en plasma circulante que incluya el IC₅₀ (i.e., la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición media – máxima de los síntomas) como se determina en el cultivo de células. Dicha información puede ser usada para determinar de forma más

certera las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden ser medidos, por ejemplo, a través de cromatografía líquida de alto desempeño

6. Kits

También se proporcionan aquí conjuntos o kits, e.g., kits para propósitos terapéuticos o kits para modular la duración de vida de células o modular la apoptosis. Un kit puede comprender uno o más compuestos sirtuina-moduladores, e.g., en dosis pre-medidas. Un kit puede opcionalmente comprender dispositivos para contactar células con los compuestos y instrucciones para el uso. Los dispositivos incluyen inyectadoras, stents y otros dispositivos para introducir un compuesto sirtuina-modulador en un sujeto (e.g., los vasos sanguíneos de un sujeto) o aplicarlos a la piel de un sujeto.

En otra incorporación más, la invención proporciona una composición de materia comprendiendo un sirtuina-modulador de esta invención y otro agente terapéutico (los mismos usados en terapias de combinación y composiciones de combinación) en formas de dosificación separadas, pero asociadas una con otra. La terminología "asociada una con otra", como es aquí usada, significa que las formas de dosificación separadas son empacadas conjuntamente o de cualquier otra forma unidas una a otra de forma que sea fácilmente aparente que las formas separadas de dosificación son entendidas a ser vendidas y administradas como parte del mismo régimen. El agente y el modulador sirtuina son preferiblemente empacados juntos en un empaque burbuja u otro empaque multi-cámara, o como contenedores conectados sellados por separado (tales como sobres de papel de aluminio o similares) que pueden ser separados por el usuario (e.g., rompiendo por las líneas punteadas entre los dos contenedores).

En otra incorporación más, la invención proporciona un kit comprendiendo en vasos separados, a) un modulador sirtuina de esta invención; y b) otro agente terapéutico tal como aquellos descritos en otra parte de la especificación.

La práctica de los presentes métodos emplearán, a menos que se indique de otra forma, técnicas convencionales de biología celular, cultivo de células,

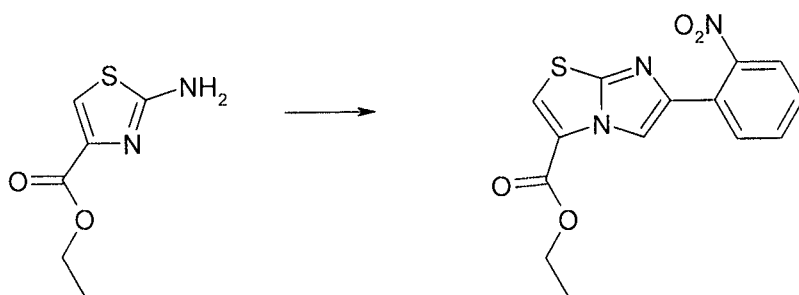
biología molecular, biología transgénica, microbiología, recombinante DNA, e inmunología, que están dentro de las habilidades del arte. Tales técnicas están explanadas completamente en la literatura. Ver, por ejemplo,, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I y II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. Patente de EE.UU. No: 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); el tratado, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

20 EJEMPLIFICACIÓN

La invención siendo descrita en forma general será más fácilmente comprendida en referencia a los siguientes ejemplos que se incluyen solo para propósitos ilustrativos de ciertos aspectos y de incorporaciones de la presente invención, y no están entendidos a limitar la invención el forma alguna.

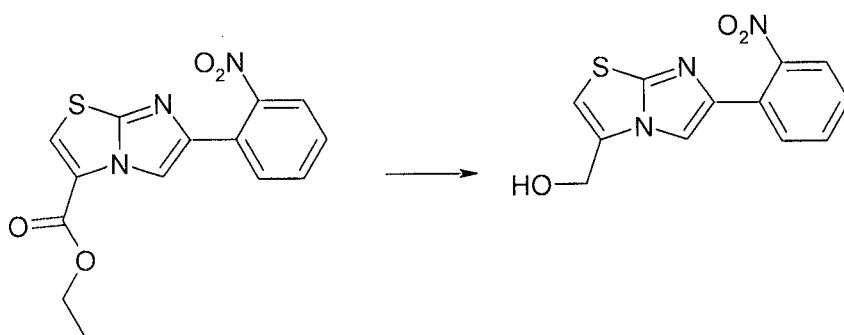
25 ***EJEMPLO 1: Preparación de 4-metil-N-(2-(3-(morfolinometil)imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)fenil)-2-(piridin-3-il)tiazol-5-carboxamida (Compuesto 1)***

Preparación de 6-(2-Nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3- ácido carboxílico etil éster



En una corrida típica, 2.1 g de etil 2-aminotiazol-4-carboxilato (Combi-Bloques, 0.0123 mol) fueron mezclados con 25 mL de metil etil cetona junto con 2-bromo-2'-nitroacetofenona (3.0 g, 0.0123 mol). La mezcla de reacción fue batida a reflujo por 18 horas. Luego fue enfriada a temperatura ambiente y filtrada para remover algunos de los sólidos. El filtrado fue concentrado para producir 3.10 g de 6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-ácido carboxílico etil éster (MS, $M^+ + H = 318$).

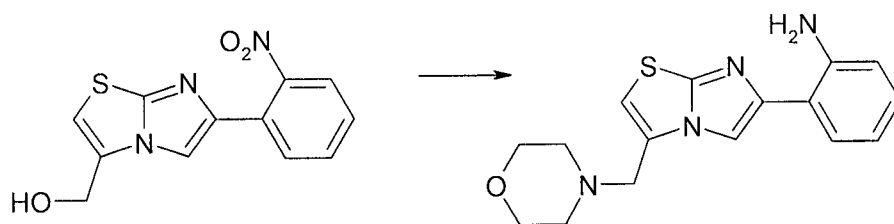
10 Preparación de [6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-il]-metanol:



6-(2-Nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-ácido carboxílico etil éster (14.50 g, 0.0458 mol) fueron mezclados con 100 mL de TF y 100 mL de agua conteniendo 7.3 g de NaOH (4 eq). La mezcla de reacción fue batida por 18 horas a temperatura ambiente y concentrada. La capa acuosa fue lavada una vez con CH₂Cl₂ y acidificada con t 6 N HCl. Los sólidos fueron recolectados por filtrado y secados para producir 7.4 g del ácido intermedio. Este material fue mezclado (7.4 g, 0.0256 mol) con t 200 mL de TF anhidro junto con N-

metilmorfolina (NMM) (2.8 mL, 0.0256 mol) y enfriada a 0 °C. Isobutil
 cloroformato (3.35 mL, 0.0256 mol) fue añadido y la mezcla de reacción fue
 batida en baño de hielo por 3 horas. NaBH₄ (0.97 g, 0.0256 mol) fue añadido
 como una solución en 30 mL de agua. La mezcla de reacción fue batida a 0 °C
 5 por 45 min. Luego fue calentada a temperatura ambiente y concentrada. La
 capa acuosa fue extraída con CH₂Cl₂. Las capas orgánicas combinadas fueron
 secadas con Na₂SO₄ y concentradas para producir el producto crudo.
 Purificación por cromatografía (Isco, usando una mezcla de pentano/etil
 acetato) produjo 5.20 g de [6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-il]-metanol
 10 (74% producido)

Preparación de 2-(3-morfolin-4-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-fenilamina:



[6-(2-Nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-il]-metanol (435 mg, 1.53 mmol)
 15 fueron disueltos en 25 mL de CH₂Cl₂ junto con 1 eq de trietilamina (0.330 mL).
 Metanosulfonil cloruro (1 eq, 0.12 mL) fue añadido y la mezcla de reacción fue
 calentada a temperatura ambiente y batida por 15 min. Fue luego extinguida
 con salmuera y extraída con CH₂Cl₂. Las capas orgánicas combinadas fueron
 secadas con Na₂SO₄ y concentradas para obtener el mesilato intermedio.

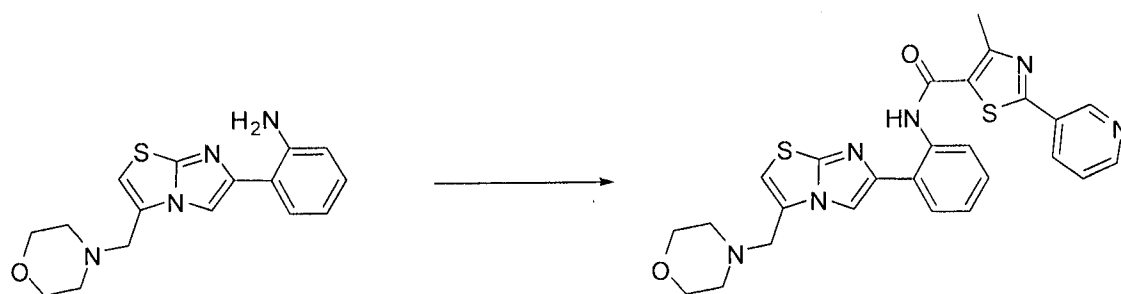
20

. Este material fue mezclado con 6 mL de CH₃CN junto con 0.33 mL de
 trietilamina y 0.14 mL de morfolina. La mezcla de reacción fue batida por 18
 horas a temperatura ambiente. Al día siguiente fue concentrada y el residuo
 resultante fue repartido entre CH₂Cl₂ y agua. La capa orgánica fue secada.
 25 (Na₂SO₄) y concentrada para producir esencialmente una producción

cuantitativa del producto. Este material fue mezclado con 6 mL de metanol y 1 mL de agua junto con 200 mg de hidrosulfuro de sodio hidrato. La resultante mezcla de reacción fue batida a reflujo por 6 horas, luego enfriada a temperatura ambiental, diluida con 100 mL de etanol absoluto y concentrada. El residuo
 5 resultante fue mezclado con 20 mL de 9:1 CH₂Cl₂/metanol y filtrado. El filtrado fue concentrado para producir 2-(3-morfolin-4-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-fenilalanina..

Preparación del Compuesto 1:

10



15

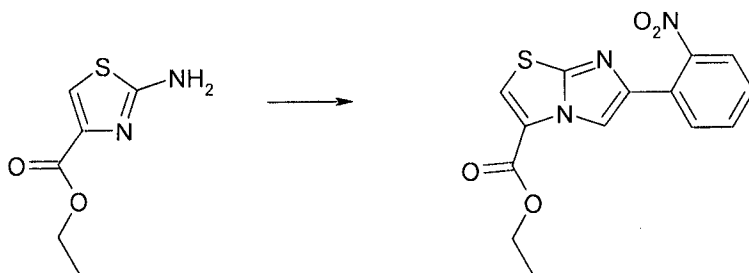
2-(3-Piridil)-4-metiltiazol-5- ácido carboxílico (0.61 g, 2.8 mmol) fueron disueltos en tionil cloruro (2 mL) y la mezcla fue batida en caliente (82 °C, 3 horas). Al secarse, el solvente fue removido y el residuo secado bajo alto vacío. El cloruro ácido fue suspendido en 5 mL de piridina y añadido a un vial de micro –ondas cargado con 2-(3-morfolinometil)imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)anilina (0.87 g, 2.8 mmol). La reacción fue irradiada con micro – ondas (160 °C, 15 min). La solución fue triturada con metanol y el sólido resultante fue filtrado y lavado con
 20 adicional metanol. El sólido fue secado para producir 0.97 g (68%) de 4-metil-N-(2-(3-morfolinometil)imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)fenil)-2-(piridin-3-il)tiazol-5-carboxamida..

La forma en sal HCl de 4-metil-N-(2-(3-morfolinometil)imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)fenil)-2-(piridin-3-il)tiazol-5-carboxamida. fue preparada disolviendo el producto (0.16 g) en 10% HCl/CH₃CN (4 mL). La solución fue entonces congelada-secada para producir la sal (0.17 g) como un sólido amarillo-naranja.

Otras sales (ácido sulfúrico, ácido metano sulfónico, ácido maleico, ácido fosfórico, ácido, L-tartárico, ácido cítrico, y ácido málico) fueron preparados de manera análoga.

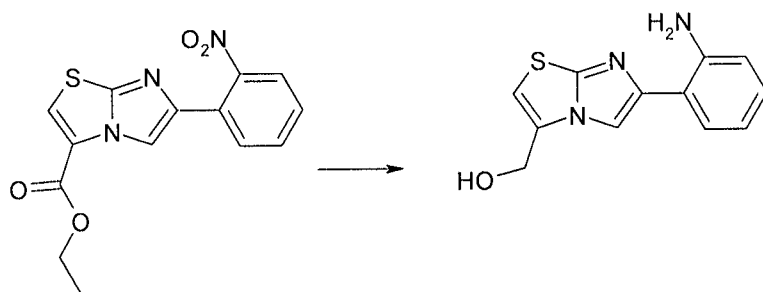
Ejemplo 2: Síntesis de N-(2-(3-(piperazin-1-il)metil)imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)fenil)quinoxalina-2-carboxamida (Compuesto 2)

Preparación de 6-(2-Nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-ácido carboxílico etil ester:



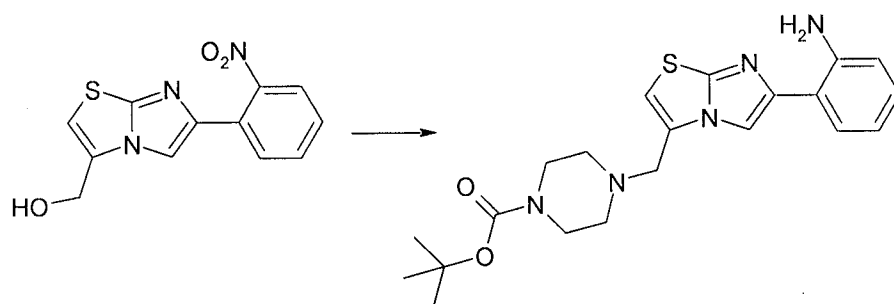
En una corrida típica, etil 2-aminotiazol-4-carboxilato (2.1g, 0.0123 mol) fue metido en metil etil cetona (25 mL) junto con 2-bromo-2'-nitroacetofenona (3.0 g, 0.0123 mol). La mezcla de reacción fue batida a reflujo durante 18 horas. Fue entonces enfriada a temperatura ambiental y filtrada para remover algunos de los sólidos. El filtrado fue concentrado para obtener 3.10 g de 6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-ácido carboxílico etil éster (Calculado para C₁₄H₁₂N₃O₄S: 313.3, [M+H]⁺ encontrado: 319).

Preparación de [6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-il]-metanol:



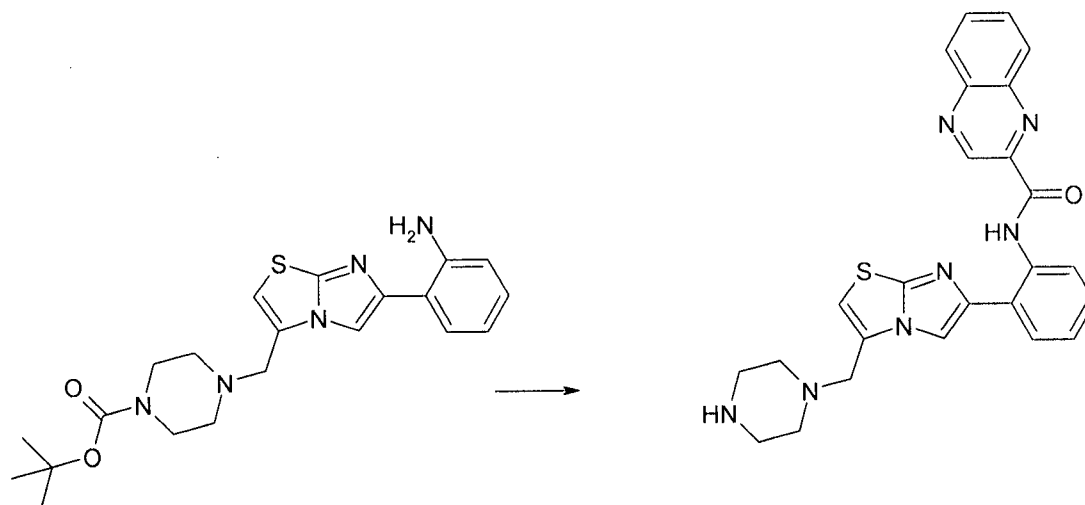
6-(2-Nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3- ácido carboxílico etil éster (14.50 g, 0.0458 mol) fueron introducidos en THF (100 mL) y agua (100 mL) conteniendo NaOH (7.3 g, 4 eq). La mezcla de reacción fue batida a temperatura ambiente por 18 horas. Luego fue concentrada. La capa acuosa fue lavada una vez con CH_2Cl_2 y luego acidificada con 6 N HCl. Los sólidos fueron colectados por filtrado y secados para producir 7.4 g del ácido intermedio. este material I (7.4 g, 0.0256 mol) fue sumergido en THF anhidro (200 mL) junto a N-metilmorfolina (2.8 mL, 0.0256 mol) y enfriados a 0°C . Isobutil cloroformato (3.35 mL, 0.0256 mol) fue añadido y la mezcla de reacción fue batida en baño de hielo por 3 horas. NaBH_4 (0.97 g, 0.0256 mol) fue añadido como una solución en agua (30 mL). La mezcla de reacción fue batida a 0°C por 45 min. Fue luego entibiada a temperatura ambiente y concentrada. La capa acuosa fue extraída con CH_2Cl_2 . Las capas orgánicas combinadas fueron secadas con Na_2SO_4 y concentradas para producir el producto crudo. Purificación por cromatografía (Isco, usando una mezcla de pentano/etil acetato) produjo 5.20 g de [6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-il]-metanol (74% producido) (Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{OS}$: 245.3, $[\text{M}+\text{H}]^+$ encontrado: 246).

20 **Preparación de 4-[6-(2-amino-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-ilmetil]-piperazina-1- ácido carboxílico tert-butil éster:**



[6-(2-Nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-il]-metanol (1.0 g, 3.64 mmol) fue disuelto en CH_2Cl_2 (100 mL) junto con trietilamina (0.51 mL, 3.64 mmol). Metanosulfonil cloruro (1 eq, 0.28 mL) fue añadido y la mezcla fue calentada a temperatura ambiente y batida por 15 minutos. Fue entonces extinguida con salmuera y extraída con CH_2Cl_2 . Las capas orgánicas combinadas fueron secadas con Na_2SO_4 y concentradas para producir el mesilato intermedio. Este material fue sumergido en CH_3CN (4 mL) junto con trietilamina (0.51 mL, 3.64 mmol) y Boc-piperazina (650 mg, 3.64 mmol) y batida a temperatura ambiente durante 1 día. La mezcla de reacción fue concentrada y el residuo resultante fue repartido entre CH_2Cl_2 y agua. La capa orgánica fue secada con Na_2SO_4 y concentrada para producir esencialmente una producción cuantitativa del producto. Este material fue sumergido en metanol (6 mL) y agua (1 mL) junto con hidrosulfuro de sodio hidrato. (200 mg) La mezcla de reacción resultante fue batida a reflujo por 24 horas. luego fue enfriada a temperatura ambiente y concentrada. El residuo resultante fue diluido con agua (2 mL) y extraído con CH_2Cl_2 . Las capas orgánicas combinadas fueron secadas con Na_2SO_4 y concentradas para producir 0.90 g de 4-[6-(2-amino-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-ilmetil]-piperazina-1- ácido carboxílico tert-butil éster (Calc'd para $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$: 413.5, $[\text{M}+\text{H}]^+$ encontrado: 414).

Preparación del Compuesto 2:

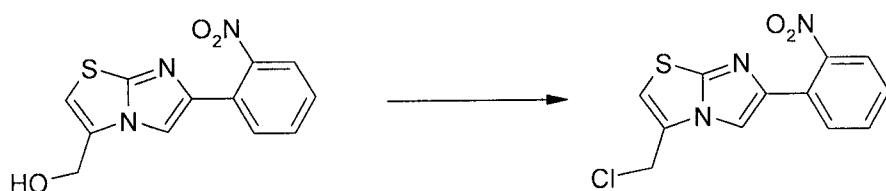


4-[6-(2-Amino-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-ilmetil]-piperazina-1- ácido carboxílico
 5 tert-butil éster (0.25 mmol) fue introducido en 1 mL de piridina junto con 1 eq
 (50 mg) de 2-quinoxaloil cloruro . La mezcla de reacción fue calentada en un
 reactor Biotage de micro- ondas (160 °C por 10 min). Luego fue enfriada a
 temperatura ambiente y concentrada. El producto crudo resultante fue
 purificado por cromatografía (Isco, gradiente de elución, CH₂Cl₂ a 95%
 10 CH₂Cl₂, 4% metanol y 1% trietilamina). El producto purificado fue entonces
 tratado con una solución conteniendo 25% de ácido trifluoroacético (TFA) en
 CH₂Cl₂ (2 mL) por 2 horas. Fue entonces concentrado y el residuo resultante
 fue triturado con etil éter para producir el producto deseado como la sal de TFA
 (Calc'd para C₂₅H₂₃N₇O₂S: 469.5 , [M+H]⁺ encontrado: 470). ¹HNMR (300
 15 MHz, DMSO-d₆) δ: 13.9 (br s, 1 H), 9.8 (br s, 1 H), 9.6 (br s, 1 H) 6.9 – 7.2 (m,
 11 H), 4.8 (br s, 2 H). El HPLC analítico fue realizado en un Agilent 1100
 Series HPLC equipado con un 3.5 µm Eclipse XDB-C18 (4.6 mm x 100 mm)
 columna con las siguientes condiciones : CH₃CN/H₂O, modificado con 0.1 %
 ácido fórmico fase móvil . Gradiente de elución: 5% sostenido (2 min), 5% a
 20 95% gradiente (11 min), 95% a 5% gradiente (0.3 min), 5% sostenido (2.7 min),

15 min. total de tiempo de corrida. Rata de flujo : 0.8 ml/min. Tiempo de retención= 3.04 min.

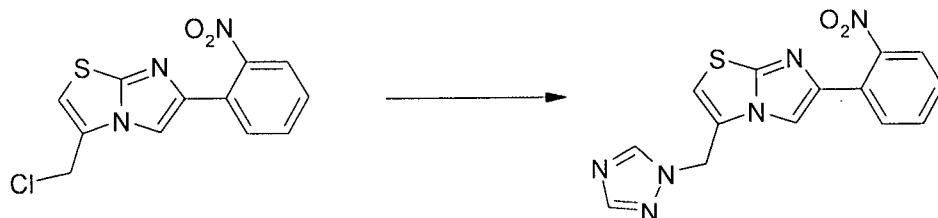
Ejemplo 3: Preparación de 4-Metil-2-piridin-3-il-tiazol-5- ácido carboxílico
[2-(3[1,2,4]triazol-1-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-fenil]-amida

Preparación de 3-Clorometil-6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol:



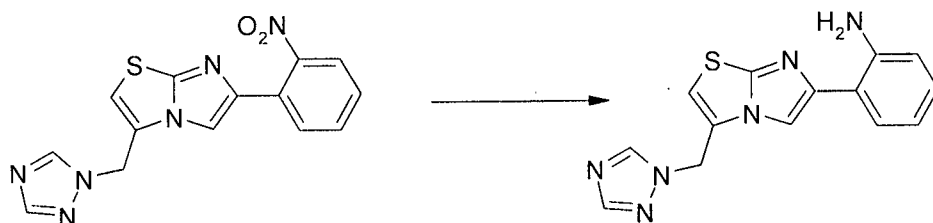
A una solución de [6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-il]-metanol (165 g, 0.6 mol) en diclorometano (1.65 L) le fueron añadidos SOCl_2 (400 mL, 5.5 mol) a temperatura ambiente. DMF (0.3 mL) fue añadido y la mezcla de reacción fue batida a 30°C (2 h). La mezcla de reacción fue enfriada a 0°C , y el precipitado fue recolectado por filtrado y secado in vacuo para dar 3-clorometil-6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol como un sólido blanco (174 g, 99% producción).

Preparación de 6-(2-Nitro-fenil)-3-[1,2,4]triazol-1-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol:



3-Clorometil-6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol (64.0 g, 0.22 mol) fueron disueltos en DMF (600 mL), seguido por la adición de 1H-[1,2,4]triazol (30.4 g, 0.44 mol), K_2CO_3 (91.0 g, 0.66 mol) y NaI (20 mg). La mezcla de reacción fue batida a temperatura ambiente durante la noche y luego a 35°C (8 h). La
 5 mezcla fue pasada a través de un cojincillo de gel de sílice y el filtrado fue concentrado in vacuo para dar un sólido amarillo. El sólido fue lavado con etil acetato para dar 6-(2-nitro-fenil)-3-[1,2,4]triazol-1-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol como un sólido amarillo (54 g, 75% producción). 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 5.75 (s, 2H), 7.40 (s, 1H), 7.52 (m, 1H), 7.68 (m, 1H), 7.79 (m, 2H), 8.05 (s, 1H),
 10 8.19 (s, 1H), 8.83 (s, 1H).

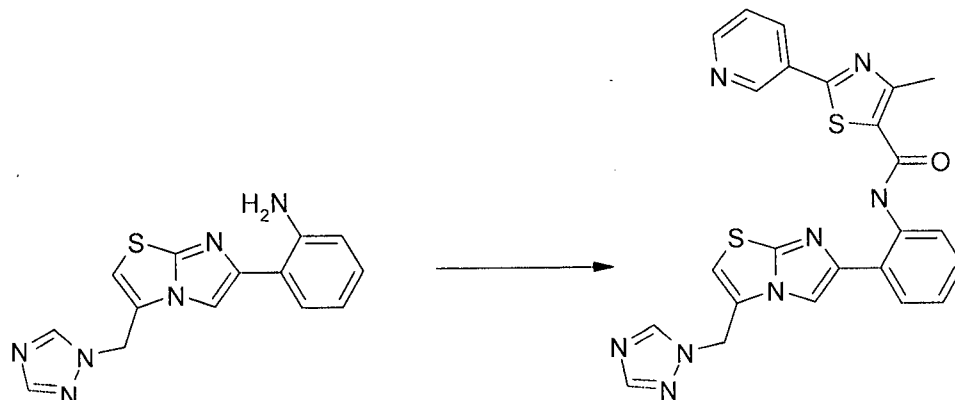
Preparación de 2-(3-[1,2,4]Triazol-1-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-fenilamina:



15

6-(2-Nitro-fenil)-3-[1,2,4]triazol-1-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol (54 g, 165 mmol) fueron disueltos en etanol (2.0 L). Pd/C (10%, 20 g) fue añadido y el frasco fue vaciado y vuelto a llenar con H_2 . La mezcla de reacción fue batida bajo H_2 a temperatura ambiente (2 días). La mezcla fue pasada a través de un cojincillo de gel de sílice y el filtrado fue concentrado in vacuo para dar un sólido
 20 amarillo. El sólido fue lavado con etanol para dar 2-(3-[1,2,4]triazol-1-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-fenilamina como un sólido amarillo (46 g, 94% producción.)

Preparación de 4-Metil-2-piridin-3-il-tiazol-5- ácido carboxílico [2-(3[1,2,4]triazol-1-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-fenil]-amida:



Una mezcla de 2-(3-[1,2,4]triazol-1-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-
 5 fenilamina (60 g, 202 mmol), 4-metil-2-piridin-3-il-tiazol-5-ácido carboxílico (54 g, 245 mmol), HATU (154 g, 405 mmol), y DIEA (132 mL, 800 mol) en DMF (350 mL) fue batida a temperatura ambiental durante la noche. TLC indicó que la reacción fue completa. El precipitado fue recolectado por filtrado, lavado con mucha agua, acetona metanol y DCM para dar un sólido blanco (79 g, 79 %
 10 producción). El sólido fue recristalizado de ácido acético, lavado con una solución saturada de Na_2CO_3 (1.0 L x 2), agua (2 L) y etanol (1.0 L), y secado en un horno al vacío a 45°C durante la noche para dar 4-metil-2-piridin-3-il-tiazol-5- ácido carboxílico [2-(3[1,2,4]triazol-1-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-fenil]-amida como un sólido blanco (62 g, 62% producción). $^1\text{H NMR}$ (DMSO-d_6 , 400 MHz): δ 2.79 (s, 3H), 5.78 (s, 2H), 7.22 (m, 1H), 7.36 (m, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.60 (m, 1H), 7.79 (d, $J=6.4\text{Hz}$, 1H), 8.04 (s, 1H), 8.33 (m, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.54 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 8.75 (m, 1H), 8.86 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 12.73 (s, 1H). ESI-MS: 499.3($\text{M}+1$), 521.4($\text{M}+23(\text{Na})$).

20 La sal HCl de 4-metil-2-piridin-3-il-tiazol-5- ácido carboxílico [2-(3[1,2,4]triazol-1-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-fenil]-amida fue preparada suspendiendo 5.20 g de la base libre en metanol (350 mL). A esto se añadieron 4N HCl (35 mL), y la mezcla se calentó hasta disolverse. La solución

195
fue enfriada a -78°C y secada via liofilización para producir 4-metil-2-piridin-3-il-tiazol-5-ácido carboxílico [2-(3[1,2,4]triazol-1-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-l)-fenil]-amida- HCl sal (7.49 g) como un sólido amarillo.

5 Ejemplo 4: Formación de Sal, Clasificación y Caracterización

Ocho sales aceptables (Regulatorias y pKa) fueron hechas del Compuesto 1, nombradas con ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido metano sulfónico, ácido maleico, ácido fosfórico, ácido L-tartárico, ácido cítrico, y ácido málico. Las sales resultantes o la base libre fueron clasificadas en:

- 10 1) Procesamiento, morfología, polimorfismo;
- 2) Forma cristalina, polimorfa estable única;
- 3) Estabilidad física;
- 4) Estabilidad acelerada de plato abierto ($40^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RH}$); y
- 5) Disolución biorelevante.

15

Figura 1 despliega los resultados de Calorimetría de Escaneo Diferencial (DSC) sobre la forma de sal HCl del Compuesto 1, que muestra pequeñas transiciones endotérmicas alrededor de 111°C y 192°C . Los resultados del Análisis Termogravimétrico (TGA) indican una pérdida general de peso al calentar, potencialmente asociada con pérdida de solventes (lo más probable es que sea debido a la pérdida de agua con base en la naturaleza higroscópica de esta sal HCl), pero ningún evento de pérdida de peso corresponde a las identificadas DSC temperaturas de transición a 111°C y 192°C . Por lo tanto, estos dos eventos térmicos DSC parecen estar asociados a cambios de la fase de nivel molecular, y sugerirían transiciones entre formas polimorfas de la sal

20

25

del Compuesto 1 al calentarse. Por encima de 200°C, los resultados DSC indicant la descomposición de la sal del Compuesto 1.

Figura 2 demuestra que la forma de base libre del Compuesto 1 tiene un solo evento endotérmico a 236°C el cual está asociado con un solo, cristalino punto de fusión. Debido a que no se observan otras transiciones térmicas en los resultados DSC o TGA, pareciera que el Compuesto 1 existe solo como una fase sencilla (i.e. no polimorfismos) sobre el rango térmico evaluado.

Potenciales cambios de fase polimorfa sobre el rango termal de f 0 - 125°C, como se ve en la Figura 1 por encima para la sal HCl, puede conducir cambios de la sustancia de la droga en condiciones normales de procesamiento y almacenaje. Debido a que las transiciones polimorfas pueden tener significativos efectos sobre la disolución y la bio-disponibilidad de la sustancia de la droga resulta practico seleccionar formas de la sustancia de la droga que minimicen o eliminen el potencial de transiciones de fase. Por lo tanto, los resultados de las Figuras 1 y 2 tomados en conjunto indican que la forma de base libre de la droga es superior como sustancia de droga, con base en la aparente forma cristalina única del Compuesto 1.

Ejemplo 5: Pruebas In Vivo

El propósito de este ejemplo fue el de comparar la eficacia del Compuesto 1 en formulaciones de sal y base libre en dos modelos de ratón diferentes de diabetes, un modelo de obesidad inducida por la dieta (DIO) y el Ob/ob ratón. La glucosa sanguínea fue el principal determinante a través del experimento de eficacia.

Para el modelo de obesidad inducida por dieta, ratones machos de seis semanas de edad C57BL/6 (Charles River Labs) fueron alimentados con una dieta alta en grasa (60% de calorías de grasa; Dietas de Investigación) durante aproximadamente 6 semanas hasta que su peso corporal alcanzó

aproximadamente 40 g. Compuestos de prueba fueron administrados por vía oral en alimentación forzada en las dosis indicadas. El vehículo usado fue 2% HPMC y 0.2% DOSS. Los pesos corporales de cada ratón individualmente fueron tomados dos veces a la semana. Cada dos semanas durante todo el estudio a los ratones de cada grupo se les tomó muestras de sangre por vía de la vena de la cola para determinación de la glucosa sanguínea. El análisis estadístico se completó usando el programa JMP (Versión 6). La Data fue analizada por una ANOVA de una sola vía en comparación al control usando un Test Dunnett. Un valor < 0.05 indicó una diferencia significativa entre los grupos.

Ob/ob ratones son manipulados genéticamente para que carezcan de leptina, una proteína importante para la saciedad que señala neurológicamente el fin del hambre. La mutación leptina es homocigote y una cepa heterocigote es incluida como control (Ob/+); este grupo no debe mostrar aumento de peso o glucosa sanguínea, aparte de los efectos normales de estar en una dieta alta en grasas. El compuesto 1 en su forma de base libre fue entonces testeado en el modelo DIO. Los resultados de los test de glucosa sanguínea para la base libre del Compuesto 1 a 100 mg/kg/día fue similar a la del resveratrol a 1000 mg/kg/día, metformina a 400 mg/kg/día y Compuesto 2 a 100 mg/kg/día, las cuales exhibieron reducciones significativas en glucosa sanguínea desde las dos semanas en adelante. (Figuras 3-5). Los resultados de las pruebas de glucosa sanguínea para el Compuesto 1 fueron similares a las del resveratrol, metformina y Compuesto 2, siendo que todos exhibieron significativas reducciones en glucosa sanguínea a partir de la semana 2 (Figuras 3-5). Para el grupo del Compuesto 1 en las semanas 2 y 3, el valor p fue de menos de .01, una reducción significativa del grupo vehículo. Aunque la glucosa sanguínea permaneció más baja que el vehículo para la semana 4 de la prueba de glucosa con alimentación, el significado se perdió para el Compuesto 2 y el resveratrol.

El compuesto 1 dosificado a 100 mg/kg como base libre mostró potencia mejorada en el modelo ob/ob, como es evidenciado en las Figuras 6-

8. Durante la semana 1, hay ya una disminución en la glucosa sanguínea de casi 60 mg/dL del grupo vehículo. Esta tendencia continuó para la glucosa en ayuno en la semana 2 (Figura 7) mientras que el grupo del Compuesto 1 tenía 158.3 mg/dL de glucosa en comparación con 285.3 mg/dL de glucosa en el grupo
5 vehículo. De acuerdo a los test ANOVA, el valor p fue menor de .0001, lo cual demostró una muy significativa reducción del grupo vehículo. Aunque los valores de glucosa sanguínea aumentaron en la semana 3, hay una significativa reducción ($p < .01$) en relación a los grupos vehículo.

Se realizó un Segundo experimento ob/ob comparando directamente al
10 Compuesto 1 como base libre Vs. HCl así como también el Compuesto 2, todos a 100 mg/kg. La data de una y dos semanas de glucosa sanguínea en ayuno se muestra en las Figuras 9 y 10 respectivamente.

EQUIVALENTES

La presente invención proporciona entre otras cosas compuestos sirtuina-
15 activadores y métodos para su uso. Aunque han sido discutidas incorporaciones específicas de la invención, la especificación precedente es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variantes de la invención se harán aparentes para aquellos calificados en el arte luego de revisar esta especificación. El total alcance de la invención será determinado en referencia a
20 las reivindicaciones, junto a su completo ámbito de equivalentes, y la especificación junto a dichas variantes.

INCORPORACION POR REFERENCIA

Todas las publicaciones y patentes aquí mencionadas, incluyendo aquellos
25 ítems listados abajo, están aquí incorporados por referencia en su totalidad, como si cada publicación individual o patente estuviera específica e individualmente indicada para ser incorporada a modo referencial. En caso de

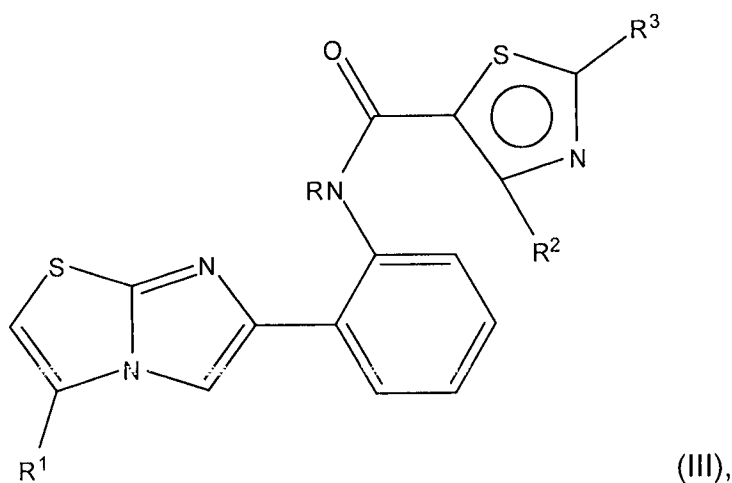
conflicto, la presente aplicación , incluyendo cualquier definición aquí establecida, controlará. .

También están incorporadas en su totalidad a modo referencial cualquier secuencia de polinucleótidos y polipéptidos con referencia a un número de acceso correlacionado a una entrada en una base de datos pública , tal como las mantenidas por *The Institute for Genomic Research* (TIGR) (www.tigr.org) y/o el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

También incorporadas a modo referencial están las siguientes : Publicaciones PCT WO 2005/002672; 2005/002555; y 2004/016726.

Lo reivindicado es:

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



o una sal de ésta, donde:

R es -H o -CH₃;

R¹ es un grupo heterociclilmetil sustituido o no sustituido conteniendo nitrógeno;

R² es -H o -CH₃; y

R³ es un grupo piridil no sustituido,

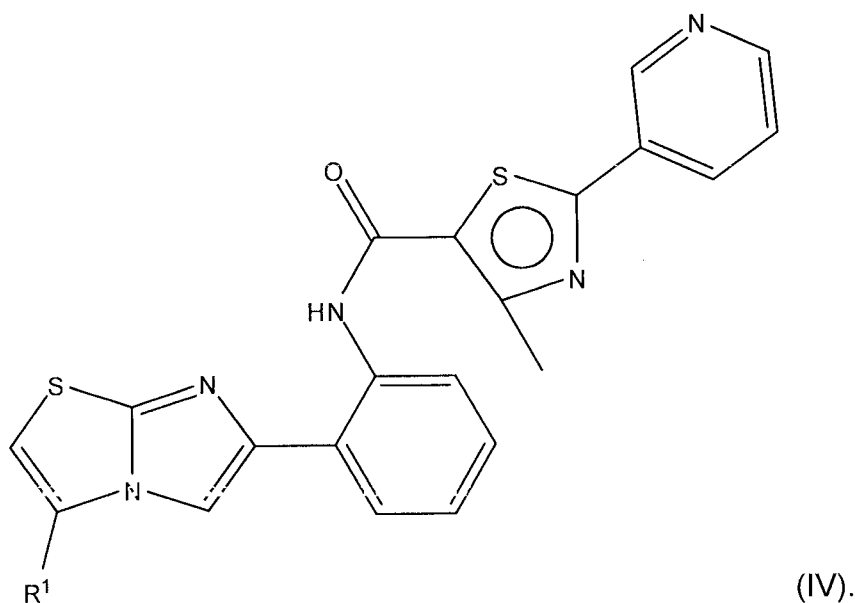
2. El compuesto de la reivindicación 1, donde R¹ es un grupo heterociclilmetil conteniendo un átomo de nitrógeno y opcionalmente un segundo hetero átomo seleccionado de nitrógeno y oxígeno.

3. El compuesto de la reivindicación 2, donde R^1 es un (substituido o no substituido no-aromático heterocíclico) grupo metil.

4. El compuesto de la reivindicación 3, donde R^1 es un grupo morfolinometil

5. El compuesto de la reivindicación 1, donde R^1 es un grupo 1,2,4-triazolilmetil.

6. El compuesto de la reivindicación 1, donde el compuesto está representado por la Fórmula Estructural (IV):



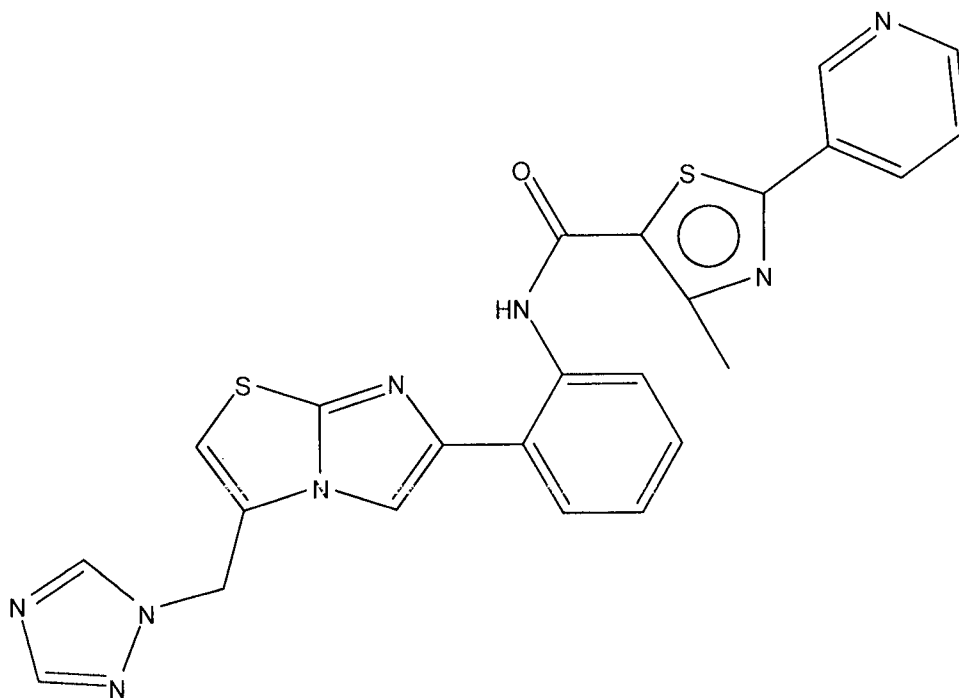
(IV).

7. El compuesto de la reivindicación, donde R^1 es un grupo heterociclilmetil conteniendo un átomo de nitrógeno y opcionalmente un segundo hetero átomo seleccionado de nitrógeno y oxígeno.

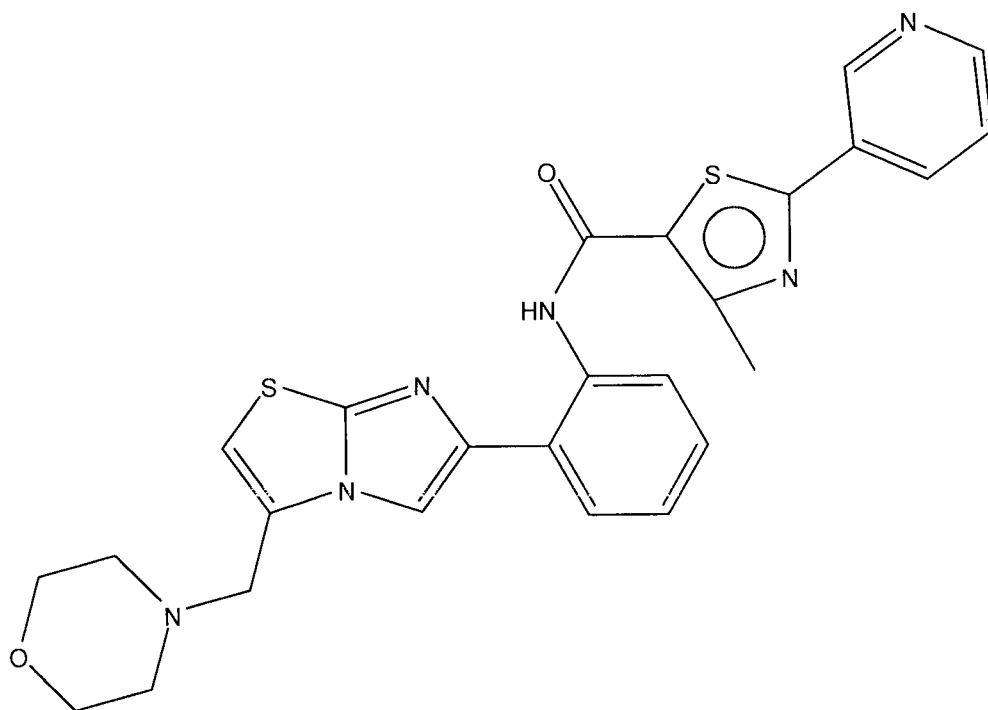
203

8. El compuesto de la reivindicación 7, donde R^1 es un (substituido o no substituido no-aromático heterocíclico) grupo metil. .

5 9. El compuesto de la reivindicación 6, donde el compuesto está representado por la Fórmula Estructural (VI):



10. Un compuesto representado por la Fórmula Estructural (V):



(V),

o una sal de ésta.

11. El compuesto de la reivindicación 10, donde el compuesto es una base
5 libre.

12. El compuesto de la reivindicación 10, donde el compuesto es una sal.

13. Una composición farmacéutica comprendiendo un compuesto o una sal
farmacéuticamente aceptable de cualquiera de las reivindicaciones precedentes
10 y un portador farmacéuticamente aceptable.

14. La composición de la reivindicación 13, donde la composición
farmacéutica está libre de pirógenos.

15. La composición de la reivindicación 13, además comprendiendo un agente activo adicional.

5 16. Un método para tratar o prevenir la resistencia a la insulina, un síndrome metabólico, diabetes, o las complicaciones de ésta, o para aumentar la sensibilidad a la insulina en un sujeto, comprendiendo administrar a un sujeto en necesidad de ello una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos una composición farmacéutica de la reivindicación 13.

10 17. El método de la reivindicación 16, donde dicho compuesto aumenta al menos una de: el nivel o la actividad de una proteína sirtuina..

18. El método de la reivindicación 17, donde el compuesto aumenta la actividad des-acetilasa de la proteína sirtuina.

15

19. El método de la reivindicación 17, donde la proteína sirtuina es una proteína de mamífero.

20

20. El método de la reivindicación 17, donde la proteína sirtuina SIPT1 de humano.

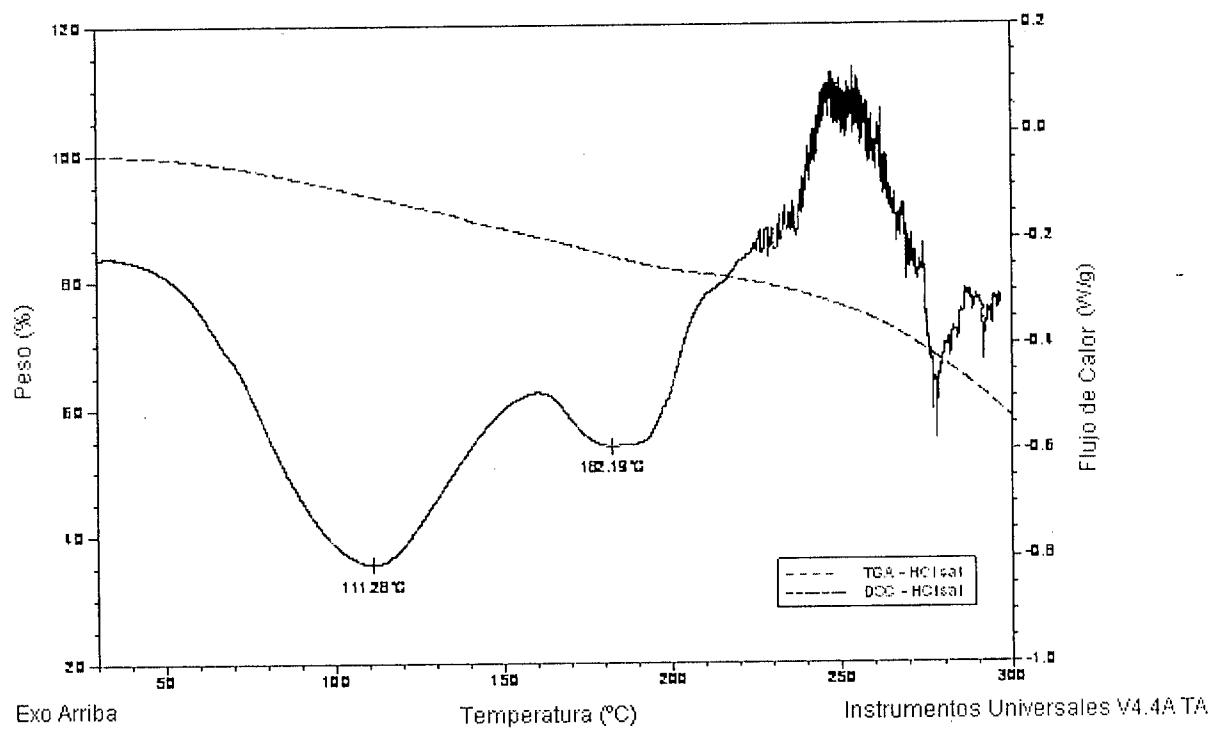
25

21. El método de la reivindicación 17, donde el compuesto no tiene sustancialmente una o más de las siguientes actividades: inhibición de la PI3-quinasa, inhibición de la aldoreductasa, inhibición de la tirosina quinasa, transactivación de EGFR tirosina quinasa, dilatación coronaria,

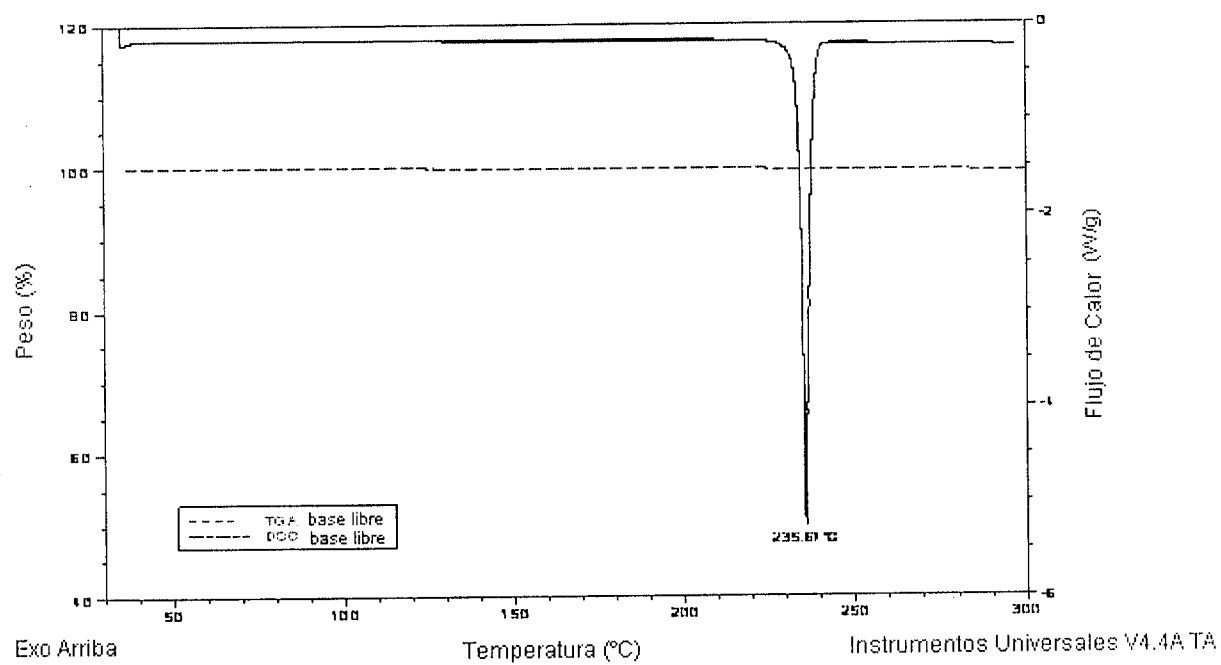
o actividad espasmolítica, a concentraciones del compuesto que son efectivas para aumentar la actividad de des-acetilación de una proteína SIRT1 y/o SIRT3.

RESUMEN

Aquí se proporcionan novedosos compuestos sirtuina-moduladores y los métodos para usarlos. Los compuestos sirtuina-moduladores pueden ser usados para incrementar la duración de la vida de una célula, y tratar y/o prevenir una amplia variedad de enfermedades y desórdenes incluyendo, por ejemplo, enfermedades o desórdenes relacionados al envejecimiento o el estrés, diabetes, obesidad, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad cardiovascular, desórdenes de la coagulación sanguínea, inflamación, cáncer, y/o rubicundez, así como también enfermedades o desórdenes que puedan beneficiarse de una incrementada actividad mitocondrial. También se proporcionan composiciones comprendiendo un compuesto sirtuina-modulador en combinación con otro agente.

**Figura 1**

209

**Figura 2**

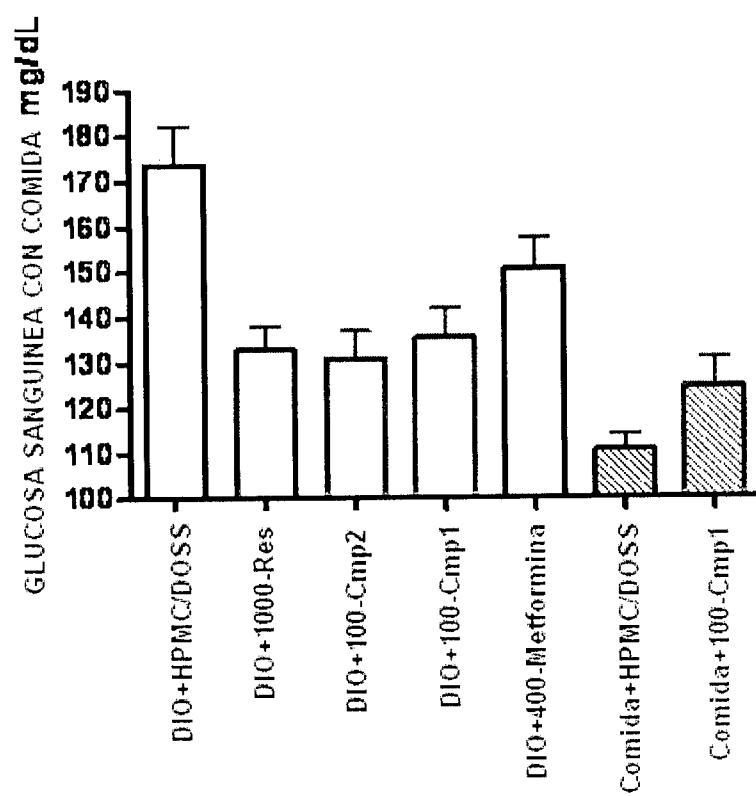
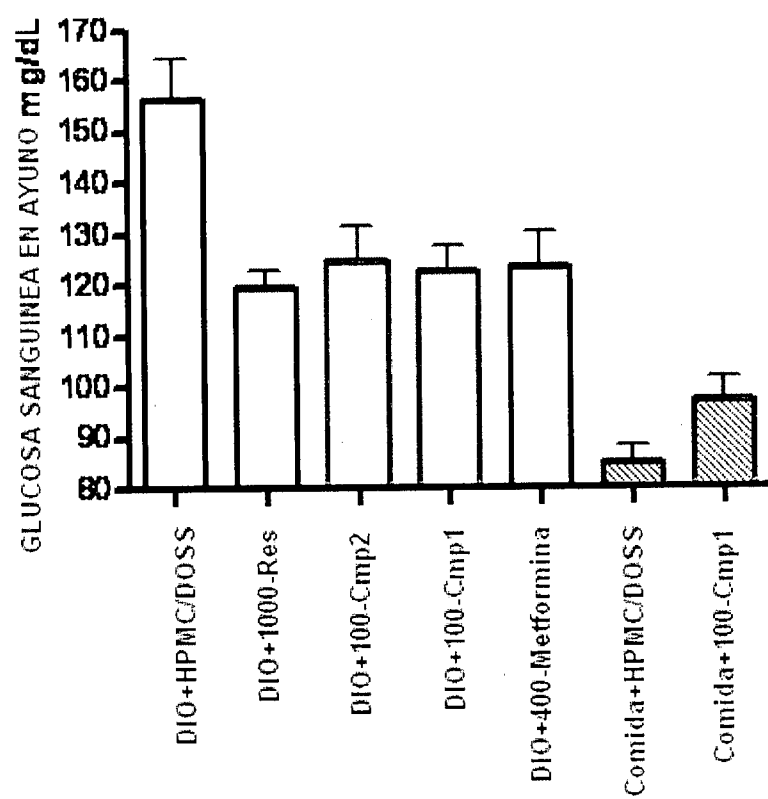


Figura 3

**Figura 4**

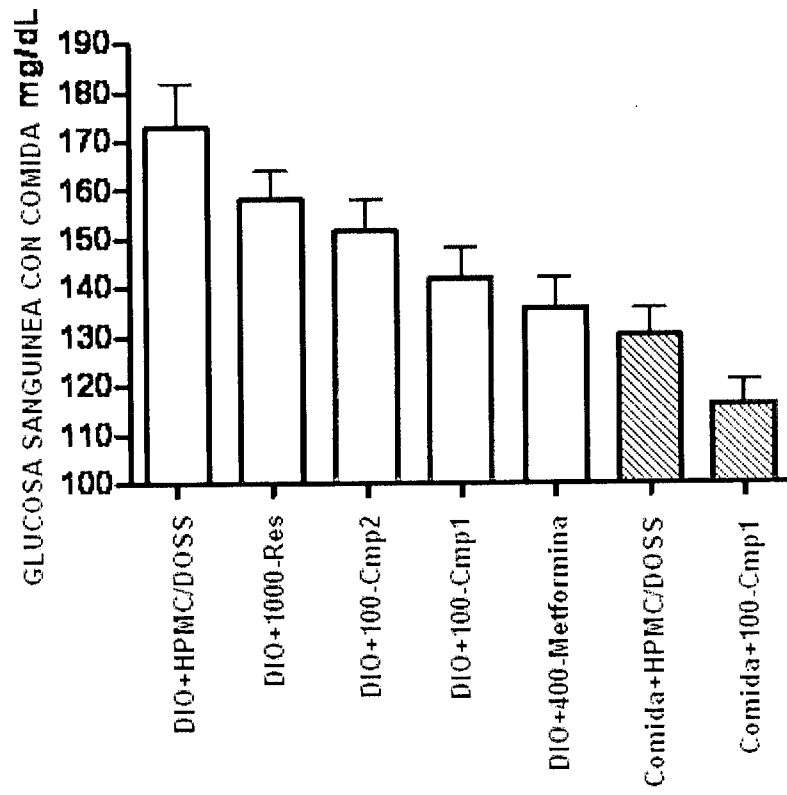


Figura 5

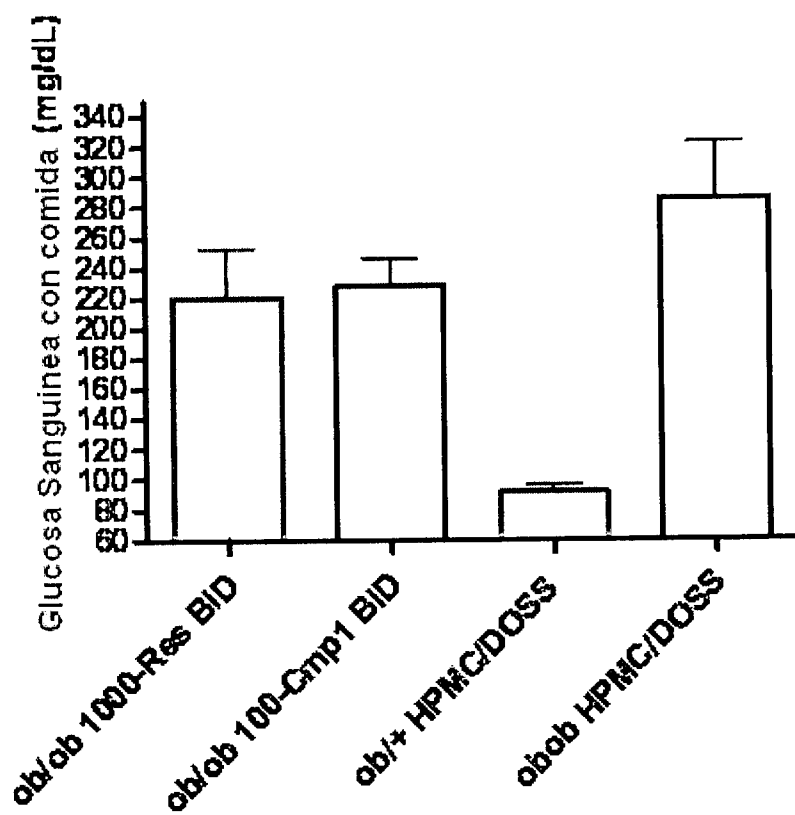


Figura 6

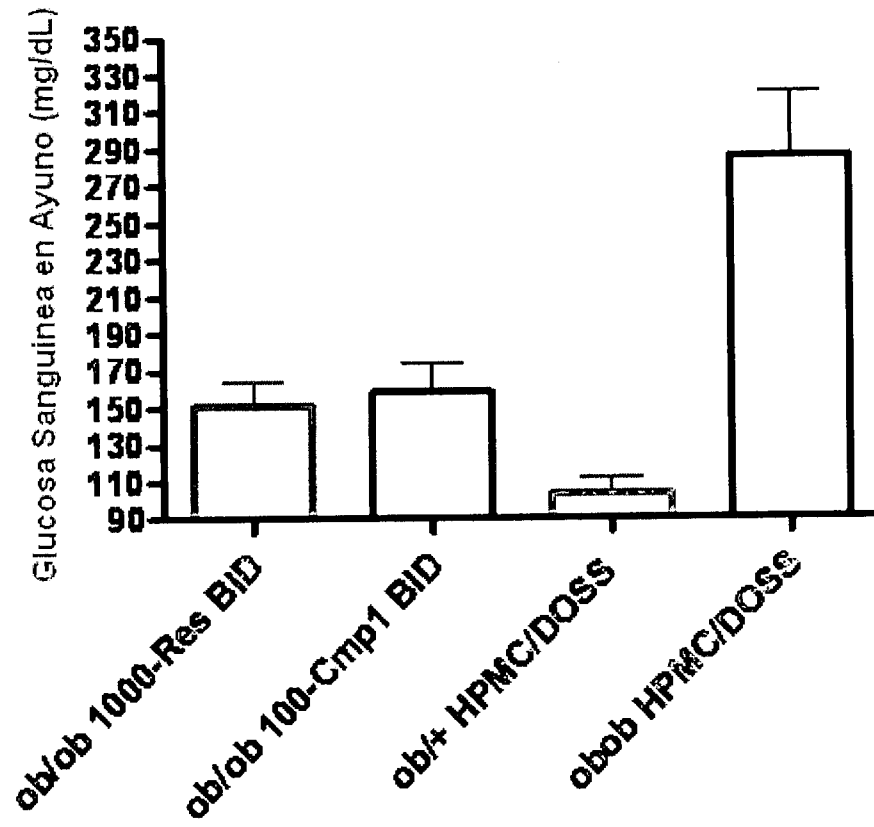


Figura 7

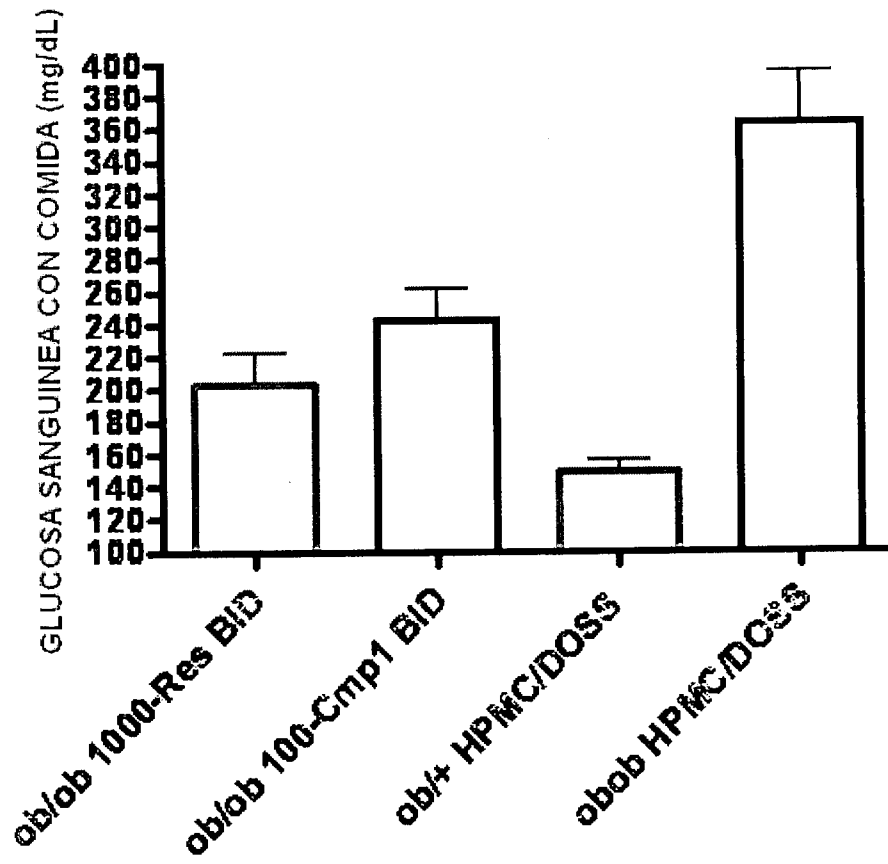


Figura 8

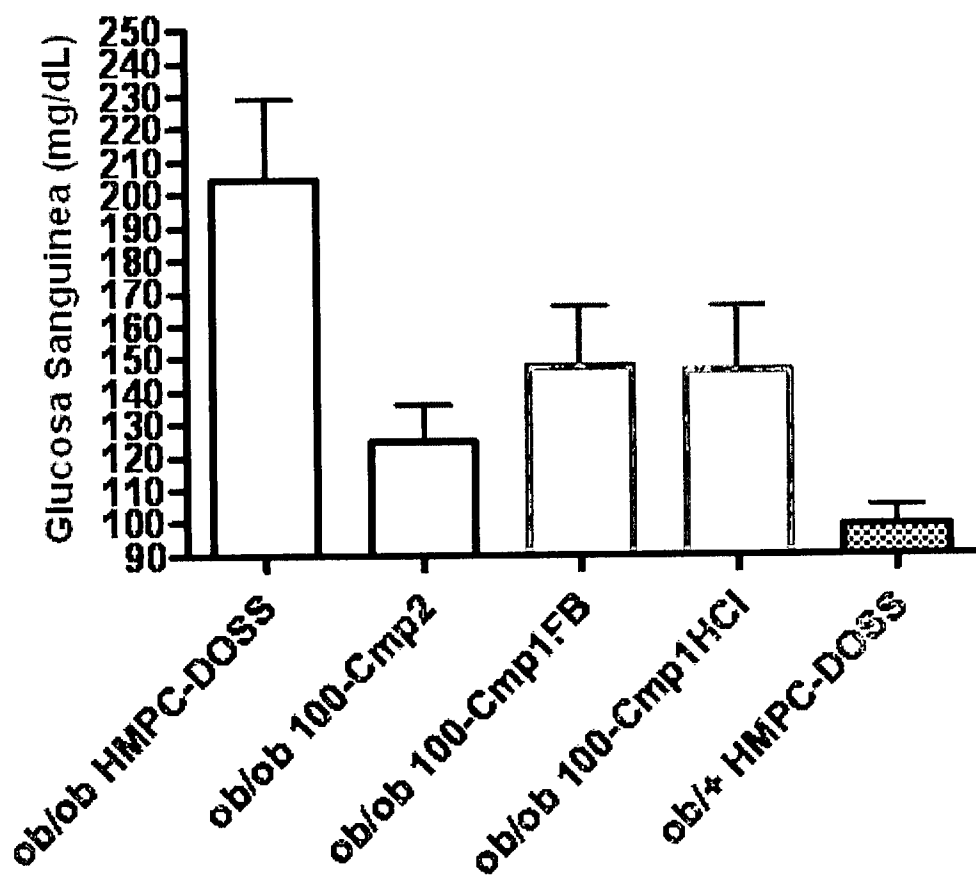


Figura 9

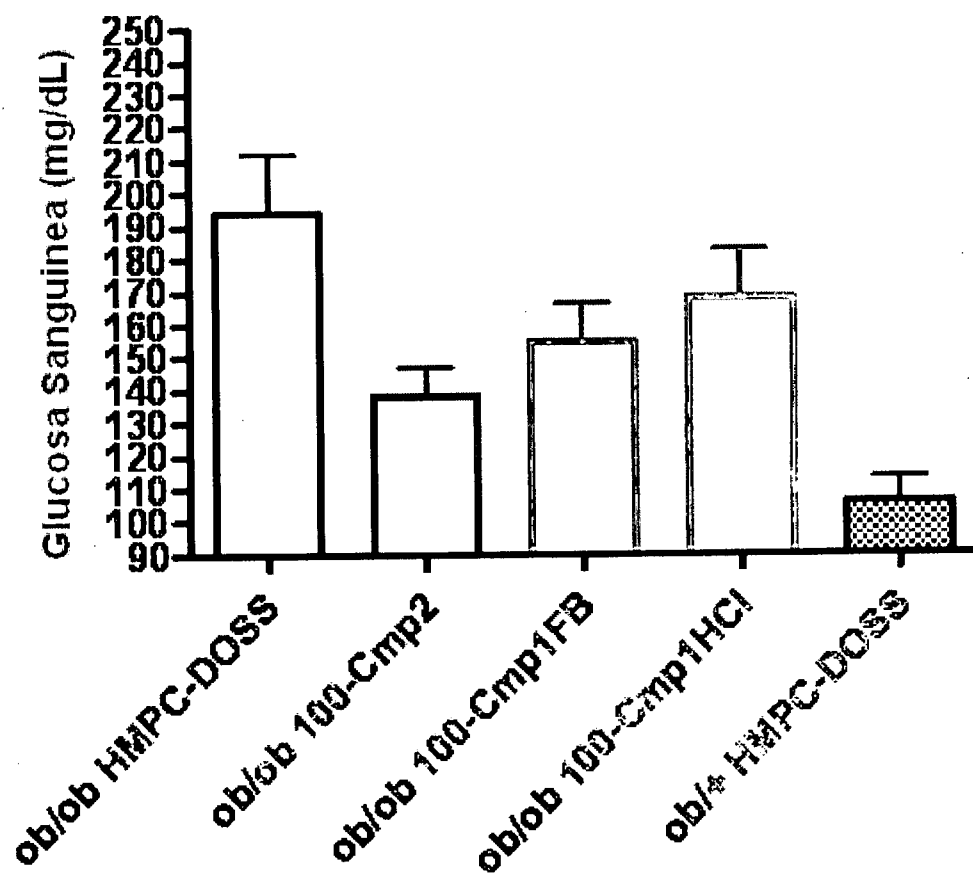


Figura 10

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

ROPES & GRAY LLP
Attn: Vincent, Matthew P.
One International Place
Boston, MA 02110
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

RECEIVED

NOV 10 2008

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

ROPES & GRAY LLP - IP DOCKETING
REFERRED TO
NOTED BY

Date of mailing
(day/month/year) 05/11/2008

Applicant's or agent's file reference

SIRT-034-W01

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.

PCT/US2008/007771

International filing date

(day/month/year) 20/06/2008

Applicant

SIRTRIS PHARMACEUTICALS, INC.

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 24 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.92.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/ISA/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority



European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2230 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Eva Brell

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 23 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement, under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 62.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/IPEA/401).

If a demand for international preliminary examination is made, the written opinion of the International Searching Authority will, except in certain cases where the International Preliminary Examining Authority did not act as International Searching Authority and where it has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b), be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority. If a demand is made, the applicant may submit to the International Preliminary Examining Authority a reply to the written opinion together, where appropriate, with amendments before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later (Rule 13bis.1(c)).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 42 and 44)

Applicant's or agent's file reference SIRT-034-WO1	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2008/007771	International filing date (day/month/year) 20/06/2008	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 20/06/2007
Applicant SIRTRIS PHARMACEUTICALS, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 13.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III)

4. With regard to the **title**,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

SIRTUIN MODULATING IMIDAZOTHIAZOLE COMPOUNDS

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 32.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/007771

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07D513/04 A61K31/429 A61P3/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07D A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/019344 A (SIRTRIS PHARMACEUTICALS INC [US]; NUNES JOSEPH J [US]; MILNE JILL [US]) 15 February 2007 (2007-02-15) claims 1-125; table 4; compound 735	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 October 2008

Date of mailing of the international search report

05/11/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.O. 5313 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stroeter, Thomas

223

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/007771

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007019344 A	15-02-2007	AU 2006278396 A1	15-02-2007
		AU 2006278397 A1	15-02-2007
		AU 2006278503 A1	15-02-2007
		AU 2006278504 A1	15-02-2007
		AU 2006278505 A1	15-02-2007
		CA 2617532 A1	15-02-2007
		CA 2617557 A1	15-02-2007
		CA 2618260 A1	15-02-2007
		CA 2618368 A1	15-02-2007
		CA 2618370 A1	15-02-2007
		EP 1910384 A1	16-04-2008
		EP 1910362 A1	16-04-2008
		EP 1910385 A1	16-04-2008
		EP 1909910 A1	16-04-2008
		EP 1910380 A1	16-04-2008
		US 2007037865 A1	15-02-2007
		WO 2007019345 A1	15-02-2007
		WO 2007019346 A1	15-02-2007
		WO 2007019416 A1	15-02-2007
		WO 2007019417 A1	15-02-2007

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2008/007771

International filing date (day/month/year)
20.06.2008

Priority date (day/month/year)
20.06.2007

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
II JV. C07D513/04 A61P31/429 A61P3/10

Applicant
SIRTRIS PHARMACEUTICALS, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☐ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☒ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80293 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tlx 522656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 1465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Stroeter, Thomas

Telephone No. +49 89 2399-3038



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2003/007771

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2008/007771

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-21</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-21</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-21</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2008/007771

Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial
applicability; citations and explanations supporting such statement**

- 1 The present application is directed to imidazo[2,1-b]thiazole derivatives as sirtuin modulating compounds for the treatment of a variety of disorders including diabetes, insulin resistance or metabolic syndrome.
- 2 Claims 16-21 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv)/67.1(iv) PCT. The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.
- 3 Reference is made to the following document:
D1: WO 2007/019344 A (SIRTRIS PHARMACEUTICALS INC) 15 February 2007
- 4 Art. 33(2) PCT: All claims appear to be novel. In particular formula (III) of the broadest compound claim 1 appears to be a novel selection of the compounds disclosed in the compound claims of D1 since D1 does not disclose specific compounds having a thiazole ring attached to the amide carbonyl group.
- 5 Art. 33(3) PCT: In view of closest prior art document D1, the problem to be solved appears to reside in the provision of further sirtuin-modulating imidazo[2,1-b]-thiazole compounds for the treatment of e.g. diabetes, insulin resistance or metabolic syndrome.

Since the presently claimed compounds are completely encompassed by the scope of the compounds of D1, they represent a selection of the compounds disclosed in the compound claims of D1.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2008/007771

Thus, the solution proposed by the Applicant being the specific biaryl group attached to the amide carbonyl group is already disclosed in D1 (see definition of R³¹) although no compounds are explicitly described. The mere choice of specific compounds within a group of compounds known for the same pharmacological activity cannot be considered inventive per se since if it is an arbitrary choice. If the Applicant considers the present selection to be a purposive one, he is requested to submit further information and argumentation in order to demonstrate an unexpected effect, e.g. a better inhibition activity over the closest prior art. No comparative tests which would support the involvement of an inventive step have yet been provided in the present description. Thus, the present claims are not inventive.

Furthermore it is noted that, the Applicant may be entitled to claim all obvious modifications of what was described (Guidelines C-III, 6.2). But an open-ended term like "substituted" as used throughout the claims of the present application, without specification of the possible substituents, is, however, speculative in the sense of Article 33(3) PCT: It includes a great variety of structural possibilities not yet explored by the applicant, the effect of which cannot be foreseen having regard to the problem underlying the present invention. Such a non-limiting term as cited above includes

- chemical groups which are structurally so remote from those of the examples that the activity of molecules comprising them cannot be predicted within the limits of qualitative structure-activity-relationship considerations
- mutagenic and/or toxic groups
- known pharmacophoric groups with the same or a completely different activity which leads to hybrid molecules or bio-conjugates the actual biological activities of which are unpredictable,

i.e. it cannot be foreseen, whether those molecules have to be considered obvious modifications of prepared and tested examples or provide a solution to the problem at all.

6 The subject-matter of the present claims 1-21 is industrially applicable and thus

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2008/007771

fulfils the requirements of Article 33(4) PCT.

Re Item VII

Certain defects in the international application

The requirements of Rule 5.1(a)(ii) PCT are not met since the most relevant background art D1 has not been identified in the description.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

- 1 The term "substantially" used in claim 21 is vague and unclear and leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical features to which it refers, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claim unclear (Art. 6 PCT).
- 2 Claim 10 is encompassed by the scope of present claim 1 and must therefore be considered to be a dependent claim. Any dependent claim must include a reference to the claim upon which it is dependent in order to fulfill the requirements of Rule 6.4 (a) PCT.

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information

For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.

Amending claims under Art. 19 PCT

Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.

Filing a demand for international preliminary examination

In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT).

If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).

Filing informal comments

After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.

End of the international phase

At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).

Relevant PCT Rules and more information

Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/JS2008/007771

International filing date (day/month/year)
20.06.2008

Priority date (day/month/year)
20.06.2007

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07D513/04 A61P31/429 A61P3/10

Applicant
SIRTRIS PHARMACEUTICALS, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☒ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-30293 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 T.: 523656 spmu d
Fax: +49 89 2399 - 4466

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Stroeter, Thomas

Telephone No. +49 89 2399-8088



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2008/007771

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

233

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2008/007771

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-21</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-21</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-21</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2008/007771

Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial
applicability; citations and explanations supporting such statement**

- 1 The present application is directed to imidazo[2,1-b]thiazole derivatives as sirtuin modulating compounds for the treatment of a variety of disorders including diabetes, insulin resistance or metabolic syndrome.
- 2 Claims 16-21 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv)/67.1(iv) PCT. The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.
- 3 Reference is made to the following document:
D1: WO 2007/019344 A (SIRTRIS PHARMACEUTICALS INC) 15 February 2007
- 4 Art. 33(2) PCT: All claims appear to be novel. In particular formula (III) of the broadest compound claim 1 appears to be a novel selection of the compounds disclosed in the compound claims of D1 since D1 does not disclose specific compounds having a thiazole ring attached to the amide carbonyl group.
- 5 Art. 33(3) PCT: In view of closest prior art document D1, the problem to be solved appears to reside in the provision of further sirtuin-modulating imidazo[2,1-b]-thiazole compounds for the treatment of e.g. diabetes, insulin resistance or metabolic syndrome.

Since the presently claimed compounds are completely encompassed by the scope of the compounds of D1, they represent a selection of the compounds disclosed in the compound claims of D1.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2008/007771

Thus, the solution proposed by the Applicant being the specific biaryl group attached to the amide carbonyl group is already disclosed in D1 (see definition of R³¹) although no compounds are explicitly described. The mere choice of specific compounds within a group of compounds known for the same pharmacological activity cannot be considered inventive per se since if it is an arbitrary choice. If the Applicant considers the present selection to be a purposive one, he is requested to submit further information and argumentation in order to demonstrate an unexpected effect, e.g. a better inhibition activity over the closest prior art. No comparative tests which would support the involvement of an inventive step have yet been provided in the present description. Thus, the present claims are not inventive.

Furthermore it is noted that, the Applicant may be entitled to claim all obvious modifications of what was described (Guidelines C-III, 6.2). But an open-ended term like "substituted" as used throughout the claims of the present application, without specification of the possible substituents, is, however, speculative in the sense of Article 33(3) PCT: It includes a great variety of structural possibilities not yet explored by the applicant, the effect of which cannot be foreseen having regard to the problem underlying the present invention. Such a non-limiting term as cited above includes

- chemical groups which are structurally so remote from those of the examples that the activity of molecules comprising them cannot be predicted within the limits of qualitative structure-activity-relationship considerations
- mutagenic and/or toxic groups
- known pharmacophoric groups with the same or a completely different activity which leads to hybrid molecules or bio-conjugates the actual biological activities of which are unpredictable,

i.e. it cannot be foreseen, whether those molecules have to be considered obvious modifications of prepared and tested examples or provide a solution to the problem at all.

6 The subject-matter of the present claims 1-21 is industrially applicable and thus

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2008/007771

fulfils the requirements of Article 33(4) PCT.

Re Item VII

Certain defects in the international application

The requirements of Rule 5.1(a)(ii) PCT are not met since the most relevant background art D1 has not been identified in the description.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

- 1 The term "substantially" used in claim 21 is vague and unclear and leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical features to which it refers, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claim unclear (Art. 6 PCT).
- 2 Claim 10 is encompassed by the scope of present claim 1 and must therefore be considered to be a dependent claim. Any dependent claim must include a reference to the claim upon which it is dependent in order to fulfill the requirements of Rule 6.4 (a) PCT.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2008/007771

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07D513/04 A61K31/429 A61P3/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EFO-Internal, WPI Data, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/019344 A (SIRTRIS PHARMACEUTICALS INC [US]; NUNES JOSEPH J [US]; MILNE JILL [US]) 15 February 2007 (2007-02-15) claims 1-125; table 4; compound 735 -----	1-21



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

S document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 October 2008

Date of mailing of the international search report

05/11/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.O. 5813 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-5016

Authorized officer

Stroeter, Thomas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/007771

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007019344 A	15-02-2007	AU 2006278396 A1	15-02-2007
		AU 2006278397 A1	15-02-2007
		AU 2006278503 A1	15-02-2007
		AU 2006278504 A1	15-02-2007
		AU 2006278505 A1	15-02-2007
		CA 2617532 A1	15-02-2007
		CA 2617557 A1	15-02-2007
		CA 2618360 A1	15-02-2007
		CA 2618368 A1	15-02-2007
		CA 2618370 A1	15-02-2007
		EP 1910384 A1	16-04-2008
		EP 1910362 A1	16-04-2008
		EP 1910385 A1	16-04-2008
		EP 1909910 A1	16-04-2008
		EP 1910380 A1	16-04-2008
		US 2007037865 A1	15-02-2007
		WO 2007019345 A1	15-02-2007
		WO 2007019346 A1	15-02-2007
		WO 2007019416 A1	15-02-2007
		WO 2007019417 A1	15-02-2007



No. 10-001888-00000-0000

Fecha: 2010-01-08 16:54:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 238

ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Descripción de la invención
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
 - ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño Industrial
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO

REFERENCIA	Radicación No.	10 1888
	Solicitud internacional	PCT/US2008/007771
	Fecha inicio fase nacional	20/01/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	2613

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

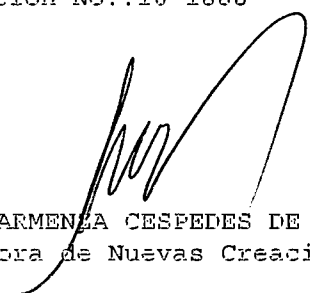
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...



Radicación No.: 10 1888


ALIX CARMEN CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha _____
adpall , **26 FEB. 2010**



Bogotá,
2020

Doctor(a)

OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO

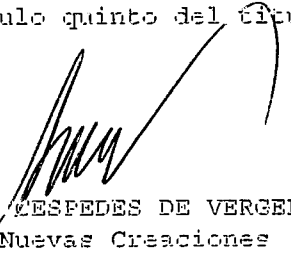
Apoderado(a) y/o Representante de
SIRTRIS PHARMACEUTICALS

REFERENCIA	Radicación No.	10 1388
	Solicitud internacional	PCT/US2008/007771
	Fecha inicio fase nacional	20/01/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	2614

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 28 FEB. 2010
adpall