

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 401 342**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/47	(2006.01)	C12N 9/12	(2006.01)
A61K 38/45	(2006.01)	C12N 15/09	(2006.01)
G01N 33/50	(2006.01)		
A61K 48/00	(2006.01)		
A61P 43/00	(2006.01)		
C12N 1/15	(2006.01)		
C12N 1/16	(2006.01)		
C12N 1/20	(2006.01)		
C12N 5/00	(2006.01)		
C12N 5/10	(2006.01)		

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2006 E 06734562 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2012 EP 1851240**

(54) Título: **Métodos y composiciones para prolongar el período de vida y aumentar la resistencia al estrés de células y organismos**

(30) Prioridad:

08.02.2005 US 53185

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.04.2013

(73) Titular/es:

**THE PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE (100.0%)
17 QUINCY STREET
CAMBRIDGE, MA 02138, US**

(72) Inventor/es:

**SINCLAIR, DAVID, A. y
BITTERMAN, KEVIN, J.**

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 401 342 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para prolongar el período de vida y aumentar la resistencia al estrés de células y organismos

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de EE.UU. N° de serie 11/053.185 presentada el 8 de febrero de 2005.

10

Declaración de derechos

Esta invención se realizó con el apoyo gubernamental bajo RO1 GM068072 otorgado por el Instituto Nacional de la Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

15

Antecedentes de la invención

Estudios fisiológicos y, más recientemente, análisis de chips ("array") de ADN (DNA) de modelos de expresión de genes han confirmado que el envejecimiento es un proceso biológico complejo. En contraposición, estudios genéticos en organismos modelo han demostrado que cambios relativamente secundarios en el entorno de un organismo o constitución genética pueden ralentizar drásticamente el proceso de envejecimiento. Por ejemplo, el período de vida de muchos diversos organismos se puede ampliar grandemente limitando simplemente la ingesta de calorías, en un régimen dietético conocido como restricción calórica (1-3).

25 ¿Cómo cambios simples pueden tener efectos tan profundos sobre un proceso complejo tal como el envejecimiento? Surge una imagen en la que todos los eucariotas poseen un sistema regulador sorprendentemente conservado que gobierna el ritmo de envejecimiento (4,5). Un sistema regulador de este tipo puede haber surgido evolutivamente para permitir a los organismos sobrevivir en condiciones adversas redirigiendo recursos a partir del crecimiento y la reproducción a vías que proporcionen resistencia al estrés (4,6).

30 Un modelo que ha demostrado ser particularmente útil en la identificación de factores reguladores del envejecimiento es la levadura incipiente, *S. cerevisiae*. El período de vida replicativo en *S. cerevisiae* se define típicamente como el número de retoños o “células hijas” producidos por una “célula madre” individual (7). Las células madre sufren cambios dependientes de la edad que incluyen un aumento de tamaño, una ralentización del ciclo celular, un aumento del nucléolo, un incremento en los niveles de NAD⁺ de estado estacionario, una gluconeogénesis y almacenamiento de energía incrementados y esterilidad que resulta de la pérdida del silenciamiento en telómeros y loci de tipo apareante (8-13). Una medida alternativa del período de vida de levaduras, conocido como envejecimiento cronológico, es el período de tiempo en el que una población de células no divisorias sigue siendo viable cuando se la priva de nutrientes (14). Un período de vida cronológico incrementado se correlaciona con una resistencia incrementada al choque térmico y al estrés oxidativo, sugiriendo que la lesión acumulativa a componentes celulares es una causa principal de este tipo de envejecimiento (14, 15). El grado de solapamiento entre envejecimiento replicativo y cronológico es actualmente confuso.

Una causa del envejecimiento replicativo de levaduras ha demostrado proceder de la inestabilidad del locus repetido del ADN ribosomal (ADNr) (16). Esta inestabilidad da origen a formas circulares de ADNr denominadas ERCs que se replican, pero que fracasan en segregar células hijas. Finalmente, las ERCs se acumulan en más de 1000 copias, que se piensa matan a células titulando factores esenciales de la transcripción y/o replicación (16-18). Regímenes que reducen la recombinación de ADN tal como la restricción calórica o una delección *fob1* amplían el período de vida replicativo (17, 19, 20).

50 Un regulador clave del envejecimiento en levaduras es la proteína silenciadora Sir2 (17), una desacetilasa dependiente de nicotinamida adenina dinucleótico (NAD^+) (21-24). Sir2 es un componente del complejo herotrimérico Sir2/3/4 que cataliza la formación de heterocromatina silenciosa en los telómeros y los dos loci de tipo apareante silenciosos (25). Sir2 es también un componente del complejo RENT que se requiere para el silenciamiento en el locus de ADNr y para que salga de la telofase (26, 27). Recientemente, este complejo ha demostrado también estimular directamente la transcripción de ARNr por parte de Pol I y estar implicado en la regulación de la estructura nucleolar (28).

55

Estudios bioquímicos han demostrado que Sir2 puede desacetilar fácilmente las colas amino-terminales de

histonas H3 y H4, dando como resultado la formación de 1-O-acetil-ADP-ribosa y nicotinamida (21-23, 29). Cepas con copias adicionales de *SIR2* exhiben un silenciamiento incrementado de ADNr (30) y un período de vida 30% más prolongado (17). Recientemente, se ha demostrado que copias adicionales del homólogo *SIR2* de *C. elegans*, *sir-2.1*, amplía grandemente el período de vida en ese organismo (31). Esto implica que la vía reguladora dependiente de *SIR2* para el envejecimiento surgió en una fase temprana de la evolución y se ha mantenido bien conservada (4). El período de vida de las levaduras, al igual que el de metazoos, está también ampliado por intervenciones que se asemejan a la restricción calórica (19, 32). Mutaciones que reducen la actividad de la vía dependiente de cAMP (adenosina 3'5'-monofosfato) que responden a glucosa (PKA) amplían el período de vida en células de tipo salvaje (wt), pero no en cepas *sir2* mutantes, demostrando que *SIR2* es un componente clave situado aguas debajo de la vía de restricción calórica (19).

En la mayoría de los organismos existen dos vías de biosíntesis de NAD⁺ (véase la Fig. 1). NAD⁺ se puede sintetizar de novo a partir de triptófano o se puede reciclar en cuatro etapas a partir de nicotinamida a través de la vía salvaje de NAD⁺. La primera etapa en la vía salvaje de NAD⁺ bacteriana, la hidrólisis de nicotinamida en ácido nicotínico y amoníaco, es catalizada por el producto génico *pncA* (33). Un gen de *S. cerevisiae* con homología a *pncA*, *YGL037*, se le asignó recientemente el nombre de *PNC1* (SGD) (34). Una nicotinato fosforribosiltransferasa, codificada por el gen *NPT1* en *S. cerevisiae*, convierte el ácido nicotínico procedente de esta reacción en ácido nicotínico mononucleótido (NaMN) (35-38). En este punto convergen la vía salvaje de NAD⁺ y la vía de NAD⁺ de novo, y NaMN se convierte en desamido-NAD⁺ (NaAD) mediante nicotinato mononucleótido adeniltransferasa (*NaMNAT*). En *S. cerevisiae* existen dos ORFs putativos con homología a genes *NaMNAT* bacterianos, *YLR328* (39) y un ORF no caracterizado, *YGR010* (23, 39). Los autores de esta invención se refieren a estos dos ORFs como *NMA1* y *NMA2*, respectivamente. En *Salmonella*, la etapa final en la regeneración de NAD⁺ es catalizada por una NAD sintetasa (40). Como un ORF todavía no caracterizado, se predice que *QNS1* codifique una NAD sintetasa (23).

En las levaduras, mutaciones nulas en *NPT1* reducen los niveles de NAD⁺ en estado estacionario en ~ 2 veces (23) y suprimen la longevidad proporcionada al limitar las calorías (19). Una hipótesis actual que explica la forma en que la restricción calórica amplia el período de vida replicativo es que la actividad metabólica disminuida provoca un incremento en los niveles de NAD⁺, que luego estimulan la actividad de Sir2 (revisado en Campisi, 2000 y Guarante, 2000).

El silenciamiento transcripcional implica la modificación hereditaria de cromatina en distintos sitios en el genoma. Al silenciamiento se le alude como una represión de largo intervalo, ya que es un promotor no específico y, a menudo, abarca un locus genómico completo (1', 2'). En levaduras, estas regiones silenciosas de ADN, que son similares a la heterocromatina de eucariotas superiores, están sometidas a una amplia diversidad de modificaciones (3'). Entre las mejor estudiadas de estas modificaciones se encuentra la acetilación reversible de histonas (revisada en 4', 5').

Existen dos clases de enzimas que afectan al estado de acetilación de histonas: histona acetiltransferasas (HATs) y las histonas desacetilasas (HDACs) oponentes. Comparadas con zonas transcripcionalmente más activas del genoma, se sabe que histonas dentro de regiones silenciosas de cromatina están hipoacetiladas, específicamente en las colas NH₂-terminales de histonas H3 y H4 del núcleo (6'). Se han descrito tres clases de histona desacetiladas y se han clasificado en base a la homología con las proteínas de levaduras. Proteínas en la clase I (similares a Rpd3) y en la clase II (similares a Hda1) se caracterizan por su sensibilidad al inhibidor tricostatina A (TSA) (7', 8'). Estudios que utilizan este inhibidor han proporcionado una abundancia de información relacionada con la función celular de estas proteínas, que incluye su implicación en la expresión de reguladores del ciclo celular, diferenciación y apoptosis de las células (revisado en 9').

La levadura Sir2 es el miembro fundador de HDACs de clase III. Desacetilasas similares a Sir2 no son inhibidas por TSA y tienen la característica única de ser NAD⁺-dependientes (10'-13'). Proteínas de esta clase se encuentran en una amplia diversidad de organismos que oscilan desde bacterias a seres humanos. Al menos dos homólogos de Sir2, Hst2 de levadura y SIRT2 humana, están localizados en el citoplasma y SIRT1 humana ha demostrado recientemente fijar como objetivo p53 para la desacetilación (11', 13'-15'). Estos resultados indican que no todos los miembros de esta familia son específicos para histonas u otros sustratos nucleares.

La expresión reguladora de la información silenciosa (SIR), se acuñó por primera vez para describir un conjunto de genes no esenciales requeridos para la represión de loci de tipo apareante (*HML* y *HMR*) de *S. cerevisiae* (16'). El silenciamiento en levaduras se observa también en telómeros y el locus del ADN ribosomal (ADNr) (2', 17'). La formación de heterocromatina en loci de tipo apareante y los tractos poli(TG₁₋₃) de telómeros en levaduras es

mediada por un complejo heterotrimérico de Sir2, Sir3 y Sir4 (18', 19'). En el locus de ADNr, Sir2 es parte del complejo RENT (siglas de regulador del silenciamiento nucleolar y salida de telofase), que incluye Net1 y Cdc14 (20, 21'). De estas proteínas, Sir2 es el único factor que es indispensable para silenciar todas las tres regiones silenciosas (22'-24').

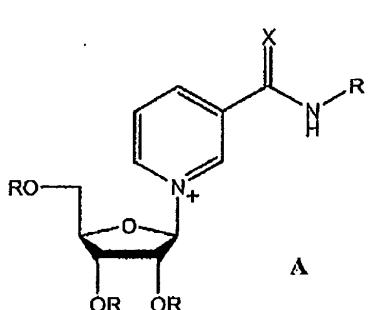
El locus de ADNr de levaduras (*RDN1*) consiste en 100-200 unidades de 9 kb repetidas en tandem que codifican ARNs ribosomales. Una causa principal del envejecimiento de levaduras ha demostrado proceder de la recombinación entre estas repeticiones (25'-27') que pueden conducir a la escisión de un círculo de ADNr extracromosomal (ERC). Los ERCs se replican, pero fracasan en segregarse a células hijas, dando como resultado su amplificación exponencial a medida que se dividen las células. Los ERCs se pueden acumular hasta un contenido en ADN mayor que el del genoma completo de la levadura en células viejas, y se piensa que mata a las células al titular factores de transcripción y/o replicación esenciales (28'). A pesar de que Sir2 silencia genes transcritos con Pol II integrados en el ADNr, existe evidencia de que su función primaria en este locus consiste en suprimir la recombinación. La delección de *SIR2* elimina el silenciamiento de ADNr y aumenta 10 veces la frecuencia de que un gen marcador se recombine fuera del ADNr (29'). Esto resulta en una formación incrementada de ERC y en un acortamiento drástico del período de vida (29', 30').

Sir2 es un componente limitante de la longevidad de levaduras. Una copia extra sencilla del gen *SIR2* suprime la recombinación y amplia el período de vida en un 40% (26', 31', 32'). Recientemente, se ha demostrado que *SIR2* es esencial para la longevidad incrementada proporcionada por la restricción de calorías (31''), un régimen que prolonga el período de vida de cada uno de los organismos en los que se ha ensayado. Además de ello, la dosificación incrementada del homólogo de Sir2, *sir2.1*, ha demostrado prolongar el período de vida del nematodo *C. elegans* (33') y el homólogo humano más próximo SIRT1 ha demostrado inhibir la apoptosis a través de la desacetilación de p53 (34', 35'). Estos hallazgos sugieren que Sir2 y sus homólogos tienen un papel conservado en la regulación de la supervivencia al nivel celular y del organismo.

Recientemente, se ha llegado a comprender mucho la bioquímica de desacetilasas similares a Sir2 (revisado por 36'). *In vitro*, Sir2 tiene especificidad para la lisina 16 de histona H4 y las lisinas 9 y 14 de histona H3 (10', 12', 13'). A pesar de que HDACs sensibles a TSA catalizan la desacetilación sin la necesidad de un cofactor, la reacción de Sir2 requiere NAD⁺. Esto permite la regulación de la actividad de Sir2 a través de cambios en la disponibilidad de este co-sustrato (10'-13'). La desacetilación de Sir2 está acoplada a la escisión del enlace glicosídico de elevada energía que une el resto ADP-ribosa de NAD⁺ a nicotinamida. Tras la escisión, Sir2 cataliza la transferencia de un grupo acetilo a ADP-ribosa (10', 11', 15', 37'). El producto de esta reacción de transferencia es O-acetil-ADP-ribosa, un nuevo metabolito que recientemente ha demostrado provocar una demora/bloqueo en el ciclo celular y en la maduración de oocitos de embriones (38').

El otro producto de la desacetilación es nicotinamida, un precursor del ácido nicotínico y una forma de vitamina B3 (39'). Dosis elevadas de nicotinamida y ácido nicotínico se utilizan a menudo de manera indistinta para auto-tratar una serie de afecciones que incluyen la ansiedad, osteoartritis, psicosis, y la nicotinamida se encuentra actualmente en ensayos clínicos como una terapia para el cáncer y diabetes de tipo I (40'). La seguridad a largo plazo de las dosis elevadas utilizadas en estos tratamientos ha sido cuestionada (41') y son confusos los posibles efectos de estos compuestos al nivel molecular.

Sumario de la invención



en donde

R representa, independientemente para cada caso, H, acetilo, benzoilo, acilo, fosfato, sulfato, (alcoxi)metilo, triarilmethyl, (trialquil)sililo, (dialquil)(aryl)sililo, (alquil)(diaril)sililo o (triaril)sililo; y

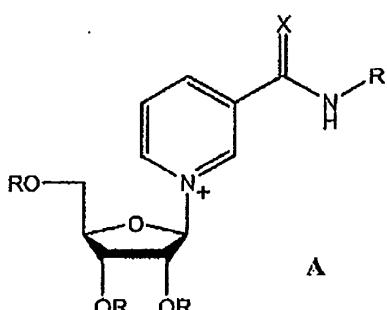
X representa O o S,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente en donde el compuesto de fórmula A es nicotinamida ribósido.

En una realización preferida, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Huntington y distrofia muscular.

La invención proporciona, adicionalmente, un uso de un compuesto de fórmula A:



en donde

R representa, independientemente para cada caso, H, acetilo, benzoilo, acilo, fosfato, sulfato, (alcoxi)metilo, triarilmethyl, (trialquil)sililo, (dialquil)(aryl)sililo, (alquil)(diaril)sililo o (triaril)sililo; y

X representa O o S,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

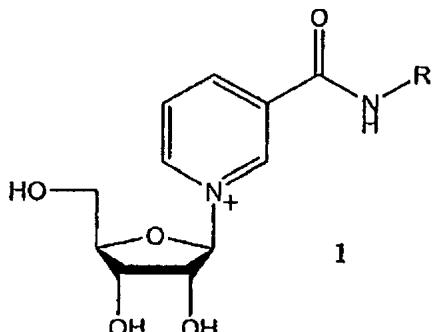
para aumentar el período de vida de una célula o su resistencia al estrés, en donde la célula se pone en contacto con el compuesto, y en donde la célula está *in vitro*.

Preferiblemente, la célula es una célula eucariótica, más preferiblemente, la célula es una célula humana.

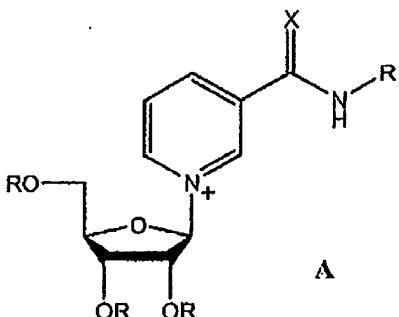
En realizaciones preferidas, el compuesto de fórmula A es nicotinamida ribósido.

La estimulación de la vía salvaje de NAD⁺ en una célula comprende poner en contacto una célula con un nicotinamida ribósido, un precursor de NAD⁺, o un análogo biológicamente activo y/o un profármaco del mismo.

Nicotinamida ribósido se puede preparar tratando NMN (p. ej. de Sigma) con una fosfatasa según se describe, p. ej., en Bieganowski et al. (2004) Cell 117:495. Nicotinamida ribósido puede estar en la forma oxidada o reducida, pareciendo esta última ser más estable (Friedlos et al. (1992) Biochem Pharmacol. 44:631. Nicotinamida ribósido (1) se representa a continuación.



Nicotinamida ribósido y algunos de sus análogos se representan por la fórmula A:



en donde

R representa, independientemente para cada caso, H, acetilo, benzoilo, acilo, fosfato, sulfato, (alcoxi)metilo, triarilmethyl, (trialquil)silico, (dialquil)(aryl)silico, (alquil)(diaril)silico o (triaryl)silico; y

5 X representa O o S,

Nicotinamida ribosido se puede poner en contacto con la célula a una concentración de aproximadamente 1 nM a 10 μ M. Una célula se puede opcionalmente poner en contacto con un agente que aumente los niveles de proteína o de actividad de una enzima nicotinamida ribosido cinasa (Nrk), que fosforila nicotinamida ribosido para formar nicotinamida mononucleótido (NMN). Nrk existe en una forma en levaduras, Nrk1, y en dos formas en seres humanos, Nrk1 (Nºs de acceso GenBank NM_017881.1; NP_060351; SEQ ID Nos: 27 y 28, respectivamente) y Nrk2 (Nºs de acceso GenBank NM_170678; NP_733778; SEQ ID Nos: 29 y 30, respectivamente).

10 Métodos para modular el período de vida de una célula o su resistencia al estrés pueden comprender modular el flujo a través de la vía salvaje de NAD⁺ en la célula. El aumento o la prolongación del período de vida de una célula o el aumento de su resistencia contra el estrés puede comprender aumentar el flujo a través de la vía salvaje de NAD⁺ en la célula. La modulación del flujo a través de la vía salvaje de NAD⁺ puede producirse esencialmente sin modificar los niveles en estado estacionario de NAD⁺ y NADH y manteniendo esencialmente la relación NAD⁺/NADH en la célula.

15 20 El aumento del flujo a través de la vía salvaje de NAD⁺ puede comprender aumentar el nivel o actividad de una proteína seleccionada del grupo que consiste en NPT1, PNC1, NMA1 y NMA2. Al menos un ácido nucleico que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en NPT1, PNC1, NMA1 y NMA2, o un ácido nucleico que comprende al menos 5 copias de un gen se puede introducir en una célula. Alternativamente, al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en NPT1, PNC1, NMA1 y NMA2 se puede introducir en una célula. Un agente que supra-regula la expresión de un gen seleccionado del grupo que consiste en NPT1, PNC1, NMA1 y NMA2 se puede poner en contacto con una célula. Esto puede determinar que la célula viva al menos aproximadamente un 40% más o al menos aproximadamente un 60% más.

25 30 El aumento del flujo a través de la vía salvaje de NAD⁺ en una célula puede aumentar la resistencia de la célula contra el estrés, p. ej. el choque térmico, estrés osmótico, agentes lesivos para el ADN (p. ej. U.V.) y niveles inadecuados de nitrógeno.

35 La modulación del período de vida de una célula puede comprender modular el silenciamiento en la célula. El silenciamiento puede incluir el silenciamiento telomérico y la recombinación de ADNr.

40 45 La célula cuyo período de vida se puede ampliar o puede ser protegida frente al estrés puede ser una célula eucariótica tal como una célula de levaduras, o una célula procariótica tal como una célula bacteriana. La célula puede estar *in vitro* o *in vivo*.

La modulación del período de vida de una célula o su resistencia al estrés puede también comprender modular la cantidad de nicotinamida y/o la relación de NAD:nicotinamida en la célula. La relación de NAD:nicotinamida se puede modular en un factor de al menos aproximadamente 50%, 2, 3, 5, 10 o más. Por ejemplo, la reducción del período de vida de una célula o hacer a una célula más sensible al estrés puede comprender aumentar el nivel de nicotinamida en la célula. Esto puede comprender poner en contacto la célula con una cantidad de nicotinamida de aproximadamente 1 a 20 mM, de preferencia de aproximadamente 2 a 10 mM. El nivel de nicotinamida en una célula también se puede aumentar incrementando el nivel o la actividad de enzimas implicadas en la biosíntesis de

nicotinamida o disminuyendo el nivel o actividad de enzimas que degradan o inactivan nicotinamida. Enzimas que inactivan directa o indirectamente nicotinamida incluyen PNC1; nicotinamida N-metil transferasa (NNMT y NNT1); NPT1, un homólogo humano de la misma; nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPRT); y, opcionalmente, nicotinamida mononucleótido adeniltransferasa (NMNAT-1 y 2); NMA1 y 2 y homólogos humanos de la misma.

5 Por el contrario, el aumento del período de vida de una célula o hacer la célula más resistente (es decir, menos sensible) al estrés puede comprender disminuir el nivel de nicotinamida en la célula. Esto se puede conseguir disminuyendo el nivel o la actividad de enzimas implicadas en la biosíntesis de nicotinamida, o aumentando el nivel o la actividad de enzimas que degradan o inactivan nicotinamida. Por consiguiente, el aumento del período de vida o la resistencia al estrés en una célula puede conseguirse aumentando la actividad o el nivel de expresión de una proteína seleccionada del grupo que consiste en NPT1, PNC1, NMA1, NMA2, NNMT, NAMPRT, NMNAT-1 y NMNAT-2. El aumento del período de vida o la resistencia al estrés también se puede conseguir poniendo en contacto la célula con nicotinamida ribósido, un precursor de NAD+ o un análogo biológicamente activo del mismo o profármaco del mismo y, opcionalmente, aumentando el nivel de proteínas o la actividad de nicotinamida ribósido cinasa p. ej. Nrk1 y Nrk2 (véase Bieganowski et al. (2004) Cell 117:495).

10 Se describen también métodos para identificar compuestos que modulan el período de vida de una célula o su resistencia al estrés, que comprenden (i) poner en contacto una proteína seleccionada del grupo que consiste en NPT1, PNC1, NMA1, NMA2, NNMT, NAMPRT, NMNAT-1 y NMNAT-2 con un compuesto de ensayo durante un período de tiempo que sería suficiente para afectar a la actividad de la proteína; y (ii) determinar la actividad de la enzima, en donde una diferencia en la actividad de la enzima en presencia del compuesto de ensayo con relación a la ausencia del compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo es un compuesto que modula el período de vida de la célula o su resistencia al estrés. Métodos de este tipo pueden comprender, además, poner en contacto una célula con el compuesto de ensayo y determinar si se ha modulado el período de vida de la célula.

15 20 25 Estos métodos pueden comprender también, además, poner en contacto una célula con el compuesto de ensayo y determinar si se ha modulado la resistencia de la célula al estrés.

30 Métodos para identificar un compuesto que module el período de vida de una célula o su resistencia a determinados tipos de estreses puede comprender (i) poner en contacto una célula o un lisado, que comprende un ácido nucleico regulador transcripcional de un gen seleccionado del grupo que consiste en NPT1, PNC1, NMA1, NMA2, NNMT, NAMPRT, NMNAT-1 y NMNAT-2 enlazado operativamente a un gen informador, con un compuesto de ensayo durante un período de tiempo que sería suficiente para afectar al ácido nucleico regulador transcripcional; y (ii) determinar el nivel o la actividad del gen informador, en donde una diferencia en el nivel o actividad del gen informador en presencia del compuesto de ensayo con relación a la ausencia del compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo es un compuesto que modula el período de vida de la célula o su resistencia a determinados tipos de estrés. Estos métodos pueden comprender, además, poner en contacto una célula con el compuesto de ensayo y determinar si se ha modulado el período de vida de la célula. Métodos de este tipo también pueden comprender, además, poner en contacto una célula con el compuesto de ensayo y determinar si se ha modulado la resistencia de la célula al estrés.

40 45 50 También se comentan en esta memoria métodos para identificar un agente, p. ej. una molécula pequeña que modula el nivel de nicotinamida en una célula. Estos métodos pueden comprender (i) proporcionar una célula o lisado celular que comprende una construcción informadora que es sensible al nivel de nicotinamida en una célula; (ii) poner en contacto la célula con un agente de ensayo; y (iii) determinar el nivel de nicotinamida en la célula puesta en contacto en el agente de ensayo, en donde un nivel diferente de nicotinamida en la célula tratada con el agente de ensayo con relación a una célula no tratada con el agente de ensayo indica que el agente de ensayo modula el nivel de nicotinamida en la célula. La célula puede comprender, además, un vector que codifica una proteína de fusión que puede unirse a un elemento de unión a ADN operativamente enlazado al gen informador. La proteína de fusión puede comprender al menos un bolsillo de unión a NAD+ de una enzima sensible a nicotinamida, p. ej. un miembro de la familia Sir2, y un polipéptido heterólogo. El polipéptido heterólogo puede ser un dominio de transactivación de un factor de transcripción. El método puede comprender, además, poner en contacto una célula con el compuesto de ensayo y determinar si se ha modulado el período de vida de la célula o su resistencia al estrés.

55 También se describen métodos asistidos por ordenador para identificar un inhibidor de la actividad de un miembro de la familia Sir2, y pueden comprender: (i) suministrar una aplicación de modelado por ordenador con un conjunto de coordenadas de la estructura de una molécula o complejo molecular, incluyendo la molécula o complejo molecular al menos una parte de un miembro de la familia Sir2 que comprende un bolsillo C; (ii) suministrar la aplicación de modelado por ordenador con un conjunto de coordenadas de la estructura de una entidad química; y

(iii) determinar si la entidad química es un inhibidor del que se espera se una a o interfiera con la molécula o complejo molecular, en donde la unión a o la interferencia con la molécula o complejo molecular es indicativa de la inhibición potencial de la actividad del miembro de la familia Sir2. La entidad química puede ser un análogo de nicotinamida. Se describe otro método para identificar un inhibidor de la actividad del miembro de la familia Sir2, y

5 puede comprender: (i) poner en contacto una proteína de la familia Sir2 que comprende al menos el bolsillo C con un compuesto de ensayo durante un tiempo suficiente para que el compuesto de ensayo se una potencialmente al bolsillo C de la proteína de la familia Sir2; y (ii) determinar la actividad de la proteína; en donde una actividad menor de la proteína en presencia del compuesto de ensayo con relación a la ausencia del compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo es un inhibidor de la actividad de un miembro de la familia Sir2.

10 Se describen también métodos para tratar o prevenir enfermedades que están asociadas con el envejecimiento o la muerte de célula (p. ej. apoptosis) en un sujeto, o enfermedades que pueden beneficiarse de los efectos de la restricción calórica. Métodos de este tipo pueden comprender administrar a un sujeto que lo necesite un agente que aumente el flujo a través de la vía salvaje de NAD+ o que reduce los niveles de nicotinamida o la relación de

15 nicotinamida/NAD+ en las células susceptibles a o que son objeto de la muerte de la célula. Enfermedades pueden ser crónicas o agudas, e incluyen enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, apoplejía, infarto de miocardio o una enfermedad metabólica tal como resistencia a la insulina, pudiendo utilizarse dichos métodos para prolongar el período de vida o aumentar la resistencia al estrés también para reducir el envejecimiento, p. ej. para fines cosméticos. El agente se puede administrar local o sistémicamente. Métodos para prolongar el período de

20 vida o aumentar la resistencia al estrés también se pueden utilizar en células, tejidos u órganos fuera de un sujeto, p. ej. en un órgano o tejido antes de trasplante.

También se describen métodos para tratar o prevenir enfermedades en las que es beneficioso reducir el período de vida de las células o hacer a las células sensibles al estrés. Enfermedades de este tipo incluyen aquellas en las

25 que son indeseables células, p. ej. enfermedades cancerígenas y autoinmunes. Métodos de este tipo también pueden sensibilizar a células para ser matadas por otros agentes, p. ej. agentes quimioterapéuticos.

30 Los métodos descritos también se pueden utilizar para modular el período de vida y la resistencia al estrés de organismos que no sean mamíferos. Por ejemplo, estos métodos se pueden utilizar en microorganismos y plantas. En particular, estos métodos permiten aumentar la resistencia de plantas a un alto contenido en sales, sequía o enfermedades, p. ej. tratando éstas con un producto químico que disminuya los niveles de nicotinamida, o modificando genéticamente genes que modulen la vía salvaje de NAD+ o el nivel de nicotinamida en las células.

35 Se describen también métodos de diagnóstico, p. ej. un método para determinar la salud general de un sujeto o si un sujeto ha sido expuesto, p. ej. expuesto de forma inconsciente, a un estado de estrés, en donde este tipo de métodos se pueden utilizar para diagnosticar la presencia o probabilidad de desarrollar un cáncer. Este diagnóstico puede comprender (i) proporcionar una muestra de células o un fluido corporal, p. ej. sangre o suero, de un sujeto y (ii) determinar el nivel de expresión de un gen o el nivel de proteínas o actividad de las mismas codificadas por el mismo, seleccionadas del grupo que consiste en NPT1, PNC1, NMA1, NMA2, NNMT, NAMPRT, NMNAT-1 y

40 NMNAT-2 , en donde un nivel de expresión mayor de un gen o el nivel de proteínas codificadas por el mismo o la actividad de las mismas con relación a una muestra testigo indica que la salud general del sujeto no es adecuada, aceptable u óptima. El diagnóstico puede comprender también determinar el nivel de NAD+, NADH, nicotinamida u otro compuesto intermedio de la vía salvaje de NAD+, o determinar el nivel de NAMPRT en el suero de un sujeto.

45 Breve descripción de los dibujos

FIG. 1. La dosificación incrementada de *NPT1* demora el envejecimiento al mimetizar la restricción calórica. El período de vida se determinó puntuando el número de células hijas producidas por cada una de las células madre antes del cese de la división celular (7, 10). Las células se hicieron crecer previamente durante un mínimo de 48 h en medio de glucosa completo.

50 A, curvas de mortalidad para tipo salvaje (PSY316AT, círculos), 2x*NPT1* (YDS1544, rombos) y 5x*NPT1* (YDS1548, triángulos) en medio con glucosa al 2%. Los períodos de vida medios son 21,9, 30,8, y 35,1 generaciones, respectivamente.

55 B, curvas de mortalidad para tipo salvaje (PSY316AT, círculos), *sir2::TRP1* (YDS1594, triángulos hacia abajo), 2x*NPT1* (YDS1544, cuadrados), *sir2::TRP1* 2x*NPT1* (YDS1573, rombos) y 5x*NPT1* 2x*SIR2* (YDS1577, triángulos hacia arriba) en medio con glucosa al 2%. Los períodos de vida medios eran 23,7, 14,4, 13,9, 31,0 y 31,9 generaciones, respectivamente.

C, curvas de mortalidad para tipo salvaje en medio de glucosa al 2% (PSY316AT, círculos) y medio de glucosa al

0,5% (PSY316AT, cuadrados) y para 2xNPT1 en medio de glucosa al 0,5% (YDS1544, triángulos). Los períodos de vida medios son 21,9, 31,7 y 34,5 generaciones, respectivamente.

FIG.2. *NPT1* y *SIR2* proporcionan resistencia al choque térmico. A, las cepas se hicieron crecer durante tres días post-desplazamiento diáuxico en medio SC y se incubaron durante 1 h a 55°C antes de extender diluciones décuples en placas de SC. B, las cepas se trataron como en A y se extendieron en SC a una baja densidad. Las colonias que surgieron al cabo de 24 horas se puntuaron y expresaron como un porcentaje de colonias que surgen de la muestra no tratada. Los valores representan la media de tres experimentos independientes (+/- desviación típica - d.t.). Cepas: W303AR *URA3* (YDS1568), W303AR *URA3 LEU2* (YDS1563) y derivados isogénicos de W303AR, 2xNPT1-*URA3* (YDS1503), 2xSIR2-*URA3* (YDS1572) y 2xNPT1-*URA3* 2xSIR2-*LEU2* (YDS1561).

FIG. 3. *NPT1* adicional aumenta el silenciamiento y la estabilidad de ADNr. A, cepas con un marcador *ADE2* en el ADNr se dejaron crecer previamente en placas de SC y se salpicaron como diluciones décuples seriadas en placas de SC. El silenciamiento incrementado se indica por una demora en el crecimiento en medios que carecen de adenina. Cepas: W303-1A *ADE2* (YDS1S96), W303-1A *RDN1::ADE2* (W303AR5) y derivados de W303AR5 2xNPT1 (YDS1503), 2xSIR2 (YDS1572) y 2xNPT1 2xSIR2 (YDS 1561). B, el silenciamiento de *MET15* en el locus de ADNr fue sometido a ensayo extendiendo derivados isogénicos de JS237 en medio rico que contenía PbNO₃ al 0,07% e incubando durante 5 días a 30°C. El silenciamiento incrementado se indica por la acumulación de un pigmento pardo. Genotipos relevantes: *met15Δ* (JS209), *MET15* (JS241), *RND1::MET15* (JS237), *sir2::TRP1* (JS218), 2xSIR2 (YDS1583), 2μSIR2 (YDS1522), *npt1Δ::kan^r* (YDS1580), 2xNPT1 (YDS1581) y 2μNPT1 (YDS1493). C, el silenciamiento de un marcador *ADE2* en el locus de ADNr se determinó en cepas con 1xNPT1, 2xNPT1 y 2μNPT1 en los siguientes fondos: tipo salvaje (W303AR5, YDS1503, YDS1496), *sir2::TRP1* (YDS878, YDS1504, YDS1494), *sir3::HIS3* (YDS924, YDS1505, YDS1587) y *sir4::HIS3* (YDS882, YDS1506, YDS1495). D, cepas con un marcador *ADE2* en el telómero fueron extendidas sobre medio de SC que contenía cantidades limitantes de adenina. El silenciamiento incrementado se indica por la acumulación de un pigmento rojo. Genotipos relevantes: (PSY316AT), 2xNPT1 (YDS1544), 5xNPT1 (YDS1548), 5xNPT1 2xSIR2 (YDS1577) y 5xNPT1 SIR2::TRP1 (YDS1573), *sir2::TRP1* (YDS1594). E, cepas en A se sometieron a ensayo en cuanto a la estabilidad de ADNr examinando la tasa de pérdida de un marcador *ADE2* integrado en el locus de ADNr. Las células se extendieron en placas sobre medio YPD y se midió la frecuencia de colonias divididas en sectores por la mitad, reflejando un fenómeno de pérdida del marcador en la primera división celular. Se examinaron más de 10.000 colonias para cada una de las cepas y cada uno de los experimentos se realizó por triplicado. Se muestran las frecuencias de recombinación media (+/- d. t.) por cada división celular. F, tasas de recombinación de ADN ribosomal para cepas de tipo salvaje (W303AR), *sir2::TRP1* (YDS878) y 2xNPT1 *sir2::TRP1* (YDS1504). Los ensayos se realizaron como en (E).

FIG. 4. Expresión de *NPT1* en respuesta a la restricción calórica y al estrés. A, la secuencia de la etiqueta 3xHA (SEQ ID NO: 49) se insertó en el marco con el extremo 3' del ORF de *NPT1* nativo en W303AR5 (YDS1531) y W303cdc10-25 (YDS1537). Las células se hicieron crecer en medio YPD a 30°C y se trataron según se describe. Se examinaron los niveles de ARNm de *NPT1* para W303AR5 desarrollada en YPD (glucosa al 0,5% y 2,0%) y W303cdc25-10 desarrollada en YPD (glucosa al 2%). Se detectó un transcríto de *NPT1* de 1,8 kb y los niveles se normalizaron al testigo de actina (*ACT1*). Se obtuvieron resultados similares en el fondo de la cepa PSY316 (no mostrado). B, los extractos de proteínas procedentes de cultivos en A se analizaron mediante transferencia Western para detectar *NPT1* etiquetado con HA utilizando anticuerpo α-HA. Se detectaron dos bandas de 53 kD y 40 kD en las cepas Npt1-HA y no se detectó banda alguna en la cepa testigo no etiquetada (no mostrada). Los niveles de actina servían como un control de carga. Se obtuvieron resultados similares en el fondo de la cepa PSY316 (no mostrado). C, se examinaron niveles de ARNm de *NPT1* en cultivos en fase log de W303AR5 de tipo salvaje (YDS1531) después de exposición durante 1 h a lo siguiente: MMS (al 0,02% v/v), paraquat (5 mM) o choque térmico (55°C). D, extractos de proteínas de cultivos en C se analizaron como en B, E y F. Se insertó una secuencia de proteína fluorescente verde (GFP) en marco en el extremo 3' de la *NPT1* nativa y ORFs de *NMA2* en W303AR5 (YDS1611 e YDS1624, respectivamente). Las células se desarrollaron en medio YPD a 30°C hasta fase logarítmica media y se fotografiaron vivas. Regiones de solapamiento entre GFP (verde) y la cepa de ADN Hoechst (falso color rojo) aparecen amarillas en la imagen fusionada.

FIG. 5. Múltiples componentes limitantes en la vía salvaje de NAD⁺. A, las etapas putativas en la biosíntesis de NAD⁺ en *S. cerevisiae* basadas en las etapas conocidas en *Salmonella*. Los genes de levadura que se piensa median en cada etapa se muestran en cursivas. NaMN, ácido nicotínico mononucleótido; NaAD, desamido- NAD⁺; NaM, nicotinamida; Na, ácido nicotínico. Adaptado de Smith *et al.* (2000), B, silenciamiento de *ADE2* en el locus de ADNr en las cepas *ADE2* (YDS1596), tipo salvaje (W303AR5), 2xNPT1 (YDS1503), 2xPNC1 (YDS1588), 2xNMA2 (YDS1589), 2xNMA1 (YDS1590) y 2xQNS1 (YDS1614). El silenciamiento incrementado se indica mediante el

retardo en el crecimiento en medios que carecen de adenina. C, cepas con un marcador *ADE2* en el telómero se extendieron sobre medio SC que contenía cantidades limitantes de adenina. El silenciamiento se indica por la acumulación de un pigmento rojo. Cepas sometidas a ensayo: tipo salvaje (PSY316AT), 2x*NPT1* (YDS 1544), 5x*NPT1* (YDS 1548), *sir2::TRP1* (YDS1594), 2x*PNC1* (YDS1591), 2x*NMA2* (YDS1592) y 2x*NMA1* (YDS1593).

5 FIG. 6. Modelo para la prolongación del período de vida vía el flujo incrementado a través de la vía salvaje de NAD⁺. Histona-desacetilasas de tipo III tales como Sir2 y Hst1-4 catalizan una etapa clave en la vía salvaje, convirtiendo NAD⁺ en nicotinamida. Copias adicionales de *PNC1*, *NPT1*, *NMA1* y *NMA2* aumentan el flujo a través de la vía salvaje de NAD⁺, la cual estimula la actividad de Sir2 y aumenta el período de vida. Copias adicionales de 10 *QNS1* fracasan en aumentar el silenciamiento, ya que, a diferencia de otras etapas en la vía, su sustrato no puede ser suministrado desde una fuente externa a la vía salvaje y, por lo tanto, es limitante para la reacción. Abreviaturas: NAD⁺, nicotinamida adenina dinucleótido; NaMN, ácido nicotínico mononucleótido; NaAD, desamido-NAD⁺.

15 FIG. 7. La vía salvaje de NAD⁺. Nicotinamida generada por Sir2 se convierte en ácido nicotínico mediante *Pnc1* y subsiguientemente de nuevo a NAD⁺ en tres etapas. Abreviaturas: NAD⁺, nicotinamida adenina dinucleótido; NaMN, ácido nicotínico mononucleótido; NaAD, desamido-NAD⁺.

20 FIG. 8. Nicotinamida inhibe el silenciamiento telomérico y de ADNr. A, el silenciamiento en el locus de ADNr se ensayó extendiendo derivados isogénicos de JS237 (*RDN1::MET15*) sobre medio rico que contenía PbNO₃ al 0,07% y nicotinamida 0, 1 ó 5 mM. El silenciamiento del marcador *MET15* se indica por la acumulación de un pigmento pardo. Colonias pardas oscuras individuales en cepas *RDN1::MET15* representan eventos de pérdida de marcador. Genotipos relevantes: *met15Δ* (JS209), *MET15* (JS241), *RDN1::MET15* (JS237), *sir2::TRP1* (JS218), 2x*SIR2* (YDS1583). B, cepas con un marcador *ADE2* en el telómero se extendieron sobre medio SC que contenía 25 cantidades limitantes de adenina y nicotinamida 0 ó 5 mM. El silenciamiento del marcador *ADE2* resulta en la acumulación de un pigmento rojo. Genotipos relevantes: (PSY316AT), W303-1A *ADE2* (YDS1596) y W303-1A *ade2* (YDS1595).

30 FIG. 9. Nicotinamida aumenta la recombinación de ADNr y acorta el período de vida de la levadura. A, se sometieron a ensayo cepas en cuanto a la estabilidad de ADNr, examinando la tasa de pérdida de un marcador *ADE2* integrado en el locus de ADNr. Las células se extendieron en placas sobre medio YPD con glucosa al 2% con o sin nicotinamida (NAM) 5 mM y se midió la frecuencia de colonias seccionadas a la mitad, reflejando un evento de pérdida de marcador en la primera división celular. Se examinaron más de 10.000 colonias para cada una de las cepas y cada uno de los experimentos se realizó por triplicado. Se muestran las frecuencias de 35 recombinación media (+/- d. t.) por cada división celular. Cepas relevantes: W303-1A *RDN1::ADE2* (W303AR5) y derivados de W303AR5 2x*SIR2* (YDS1572) y *sir2::TRP1* (YDS878). B, Comparación de estructuras para nicotinamida (NAM) y ácido nicotínico (NA). C y D, los períodos de vida se determinaron puntuando el número de células hijas producidas por cada una de las células madre antes del cese de la división celular (68', 69'). Las células se hicieron crecer previamente durante un mínimo de 48 h en medio de glucosa completo. C, curvas de 40 mortalidad para cepas de tipo salvaje (PSY316AT) y *sir2::TRP1* (YDS1594) en nicotinamida (NAM) 0 ó 5 mM. Los períodos de vida medios eran wt (tipo salvaje): 22,4, 12,1 y *sir2*: 12,1, 11,7, respectivamente. D, curvas de mortalidad para cepas de tipo salvaje y *sir2* de C, en presencia de ácido nicotínico (NA) 0,5 mM o 50 mM. Los períodos de vida medios eran wt: 22,4, 26, 25 y *sir2*: 12,1, 12,2.

45 FIG.10. Nicotinamida des-reprime el locus de tipo apareante silencioso (*HMR*) en las células tanto en ciclo como paralizadas en G1. A, células PSY316 que contienen un transcripto GFP impulsado por *ADH* insertado en el locus *HMR* (YDS970) se hicieron crecer en medio YPD a 30°C hasta la fase logarítmica media y se trataron con nicotinamida (NAM) 5 mM durante los tiempos indicados. Las células se fotografiaron vivas. B, La cepa YDS970 o el mutante *sir4Δ* isogénico (YDS1499) se trataron con nicotinamida (NAM) 5 mM, ácido nicotínico (NA) 5 mM o ácido quinolínico (QA) 5 mM. Las células fueron analizadas mediante clasificación de células activadas por 50 fluorescencia (FACS) para determinar el grado de expresión de *ADH-GFP*. C, un derivado *MATa* de la cepa YDS970 (YDS1005) se suprimió para *HML* y se trató con 10 µg/ml de factor alfa durante 3 horas. Después, las células se desarrollaron en presencia de nicotinamida 5 mM durante los tiempos indicados y se examinaron mediante FACS como antes. El progreso del ciclo celular se vigiló en cada instante mediante el análisis FACS de 55 células teñidas con yoduro de propidio.

FIG.11. Nicotinamida no altera la localización de proteínas Sir. Cepas de tipo salvaje que contienen *SIR2-GFP* (YDS 1078) (C y D), *SIR3-GFP* (YDS 1099) (E y F), o *GFP-SIR4* (YDS1097) (G y H) y un derivado *sir2* isogénico

que expresa *SIR3-GFP* (YDS 1109) (*A* y *B*) se hicieron crecer durante 2 horas en presencia de nicotinamida 5 mM. La fluorescencia por GFP se detectó en células vivas.

FIG. 12. Sir2 no se asocia con el ADN procedente de telómeros ni loci de tipo apareante en presencia de nicotinamida. *A* y *B*, la inmunoprecipitación con cromatina utilizando un anticuerpo α -Sir2 políclonal se realizó en extractos de cepas *sir2* (YDS878) (*A*) o de tipo salvaje (W303AR5) (*B*) en presencia de nicotinamida (NAM) 5 mM. Se muestra la amplificación por PCR tanto de ADN de entrada procedente de extractos de células completas como de cromatina inmunoprecipitada. La PCR se realizó utilizando pares de cebadores específicos para el gen *CUP1* (paneles superiores), ADNr 5S (segundos paneles), el locus *HMR* (terceros paneles) o ADN subtelomérico de 1,4 y 10 0,6 kb procedente de telómeros (paneles inferiores). Las secuencias de cebadores se listan en la Tabla 4.

FIG.13. Nicotinamida es un potente inhibidor no competitivo de Sir2 de levaduras y SIRT1 humana *in vitro*. *A*, Sir2 etiquetado con GST recombinante se combinó con sustrato acetilado durante 30 minutos a 30°C en presencia de DTT 1 mM, 200, 350, 500 ó 750 μ M de NAD⁺ y las concentraciones indicadas de nicotinamida. Las reacciones se terminaron mediante la adición de revelador y las muestras se analizaron mediante fluorometría (excitación establecida a 360 nm y emisión a 460 nm). Los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos se muestran como una gráfica del doble recíproco de Lineweaver-Burk de unidades de fluorescencia arbitraria (AFUs) min⁻¹ frente a NAD⁺ (μ M). *B*, los experimentos se realizaron como en *A*, excepto que se utilizó SIRT1 humana recombinante y las reacciones se llevaron a cabo a 37°C. *C*, las reacciones de desacetilación se realizaron por triplicado con 2,5 μ g de SIRT1, DTT 1 mM, 200 μ M de NAD⁺ y muestra en blanco de agua 50 μ M, muestra en blanco de DMSO, ácido nicotínico, sirtinol, M15, esplitomicina o nicotinamida. Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C durante 30 minutos y la fluorescencia se midió como en *A*.

FIG.14A-C. Nicotinamida alojada en el bolsillo C conservado de Sir2-Af1. (A) El panel de la izquierda muestra una vista frontal de la representación en superficie de Sir2-Af1, con NAD⁺ unido en púrpura y una flecha roja que apunta al túnel de unión de acetilo-lisina. El sitio C está trazado con una curva verde azulada discontinua. El panel de la derecha muestra el corte de proteínas a través de la línea discontinua y girada 90 grados a lo largo de su eje vertical. La superficie de los residuos conservados en el sitio C es de color verde azulado. (B) Vista en primer plano del rectángulo en negro representado en el panel de la derecha de A, que muestra la nicotinamida profundamente alojada en el bolsillo C de Sir2-Af1. (C) Vista estereoscópica de la nicotinamida alojada (verde) rodeada por los residuos conservados en el bolsillo C. Las interacciones putativas se muestran como líneas discontinuas, incluidos enlaces H (azules), electrostáticos (magenta) y de Van der Waals (amarillos).

Fig. 15 muestra un alineamiento de homólogos de NPT1 (SEQ ID NOS 41-44, respectivamente, en orden de aparición).

Fig. 16 muestra un alineamiento de homólogos de PNC1 (SEQ ID NOS 16, 45-48 y 4, respectivamente, en orden de aparición).

Fig. 17A-E. La restricción de calorías y el estrés térmico amplían el período de vida de una manera dependiente de PNC1. (A) Pnc1 cataliza la conversión de nicotinamida en ácido nicotínico. (B) En levaduras, NAD⁺ es sintetizado *de novo* a partir de triptófano y es reciclado a partir de nicotinamida a través de la vía salvaje de NAD⁺. (C) La ampliación del período de vida mediante restricción con glucosa requiere PNC1. El período de vida medio en medios completos que contienen glucosa al 2,0% (p/v) eran: tipo salvaje (21,6), *pnc1* Δ (19,1); *sir2* Δ (14,2). Los períodos de vida medios en glucosa al 0,5% eran: tipo salvaje, (32,7); *pnc1* Δ (18,1); *sir2* Δ (14,7). (D) Ampliación del período de vida mediante exposición a estrés térmico suave. A 30°C, los períodos de vida medios eran: tipo salvaje, (19,4); *pnc1* Δ (18,5); *sir2* Δ (12,0). A 37°C, los períodos de vida medios eran: tipo salvaje, (23,4); *pnc1* Δ (17,5); *sir2* Δ (10,6). (E) PNC1 adicional prolonga el período de vida de una manera dependiente de SIR2. Períodos de vida medios en glucosa al 2,0%/30°C: tipo salvaje, (19,7); 5xPNC1 (36,1), *sir2* Δ (14,2); 5xPNC1 *sir2* Δ (15,1); *pnc1* Δ *sir2* Δ (14,4).

Figura 18A-D. Los niveles de Pnc1 y la actividad se elevan en respuesta a la restricción de calorías y al estrés. (A) Detección de Pnc1-GFP en extractos de células enteras de levaduras utilizando un anticuerpo anti-GFP. Los niveles de actina se incluyen como un control de la carga. Se realizaron extractos a partir de cultivos de tipo salvaje en fase logarítmica media desarrollados en medios completos con glucosa al 2,0%, al 0,5% o al 0,1% (p/v). (B) Niveles de Pnc1-GFP en extractos procedentes de cultivos de tipo salvaje, *cdc25-10* o *bna6* Δ de fase logarítmica media detectados como antes. (C) Detección de Pnc1-GFP en extractos a partir de cultivos de tipo salvaje en fase logarítmica media según se describe antes. Los cultivos se hicieron crecer bajo las siguientes condiciones: medio completo (sin tratamiento), medio definido (SD), restricción de aminoácidos (a.a.) (SD que carece de aminoácidos

no esenciales), estrés por sales (NaCl 300 mM), estrés térmico (37°C), sorbitol (1 M). (D) Medición de la desaminación de nicotinamida por parte de Pnc1 a partir de extractos celulares de cultivos de tipo salvaje en fase logarítmica media hechos crecer bajo las condiciones indicadas. Los valores mostrados son la media de tres experimentos independientes. La actividad se expresa como nmol de amoníaco producido/min/mg de proteína total, \pm d. t.: glucosa al 2,0% $0,90 \pm 0,26$, glucosa al 0,1% $4,38 \pm 0,43$, 37°C $3,28 \pm 0,32$, sorbitol (1 M) $3,75 \pm 0,65$.

Fig. 19A-C. *PNC1* confiere resistencia a un estrés agudo. (A) *PNC1* adicional confiere resistencia al estrés por sales. Células procedentes de colonias en fase logarítmica media se extendieron sobre medio completo que contenía NaCl 600 mM o LiCl 200 mM y se incubaron durante 4 d a 25°C. En medio de levadura estándar (glucosa al 2%, 25°C) no existía diferencia detectable alguna en la tasa de crecimiento entre cepas de tipo salvaje, 5x*PNC1* o 5x*PNC1 sir2Δ*. (B) *PNC1* adicional protege frente a la lesión inducida por UV de una manera independiente de *SIR2*. Células procedentes de cultivos en fase logarítmica media se extendieron en placas a baja densidad sobre medio completo y se expusieron a una radiación UV (5 mJ/cm², 254 nm). La viabilidad se determinó por la capacidad de formar colonias después de 3 d de crecimiento en la oscuridad a 30°C. Los valores se expresan como porcentaje viable \pm e. t. (error típico). (C) *PNC1* proporciona una protección independiente de *SIR2* frente a la lesión de ADN mitocondrial. El análisis de las microcolonias de células en fase logarítmica extendidas en medio de glicerol al 3% (v/v) completo y 10 µg/ml de bromuro de etidio (EtBr). Se puntuaron al menos 100 microcolonias después de 3 d en dos experimentos independientes. El número de células por colonia \pm e. t. eran: tipo salvaje $6,92 \pm 0,06$, 5x*PNC1* $18,72 \pm 0,53$ y 5x*PNC1 sir2Δ* $16,15 \pm 2,82$. No se detectó diferencia alguna en el crecimiento entre estas cepas en medio de glucosa al 2% (p/v) completo con EtBr.

Fig. 20A-D. Pnc1-GFP está localizado en el citoplasma y el núcleo y está concentrado en peroxisomas. (A) Fluorescencia por Pnc1-GFP se detectó en células tomadas de cultivos de tipo salvaje en fase logarítmica media en medio completo que contenía glucosa al 2,0% (no restringida), o glucosa al 0,5% o al 0,1% (Glu). (B) Detección de Pnc1-GFP en células procedentes de cultivos de tipo salvaje desarrollados bajo las siguientes condiciones: restricción de aminoácidos (a. a.) (SD que carece de aminoácidos no esenciales), estrés por sales (NaCl 300 mM), estrés térmico (37°C). (C) Co-localización de Pnc1-GFP (verde) y RFP-PTS1 (Peroxisomal Targeting Signal 1 – señal de focalización peroxisomal 1) (rojo) en células procedentes de cultivos de tipo salvaje en fase logarítmica media. El amarillo indica solapamiento. Los cultivos se hicieron crecer en medio completo que contenía glucosa al 0,5% para facilitar la visualización de la fluorescencia. (D) Localización de Pnc1-GFP en células procedentes de cultivos en fase logarítmica media de cepas mutantes peroxisomales, *pex6Δ*, *pex5Δ* y *pex7Δ*. Los cultivos se hicieron crecer en medio completo que contenía glucosa al 0,5% para potenciar la visualización de la fluorescencia. Todas las imágenes se tomaron con la misma exposición de 1 s.

Fig. 21A-B. La manipulación del metabolismo de nicotinamida afecta al silenciamiento dependiente de *SIR2*. (A) Para medir el silenciamiento, un informador *ADE2* se integró en el locus del ADN ribosomal (ADNr). En este sistema, el crecimiento incrementado en medios que carecen de adenina indica un silenciamiento reducido de *ADE2*. Las cepas se salpicaron en diluciones decúples seriadas en placas con o sin adenina. Una cepa Ade⁺ servía como testigo. (B) Modelo para la regulación del período de vida y resistencia al estrés por parte de nicotinamida. Estímulos medioambientales dispares que incluyen restricción de calorías, estrés térmico y osmótico sirven como entradas a una vía común de longevidad y de resistencia al estrés. Las células coordinan una respuesta a estas entradas induciendo la transcripción de *PNC1*, que codifica una enzima que convierte nicotinamida en ácido nicotínico. Además de aliviar la inhibición de Sir2 y de fomentar la longevidad, el agotamiento de nicotinamida activa un cierto número de proteínas diana adicionales implicadas en la resistencia al estrés y, posiblemente, en otros procesos celulares.

FIG. 22 muestra que los niveles de proteína NAMPRT extracelulares son mayores en el suero de ratas sometidas a restricción de calorías.

FIG. 23 A es un borrón de transferencia Western que muestra el nivel intracelular de NAMPRT y beta-tubulina en células MEF no sometidas a tratamiento alguno, inanición con suero o estrés oxidativo con H₂O₂.

FIG. 23 B es un diagrama que muestra los niveles relativos de NAMPRT intracelular a partir del borrón de transferencia Western de FIG. 23A.

FIG 24 A es un borrón de transferencia Western que muestra el nivel de NAMPRT intracelular y GAPDH en cardiomiositos no sometidos a tratamiento alguno, inanición con suero o hipoxia.

FIG. 24 B es un diagrama que muestra los niveles relativos de NAMPRT procedentes del borrón de transferencia Western de la FIG. 24A.

5 FIG. 25 es un histograma que muestra el número relativo de copias de ARNm de NAMPRT medidas mediante RT-PCR en tiempo real comparado con el número de copias de ARNm de beta-actina en células de ratones con una dieta normal y ratones que ayunaron durante 48 horas.

Descripción detallada de la invención

10 Se ha descubierto que el período de vida de células de levaduras se puede prolongar en al menos aproximadamente un 60% aumentando el flujo a través de la vía salvaje de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD)⁺ (mostrado en la Fig. 1). Además, aquí se demostró que este aumento en el flujo a través de la vía salvaje de NAD⁺ se produce esencialmente sin incremento en los niveles de NAD⁺ y NADH y, esencialmente, manteniendo constante la relación de NAD⁺/NADH. Tal como se muestra en los Ejemplos Comparativos, el 15 aumento del flujo a través de la vía salvaje de NAD⁺ y, con ello, el aumento del período de vida de células se puede conseguir introduciendo en las células copias adicionales de un gen implicado en la vía salvaje de NAD⁺, p. ej. NPT1, PNC1, NMA1 y NMA2. También se ha demostrado en los Ejemplos que el aumento del flujo a través de la vía salvaje de NAD⁺ protege a las células de levadura frente a determinados tipos de estrés, p. ej. choque térmico. Además, la sobre-expresión de PNC1 aumenta el silenciamiento, el período de vida, así como la 20 resistencia al estrés, p. ej. protege a las células frente a una disgregación del ADN provocada por luz ultravioleta (U.V.) y bromuro de etidio y estrés osmótico. Por otra parte, la delección de PNC1 evita una prolongación del período de vida y hace a las células sensibles al estrés.

25 Se ha demostrado también que la nicotinamida inhibe el silenciamiento en levaduras y, con ello, disminuye el período de vida de las células. También se demostró que nicotinamida hace a las células más sensibles al estrés. En particular, se demostró que la sobre-expresión de nicotinamida metil transferasa (NNMT) una enzima que está implicada en la secreción de nicotinamida a partir de células, estimulaba el silenciamiento y, así, extendía el período de vida y aumentaba la tolerancia al estrés (p. ej. exposición a radiación), mientras que la delección de esta enzima tenía el efecto opuesto.

30 En base a al menos la intensa conservación de la vía salvaje de NAD⁺ y de las vías de novo y los fenómenos de silenciamiento de procariotas a eucariotas, es de esperar que los métodos descritos en esta memoria sean aplicables a cualquier célula eucariótica, además de células de levadura, y a células procarióticas.

35 1. Definiciones

Tal como se utiliza en esta memoria, los siguientes términos y frases deben tener los significados recogidos más abajo. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que el comúnmente se entiende por una persona experta ordinaria en la técnica a la 40 que pertenece esta invención.

Las formas en singular “un”, “una” y “el” y “la” incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto dictamine claramente otra cosa.

45 El término “agente” se utiliza en esta memoria para designar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica (tal como un ácido nucleico, un anticuerpo, una proteína o porción de la misma, p. ej. un péptido) o un extracto preparado a partir de materiales biológicos tales como células o tejidos de bacterias, plantas, hongos o animales (particularmente mamíferos). La actividad de este tipo de agentes puede hacerles adecuados como un “agente terapéutico” que es una sustancia (o sustancias) biológica, fisiológica o 50 farmacológicamente activa(s) que actúa(n) local o sistémicamente en un sujeto.

55 “Diabetes” se refiere a un alto contenido de azúcar en sangre o cetoacidosis, así como anomalías metabólicas crónicas generales que surgen de un estado de elevado azúcar en sangre prolongado o una disminución en la tolerancia a la glucosa. “Diabetes” abarca tanto las formas de tipo I como de tipo II (diabetes mellitus no dependiente de insulina o NIDDM) de la enfermedad. Los factores de riesgo para la diabetes incluyen los siguientes factores: cintura de más de 40 pulgadas (101 cm) para los hombres o de 35 pulgadas (89 cm) para las mujeres, presión sanguínea de 130/85 mm de Hg o superior, triglicéridos por encima de 150 mg/dl, glucosa en sangre en ayunas mayor que 100 mg/dl o lipoproteínas de alta densidad de menos de 40 mg/dl en los hombres o de 50 mg/dl en las mujeres.

El término “DE₅₀” está reconocido en la técnica. En determinadas realizaciones, DE₅₀ significa la dosis de un fármaco que produce el 50% de su respuesta o efecto máximo o, alternativamente, la dosis que produce una respuesta predeterminada en el 50% de sujetos o preparados de ensayo. El término “DL₅₀” está reconocido en la técnica. En determinadas realizaciones DL₅₀ significa la dosis de un fármaco que es letal en el 50% de los sujetos de ensayo. La expresión “índice terapéutico” es una expresión reconocida en la técnica que se refiere al índice terapéutico de un fármaco, definido como DL₅₀/ DE₅₀.

La expresión “resistencia a insulina” se refiere a un estado en el que una cantidad normal de insulina produce una respuesta biológica subnormal con relación a la respuesta biológica de un sujeto que no tiene resistencia a la insulina.

Un “trastorno de resistencia a insulina”, tal como se comenta en esta memoria, se refiere a cualquier enfermedad o afección que es provocada por o es contribuida por la resistencia a insulina. Ejemplos incluyen: diabetes, diabetes gestacional, obesidad, síndrome metabólico, síndromes de resistencia a insulina, síndrome X, resistencia a insulina, hipertensión sanguínea, hipertensión, alto nivel de colesterol en sangre, dislipidemia, hiperlipidemia, dislipidemia, enfermedad aterosclerótica incluida apoplejía, enfermedad de las arterias coronarias o infarto de miocardio, hiperglucemia, hiperinsulinemia y/o hiperproinsulinemia, tolerancia a la glucosa alterada, liberación retardada de insulina, complicaciones diabéticas, incluida enfermedad del corazón coronaria, angina de pecho, fallo cardíaco congestivo, apoplejía, funciones cognitivas en demencia, retinopatía, neuropatía periférica, nefropatía, glomerulonefritis, glomeruloesclerosis, síndrome nefrótico, nefroesclerosis hipertensiva, algunos tipos de cáncer (tal como endometrial, de mama, próstata y colon), complicaciones en el embarazo, deficiente salud reproductora femenina (tal como irregularidades menstruales, infertilidad, ovulación irregular, síndrome del ovario poliquístico (PCOS)), lipodistrofia, trastornos relacionados con el colesterol tal como cálculos biliares, colecistitis y colelitiasis, gota, apnea del sueño obstructiva y problemas respiratorios, osteoartritis y prevención y tratamiento de la pérdida ósea, p. ej. osteoporosis.

El término “aislado”, tal como se utiliza en esta memoria con respecto a ácidos nucleicos tales como ADN o ARN, se refiere a moléculas separadas de otros ADNs o ARNs, respectivamente que están presentes en la fuente natural de la macromolécula. El término aislado, tal como se utiliza en esta memoria, también se refiere a un ácido nucleico o péptido que está esencialmente exento de material celular, material viral o medio de cultivo cuando se produce por técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Además de ello, un “ácido nucleico aislado” quiere dar a entender que incluye fragmentos de ácidos nucleicos que no se producen de forma natural como fragmentos y que no se encuentran en el estado natural. El término “aislado” se utiliza también en esta memoria para aludir a polipéptidos que son aislados de otras proteínas celulares y quiere dar a entender que abarca tanto polipéptidos purificados como recombinantes.

“Modular el flujo a través de la vía salvaje de NAD+ de una célula” se refiere a una acción que resulta en aumentar o disminuir el número de moléculas de NAD+ que son generadas por la vía salvaje de NAD+, p. ej. mostrada en la Fig. 1.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión “ácido nucleico” se refiere a polinucleótidos tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) y, en los casos en que sea apropiado, ácido ribonucleico (ARN). También debería entenderse que la expresión incluye equivalentes, análogos o cualquiera de ARN o ADN preparado a partir de análogos de nucleótidos y, según sea aplicable a la realización que se describe, polinucleótidos de cadena sencilla (sentido o antisentido) y de doble cadena. ESTs, cromosomas, ADNcs, ARNm y ARNrson ejemplos representativos de moléculas a las que se puede aludir como ácidos nucleicos.

La frase “ácido nucleico correspondiente a un gen” se refiere a un ácido nucleico que se puede utilizar para detectar el gen, p. ej. un ácido nucleico que es capaz de hibridarse específicamente al gen.

La expresión “porcentaje idéntico” se refiere a una identidad de la secuencia entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos. En cada caso, la identidad se puede determinar comparando una posición en cada una de las secuencias que puede alinearse para fines comparativos. Cuando una posición equivalente en las secuencias comparadas está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son idénticas en esa posición; cuando el sitio equivalente está ocupado por el mismo o un residuo aminoácido similar (p. ej. similar en la naturaleza estérica y/o electrónica), entonces a las moléculas se las puede aludir como homólogas (similares) en esa posición. Expresión como un porcentaje de homología, similitud o identidad se refiere a una función del número de aminoácidos idénticos o similares en posiciones compartidas por las secuencias

comparadas. Se pueden utilizar diversos algoritmos y/o programas de alineamiento, incluidos FASTA, BLAST o ENTREZ. FASTA y BLAST están disponibles como una parte del paquete de análisis de la secuencia GCG (Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.) y se pueden utilizar, p. ej., con ajustes por defecto. ENTREZ está disponible del Centro Nacional para la Información de Biotecnología, Biblioteca Nacional de Medicina, Instituto

- 5 Nacional de Salud, Bethesda, Md. En una realización, la identidad del porcentaje de dos secuencias se puede determinar mediante el programa GCG, con un peso de desfase de 1, p. ej., cada desfase de aminoácido es pesado como si fuera un error de apareamiento de un solo aminoácido o nucleótido entre las dos secuencias.
- 10 Otras técnicas para el alineamiento se describen en Methods in Enzymology, vol. 266: Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis (1996), comp. Doolittle, Academic Press, Inc., una división de Harcourt Brace & Co., San Diego, California, EE.UU. Preferiblemente, para alinear la secuencia se utiliza un programa de alineamiento que permite desfases en la secuencia. El algoritmo de Smith-Waterman es un tipo de algoritmo que permite desfases en los alineamientos de las secuencias. Véase *Meth. Mol. Biol.* 70: 173-187 (1997). También, se puede utilizar el programa GAP que utiliza el método de alineamiento de Needleman y Wunsch para alinear secuencias. Una estrategia de búsqueda alternativa utiliza el software MPSRCH, que funciona en un ordenador
- 15 MASPAR. MPSRCH utiliza un algoritmo de Smith-Waterman para puntuar secuencias en un ordenador masivamente paralelo. Esta estrategia mejora la capacidad de captar apareamientos distamente relacionados, y es especialmente tolerante de pequeños desfases y errores en las secuencias de nucleótidos. Se pueden utilizar secuencias de aminoácidos codificadas por ácidos nucleicos para la búsqueda de bases de datos tanto de proteínas como de ADN. Las bases de datos con secuencias individuales se describen en Methods in Enzymology, comp. Doolittle, *supra*. Bases de datos incluyen Genbank, EMBL, y la base de datos de ADN de Japón (DDBJ).
- 20

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

- 25 "Período de vida replicativo", que se utiliza de manera indistinta en esta memoria con "período de vida" de una célula se refiere al número de células hijas producidas por una "célula madre" individual. "Envejecimiento cronológico", por otra parte, se refiere al período de tiempo en el que una población de células no en división permanece viable cuando se desprovee de nutrientes. El período de vida de las células se puede incrementar en al menos aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60% o entre 20% y 70%, 30% y 60%, 40 y 60% o más utilizando los métodos de la invención.
- 30

"Miembros de la familia Sir2" o "miembros de la familia de proteínas Sir2" se refiere a la proteína Sir2 de *S. cerevisiae*, así como a cualesquiera histona desacetilasas con similitudes estructurales sustanciales con Sir2, p. ej. los homólogos humanos, hSIRT1, hSIRT2, hSIRT3, hSIRT4, hSIRT5, hSIRT6 y hSIRT7; y Sir-2.1.

35 "Molécula pequeña", tal como se utiliza en esta memoria, quiere aludir a una composición que tiene un peso molecular menor que aproximadamente 5 kD y, lo más preferiblemente, menor que aproximadamente 4 kD. Moléculas pequeñas pueden ser ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, hidratos de carbono, lípidos u otras moléculas orgánicas (con contenido en carbono) o inorgánicas. Muchas compañías farmacéuticas tienen amplios bancos de mezclas químicas y/o biológicas, a menudo extractos fúngicos, bacterianos o de algas, que pueden ser rastreados con cualquiera de los ensayos descritos en esta memoria.

40 La expresión "hibridación específica" de una sonda a un sitio diana de un ácido nucleico plantilla se refiere a la hibridación de la sonda predominantemente a la diana de modo que pueda claramente interpretarse la señal de hibridación. Tal como se describe adicionalmente en esta memoria, condiciones de este tipo que resultan en una hibridación específica varían en función de la longitud de la región de homología, del contenido GC de la región, de la temperatura de fusión "Tm" del híbrido. Así, las condiciones de hibridación variarán en el contenido en sales, la acidez y temperatura de la disolución de hibridación y de los líquidos de lavado.

45

45 "Estrés" se refiere a cualquier estado no óptimo para el crecimiento, desarrollo o reproducción. Una "condición de estrés" puede ser exposición a choque térmico; estrés osmótico; un agente lesivo del ADN; un nivel inadecuado de sales; niveles inadecuados de nitrógeno; nivel inadecuado de nutrientes; radiación o un compuesto tóxico, p. ej. una toxina o un agente de contienda químico (tales como bombas sucias y otras armas que pueden utilizarse en el terrorismo biológico). "Niveles inadecuados" se refieren a niveles que resultan en un estado no óptimo para el crecimiento, desarrollo o reproducción.

50

55 "Tratar" una afección o enfermedad se refiere a curar así como aliviar al menos un síntoma de la afección o enfermedad.

La expresión "agente terapéutico" está reconocida en la técnica y se refiere a cualquier resto químico que sea una sustancia biológica, fisiológica o farmacológicamente activa que actúa local o sistémicamente en un sujeto. La expresión también significa cualquier sustancia destinada al uso en el diagnóstico, curación, mitigación,

5 tratamiento o prevención de una enfermedad o en la mejora de un desarrollo físico o mental deseable y/o estados en un animal o ser humano.

La expresión "efecto terapéutico" está reconocida en la técnica y se refiere a un efecto local o sistémico en animales, particularmente mamíferos y, más particularmente, seres humanos, provocado por una sustancia farmacológicamente activa. La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de una sustancia de este tipo que produce algún efecto local o sistémico deseado en una relación de beneficio/riesgo razonable, aplicable a cualquier tratamiento. La cantidad terapéuticamente eficaz de una sustancia de este tipo variará en función del sujeto y de la enfermedad o afección que se esté tratando, del peso y de la edad del sujeto, de la gravedad de la enfermedad o afección, del modo de administración y similares que pueden fácilmente determinarse por un experto ordinario en la técnica. Por ejemplo, determinadas composiciones descritas en esta memoria se pueden administrar en una cantidad suficiente para producir un efecto deseado a una relación de beneficio/riesgo razonable, aplicable a un tratamiento de este tipo.

20 Una "variante" de un polipéptido se refiere a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos del polipéptido que está alterada en uno o más residuos aminoácidos. La variante puede tener cambios "conservativos", en donde un aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares (p. ej. reemplazo de leucina por isoleucina). Una variante puede tener cambios "no conservativos" (p. ej. reemplazo de glicina por triptófano). Variaciones menores análogas también pueden incluir delecciones o inserciones de aminoácidos, o ambas. Una guía para determinar qué residuos aminoácidos pueden ser sustituidos, insertados o suprimidos sin eliminar la actividad biológica o inmunológica se puede encontrar utilizando programas de ordenador bien conocidos en la técnica, por ejemplo el software LASERGENE (DNASTAR).

30 El término "variante", cuando se utiliza en el contexto de una secuencia de polinucleótidos, puede comprender una secuencia de polinucleótidos relacionada con la de un gen particular o la secuencia codificante del mismo. Esta definición también puede incluir, por ejemplo, variantes "alélicas", "de corte y empalme", "de especies" o "polimórficas". Una variante de corte y empalme puede tener una identidad significativa con una molécula de referencia, pero generalmente tendrá un número mayor o menor de polinucleótidos debido al corte y empalme alternativo de exones durante el procesamiento de ARNm. El polipéptido correspondiente puede poseer dominios funcionales adicionales o una ausencia de dominios. Variantes de especies son secuencias de polinucleótidos que varían de una especie a otra. Los polipéptidos resultantes tendrán generalmente una importante identidad de aminoácidos en relación uno con otro. Una variación polimórfica es una variación en la secuencia de polinucleótidos de un gen particular entre individuos de una especie dada. Variantes polimórficas también pueden comprender "polimorfismos de un solo nucleótido" (SNPs) en que la secuencia de polinucleótidos varía en una base. La presencia de SNPs puede ser indicativa, por ejemplo, de una determinada población, un estado patológico o una propensión a un estado patológico.

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

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

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

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

triple enlace, respectivamente.

A menos que se especifique de otro modo el número de carbonos "alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo, según se define arriba, pero que tiene de uno a aproximadamente diez carbonos, alternativamente de uno a aproximadamente seis átomos de carbono en su estructura de la cadena principal. De igual manera, "alquenilo inferior" y "alquinilo inferior" tienen longitudes de cadena similares.

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

El término "arilo" está reconocido en la técnica y se refiere a grupos aromáticos de un solo anillo de 5, 6 y 7 miembros que pueden incluir desde cero a cuatro heteroátomos, por ejemplo benceno, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, triazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina, y similares. A los grupos arilo con heteroátomos en la estructura del anillo también se les puede aludir como "heterociclos de arilo" o "compuestos heteroaromáticos". El anillo aromático puede estar sustituido en una o más posiciones del anillo con sustituyentes como los descritos anteriormente, por ejemplo halógeno, azida, alquilo, aralquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, hidroxilo, alcoxilo, amino, nitro, sulfhídrido, imino, amido, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, éter, alquistio, sulfonilo, sulfonamido, cetona, aldehído, éster, heterociclico, restos aromáticos o heteroaromáticos, -CF₃, -CN o similares. El término "arilo" incluye también sistemas de anillo policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en que dos o más carbonos son comunes a dos anillos contiguos (los anillos son "anillos condensados"), en donde al menos uno de los anillos es aromático, p. ej. los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos y/o heterociclicos.

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

Los términos "heterociclico" o "grupo heterocíclico" están reconocidos en la técnica y se refieren a estructuras de anillo de 3 a aproximadamente 10 miembros, alternativamente anillos de 3 a aproximadamente 7 miembros, cuyas estructuras de anillo incluyen uno a cuatro heteroátomos. Los heterociclos también pueden ser policíclicos. Grupos heterociclico incluyen, por ejemplo, tiofeno, tiantreno, furano, pirano, isobenzofurano, cromeno, xanteno, fenoxanteno, pirrol, imidazol, pirazol, isotiazol, isoxazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, indolizina, isoindol, indol, indazol, purina, quinolizina, isoquinolina, quinolina, ftalacina, naftiridina, quinoxalina, quinazolina, cinolina, pteridina, carbazol, carbolina, fenantridina, acridina, pirimidina, fenantrolina, fenazina, fenarsazina, fenotiazina, furazan, fenoaxazina, pirrolidina, oxolano, tiolano, oxazol, piperidina, piperazina, morfolina, lactonas, lactamas tales como acetidinonas y pirrolidinonas, sultamas, sultonas, y similares. El anillo heterocíclico puede estar sustituido en una o más posiciones con sustituyentes como los descritos anteriormente tal como, por ejemplo, halógeno, alquilo, aralquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, hidroxilo, amino, nitro, sulfhídrido, imino, amido, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, éter, alquistio, sulfonilo, cetona, aldehído, éster, un heterociclico, un resto aromático o heteroaromático, -CF₃, -CN, o similares.

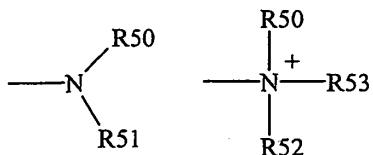
Los términos "policíclico" o "grupo policíclico" están reconocidos en la técnica y se refieren a dos o más anillos (p. ej. cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos y/o heterociclicos), en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos contiguos, p. ej. los anillos son "anillos condensados". Anillos que están unidos a través de átomos no adyacentes se denominan anillos "puenteados". Cada uno de los anillos del policiclo puede estar sustituido con sustituyentes tales como los descritos arriba tales como, por ejemplo, halógeno, alquilo, aralquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, hidroxilo, amino, nitro, sulfhídrido, imino, amido, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, éter, alquistio, sulfonilo, cetona, aldehído, éster, un heterociclico, un resto aromático o heteroaromático, -CF₃, -CN, o similares.

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

El término "nitro" está reconocido en la técnica y se refiere a -NO₂; el término "halógeno" está reconocido en la técnica y se refiere a -F, -Cl, -Br o -I; el término "sulfhidrido" está reconocido en la técnica y se refiere a -SH; el término "hidroxilo" significa -OH; y el término sulfonilo está reconocido en la técnica y se refiere a -SO₃⁻. "Haluro" designa el correspondiente anión de los halógenos y "pseudohaluro" tiene la definición recogida en la pág. 560 de "Advanced Inorganic Chemistry" de Cotton y Wilkinson.

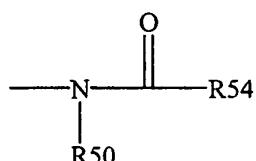
Los términos "amina" y "amino" están reconocidos en la técnica y se refieren tanto a aminas no sustituidas como

sustituidas, p. ej. un resto que puede representarse por las fórmulas generales:



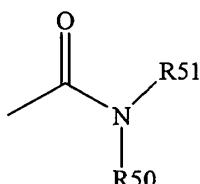
- en donde R50, R51 y R52 representan, cada uno independientemente, hidrógeno, un alquilo, un alquenilo, $-(CH_2)_m-$ R61, o R50 y R51, tomados junto con el átomo de N al que están unidos, completan un heterociclo que tiene de 4 a 8 átomos en la estructura del anillo; R61 representa un arilo, un cicloalquilo, un cicloalquenilo, un heterociclo o un policiclo; y m es cero o un número entero en el intervalo de 1 a 8. En determinadas realizaciones, sólo uno de R50 o R51 puede ser un carbonilo, p. ej. R50, R51 y el nitrógeno juntos no forman una imida. En otras realizaciones, R50 y R51 (y opcionalmente R52) representan, cada uno independientemente, un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo o $-(CH_2)_m-R61$. Así, el término "alquilamina" incluye un grupo amina tal como se define arriba que tiene un alquilo sustituido o no sustituido unido a la misma, es decir, al menos uno de R50 y R51 es un grupo alquilo.

- El término "acilamino" está reconocido en la técnica y se refiere a un resto que puede representarse por la fórmula general:



- en donde R50 es como se define arriba y R54 representa un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo o $-(CH_2)_m-R61$, en que m y R61 son como se definen arriba.

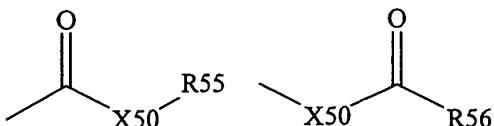
- El término "amido" está reconocido en la técnica como un carbonilo amino-sustituido e incluye un resto que puede representarse por la fórmula general:



- en donde R50 y R51 son como se definen arriba. En determinadas realizaciones de la amida en la presente invención no incluirán imidas que pueden ser inestables.

- El término "alquiltio" se refiere a un grupo alquilo según se define arriba que tiene un radical azufre unido al mismo. En determinadas realizaciones, el resto "alquiltio" está representado por uno de -S-alquilo, -S-alquenilo, -S-alquinilo -S- $(CH_2)_m-R61$, en donde m y R61 son como se definen arriba. Grupos alquiltio representativos incluyen metiltio, etiltio y similares.

El término "carbonilo" está reconocido en la técnica e incluye restos tales como los que se pueden representar por las fórmulas generales:



- en donde X50 es un enlace o representa un oxígeno o un azufre, y R55 y R56 representan un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo, $-(CH_2)_m-R61$ o una sal farmacéuticamente aceptable, R56 representa un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo o $-(CH_2)_m-R61$, en donde m y R61 son como se definen arriba. En los casos en que X50 sea un oxígeno y

R55 o R56 no sea hidrógeno, la fórmula representa un “éster”. En los casos en los que X50 sea un oxígeno y R55 sea como se ha definido arriba, al resto se le alude en esta memoria como un grupo carboxilo y, particularmente, cuando R55 sea un hidrógeno, la fórmula representa un “ácido carboxílico”. En los casos en que X50 sea un oxígeno y R56 sea hidrógeno, la fórmula representa un “formiato”. En general, en los casos en los que el átomo de oxígeno de la fórmula anterior esté reemplazado por azufre, la fórmula representa un grupo “tiolcarbonilo”. En los casos en los que X50 sea un azufre y R55 o R56 no sean hidrógeno, la fórmula representa un “tioléster”. En los casos en los que X50 sea un azufre y R55 sea hidrógeno, la fórmula representa un “ácido tiolcarboxílico”. En los casos en los que X50 sea un azufre y R56 sea hidrógeno, la fórmula representa un “tiolformiato”. Por otra parte, en los casos en los que X50 sea un enlace y R55 no sea hidrógeno, la fórmula anterior representa un grupo “cetona”.
 5 En los casos en los que X50 sea un enlace y R55 sea hidrógeno, la fórmula anterior representa un grupo “aldehído”.

10 Los términos “alcoxilo” o “alcoxi” están reconocidos en la técnica y se refieren a un grupo alquilo, según se ha definido arriba, que tiene un radical oxígeno unido al mismo. Grupos alcoxilo representativos incluyen metoxi, etoxi, propiloxi, terc-butoxi y similares. Un “éter” es dos carbonos unidos covalentemente por un oxígeno. Por consiguiente, el sustituyente de un alquilo que hace que ese alquilo sea un éter es o se asemeja a un alcoxilo tal como se puede representar por uno de -O-alquilo, -O-alquenilo, -O-alquinilo, -O-(CH₂)_m-R61, en que m y R61 se describen arriba.
 15

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

25 Los términos trifilo, tosilo, mesilo y nonaftilo están reconocidos en la técnica y se refieren a grupos trifluorometanosulfonilo, p-toluensulfonilo, metanosulfonilo y nonafluorobutanosulfonilo, respectivamente. Los términos triflato, tosilato, mesilato y nonaftato están reconocidos en la técnica y se refieren a grupos funcionales éster trifluorometanosulfonato, éster p-toluensulfonato, éster metanosulfonato y éster nonafluorobutanosulfonato y moléculas que contienen a dichos grupos, respectivamente.

30 Las abreviaturas Me, Et, Ph, Tf, Nf, Ts y Ms representan metilo, etilo, fenilo, trifluorometanosulfonilo, nonafluorobutanosulfonilo, p-toluensulfonilo y metanosulfonilo, respectivamente. Una lista más completa de las abreviaturas utilizadas por los químicos orgánicos de experiencia ordinaria en la técnica aparecen en el primer ejemplar de cada uno de los volúmenes de Journal of Organic Chemistry; esta lista se presenta típicamente en una tabla titulada Standard List of Abbreviations.

35 Determinados compuestos contenidos en composiciones de la presente invención pueden existir en formas geométricas o estereoisoméricas particulares. Además, los polímeros descritos en esta memoria también pueden ser ópticamente activos. La presente invención contempla la totalidad de este tipo de compuestos, incluidos isómeros cis y trans, enantiómeros R y S, diastereoisómeros, isómeros (D), isómeros (L), sus mezclas racémicas, y otras mezclas de los mismos, como que caen dentro del alcance de la invención. Átomos de carbono asimétricos adicionales pueden estar presentes en un sustituyente tal como un grupo alquilo. La totalidad de estos isómeros, 40 así como mezclas de los mismos, pretende estar incluida en esta invención.

45 Por ejemplo, si se desea un enantiómero particular de un compuesto de la presente invención, éste se puede preparar mediante síntesis asimétrica o mediante derivación con un grupo auxiliar quiral, en que la mezcla diastereomérica resultante se separa y el grupo auxiliar se escinde para proporcionar los enantiómeros puros deseados. Alternativamente, en los casos en los que la molécula contenga un grupo funcional de carácter básico tal como amino, o un grupo funcional de carácter ácido tal como carboxilo, se forman sales diastereoméricas con un ácido o base ópticamente activo apropiado, seguido de resolución de los diastereoisómeros así formados, mediante cristalización fraccionada o medios cromatográficos bien conocidos en la técnica, y subsiguiente 50 recuperación de los enantiómeros puros.

55 Se entenderá que “sustitución” o “sustituido con” incluye la condición implícita de que este tipo de sustitución está de acuerdo con la valencia permitida del átomo sustituido y el sustituyente, y que la sustitución resulta en un compuesto estable, p. ej. que no sufre espontáneamente transformación tal como re-disposición, ciclación, eliminación, u otra reacción.

Se contempla también que el término “sustituido” incluya todos los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos. En un amplio aspecto, los sustituyentes permisibles incluyen sustituyentes acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos de compuestos

orgánicos. Sustituyentes ilustrativos incluyen, por ejemplo, los descritos antes en esta memoria. Los sustituyentes permisibles pueden ser uno o más y los mismos o diferentes para compuestos orgánicos apropiados. Para los fines de esta invención, heteroátomos tales como nitrógeno pueden tener sustituyentes hidrógeno y/o cualesquiera sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos descritos en esta memoria que satisfagan las valencias de los

5 hetroátomos. Esta invención no pretende estar limitada de modo alguno por los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos.

Para los fines de esta invención, los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla Periódica de los Elementos, versión CAS, *Handbook of Chemistry and Physics* 67^a Ed., 1986-87, contraportada. También para los fines de esta invención, se contempla que el término "hidrocarburo" incluya todos los compuestos permisibles que tengan al menos un hidrógeno y un átomo de carbono. En un amplio espectro, los hidrocarburos permisibles incluyen compuestos orgánicos acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos, que pueden estar sustituidos o no sustituidos.

10 15 La definición de cada una de las expresiones, p. ej. alquilo inferior, m, n, p, y similares, cuando se produce más de una vez en cualquier estructura, pretende ser independiente de su definición en otro sitio en la misma estructura.

20 La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" está reconocida en la técnica y se refiere, a las sales por adición de ácidos no tóxicas, inorgánicas y orgánicas de compuestos, que incluyen, por ejemplo, las contenidas en composiciones de la presente invención.

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

40 Las expresiones "administración sistémica", "administrado por vía sistémica", "administración periférica" y "administrado por vía periférica" están reconocidas en la técnica y se refieren a la administración de una composición objeto, un producto terapéutico u otro material que no entre directamente en el sistema nervioso central, de modo que penetre en el sistema de paciente y, así, sea objeto de metabolismo y de otros procesos similares, por ejemplo, la administración por vía subcutánea.

45 Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" están reconocidas en la técnica y se refieren a modos de administración que no sean la administración por vía enteral y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradermal, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, cuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e infusión.

50 2. Métodos para aumentar el período de vida de una célula o protegerla frente a determinados estrés

55 El período de vida de una célula se puede aumentar y/o la célula se puede proteger frente a determinados estrés aumentando el flujo a través de la vía salvaje de NAD⁺. Esto se puede conseguir, p. ej., aumentando el nivel o actividad de al menos una proteína implicada en la vía salvaje de NAD⁺ tal como una proteína seleccionada del grupo que consiste en NPT1, PNC1, NMA1 y NMA2.

El nivel de proteínas se puede aumentar en una célula, p. ej. introduciendo en la célula un ácido nucleico que codifique la proteína operativamente enlazada a una secuencia reguladora transcripcional que dirige la expresión de la proteína en la célula. Métodos para expresar ácidos nucleicos en células y elementos reguladores

transcripcionales apropiados para hacer esto son bien conocidos en la técnica. Alternativamente, una proteína se puede introducir en una célula, habitualmente en presencia de un vector que facilite la entrada de las proteínas en las células, p. ej. liposomas. Las proteínas también se pueden enlazar a péptidos de transcritosis para ese fin. Todavía en otros métodos, un agente que estimula la expresión del gen endógeno se pone en contacto con una célula. Agentes de este tipo se pueden identificar tal como se describe adicionalmente en esta memoria.

5 Una secuencia de nucleótidos que codifica nicotinato fosforribosiltransferasa (NPT1) de *S. cerevisiae* y la proteína codificada por ella se recogen como SEQ ID Nos: 1 y 2, respectivamente. NPT1 también se conoce como "LSR2."

10 El ADNC completo de NPT1 de *S. cerevisiae* y la proteína codificada se proporcionan por los números de acceso GenBank C_001147 y AAB59317, respectivamente, los cuales se recogen como SEQ ID NOS: 1 y 2,

respectivamente. Los números de acceso L11274 y AAB59317 también parecen referirse a las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de *S. cerevisiae*, respectivamente. El homólogo de NPT1 en bacterias es PncB (35, 37 y

15 38). La NPT1 de *E. coli* se proporciona como el número de acceso GenBank J05568. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos humanas se proporcionan por los números de acceso GenBank BC006284 y

19 AAH06284, respectivamente, y X71355 y CAA50490, respectivamente, AAH32466 y BC032466 y se describen en Chong et al. (1993) Genomics 18:355. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos humanas también se recogen como SEQ ID Nos: 13 y 14, respectivamente (y corresponden al No. de acceso GenBank BC032466). A la proteína humana se la alude también como una "proteína de transporte de fosfato de sodio renal." Secuencias de

20 nucleótidos y aminoácidos de ratón se proporcionan por los números de acceso GenBank X77241 y CAA54459 y se describen en Chong et al. (1995) Am. J. Physiol. 268:1038. La región del promotor de la NPT1 de ratón se

25 proporciona como el número de acceso GenBank AF361762 y se describe en Soumounou et al. (2001) Am J. Physiol. 281: F1082. NPT1 también se recoge como un Clon IMAGE, bajo el número 3957135. Un alineamiento de homólogos de NPT1 se recoge en la Fig. 15.

25 Una secuencia de nucleótidos que codifica PNC1 de *S. cerevisiae* y la proteína codificada por ella se recogen como SEQ ID Nos: 3 y 4, respectivamente, las cuales corresponden a los números de acceso GenBank NC_001139 y NP_011478, respectivamente. PNC1 es el homólogo de levadura de la proteína bacteriana pncA, la cual cataliza la hidrólisis de nicotinamida en ácido nicotínico y amoniaco. PNC1 de *S. cerevisiae*, a la que también se alude como marco de lectura abierta (ORF- siglas en inglés) YGL037 se describe en Ghislain et al. (2002) Yeast 19:215. Las

30 secuencias de nucleótidos y aminoácidos de una PNC1 de Arachis hypogaea se proporcionan por los números de acceso GenBank M37636 y AAB06183 y se describen en Buffard et al. (1990) PNAS 87:8874. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de homólogos humanos potenciales se proporcionan por los números de acceso GenBank BC017344 y AAH 17344, respectivamente; AK027122 y NP_078986, respectivamente; XM_041059 y

35 XP_041059, respectivamente; y NM_016048 y NP_057132, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de una potencial PNC1 humana se recogen como SEQ ID Nos: 15 y 16, respectivamente y corresponden al No. de acceso GenBank BC017344. Un alineamiento de PNC1 humana, de mosca y de *S. cerevisiae* se recoge en la Fig. 16. Un homólogo funcional humano de PNC1 es NAMPRT, que se describe más adelante en esta memoria.

40 Una secuencia de nucleótidos que codifica NMA1 de *S. cerevisiae* y la proteína codificada por ella se recogen como SEQ ID Nos: 5 y 6, respectivamente, las cuales corresponden a los números de acceso GenBank NC_001144.2 y NP_013432, respectivamente. La NMA1 de *S. cerevisiae* corresponde ORF YLR328, descrito en Smith et al. (2000)

45 PNAS 97:6658. NMA1 es el homólogo de *S. cerevisiae* del gen NaMNAT bacteriano. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de homólogos humanos se proporcionan por los números de acceso GenBank NM_022787 y NP_073624, respectivamente; AK026065 y BAB 15345, respectivamente; AF459819 y AAL76934,

50 respectivamente; XM_087387 y XP_087387, respectivamente; y AF345564 y AAK52726, respectivamente, y NP_073624; AAL76934; NP_073624; y AF314163. La secuencia de nucleótidos y aminoácidos de NMA1 humana se recoge como SEQ ID Nos: 17 y 18, respectivamente, y corresponde al número de acceso GenBank NM_022787. Se proporciona un clon IMAGE bajo el número 4874147 y el clon HRC hrc08458. Homólogos bacterianos se describen, p. ej., en Zhang et al. (2002) Structure 10:69.

55 Una secuencia de nucleótidos que codifica NMA2 de *S. cerevisiae* y la proteína codificada por ella se recogen como SEQ ID Nos: 7 y 8, respectivamente, las cuales corresponden a los números de acceso GenBank NC_001139 y NP_011524, respectivamente. La NMA2 de *S. cerevisiae* corresponde a ORF YGR010, descrito en Emanuelli et al. (1999) FEBS Lett. 455:13. NMA2 es el homólogo de *S. cerevisiae* del gen NaMNAT bacteriano.

Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de homólogos humanos se proporcionan por los números de acceso GenBank NM_015039 y NP_055854, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de NMA2 humana se recogen como SEQ ID Nos: 19 y 20, respectivamente, y corresponden al número de acceso GenBank NM_015039.

- Resultará evidente para una persona experta en la técnica que de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria se puede utilizar una proteína de longitud completa o ácido nucleico que codifique la misma o a una parte de la misma. Una parte de una proteína es preferiblemente una parte biológicamente activa de la misma. Partes que son biológicamente activas se pueden identificar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y utilizando un ensayo que puede vigilar la actividad de la proteína particular. Ensayos para determinar la actividad de una proteína NPT1 se describen, p. ej., en Pescanglini et al. (1994) Clin. Chim. Acta 229: 15-25 y Sestini et al. (2000) Archives of Biochem. Biophys. 379:277. Ensayos para determinar la actividad de una proteína PNC1 se describen, p. ej., en Ghislain et al. Yeast 19:215. Ensayos para determinar la actividad de una proteína NMA1 y NMA2 se describen, p. ej., en Sestini et al., *supra*. Alternativamente, la actividad de una proteína de este tipo se puede testar en un ensayo en el que se determina el período de vida de una célula. Por ejemplo, una célula se transfecta con un ácido nucleico que comprende una o más copias de una secuencia que codifica una parte de una proteína NPT1, PNC1, NMA1 o NMA2 o un ácido nucleico control y se compara el período de vida de las células. Un período de vida mayor de una célula transfectada con una parte de una de las proteínas indica que la parte de la proteína es una parte biológicamente activa. Ensayos para determinar el período de vida de una célula se conocen en la técnica y también se describen adicionalmente en esta memoria. En particular, se pueden realizar ensayos para determinar el período de vida de una célula de mamífero según se describe, p. ej., en Cell Growth, Differentiation and Senescence: A Practical Approach. George P. Studzinski (comp.). En lugar de medir el período de vida, también se puede medir la resistencia de una célula transfectada a determinados estrés, p. ej. choque térmico, para determinar si una parte de una proteína es una parte biológicamente activa. Métodos para medir la resistencia a determinados estrés son conocidos en la técnica y también se describen adicionalmente en esta memoria. En particular, ensayos para determinar la resistencia de una célula de mamífero al choque térmico se pueden realizar según se describe, p. ej., en Bunelli et al. (1999) Exp. Cell Res. 262:20.
- Además de las partes de las proteínas NPT1, PNC1, NMA1 o NMA2, en los métodos descritos se pueden utilizar otras variantes tales como proteínas que contienen una delección, inserción o adición de uno o más aminoácidos, con la condición de que la proteína sea biológicamente activa. Ejemplos de cambios de aminoácidos incluyen sustituciones conservativas de aminoácidos. Otros cambios incluyen sustituciones para aminoácidos que no se producen de forma natural. En los métodos descritos también se pueden utilizar proteínas codificadas por ácidos nucleicos que se hibridan a un ácido nucleico que codifica NPT1, PNC1, NMA1 o NMA2 bajo condiciones de rigurosidad elevada o media y que son biológicamente activos, incluidos ácidos nucleicos que se hibridan bajo condiciones de elevada rigurosidad de 0,2 a 1 x SSC a 65°C, seguido de un lavado a 0,2 x SSC a 65°C a un gen que codifica NPT1, PNC1, NNM1 o NMA2, o ácidos nucleicos que se hibridan bajo condiciones de baja rigurosidad de 6 x SSC a temperatura ambiente, seguido de un lavado a 2 x SSC a la temperatura ambiente a un gen que codifica NPT1, PNC1, NMA1 o NMA2. Otras condiciones de hibridación incluyen 3 x SSC a 40 ó 50°C, seguido de un lavado en 1 ó 2 x SSC a 20, 30, 40, 50, 60 ó 65°C. Las hibridaciones se pueden realizar en presencia de formaldehido, p. ej. al 10%, 20%, 30%, 40% o 50%, que aumentan adicionalmente la rigurosidad de la hibridación. Teoría y práctica de la hibridación de ácidos nucleicos se describe, p. ej., en S. Agrawal (comp.) Methods in Molecular Biology, volumen 20; y Tijssen (1993) Laboratory Techniques in biochemistry and molecular biology-hybridization with nucleic acid probes, p. ej., parte I, Capítulo 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, Nueva York, proporcionan una guía básica a la hibridación de ácidos nucleicos.
- Proteínas útiles en los métodos descritos en esta memoria pueden tener una homología o identidad de al menos 50%, 70%, 80%, 90%, preferiblemente al menos aproximadamente 95%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 98% y, lo más preferiblemente, al menos 99% con una proteína de tipo salvaje NPT1, PNC1, NMA1 o NMA2 o un dominio de la misma, p. ej. el dominio catalítico. Otras proteínas pueden ser codificadas por un ácido nucleico que tiene una homología o identidad de al menos aproximadamente 90%, de preferencia al menos aproximadamente 95%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 98% y, lo más preferiblemente, al menos 99% con un ácido nucleico de tipo salvaje NPT1, PNC1, NMA1 o NMA2, p. ej. los descritos en esta memoria.
- Las proteínas pueden ser proteínas de fusión, p. ej. proteínas condensadas a un péptido de transcritosis. Proteínas de fusión pueden comprender también un péptido heterólogo que puede ser utilizado para purificar la proteína y/o para detectarla.
- También se pueden utilizar variantes de proteínas que se producen de forma no natural. Variantes de este tipo pueden ser peptidomiméticos.

La actividad de una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en NPT1, PNC1, NMA1 y NMA2 puede ser potenciada o aumentada, por ejemplo, poniendo en contacto una célula con un compuesto que incrementa la actividad, p. ej. la actividad enzimática de una de estas proteínas. Ensayos para identificar compuestos de este tipo se describen adicionalmente en esta memoria.

- 5 El flujo a través de la vía salvaje de NAD⁺ puede aumentarse sin modificar sustancialmente el nivel de NAD⁺, NADH y la relación de NAD⁺/NADH en una célula. Niveles de NAD⁺ y NADH y relaciones de estas dos moléculas se pueden determinar p. ej., según se describe en los Ejemplos Comparativos.
- 10 Cualesquiera medios para la introducción de polinucleótidos en mamíferos, humanos o no humanos, o células de los mismos pueden adaptarse para el suministro de las diversas construcciones descritas en esta memoria en el receptor pretendido. La transfección se puede utilizar para suministrar construcciones de ADN a células, es decir, mediante el suministro de ADN "desnudo" o en un complejo con un sistema de dispersión coloidal. Un sistema coloidal incluye complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Sistemas coloidales pueden ser ADN formando complejo con lípidos o formulado con liposomas. En la estrategia primera, antes de la formulación de ADN, p. ej. con lípido, un plásmido que contiene un transgen que porta las construcciones de ADN deseadas se puede optimizar primero experimentalmente para la expresión (p. ej. inclusión de un intrón en la región no traducida 5' y eliminación de secuencias innecesarias (Felgner, et al., Ann NY Acad Sci 126:139, 1995). La formulación de ADN, p. ej. con diversos materiales de lípidos o liposomas puede luego efectuarse utilizando métodos y materiales conocidos y puede suministrarse al mamífero receptor. Véase, p. ej., Canonico et al, Am J Respir Cell Mol Biol 10:24-29, 1994; Tsan et al, Am J Physiol 268; Alton et al., Nat Genet. 5:135-142, 1993 y la patente de EE.UU. nº 5.679.647 de Carson et al.
- 15 20 25 30 35 40
- La fijación como objetivo de liposomas se puede clasificar en base a factores anatómicos y mecanísticos. La clasificación anatómica se basa en el nivel de selectividad, por ejemplo específico para el órgano, específico para la célula y específico para la organela. La fijación como objetivo mecanístico se puede distinguir en base a si es pasiva o activa. La fijación como objetivo pasiva utiliza la tendencia natural de los liposomas a distribuirse en células del sistema retículo-endotelial (RES) en órganos que contienen capilares sinusoidales. Por otra parte, la fijación como objetivo activa implica la alteración del liposoma mediante acoplamiento del liposoma a un ligando específico tal como un anticuerpo monoclonal, azúcar, glicolípido o proteína, o cambiando la composición o el tamaño del liposoma con el fin de conseguir fijar como objetivo órganos de células distintas de los sitios de localización que se producen de forma natural.
- 45 50
- La superficie del sistema de suministro fijado como objetivo puede modificarse de una diversidad de maneras. En el caso de un sistema de suministro fijado como objetivo liposomal, grupos lípidos se pueden incorporar en la bicapa lípida del liposoma con el fin de mantener al ligando fijado como objetivo en asociación estable con la bicapa liposomal. Se pueden utilizar diversos grupos de enlace para unir las cadenas de lípidos al ligando fijado como objetivo. ADN desnudo o ADN asociado con un vehículo de suministro, p. ej., liposomas se puede administrar a varios sitios en un sujeto (véase más abajo).

Construcciones de ADN se pueden suministrar utilizando vectores virales. Los transgenes se pueden incorporar en cualquiera de una diversidad de vectores virales útiles en la terapia génica tales como retrovirus recombinantes, adenovirus, virus adeno-asociado (AAV), y virus herpes simplex-1, o plásmidos bacterianos o eucarióticos recombinantes. Vectores virales tales como estrategias basadas en AAV y adenovirus pueden ser particularmente útiles en los métodos descritos. Generalmente, se entiende que vectores de este tipo son el sistema de suministro de genes recombinantes de elección para la transferencia de genes exógenos *in vivo* particularmente en seres humanos. La siguiente guía adicional sobre la elección y uso de vectores virales puede ser útil al practicante. Tal como se describe con mayor detalle más abajo, realizaciones de este tipo de las construcciones de expresión objeto están específicamente contempladas para uso en diversos protocolos de terapia génica *in vivo* y *ex vivo*.

55

Un sistema de suministro de genes virales puede utilizar vectores derivados de adenovirus. El conocimiento de la organización genética de adenovirus, un virus de ADN de 36 kB, lineal y de doble cadena, permite la sustitución de un gran trozo de ADN adenoviral con secuencias extrañas de hasta 8 kB. En contraposición a los retrovirus, la infección de ADN adenoviral en células hospedantes no resulta en una integración cromosomal debido a que el ADN adenoviral puede replicarse de una manera episomal sin una genotoxicidad potencial. También, los adenovirus son estructuralmente estables y no se ha detectado reduplicación en el genoma alguna después de una amplificación extensiva. Los adenovirus pueden infestarse virtualmente a todas las células epiteliales independientemente de su fase en el ciclo celular. Hasta ahora, la infección adenoviral parece estar ligada

solamente a enfermedades suaves tales como enfermedad respiratoria aguda en el ser humano.

Adenovirus es particularmente adecuado para uso como un vector de transferencia de genes debido a su genoma de tamaño mediano, facilidad de manipulación, elevada titulación, amplia gama de células diana y una elevada infectividad. La partícula del virus es relativamente estable y es susceptible de purificación y concentración y, como antes, se puede modificar de modo que afecte al espectro de infectividad. Adicionalmente, el adenovirus es fácil de hacer crecer y manipular y exhibe una amplia gama de hospedantes *in vitro* e *in vivo*. Este grupo de virus puede obtenerse en títulos elevados, p. ej. 10^9 – 10^{11} unidades formadoras de placas (PFU)/ml y son muy infecciosos. El ciclo de vida de adenovirus no requiere la integración en el genoma de la célula hospedante. Los genes extraños suministrados por vectores de adenovirus son episomales y, por lo tanto, tienen una baja genotoxicidad a células hospedantes. No se han reseñado efectos secundarios en estudios de vacunación con adenovirus de tipo salvaje (Couch et al., 1963; Top et al., 1971), demostrando su seguridad y potencial terapéutico como vectores de transferencia de genes *in vivo*. Además de ello, la capacidad portadora del genoma adenoviral para ADN extraño es amplia (de hasta 8 kilobases) con relación a otros vectores de suministro de genes (Berkner et al., supra; Haj-Ahmand y Graham (1986) J. Virol. 57:267). La mayoría de los vectores adenovirales defectuosos en la replicación, actualmente en uso, y, por lo tanto, favorecidos por la presente invención, están suprimidos para la totalidad o partes de los genes E1 y E3 virales, pero conservan tanto como el 80% del material genético adenoviral (véase, p. ej. Jones et al., (1979) Cell 16:683; Berkner et al., supra; y Graham et al., en Methods in Molecular Biology, E.J. Murray, comp. (Humana, Clifton, NJ, 1991) vol. 7, págs.. 109-127). La expresión de los polinucleótidos insertados puede realizarse bajo el control, por ejemplo, del promotor E1A, el promotor tardío principal (MLP) y secuencias conductoras asociadas, el promotor E3 viral o secuencias promotoras añadidas exógenamente.

El genoma de un adenovirus se puede manipular de modo que codifique un producto génico de interés, pero está inactivado en términos de su capacidad de replicarse en un ciclo de vida viral lítico normal (véase, por ejemplo, Berkner et al., (1988) BioTechniques 6:616; Rosenfeld et al., (1991) Science 252:431-434; y Rosenfeld et al., (1992) Cell 68: 143-155). Vectores adenovirales derivados de la cepa de adenovirus Ad tipo 5 d1324 u otras cepas de adenovirus (p. ej. Ad2, Ad3, Ad7, etc.) son bien conocidos por los expertos en la técnica. Adenovirus recombinantes pueden ser ventajosos en determinadas circunstancias debido a que no son capaces de infestarse células no en división y pueden utilizarse para infestar una amplia diversidad de tipos de células, incluido el epitelio de las vías respiratorias (Rosenfeld et al., (1992), citado supra), células endoteliales (Lemarchand et al., (1992) PNAS USA 89:6482-6486), hepatocitos (Herz y Gerard, (1993) PNAS USA 90:2812-2816) y células de la musculatura (Quantin et al., (1992) PNAS USA 89:2581-2584).

Los adenovirus también pueden ser específicos del tipo de célula, es decir, infestarse sólo tipos restringidos de células y/o expresar un transgen sólo en tipos restringidos de células. Virus pueden comprender un gen bajo el control transcripcional de una región de iniciación de la transcripción específicamente regulada por parte de células hospedantes diana, según se describe, p. ej., en la patente de EE.UU. nº 5.698.443, de Henderson y Schuur, expedida el 16 de diciembre de 1997. Así, la replicación de adenovirus competentes se puede restringir a determinadas células, p. ej. insertando un elemento de respuesta específico para la célula para regular una síntesis de una proteína necesaria para la replicación, p. ej. E1A o E1B.

Secuencias de ADN de un cierto número de tipos de adenovirus están disponibles de Genbank. Por ejemplo, el adenovirus humano tipo 5 tiene el N° de acceso Genbank M73260. Las secuencias de ADN de adenovirus pueden obtenerse a partir cualquiera de los 42 tipos de adenovirus humanos actualmente identificados. Diversas cepas de adenovirus están disponibles de American Type Culture Collection, Rockville, Maryland o, bajo petición, de un cierto número de fuentes comerciales y académicas. Un transgen, según se describe en esta memoria, se puede incorporar en cualquier vector adenoviral y protocolo de suministro mediante digestión por restricción, ligamiento al enlazador o relleno en los extremos y ligamiento.

Líneas de células productoras de adenovirus pueden incluir uno o más de los genes adenovirales E1, E2a y la secuencia de ADN de E4 para empaquetar vectores de adenovirus en los que uno o más de estos genes ha sido mutado o suprimido, se describen, p. ej., en los documentos PCT/US95/15947 (WO 96/18418) por Kadan et al., PCT/US95/07341 (WO 95/346671) por Kovacs et al.; PCT/FR94/00624 (WO 94/281152) por Imler et al.; PCT/FR94/00851 (WO 95/02697) por Perrocaudet et al., PCT/US95/14793 (WO 96/14061) por Wang et al.

Un sistema de vector viral útil para el suministro de polinucleótidos es el virus adeno-asociado (AAV). El virus adeno-asociado es el virus defectuoso que se produce de forma natural que requiere otro virus, tal como un adenovirus o un virus herpes, en calidad de un virus helper o auxiliar para la replicación eficaz y un ciclo de vida productivo. (Para una revisión, véase Muzyczka et al., Curr. Topics in Micro. and Immunol. (1992) 158:97-129).

El AAV no ha sido asociado con la causa de enfermedad alguna. AAV no es un virus transformante ni oncogénico. La integración de AAV en los cromosomas de líneas de células humanas no provoca alteración significativa alguna en las propiedades de crecimiento ni en las características morfológicas de las células. Estas propiedades de AAV 5 también lo recomiendan como un vector de terapia génica humana potencialmente útil.

AAV es también uno de los pocos virus que puede integrar su ADN en células no en división, p. ej. en células epiteliales pulmonares, y exhibe una elevada frecuencia de integración estable (véase, por ejemplo, Flotte et al., 10 (1992) Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7:349-356; Samulski et al., (1989) J. Virol. 63:3822-3828; y McLaughlin et al., (1989) J. Virol. 62:1963-1973). Vectores que contienen tan pocos como 300 pares de bases de AAV pueden empaquetarse y pueden integrarse. El espacio para el ADN exógeno está limitado a aproximadamente 4,5 kb. Se 15 puede utilizar un vector de AAV tal como el descrito en Tratschin et al., (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 para introducir ADN en células. Una diversidad de ácidos nucleicos ha sido introducida en diferentes tipos de células utilizando vectores de AAV (véase, por ejemplo, Hermonat et al., (1984) PNAS USA 81:6466-6470; Tratschin et al., (1985) Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081; Wondisford et al., (1988) Mol. Endocrinol. 2:32-39; Tratschin et al., (1984) J. Virol. 51:611-619; y Flotte et al., (1993) J. Biol. Chem. 268:3781-3790).

Los vectores de expresión basados en AAV, que pueden utilizarse en los métodos descritos, contienen típicamente 20 las repeticiones terminales invertidas (ITRs) de 145 nucleótidos que flanquean un sitio de restricción que puede utilizarse para la subclonación del transgen, ya sea directamente utilizando el sitio de restricción disponible o mediante escisión del transgen con enzimas de restricción, seguido de despuente de los extremos, ligamiento de enlazadores de ADN apropiados, digestión por restricción y ligamiento en el sitio entre las ITRs. La capacidad de vectores de AAV es de aproximadamente 4,4 kb (Kotin, R. M., Human Gene Therapy 5:793-801, 1994 y Flotte et al. J. Biol. Chem. 268:3781-3790, 1993).

Reservas de AAV se pueden producir según se describe en Hermonat y Muzyczka (1984) PNAS 81:6466, modificada utilizando el pAAV/Ad descrito por Samulski et al. (1989) J. Virol. 63:3822. La concentración y purificación del virus se puede conseguir por métodos reseñados tales como el bandeo en gradientes de cloruro de cesio, tal como se utilizó para el informe inicial de la expresión del vector de AAV *in vivo* (Flotte et al. J. Biol. Chem. 25 268:3781-3790, 1993) o purificación cromatográfica, según se describe en O'Riordan et al., documento WO 97/08298. Métodos para el empaquetamiento *in vitro* de vectores de AAV están también disponibles y tienen la ventaja de que no existe limitación de tamaño del ADN empaquetado en las partículas (véase la patente de EE.UU. 30 5.688.676 de Zhou et al., expedida el 18 de noviembre de 1997). Este proceso implica la preparación de extractos de empaquetamiento exentos de células.

Vectores de adenovirus-AAV híbridos representados por una cápsida de adenovirus que contiene un ácido nucleico 35 que comprende una parte de un adenovirus, y secuencias de ITR 5' y 3' procedentes de un AAV que flanquean un transgen seleccionado bajo el control de un promotor. Véase, p. ej. Wilson et al, Publicación de la Solicitud de Patente Internacional N° WO 96/13598. Este vector híbrido se caracteriza por un suministro de transgenes de 40 elevado título a una célula hospedante y la capacidad de integrar establemente el transgen en el cromosoma de la célula hospedante en presencia del gen rep. Este virus es capaz de infectar virtualmente a todos los tipos de células (capacidad conferida por su secuencia de adenovirus) y la integración del transgen a largo plazo estable en el genoma de la célula hospedante (capacidad conferida por sus secuencias de AAV).

45 Las secuencias de ácido nucleico del adenovirus empleadas en este vector pueden oscilar desde una cantidad de secuencia mínima, que requiere el uso de un virus helper para producir la partícula de virus híbrido, a sólo delecciones seleccionadas de genes de adenovirus, productos génicos suprimidos que pueden suministrarse en el proceso viral híbrido mediante una célula empaquetadora. Por ejemplo, un virus híbrido puede comprender las secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) 5' y 3' de un adenovirus (que actúan como orígenes de la 50 replicación). La secuencia terminal izquierda (5') del genoma de Ad5 que se puede utilizar se extiende desde los pb 1 hasta aproximadamente 360 del genoma de adenovirus convencional (al que se alude también como unidades de mapa 0-1) e incluye la ITR 5' y el dominio de empaquetamiento/potenciador. Las secuencias de adenovirus 3' del virus híbrido incluyen la secuencia de la ITR 3' terminal de la derecha que es de aproximadamente 580 nucleótidos (aproximadamente pb 35.353 - fin del adenovirus, a la que se alude como aproximadamente 98,4-100 unidades de mapa).

La preparación de un vector híbrido se describe adicionalmente en detalle en la solicitud PCT publicada, titulada "Hybrid Adenovirus-AAV Virus and Method of Use Thereof", documento WO 96/13598 por Wilson et al. Para una guía detallada adicional sobre tecnología de adenovirus y de adenovirus-AAV híbridos, incluidos métodos y

materiales para la incorporación de un transgen, la propagación y purificación de virus recombinantes que contienen el transgen y su uso en la transfección de células y mamíferos, véase también Wilson et al, documentos WO 94/28938; WO 96/13597 y WO 96/26285, y referencias citadas en los mismos.

- 5 Con el fin de construir un vector retroviral, un ácido nucleico de interés se inserta en el genoma viral en el lugar de determinadas secuencias virales para producir un virus que es defectuoso en la replicación. Con el fin de producir viriones, se construye una línea de células de empaquetamiento que contienen los genes gag, pol y env, pero sin los componentes LTR y psi (Mann et al. (1983) Cell 33:153). Cuando un plásmido recombinante que contiene un ADNc humano junto con las secuencias del LTR y psi retrovirales se introduce en esta línea celular (mediante precipitación con fosfato de calcio, por ejemplo), la secuencia psi permite que el transcripto de ARN del plásmido recombinante sea empaquetado en partículas virales que luego son segregadas al medio de cultivo (Nicolas y Rubenstein (1988) "Retroviral Vectors", en: Rodriguez y Denhardt comp. Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and their Uses. Stoneham:Butterworth; Temin, (1986) "Retrovirus Vectors for Gene Transfer: Efficient Integration into and Expression of Exogenous DNA in Vertebrate Cell Genome", en: Kucherlapati comp. Gene Transfer. Nueva York: Plenum Press; Mann et al., 1983 supra). El medio que contiene los retrovirus recombinantes se recoge luego, opcionalmente se concentra y se utiliza para la transferencia de genes. Vectores retrovirales son capaces de infestar una amplia diversidad de tipos de células. La integración y la expresión estable requieren la división de células hospedantes (Paskind et al. (1975) Virology 67:242). Este aspecto es particularmente relevante para el tratamiento de PVR, ya que estos vectores permiten una fijación como objetivo selectiva de células que proliferan, es decir, una fijación como objetivo selectiva de las células en la membrana epirretinal, ya que éstas son las únicas que proliferan en los ojos de sujetos de PVR.

Un requisito previo principal para el uso de retrovirus consiste en asegurar la seguridad de su uso, particularmente con respecto a la posibilidad de la dispersión de virus de tipo salvaje en la población de células. El desarrollo de líneas de células especializadas (denominadas "células de empaquetamiento") que producen sólo retrovirus defectuosos en la replicación ha aumentado la utilidad de retrovirus para la terapia génica, y retrovirus defectuosos están bien caracterizados para uso en la transferencia de genes para fines de terapia génica (para una revisión, véase Miller, A. D. (1990) Blood 76:271). Así, se pueden construir retrovirus recombinantes en los que parte de la secuencia codificante retroviral (gap, pol, env) ha sido reemplazada por un ácido nucleico que codifica una proteína descrita en esta memoria, p. ej. un activador transcripcional, haciendo al retrovirus defectuoso en la replicación. El retrovirus defectuoso en la replicación puede luego empaquetarse en viriones que pueden utilizarse para infestar una célula diana mediante el uso de un virus helper por técnicas convencionales. Protocolos para producir retrovirus recombinantes y para infestar células *in vitro* o *in vivo* con virus de este tipo se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. et al., (comps.) Greene Publishing Associates, (1989), secciones 9.10-9.14 y otros manuales de laboratorio convencionales. Ejemplos de retrovirus adecuados incluyen pLJ, pZIP, pWE y pEM que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Un vector retroviral preferido es pSR MSVtkNeo (Muller et al. (1991) Mol. Cell Biol. 11:1785 y pSR MSV(XbaI) (Sawyers et al. (1995) J. Exp. Med. 181:307) y derivados del mismo. Por ejemplo, los sitios BamHI únicos en ambos de estos dos vectores pueden ser retirados digiriendo los vectores con BamHI, llenándolos con Klenow y volviéndolos a ligar para producir pSMTN2 y pSMTX2, respectivamente, según se describe en el documento PCT/US96/09948 por Clackson et al. Ejemplos de líneas de virus de empaquetamiento adecuadas para preparar sistemas retrovirales tanto ecotrópicos como anfotrópicos incluyen Crip, Cre, 2 y Am.

Retrovirus, incluidos lentivirus, han sido utilizados para introducir una diversidad de genes en muchos tipos de células diferentes, incluidas células neurales, células epiteliales, células retinales, células endoteliales, linfocitos, mioblastos, hepatocitos, células de la médula ósea, *in vitro* y/o *in vivo* (véase, por ejemplo, revisión por Federico (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 10:448; Egliitis et al., (1985) Science 230:1395-1398; Danos y Mulligan, (1988) PNAS USA 85:6460-6464; Wilson et al., (1988) PNAS USA 85:3014-3018; Armentano et al., (1990) PNAS USA 87:6141-6145; Huber et al., (1991) PNAS USA 88:8039-8043; Ferry et al., (1991) PNAS USA 88:8377-8381; Chowdhury et al., (1991) Science 254:1802-1805; van Beusechem et al., (1992) PNAS USA 89:7640-7644; Kay et al., (1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Dai et al., (1992) PNAS USA 89:10892-10895; Hwu et al., (1993) J. Immunol. 150:4104-4115; patente de EE.UU. Nº 4.868.116; patente de EE.UU. Nº 4.980.286; solicitud PCT WO 89/07136; solicitud PCT WO 89/02468; solicitud PCT WO 89/05345; y solicitud PCT WO 92/07573).

55 Además de ello, se ha demostrado que es posible limitar el espectro de infección de retrovirus y, por consiguiente, de vectores basados en retrovirus, modificando las proteínas de empaquetamiento virales sobre la superficie de la partícula viral (véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO93/25234, WO94/06920 y WO94/11524). Por ejemplo, estrategias para la modificación del espectro de infección de vectores retrovirales incluyen: acoplamiento de anticuerpos específicos para antígenos de la superficie de la célula a la proteína env viral (Roux et al., (1989)

- PNAS USA 86:9079-9083; Julian et al., (1992) J. Gen Virol 73:3251-3255; y Goud et al., (1983) Virology 163:251-254); o el acoplamiento de ligandos de la superficie de la célula a las proteínas env virales (Neda et al.,(1991) J. Biol. Chem. 266:14143-14146). El acoplamiento puede estar en forma de la reticulación química con una proteína u otra variedad (p. ej. lactosa para convertir la proteína env en una asialoglicoproteína) así como generando proteínas de fusión (p. ej. anticuerpo de cadena sencilla/proteínas de fusión env). Esta técnica, aun cuando es útil para limitar o dirigir de otro modo la infección a determinados tipos de tejido, también puede utilizarse para convertir un vector ecotrópico en un vector anfotrópico.
- Otros sistemas de vectores virales que se pueden utilizar para suministrar polinucleótidos se han derivado de virus herpes, p. ej. virus Herpes simplex (patente de EE.UU. Nº 5.631.236 de Woo et al., expedida el 20 de mayo de 1997 y documento WO 00/08191 por Neurovex), virus vacuna (Ridgeway (1988) Ridgeway, "Mammalian expression vectors," En: Rodriguez R L, Denhardt D T, comp. Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses. Stoneham: Butterworth,; Baichwal y Sugden (1986) "Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes," En: Kucherlapati R, comp. Gene transfer. Nueva York: Plenum Press; Coupar et al. (1988) Gene, 68:1-10), y varios virus de ARN. Virus de este tipo incluyen un alfavirus, un virus de la viruela, un arenavirus, un virus vacuna, un virus vacuna, un virus de la polio y similares. Ofrecen varias características atractivas para diversas células de mamíferos (Friedmann (1989) Science, 244:1275-1281; Ridgeway, 1988, supra; Baichwal y Sugden, 1986, supra; Coupar et al., 1988; Horwitz et al. (1990) J. Virol., 64:642-650).
- La expresión de una proteína, p. ej. una proteína seleccionada del grupo que consiste en NPT1, PNC1, NMA1 y NMA2 o una variante biológicamente activa de la misma en células de un sujeto a quien, p. ej., se administró un ácido nucleico que codifica la proteína, se puede determinar, p. ej., obteniendo una muestra de las células del paciente y determinando el nivel de la proteína en la muestra con relación a una muestra testigo.
- Una proteína o variante biológicamente activa de la misma se puede administrar al sujeto de modo que alcance a las células diana y atraviese la membrana celular. Es posible sintetizar polipéptidos en procariotas o eucariotas o en células de los mismos y purificarlos de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, polipéptidos recombinantes se pueden sintetizar en células humanas, células de ratón, células de rata, células de insectos, células de levaduras y células vegetales. Polipéptidos también se pueden sintetizar en extractos exentos de células, p. ej. lisados de reticulocitos o extractos del germe de trigo. La purificación de proteínas se puede hacer por diversos métodos, p. ej. métodos cromatográficos (véase, p. ej. Robert K Scopes "Protein Purification: Principles and Practice" Tercera ed. Springer-Verlag, N.Y. 1994). Los polipéptidos se pueden producir como un polipéptido de fusión que comprende una etiqueta epítopo que consiste en aproximadamente seis residuos histidina consecutivos. Polipéptidos de fusión se pueden purificar en una columna de Ni⁺⁺. Al insertar un sitio proteasa entre la etiqueta y el polipéptido, la etiqueta puede ser separada después de la purificación del péptido en la columna de Ni⁺⁺. Estos métodos son bien conocidos en la técnica y vectores comerciales y matrices de afinidad están disponibles en el comercio.
- Los polipéptidos se pueden administrar mezclándolos con liposomas, según se describe arriba. La superficie de los liposomas se puede modificar añadiendo moléculas que dirigirán el liposoma a la localización fisiológica deseada. Una proteína se puede modificar de modo que se aumente su tasa de atravesar la membrana celular. Esto se puede hacer fusionando un polipéptido a un segundo péptido que fomenta la "transcitosis", p. ej. la absorción del péptido por parte de células. En algunos casos, el péptido puede ser una porción de la proteína de transactivador de VIH (TAT) tal como el fragmento correspondiente a los residuos 37-62 ó 48-60 de TAT, porciones del cual son rápidamente recogidas por la célula *in vitro* (Green y Loewenstein, (1989) Cell 55:1179-1188).
- El péptido de internalización se puede derivar de la proteína antennapedia de *Drosophila*, u homólogos de la misma. El homeodominio de 60 aminoácidos de longitud de la homeo-proteína antennapedia ha demostrado translocarse a través de las membranas biológicas y puede facilitar la translocación de polipéptidos heterólogos a los que se acople. Así, polipéptidos se pueden fusionar a un péptido que consiste en aproximadamente los aminoácidos 42-58 de antennapedia de *Drosophila* o fragmentos más cortos para la transcitosis. Véase, por ejemplo, Derossi et al. (1996) J Biol Chem 271:18188-18193; Derossi et al. (1994) J Biol Chem 269:10444-10450; y Perez et al. (1992) J Cell Sci 102:717-722.
- La cantidad de nicotinamida en una célula se puede disminuir, p. ej. inhibiendo la expresión de genes de la vía salvaje de NAD+ u otra vía que produzca nicotinamida. La inhibición de los genes se puede realizar, p. ej., tal como se describe adicionalmente en esta memoria, tal como realizando ARNi en los genes de la vía salvaje de NAD+ que producen nicotinamida. También se pueden inhibir genes que estén implicados en la síntesis de novo

de nicotinamida. Por ejemplo, se pueden regular niveles de nicotinamida en células, regulando el nivel o actividad de poli(adenosina difosfato-ribosa) polimerasa-1 (PARP). En particular, los niveles de nicotinamida se pueden reducir, reduciendo el nivel o actividad de PARP, ya que esta enzima genera nicotinamida. Los niveles de nicotinamida también se pueden disminuir en células reduciendo el nivel o actividad de glicohidrolasas (p. ej. CD38

5 humana, una ectoenzima que se expresa en la superficie de células inmunes tales como neutrófilos; gi:4502665 y Nº de acceso GenBank NP_001766) que escinden NAD en nicotinamida.

Los niveles de nicotinamida también se pueden disminuir inhibiendo la vía de síntesis de nicotinamida de novo. Genes implicados en esta vía incluyen los genes BNA en *S. cerevisie* (BNA1-6). Alternativamente, también se 10 pueden inhibir miembros de la familia de poli(adenosina difosfato-ribosa) polimerasa (PARP), p. ej. PARP-1 y PARP-γ y tankirasa para disminuir los niveles de nicotinamida.

También es posible reducir el nivel o actividad de transportadores de nicotinamida para reducir el nivel de 15 nicotinamida que se importe a las células. Por ejemplo, en levaduras, el ácido nicotínico es transportado por la proteína Tna1 (transporte de nicotinato/nicotinamida mononucleótido). Homólogos humanos de TNA1 de levaduras tienen los siguientes números de acceso GenBank gi: 9719374 y AAF97769; gi: 6912666 y NP_036566; gi: 18676562 y AB84933; gi: 12718201 y CAC28600; gi: 19263934 y AAH25312; gi: 9966811 y NP_065079; y gi:22761334 y BAC11546. Otros transportadores de nucleósidos que pueden modularse incluyen transportadores 20 de nucleósidos bacterianos y de mosca y los siguientes genes humanos que son homólogos a los mismos: gi: 8923160 y NP_060164; gi: 14336678 y AAK61212; gi: 22749231 y NP_689812; y gi: 18603939 y XP_091525.

Alternativamente, pueden disminuirse los niveles de nicotinamida o puede inactivarse la nicotinamida, p. ej., estimulando la actividad o aumentando el nivel de enzimas que metabolizan, degradan o inhiben la nicotinamida, p. ej. nicotinamida N-metil transferasa, a la que también se alude como nicotinamida metiltransferasa (NNMT; 25 EC2.1.1.1; número de registro CAS 9029-74-7). Esta enzima cataliza la reacción S-adenosil-L-metionina + nicotinamida = S-adenosil-L-homocisteína + 1-metilnicotinamida y fomenta la excreción de nicotinamida a partir de la célula (véase también, Cantoni (1951) *J. Biol. Chem.* 203:216). A la enzima humana se la alude como NNMT y su secuencia completa se puede encontrar en el número de acceso GenBank U08021 y como SEQ ID NO: 9 para la secuencia de nucleótidos y SEQ ID NO: 10 para la proteína (Aksoy et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:14835). A la 30 versión de levadura de esta enzima se la alude como NNT1 (a la que se alude también como YLR258w).

Todavía otra enzima que metaboliza nicotinamida y, con ello, reduce el nivel de nicotinamida, 1 nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPRT; E.C.2.4.2.12) Al gen humano se le alude también como factor potenciador de 35 colonias de células pre-B (PBEF1) y visfatina, y existe como dos isoformas (véase, p. ej., Samal et al. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14:1431, Rongwaux et al. (2002) *Euro. J. Immunol.* 32:3225 y Fukuhara et al. *Science* 307: 426-30 (2005); patentes de EE.UU. 5.874.399 y 6.844.163). La secuencia de la isoforma a está disponible bajo los números de acceso GenBank NM_005746, NP_005737 y U02020 y la secuencia de la isoforma b está disponible bajo los números de acceso GenBank NM_182790, NP_877591 y BC020691. Las secuencias de nucleótidos y 40 aminoácidos de la isoforma a de NAMPRT humana (NM_005746) se recogen como SEQ ID Nos: 21 y 22. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la isoforma b de NAMPRT humana (BC020691) se recogen como SEQ ID Nos: 11 y 12, respectivamente. La secuencia de un clón genómico de NAMPRT humana se proporciona en el Nº de acceso GenBank AC007032. La estructura del gen humano se describe en Ognjanovic et al. (2001) *J. Mol. Endocrinol.* 26:107. En células de levadura y humanas puede aumentarse el nivel de PNC1 u homólogo humano 45 funcional o equivalente del mismo para reducir los niveles de nicotinamida.

Otra enzima que metaboliza nicotinamida y que, con ello, puede modular p. ej., reducir el nivel de nicotinamida es 50 nicotinamida mononucleótido (NMN) adeniltransferasa en células humanas. A la enzima humana se le alude como NMNAT-1 (E.C.2.7.7.18). Se proporcionan los siguientes números de acceso GenBank para la enzima humana: NP_073624; NM_022787; AAL76934; AF459819 y NP_073624; AF314163. Una variante de este gen es NMNAT-2 (KIAA0479), cuya versión humana se puede encontrar bajo los números de acceso a GenBank NP_055854 y NM_015039 (Raffaelli et al. (2002) *Biochem Biophys Res Commun* 297:835). En células de levaduras, las enzimas equivalentes en la vía salvaje de NAD⁺ son nicotinato mononucleótido adeniltransferasa 1 y 2 (NMA1 y NMA2, respectivamente) (E.C.2.7.7.1).

Todavía otra enzima que puede incrementarse para disminuir los niveles de nicotinamida es fosforribosilpirofosfato 55 (PRPP) sintasa (PRPS), que convierte ribosa 5-fosfato en PRPP, el sustrato de NPT1. Existen varias enzimas relacionadas que tienen los siguientes números de acceso GenBank: gi: 4506127 y NP_002755 (Prps1); gi: 4506129 y NP_002756 (Prps2); gi: 20539448; gi: 4506133 y NP_002758 (proteína asociada a Prps 2); gi: 24418495 y Q14558 (proteína asociada a Prps 1); gi: 17644236 y CAD18892; gi: 2160401 y BAA05675 (isoforma 1

e Prps); y gi: 2160402 y BAA05676 (isoforma 2 de Prps).

La reducción de los niveles de nicotinamida en células también puede proporcionar otras ventajas tales como la estimulación de la reparación de la rotura de ADN. De hecho, PARP es regulada por nicotinamida (la nicotinamida regula negativamente a PARP). Así, regulando el nivel de nicotinamida en células, p. ej. tal como se describe más adelante en esta memoria, se regulará la actividad de PARP. Por consiguiente, dado que PARP está implicada en numerosas funciones celulares tales como la reparación de la rotura de ADN, la regulación de la longitud del telómero y la modificación de histonas, la modulación de los niveles de nicotinamida modulará estas actividades. Por ejemplo, la reducción de los niveles de nicotinamida en células aumentará la actividad de PARP y, con ello, potenciará adicionalmente el mecanismo de reparación de la rotura de ADN de células.

Además de aplicar los métodos descritos en esta memoria en células eucarióticas tales como células de mamíferos y células de levaduras, los métodos también se pueden aplicar a células vegetales, en base al menos al hecho de que miembros de la familia Sir2 están presentes en plantas. Por consiguiente, también se describen métodos para ampliar el período de vida de plantas y células vegetales y para hacer a las plantas y células vegetales más resistentes al estrés, p. ej. condiciones de sal excesiva. La prolongación del período de vida de células vegetales puede conseguirse, p. ej., modulando el nivel o actividad de proteínas en células vegetales que son esencialmente homólogas a las proteínas descritas en esta memoria en los sistemas de levaduras y de mamíferos aumentando el período de vida y/o la resistencia al estrés de las células. Alternativamente, el nivel de nicotinamida en células vegetales se puede reducir, en particular según se describe en esta memoria para modular su nivel en otras células eucarióticas. Ácidos nucleicos se pueden introducir en células vegetales de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, lo que sigue son genes procedentes de *Arabidopsis thalainia* que son homólogos a los genes descritos anteriormente y que pueden ser modulados para modular el flujo a través de la vía salvaje de NAD+ o los niveles de nicotinamida en células. Homólogos de levadura PNC1: gi 18401044 NP_566539.1 (una hidrolasa putativa); gi 15237256 NP_1977131; y gi 15237258 NP_197714.1. Homólogos de levadura NPT1: gi 2026021 AAM13003.1; gi 15234571 NP_195412.1; gi 25054896 AAN71931.1; y gi 15227832 NP_179923.1. Homólogos de levadura NMA1/2: gi 22327861 NP_200392.2 y gi 9758615 BAB09248.1. Homólogos de levadura NNT1 (YL285W): gi 20197178 AAC14529; gi 22325900 NP_565619.2; gi 15219438 NP_177475.1 (una proteína relacionada con tumores); gi 12324311 AA652120.1; gi:22330409 NP_683465; gi:15240506 NP_199767; gi 8778835 AAF79834.1; y gi 15231011 NP_188637. Homólogo de NNMT humana: gi 15238203 NP_196623. Homólogo de levadura QNS1 (gen situado aguas abajo de NMA1/2 en la vía salvaje de NAD+): gi:15221990 NP_175906. Homólogos de levadura BNA6: gi:18379203 NP_565259 y gi:21555686 AAM63914.

El período de vida y la resistencia al estrés en microorganismos tales como procariotas se puede aumentar en base al hecho de que miembros de la familia Sir2 también están presentes en estos organismos.

Tal como se recoge anteriormente, en los métodos descritos se puede utilizar una proteína de longitud completa, arriba descrita (p. ej. PARP, TNA1, NNMT, PBEF, NMN, NMNAT-1, PRPP y homólogos y equivalentes de estas proteínas) o un ácido nucleico que codifica las mismas, o cualquier parte de las mismas, preferiblemente una parte biológicamente activa. Homólogos pueden ser proteínas homólogas de otras especies o proteínas o ácidos nucleicos que tienen un cierto grado o porcentaje de identidad con una proteína particular tal como se describe adicionalmente antes. También se pueden utilizar proteínas de fusión tales como las que comprenden un péptido arriba descrito o ácidos nucleicos que codifican el mismo. Las proteínas o los ácidos nucleicos se pueden poner en contacto con una célula, introducir en una célula o expresar en una célula. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una proteína se puede introducir en una célula tal como se describe arriba. Alternativamente, el nivel de una proteína o su actividad se puede aumentar en una célula. Por ejemplo, un agente que estimula la expresión del gen que codifica la proteína o un agente que aumenta la actividad de una proteína se puede poner en contacto con una célula.

NAMPRT u homólogo o equivalente de la misma o fragmento biológicamente activo (incluido en el término "variante") de la misma se puede poner en contacto con una célula. Tal como se describe en los Ejemplos, NAMPRT está presente en el suero de animales bajo determinadas condiciones y, así, se presume que actúa sobre una célula. La puesta en contacto de una célula con una cantidad eficaz de NAMPRT o una variante de la misma puede, por consiguiente, prolongar el período de vida de una célula o protegerla del estrés o inducir cualquiera de las otras actividades biológicas descritas en esta memoria. En animales, NAMPRT puede ser administrado por cualquiera de los medios convencionales para la administración de productos farmacéuticos, p. ej. según se describe adicionalmente en esta memoria.

Partes de NAMPRT biológicamente activas tales como proteínas NAMPRT o fragmentos de péptidos capaces de modular el período de vida de una célula o su resistencia al estrés; en los métodos descritos se pueden utilizar los que tengan actividad enzimática y los que sean capaces de unirse y/o activar el receptor de insulina Visfatina. Los fragmentos pueden consistir también en aproximadamente al menos 20, 50, 100, 200 ó 300 aminoácidos de cualquier isoforma. Fragmentos de proteínas NAMPRT pueden incluir aminoácidos 15 ó 32 a 491 de la isoforma a (SEQ ID NO: 22) que se piensa es la forma madura de la proteína (véase la patente de EE.UU. Nº 5.874.399), NAMPRT puede estar glicosilada, p. ej., en Asn 29 y/o Asn 396, o puede estar no glicosilada.

Una proteína NAMPRT u otra proteína extracelular descrita en esta memoria también puede modificarse con un polímero soluble en agua tal como polietilenglicol. La unión covalente de polímeros solubles en agua a proteínas se puede llevar a cabo utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica y que han sido descritas en la patente de EE.UU. Nº 4.179.937. El polipéptido modificado puede tener propiedades deseables tales como una solubilidad incrementada en disoluciones acuosas, estabilidad incrementada, mayor semivida in vivo y actividad biológica incrementada.

También se comentan en esta memoria compuestos o agentes que estimulan el nivel de expresión del gen NAMPRT o la actividad de la proteína. Inductores conocidos incluyen el mitógeno pokeweed, polisacárido (LPS), interleucina (IL)-1 β , factor de necrosis tumoral (TNF) α e IL-6 (Ognjanovic et al. (2001) J. Mol. Endocrinol. 26:107). Inductores adicionales de los niveles de expresión de NAMPRT pueden ser identificados en ensayos, utilizando la región promotora del gen, es decir, p. ej., incluida en el clon genómico arriba descrito.

3. Métodos para reducir el período de vida de una célula o para hacerla más susceptible a determinados estrés

El nivel de expresión o actividad de una proteína seleccionada del grupo que consiste en NPT1, PNC1, NMA1 y NMA2 se puede disminuir en una célula introduciendo en la célula un agente que inhiba la expresión del gen correspondiente. Un agente puede ser una molécula pequeña que actúe directa o indirectamente sobre el promotor del correspondiente gen para reducir o inhibir su transcripción. Un agente también puede ser un compuesto que inhiba la actividad biológica de la proteína. Un agente también puede ser una molécula antisentido, una molécula triplex o un ARNsi. Todavía otros agentes son ácidos nucleicos que codifican una proteína tal como un mutante negativo dominante o un anticuerpo intracelular u otra proteína que interfiera con la actividad biológica de la proteína. Métodos de este tipo son bien conocidos en la técnica.

Un método para disminuir el nivel de expresión de un gen en una célula consiste en introducir en la célula moléculas antisentido que sean complementarias a al menos una parte del gen diana o ARN. Un ácido nucleico "antisentido", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un ácido nucleico capaz de hibridarse a una parte del ARN diana, específica para la secuencia (p. ej., no-poli A), por ejemplo su región de iniciación de la traducción, en virtud de alguna complementariedad de la secuencia a una región codificante y/o no codificante. Ácidos nucleicos antisentido pueden ser oligonucleótidos que son de doble cadena o de cadena sencilla, ARN o ADN o una modificación o derivado de los mismos, que pueden ser directamente administrados de una manera controlable a una célula o que pueden ser producidos intracelularmente mediante transcripción de secuencias exógenas introducidas, en cantidades controlables, suficientes para perturbar la traducción del ARN diana.

Ácidos nucleicos antisentido pueden ser de al menos seis nucleótidos y también pueden ser oligonucleótidos (que oscilan entre 6 y aproximadamente 200 oligonucleótidos). Los oligonucleótidos pueden ser de al menos 10 nucleótidos, al menos 15 nucleótidos, al menos 100 nucleótidos o al menos 200 nucleótidos. Los oligonucleótidos pueden ser ADN o ARN o mezclas químicas o derivados o versiones modificadas de los mismos, de cadena sencilla o de cadena doble. El oligonucleótido puede estar modificado en el resto de base, resto azúcar o cadena principal fosfato. El oligonucleótido puede incluir otros grupos adjuntos tales como péptidos, o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana de la célula (véase, p. ej., Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556; Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652: publicación PCT Nº WO 88/09810, publicada el 15 de diciembre de 1988), agentes de escisión activadores de la hibridación (véase, p. ej., Krol et al., 1998, BioTechniques 6: 958-976) o agentes intercalantes (véase, p. ej., Zon, 1988, Pharm. Res. 5: 539-549).

Un oligonucleótido antisentido se puede proporcionar preferiblemente en forma de ADN de cadena sencilla. El oligonucleótido puede modificarse en cualquier posición de su estructura con constituyentes generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido pueden comprender al menos un resto base modificado que se selecciona del grupo que incluye, pero no se limita a 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantino, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-

carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metalguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-

5 N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w y 2,6-diaminopurina.

10 El oligonucleótido puede comprender al menos un resto azúcar modificado, seleccionado del grupo que incluye, pero no se limita a arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.

El oligonucleótido también puede comprender al menos una cadena principal fosfato modificada, seleccionada del grupo que consiste en un fosforotioato, un fosforoditioato, un fosforoamidotioato, un fosforoamidato, un fosforodiamidato, un metilfosfonato, un fosfotriéster de alquilo y un formacetal o análogo del mismo.

15 15 El oligonucleótido puede ser un oligonucleótido 2- α -anomérico. Un oligonucleótido α -anomérico forma híbridos de doble cadena específicos con ARN complementario, en los que, al contrario de las unidades β habituales, las cadenas discurren paralelas una con otra (Gautier et al., 1987, Nucl. Acids. Res. 15:6625-6641).

20 20 El oligonucleótido puede conjugarse a otra molécula, p. ej., un péptido, un agente reticulante activado por hibridación, un agente de transporte, un agente de escisión activado por hibridación, etc. Una molécula antisentido puede ser un "ácido nucleico peptídico" (PNA). PNA se refiere a una molécula antisentido o a un agente antigénico que comprende un oligonucleótido de al menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud enlazado a una cadena principal peptídica de residuos aminoácidos que termina en lisina. La lisina terminal confiere solubilidad a la composición. Los PNAs se unen preferentemente a ADN o ARN de cadena sencilla complementario y detienen el alargamiento del transcripto y pueden pegilarse con el fin de ampliar su período de vida en la célula.

30 30 Ácidos nucleicos antisentido pueden comprender una secuencia complementaria a al menos una parte de una especie de ARN diana. Sin embargo, puede no requerirse una complementariedad absoluta. Una secuencia "complementaria a al menos una parte de un ARN", tal como se alude en esta memoria, significa una secuencia que tiene una complementariedad suficiente para ser capaz de hibridarse con el ARN, conformando un dúplex estable; en el caso de ácidos nucleicos antisentido de doble cadena, una cadena sencilla del ADN dúplex puede, así, someterse a ensayo, o la formación triplex puede someterse a ensayo. La capacidad de hibridarse dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico antisentido. Generalmente, cuanto más largo sea el ácido nucleico hibridante, tantos más apareamientos erróneos de bases con un ARN diana puede contener y aún formar un dúplex estable (o triplex, según sea el caso). Un experto en la técnica puede determinar un grado tolerable de apareamiento erróneo utilizando procesos convencionales para determinar el punto de fusión del complejo hibridado. La cantidad de ácido nucleico antisentido, que será eficaz para inhibir la traducción de un ARN diana, puede determinarse mediante técnicas de ensayo convencionales.

40 40 Los oligonucleótidos antisentido sintetizados pueden entonces administrarse a una célula de una manera controlada. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido se pueden colocar en el entorno de crecimiento de la célula a niveles controlados en donde pueden ser recogidos por la célula. La absorción de los oligonucleótidos antisentido puede ser asistida mediante el uso de métodos bien conocidos en la técnica.

45 45 Ácidos nucleicos antisentido pueden expresarse de manera controlable intracelularmente mediante transcripción a partir de una secuencia exógena. Por ejemplo, un vector se puede introducir *in vivo* de modo que sea recogido por una célula, dentro de cuya célula el vector o una parte del mismo se transcribe, produciendo un ácido nucleico (ARN) antisentido de la invención. Un vector de este tipo contendría una secuencia que codifica el ácido nucleico antisentido. Un vector de este tipo puede permanecer siendo episomal o puede convertirse en cromosómicamente integrado, en tanto que sea transcripto para producir el ARN antisentido deseado. Dichos vectores se pueden construir por métodos de tecnología de ADN recombinante convencionales en la técnica. Los vectores pueden ser plásmidos, virales, u otros conocidos en la técnica, utilizados para la replicación y la expresión en células de mamíferos. La expresión de las secuencias que codifican los ARNs antisentido puede ser mediante cualquier promotor conocido en la técnica para actuar en una célula de interés. Promotores de este tipo pueden ser inducibles o constitutivos. Los promotores pueden ser controlables o inducibles mediante la administración de un resto exógeno con el fin de conseguir una expresión controlada del oligonucleótido antisentido. Promotores controlables de este tipo incluyen el promotor Tet. Otros promotores para células de mamíferos incluyen, pero no se limitan a: la región del promotor temprano de SV40 (Bernoist y Chambon, 1981, Nature 290:304-310), el

promotor contenido en la repetición 3' larga terminal del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al., 1980, Cell 22: 787-797), el promotor de timidina quinasa de herpes (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1441-1445), las secuencias reguladoras del gen metalotioneina (Brinster et al., 1982, Nature 296: 39-42), etc.

- 5 La terapia antisentido para una diversidad de cánceres se encuentra en fase clínica y ha sido discutida ampliamente en la bibliografía. Reed revisó la terapia antisentido dirigida en el gen Bcl-2 en tumores; la sobre-expresión, mediada por transferencia de genes, de Bcl-2 en líneas de células tumorales confirió resistencia a muchos tipos de fármacos contra el cáncer (Reed, J. C., N.C.I. (1997) 89:988-990). El potencial del desarrollo clínico de inhibidores antisentido de *ras* se discute por Cowser, L.M., Anti-Cancer Drug Design (1997) 12:359-371.
- 10 Dianas antisentido importantes adicionales incluyen leucemia (Geurtz, A.M., Anti-Cancer Drug Design (1997) 12:341-358; quinasa C-ref humana (Monia, B.P., Anti-Cancer Drug Design (1997) 12:327-339); y proteína quinasa C (McGraw et al., Anti-Cancer Drug Design (1997) 12:315-326).

15 El nivel de un ARNm o polipéptido particular en una célula se puede reducir mediante la introducción de una ribozima en la célula o ácido nucleico que la codifica. Moléculas de ribozima diseñadas para escindir catalíticamente transcritos de ARN también pueden introducirse o expresarse en células para inhibir la expresión de un gen (véase, p. ej., Sarver et al., 1990, Science 247:1222-1225 y patente de EE.UU. Nº 5.093.246). Un motivo de ribozima comúnmente utilizado es la cabeza de martillo para la cual los requisitos de secuencia del sustrato son mínimos. El diseño de la ribozima de cabeza de martillo se describe en Usman et al., Current Opin. Struct. Biol. (1996) 6:527-533. Usman discute también los usos terapéuticos de ribozimas. Las ribozimas también se pueden preparar y utilizar según se describe en Long et al., FASEB J. (1993), 7:25; Symons, Ann. Rev. Biochem. (1992) 61:641; Perrotta et al., Biochem. (1992) 31:16-17; Ojwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1992) 89:10802-10806; y en la patente de EE.UU. Nº 5.254.678. La escisión de ribozimas de ARN de VIH-I se describe en la patente de EE.UU. Nº 5.144.019; métodos para escindir ARN utilizando ribozimas se describen en la patente de EE.UU. Nº 5.116.742; y métodos para aumentar la especificidad de ribozimas se describen en la patente de EE.UU. Nº 5.225.337 y Koizumi et al., Nucleic Acid Res. (1989) 17:7059-7071. La preparación y uso de fragmentos de ribozima en una estructura de cabeza de martillo se describen también por Koizumi et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17:7059-7071. La preparación y uso de fragmentos de ribozima en una estructura de horquilla se describen por Chowrira y Burke, Nucleic Acids Res. (1992) 20:2835. Las ribozimas también se pueden preparar mediante transcripción rodante según se describe en Daubendiek y Kool, Nat Biotechnol. (1997) 15(3):273-277.

30 Otro método para disminuir o bloquear la expresión de genes es introduciendo ARNs interferentes pequeños de doble cadena (ARNsis), que median en la degradación de ARNm específico para la secuencia. La interferencia de ARN (ARNi) es el proceso de silenciamiento de genes específico para la secuencia post-transcripcional en animales y plantas, iniciado mediante ARN de doble cadena (ARNds) que es homólogo en la secuencia al gen silenciado. *In vivo*, ARNds largo se escinde mediante ribonucleasa III para generar ARNsis de 21 y 22 nucleótidos. Se ha demostrado que los dúplex de ARNsi de 21 nucleótidos suprimen específicamente la expresión de genes endógenos y heterólogos en diferentes líneas de células de mamíferos, incluidas células de riñón embrionario humano (293) y HeLa (Elbashir et al. Nature 2001; 411(6836):494-8). Por consiguiente, la traducción de un gen en una célula se puede inhibir poniendo en contacto la célula con ARNs de doble cadena cortos con una longitud de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos, de preferencia de aproximadamente 18 a 21 nucleótidos y, lo más preferiblemente, de 19 a 21 nucleótidos. Alternativamente, un vector que codifica ARNsis de este tipo o ARNs de horquilla que se metabolizan en ARNsis se puede introducir en una célula diana (véase, p. ej., McManus et al. (2002) RNA 8:842; Xia et al. (2002) Nature Biotechnology 20:1006; y Brummelkamp et al. (2002) Science 296:550).

45 Vectores que se pueden utilizar están comercialmente disponibles, p. ej. de OligoEngine bajo el nombre pSuper RNAi System™.

50 La expresión de genes también se puede reducir fijando como objetivo secuencias de desoxirribonucleótidos complementarias a la región reguladora del gen diana (es decir, el promotor y/o potenciadores del gen) para formar estructuras helicoidales triples que evitan la transcripción del gen en células diana en el cuerpo. (Véase, generalmente, Helene, C. 1991, Anticancer Drug Des., 6(6):569-84; Helene, C., et al., 1992, Ann. N.Y. Accad. Sci., 660:27-36; y Maher, L.J., 1992 Bioassays 14(12): 807-15).

55 Aptámeros de ARN se pueden introducir o expresar en una célula. Aptámeros de ARN son ligandos de ARN específicos para proteínas tales como para ARN de Tat y Rev (Good et al., 1997, Gene Therapy 4: 45-54) que pueden inhibir específicamente su traducción.

La actividad biológica de un polipéptido se puede disminuir introduciendo en la célula un mutante dominante negativo. Un polipéptido dominante mutante negativo interactuará con una molécula con la que interactúa

normalmente el polipéptido, compitiendo con ello por la molécula, pero ya que es biológicamente inactivo, inhibirá la actividad biológica del polipéptido. Se puede crear un mutante dominante negativo de una proteína, p. ej. mutando el dominio de unión al sustrato, el dominio catalítico o un dominio de localización celular del polipéptido.

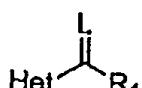
5 El polipéptido mutante se puede sobre-producir. Se realizan mutaciones puntuales que tienen un efecto de este tipo. Además, la fusión de diferentes polipéptidos de diversas longitudes al extremo de una proteína puede producir mutantes dominantes negativos. Están disponibles estrategias generales para producir mutantes dominantes negativos, véase, Herskowitz, *Nature* (1987) 329:219-222.

10 La actividad de una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en NPT1, PNC1, NMA1 y NMA2 puede disminuirse, p. ej., poniendo en contacto una célula con un compuesto que inhibe la actividad, p. ej. la actividad enzimática de una de esas proteínas. Ensayos para identificar compuestos de este tipo se describen adicionalmente en esta memoria.

15 El flujo a través de la vía salvaje de NAD⁺ en una célula se puede disminuir poniendo en contacto la célula con nicotinamida o una variante de la misma que tiene esencialmente la misma actividad biológica. Una célula se puede poner en contacto con una cantidad de nicotinamida de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 100 mM, de preferencia aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, incluso más preferiblemente 2 mM a aproximadamente 10 mM y, lo más preferiblemente, aproximadamente 5 mM. La nicotinamida está comercialmente disponible (véase, por ejemplo, la fuente proporcionada en los Ejemplos). Una célula se puede 20 poner en contacto con nicotinamida durante un tiempo suficiente para ejercer el efecto deseado. Por ejemplo, una célula se puede poner en contacto durante al menos aproximadamente 60 minutos o durante al menos aproximadamente 24 horas con nicotinamida. Una célula también puede ponerse en contacto continuamente con nicotinamida.

25 Además de nicotinamida, las células se pueden poner en contacto con análogos de la misma. Análogos de este tipo incluyen pirazinamida, que se vende como un agente antituberculoso. Los análogos se pueden identificar, p. ej., mediante rastreo de bancos combinatorios de análogos para los que tienen la actividad deseada. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo para medir el período de vida. Alternativamente, análogos de nicotinamida o agentes que interactúan con el bolsillo C de miembros de la familia Sir2 se pueden identificar mediante un diseño de 30 fármacos racional según se describe adicionalmente en esta memoria.

Análogos o derivados de nicotinamida incluyen compuestos de fórmula I:



I

35 en donde

L es O, NR, o S;

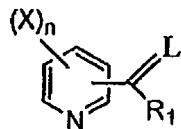
R es alquilo o fenilo;

R₁ es -NH₂, -O-alquilo, -N(R)₂ o -NH(R); y

Het es heteroarilo o heterocicloalquilo.

40 Se describen en esta memoria compuestos de fórmula I y las definiciones adjuntas, en donde L es O; compuestos de fórmula I y las definiciones adjuntas, en donde R₁ es -NH₂; compuestos de fórmula I y las definiciones adjuntas, en donde Het se selecciona del grupo que consiste en piridina, furano, oxazol, imidazol, tiazol, isoxazol, pirazol, isotiazol, piridazino, pirimidina, pirazina, pirrol, tetrahidrofuran, 1,4-dioxano, 1,3,5-trioxano, pirrolidina, piperidina y 45 piperazina; compuestos de fórmula I y las definiciones adjuntas, en donde Het es piridina; compuestos de fórmula I y las definiciones adjuntas, en donde L es O y R₁ es -NH₂; compuestos de fórmula I y las definiciones adjuntas, en donde L es O y Het es piridina; compuestos de fórmula I y las definiciones adjuntas, en donde R₁ es -NH₂ y Het es piridina; y compuestos de fórmula I y las definiciones adjuntas, en donde L es O, R₁ es -NH₂ y Het es piridina.

50 Otros análogos o derivados de nicotinamida incluyen compuestos de fórmula II:



II

en donde

L es O, NR, o S;

5 R es alquilo o fenilo;

R₁ es -NH₂, -O-alquilo, -N(R)₂ o -NH(R); yX es H, alquilo, -O-alquilo, OH, haluro o NH₂; y

n es un número entero de 1 a 4 inclusive.

- 10 También se describen compuestos de fórmula II y las definiciones adjuntas, en donde L es O; compuestos de fórmula II y las definiciones adjuntas, en donde R₁ es -NH₂; compuestos de fórmula II y las definiciones adjuntas, en donde X es H y n es 4; compuestos de fórmula II y las definiciones adjuntas, en donde L es O y R₁ es -NH₂; compuestos de fórmula II y las definiciones adjuntas, en donde L es O y X es H y n es 4; compuestos de fórmula II y las definiciones adjuntas, en donde R₁ es -NH₂, X es H y n es 4; y compuestos de fórmula II y las definiciones adjuntas, en donde L es O, R₁ es -NH₂, X es H y n es 4.

También se pueden utilizar sales farmacéuticamente aceptables y profármacos de los compuestos descritos en esta memoria.

- 20 Se pueden utilizar inhibidores de un miembro de la familia Sir2 para reducir el período de vida de las células. Inhibidores que reducen el período de vida de las células son moléculas que se unen al bolsillo C de un miembro de la familia Sir2, p. ej., nicotinamida o análogos de la misma.

- 25 Alternativamente, el aumento del nivel o actividad de enzimas que producen nicotinamida en una célula puede reducir su período de vida o hacerlas más susceptibles al estrés. Por ejemplo, se puede aumentar el nivel o actividad de enzimas implicadas en la biosíntesis de nicotinamida en la vía salvaje de NAD⁺ o en las vías de síntesis *de novo*. Enzimas se recogen arriba en la sección previa. Todavía otro método para aumentar el nivel de nicotinamida en células incluye inhibir enzimas que inactivan o degradan directa o indirectamente a nicotinamida, p. ej., nicotinamida metil transferasa en células de levaduras y humanas; nicotinamida fosforribosiltransferasa en células humanas (discutidas anteriormente) y NPT1 de levadura u homólogos humanos de la misma (también descritos arriba). En esta memoria se describen además, y también se conocen en la técnica, métodos para modular los niveles de expresión de genes o la actividad de proteínas.

30 Inhibidores de NAMPRT incluyen FK866 (Hasmann y Schemainda, Cancer Research, 63:7436-7442, 2003) y compuestos descritos en el documento WO 97/48397 y en el documento WO 03/080054.

- 35 Niveles de nicotinamida se pueden aumentar en células aumentando el nivel o la actividad de glicohidrolasas que escinden NAD en nicotinamida. También es posible aumentar el nivel o actividad de transportadores de nicotinamida para aumentar el nivel de nicotinamida en las células.
- 40 La disminución del período de vida de células o su resistencia al estrés también se puede conseguir en células vegetales y microorganismos, modulando genes de plantas que corresponden a los genes arriba descritos. Estos genes han sido descritos en la sección previa.

45 4. Métodos para identificar agentes que modulan el flujo a través de la vía salvaje de NAD⁺ o el nivel de nicotinamida en células

- 50 Agentes que modulan el flujo a través de la vía salvaje de NAD⁺ o el nivel de nicotinamida en células pueden incluir moléculas pequeñas, p. ej. moléculas orgánicas pequeñas, o cualesquiera macromoléculas biológicas, p. ej. ácido nucleico tal como ADN o ARN, de cadena sencilla o de doble cadena; una proteína o péptido, un polisacárido, un lípido o combinaciones moleculares de los mismos.

Un compuesto que modula el período de vida de una célula o su resistencia a determinados tipos de estrés se puede identificar (i) poniendo en contacto una proteína seleccionada del grupo que consiste en NPT1, PNC1,

NMA1 y NMA2 con un compuesto de ensayo durante un período de tiempo que será suficiente para afectar a la actividad de la proteína; y (ii) determinar la actividad de la enzima, en donde una diferencia en la actividad de la enzima en presencia del compuesto de ensayo con relación a la ausencia del compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo es un compuesto que modula el período de vida de la célula. El método puede comprender, 5 además, poner en contacto una célula con el compuesto de ensayo y determinar si se ha modulado el período de vida de la célula. Alternativamente, el método puede comprender, además, poner en contacto una célula con el compuesto de ensayo y determinar si se ha modulado la resistencia de la célula a determinados estrés, p. ej. choque térmico, estrés osmótico, alta temperatura, restricción de calorías, agentes lesivos de ADN (p. ej., U. V. y 10 el mutágeno mitocondrial bromuro de etidio), condiciones inapropiadas de nitrógeno. La determinación de la actividad de la enzima se puede realizar según se describe adicionalmente en esta memoria. También puede consistir en medir el efecto de los compuestos de ensayo sobre el período de vida de una célula o sobre su resistencia al estrés, p. ej., choque térmico, estrés osmótico, etc.

Como se comprenderá por parte de una persona experta en la técnica, el ensayo anterior también se puede realizar con un parte biológicamente activa o variante de una de las proteínas arriba descritas tales como las arriba 15 descritas. Por ejemplo, una parte de una proteína puede consistir en su sitio catalítico. El sitio catalítico de NPT1 de *S. cerevisiae* y humana está localizado entre aproximadamente los aminoácidos 209 y 240. El sitio catalítico de PNC1 de *S. cerevisiae* está localizado en aproximadamente los aminoácidos 150-186. El sitio catalítico de NMNAT humana (homólogo de NMA1 y NMA2) está localizado en aproximadamente los aminoácidos 100-110 y 280-310 20 (ambas secuencias contribuyen al sitio activo).

La identificación de un compuesto que modula el período de vida de una célula o su resistencia a determinados tipos de estrés puede comprender (i) poner en contacto una célula o un lisado que comprende un ácido nucleico regulador transcripcional de un gen seleccionado del grupo que consiste en NPT1, PNC1, NMA1 y NMA2 25 operativamente enlazado a un gen informador, con un compuesto de ensayo durante un período de tiempo que sería suficiente para afectar al ácido nucleico regulatorio transcripcional; y (ii) determinar el nivel o actividad del gen informador, en donde una diferencia en el nivel o actividad del gen informador en presencia del compuesto de ensayo con relación a la ausencia del compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo es un compuesto que modula el período de vida de la célula o su resistencia a determinados tipos de estrés. El método puede 30 comprender, además, poner en contacto una célula con el compuesto de ensayo y determinar si se ha modulado el período de vida de la célula. El método también puede comprender, además, poner en contacto una célula con el compuesto de ensayo y determinar si se ha modulado la resistencia de la célula a determinados estrés, p. ej. choque térmico. Ácidos nucleicos reguladores transcripcionales son conocidos en la técnica o pueden fácilmente 35 aislar acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. El gen informador puede ser cualquier gen que codifica una proteína cuya expresión puede ser detectada, p. ej., mediante clasificación de células activada por fluorescencia. La célula puede ser una célula procariótica o eucariótica. El lisado puede ser un lisado completo de una célula, preparado de acuerdo con métodos conocidos en la técnica o puede ser una fracción de un lisado de la célula o una combinación de varios lisados de la célula o fracciones de lisados de la célula. Un lisado también 40 puede comprender una o más proteínas recombinantes.

40 La regulación del nivel de nicotinamida en una célula puede comprender identificar agentes que modulen una enzima que aumente o disminuya directa o indirectamente los niveles de nicotinamida en una célula. En esta memoria se describen enzimas a modo de ejemplo. Los ensayos pueden realizarse esencialmente según se describe arriba para identificar agentes que modulan la vía salvaje de NAD⁺.

45 5. Métodos para identificar inhibidores de Sir2 y miembros de la familia Sir2

Tal como se muestra en esta memoria, nicotinamida inhibe Sir2 y SRT1 humana. También se ha demostrado que 50 nicotinamida inhibe Sir2 de forma no competitiva mediante unión al bolsillo C de Sir2. Se pueden utilizar ensayos, p. ej., basados en el diseño de fármacos racional, para identificar análogos de nicotinamida que también son inhibidores de Sir2 y otros miembros de la familia Sir2 de proteínas que comprenden un bolsillo C.

Los agentes se pueden identificar por métodos descritos en esta memoria que se pueden utilizar para reducir el período de vida de células tal como para tratar afecciones que pueden beneficiarse de reducir el período de vida de 55 determinadas células. Un método de este tipo implica identificar un agente para uso como un inhibidor de un miembro de la familia Sir2 utilizando un conjunto de datos que comprenden las coordenadas tridimensionales de al menos una parte de un miembro de la familia Sir2 que comprende el bolsillo C. La estructura cristalina de un homólogo de Sir2 se describe en Min et al. (2001) Cell 105:269, y la estructura se proporciona en Protein Data Bank ID code IICI. El bolsillo C está localizado en aproximadamente los aminoácidos 70-90 y 127-167 de SIRT1

humana. El bolsillo C de Sir2 está localizado en aproximadamente los aminoácidos 250-270 y 310-350. Las coordenadas pueden comprender, además, las coordenadas de nicotinamida o un análogo de la misma. Las coordenadas tridimensionales pueden ser las de un homólogo de Sir2. Ensayos pueden comprender co-cristalizar al menos una parte de un miembro de la familia Sir2 que comprende el bolsillo C con un compuesto, p. ej., un análogo de nicotinamida. La co-cristalización puede realizarse en presencia o ausencia de NAD⁺.

5 Puede seleccionarse un agente potencial para realizar un diseño de fármaco racional con las coordenadas tridimensionales de una parte de un miembro de la familia Sir2 que comprende al menos el bolsillo C. Tal como se señala arriba, la selección se puede realizar en unión con un modelado por ordenador. El agente potencial puede 10 luego ponerse en contacto con el miembro de la familia Sir2 y se puede determinar (p. ej., medir) la actividad del miembro de la familia Sir2. Un agente potencial puede identificarse como un agente que inhibe a un miembro de la familia Sir2 cuando existe una disminución en la actividad determinada para el miembro de la familia Sir2.

15 El método puede comprender, además, preparar un cristal suplementario que contenga al menos una parte de un miembro de la familia Sir2 que comprende el bolsillo C unido al agente potencial. El cristal suplementario puede difractar de manera eficaz rayos X para la determinación de las coordenadas atómicas hasta una resolución mejor que 5,0 Angstroms, hasta una resolución igual a o mejor que 3,5 Angstroms, o hasta una resolución igual a o mejor que 3,3 Angstroms. Las coordenadas tridimensionales del cristal suplementario pueden luego determinarse 20 con análisis de reemplazamiento molecular y se selecciona un agente de segunda generación realizando un diseño racional del fármaco con coordenadas tridimensionales determinadas para el cristal suplementario. La selección se puede realizar en unión con un modelado por ordenador. El agente de segunda generación puede ser un análogo de nicotinamida.

25 Como resultará fácilmente evidente, la estructura tridimensional de un cristal suplementario se puede determinar mediante análisis de reemplazamiento molecular o dispersión anómala de múltiples longitudes de onda o reemplazamiento isomorfo múltiple. Un fármaco candidato puede luego seleccionarse realizando un diseño racional del fármaco con la estructura tridimensional determinada para el cristal suplementario, preferiblemente en unión con el modelado por ordenador. El fármaco candidato puede luego someterse a ensayo en un gran número 30 de ensayos de rastreo de fármacos utilizando metodología bioquímica convencional exemplificada en esta memoria.

35 El método puede comprender, además, poner en contacto el agente de segunda generación con un miembro de la familia Sir2 o una parte del mismo de una especie diferente y determinar (p. ej., medir) la actividad del miembro de la familia Sir2 o parte del mismo de la otra especie. Un agente potencial se puede identificar como un agente para uso como un inhibidor esencialmente específico de un miembro de la familia Sir2 de una primera especie cuando existe un cambio significativamente menor (un factor de dos o más) en la actividad del miembro de la familia Sir2 de otras especies con relación a lo observado para el miembro de la familia Sir2 de la primera especie. Preferiblemente, no se observa cambio alguno o, alternativamente, se observa un cambio mínimo (es decir, menor que 15%) en la actividad de la otra especie.

40 40 Un método asistido por ordenador para identificar un inhibidor de la actividad de un miembro de la familia Sir2 puede incluir: suministrar una aplicación de modelado por ordenador en un conjunto de coordenadas estructurales de una molécula o complejo molecular, incluyendo la molécula o complejo molecular al menos una parte de un miembro de la familia Sir2 que comprende un bolsillo C; suministrar la aplicación de modelado por ordenador con 45 un conjunto de coordenadas estructurales de una entidad química, p. ej., un análogo de nicotinamida; y determinar si la entidad química es un inhibidor del que se espera que se una a o interfiera con la molécula o el complejo molecular, en donde la unión a o la interferencia con la molécula o el complejo molecular es indicativa de una inhibición potencial de la actividad del miembro de la familia Sir2. La determinación de si la entidad química es un inhibidor del que se espera se una a o interfiera con la molécula o complejo molecular puede incluir realizar una operación de ajuste entre la entidad química y un bolsillo de unión de la molécula o complejo molecular, seguido de análisis por ordenador de los resultados de la operación de ajuste para cuantificar la asociación entre la entidad química y el bolsillo de unión. El método puede incluir, además, rastrear un banco de entidades químicas. El método puede también incluir, además, suministrar o sintetizar el inhibidor potencial, sometiéndolo luego a ensayo el 50 inhibidor potencial para determinar si inhibe la actividad de un miembro de la familia Sir2.

55 55 Un método para producir un inhibidor de un miembro de la familia Sir2 puede incluir sintetizar química o enzimáticamente una entidad química para proporcionar un inhibidor de la actividad de un miembro de la familia Sir2, habiendo sido diseñada la entidad química durante un proceso asistido por ordenador, p. ej. tal como se describe arriba.

Se describe también un aparato que comprende una representación de un complejo entre un miembro de la familia Sir2 y nicotinamida o análogo de la misma. Un aparato de este tipo es un ordenador que comprende la representación del complejo en una memoria del ordenador. El ordenador puede comprender un medio de almacenamiento de datos legible por la máquina que contiene un material de almacenamiento de datos que es codificado con los datos legibles por la máquina que comprende las coordenadas atómicas del complejo. El ordenador puede comprender, además, una memoria de trabajo para almacenar instrucciones para procesar los datos legibles por la máquina, una unidad de procesamiento central acoplada tanto a la memoria de trabajo como al medio de almacenamiento de datos legible por la máquina para procesar los datos legibles por la máquina en una representación tridimensional del complejo. El ordenador puede también comprender un display que está acoplado a la unidad de procesamiento central para mostrar la representación tridimensional.

6. Usos de la invención

15 Tal como se describe adicionalmente en esta memoria, el aumento del flujo a través de la vía salvaje de NAD+, p. ej. aumentando la actividad o el nivel de proteínas en la vía, o reduciendo los niveles de nicotinamida, mimetiza la restricción de calorías y, con ello, fomenta la supervivencia de las células y la salud en células y organismos.

20 El aumento del flujo a través de la vía salvaje de NAD+ o la disminución de los niveles de nicotinamida se pueden utilizar para aumentar el período de vida de las células y proteger a las células frente a al menos determinados estrés *in vitro*. Por ejemplo, células en cultivo se pueden tratar según se describe en esta memoria tal como para mantenerlas proliferando durante más tiempo. Esto es particularmente útil para cultivos de células primarias (es decir, células obtenidas de un organismo, p. ej. un ser humano) que se sabe tienen sólo un período de vida limitado en cultivo. El tratamiento de este tipo de células, p. ej., integrando una o más copias adicionales de uno o 25 más genes seleccionados del grupo que consiste en NPT1, PNC1, NMA1, NMA2, nicotinamida, N-metil transferasa (NNMT y NNT1), nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPRT) y, opcionalmente, nicotinamida mononucleótido adeniltransferasa (NMNAT, NMAT-1 y 2) humana puede resultar en el incremento del período de tiempo que las células se mantienen vivas en cultivo. Células madre (ES) embrionarias no humanas y células pluripotentes y 30 células diferenciadas de las mismas también se pueden modificar con el fin de mantener a las células o a la progenie de las mismas en cultivo durante períodos de tiempo más prolongados. Cultivos primarios de células, células ES, células pluripotentes y progenie de las mismas se pueden utilizar, p. ej., para identificar compuestos con efectos biológicos particulares sobre las células o para someter a ensayo la toxicidad de compuestos en las células (es decir, ensayos de citotoxicidad).

35 En lugar de introducir una o más copias de los genes arriba citados en una célula, una célula también se puede poner en contacto con la proteína codificada por parte de estos genes. Por ejemplo, NAMPRT o una variante de la misma se puede añadir al medio de cultivo de células desde el que interactuará con la célula y ejercerá sus actividades sobre la célula, NAMPRT puede añadirse a una concentración suficiente para inducir un efecto biológico sobre células, p. ej., a una concentración de aproximadamente 1 hasta 1000 ng/ml, de aproximadamente 40 1 a 300 ng/ml o de aproximadamente 3 a 100 ng/ml. También se pueden utilizar concentraciones de aproximadamente 10 y 100 ng/ml. NAMPRT se puede producir *in vitro*, p. ej., en un sistema de expresión bacteriano o en un sistema de transcripción y/o traducción *in vitro* o *in vivo*, p. ej. en células, de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

45 Nicotinamida ribósido o un homólogo o profármaco funcional del mismo se puede añadir al cultivo.

Células que pretenden ser preservadas durante largos períodos de tiempo se pueden tratar tal como se describe en esta memoria. Las células pueden ser células en suspensión, p. ej., células de la sangre, o tejidos u órganos. Por ejemplo, la sangre recogida de un individuo para la administración a un individuo se puede tratar de acuerdo con los métodos descritos, tal como para preservar las células de la sangre durante períodos de tiempo más largos. Otras células que se pueden tratar para ampliar su período de vida y/o protegerlas frente a determinados tipos de estrés, incluyen células para el consumo, p. ej., células procedentes de mamíferos no humanos (tal como carne) o células vegetales (tales como hortalizas).

55 Células obtenidas de un sujeto, p. ej. un ser humano u otro mamífero, se pueden tratar de acuerdo con los métodos de la invención y luego administrar al mismo o a un sujeto diferente. Por consiguiente, células o tejidos obtenidos de un donante para uso como un injerto pueden tratarse según se describe en esta memoria antes de la administración al receptor del injerto. Por ejemplo, células de la médula ósea se pueden obtener de un sujeto, tratar *ex vivo* para prolongar su período de vida y proteger las células frente a determinados tipos de estrés y luego

- 5 administrar a un receptor. Células del injerto, p. ej. de la médula ósea, pueden transfectarse con una o más copias de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en NPT1, PNC1, NMA1, NMA2, NMNAT, NNT1, NAMPRT y, opcionalmente, NMAT-1 ó 2. Un injerto se puede incubar con una disolución que comprende la proteína, p. ej., NAMPRT. El injerto puede ser un órgano, un tejido o células sueltas.
- 10 Las células se pueden calentar *in vivo* para aumentar su período de vida y/o protegerlas frente a determinados tipos de estrés. Por ejemplo, la piel se puede proteger del envejecimiento, p. ej. el desarrollo de arrugas, tratando la piel, p. ej. las células epiteliales, tal como se describe en esta memoria.
- 15 10 La piel se puede poner en contacto con una composición farmacéutica o cosmética que comprende un compuesto que es capaz de aumentar la transcripción de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en NPT1, PNC1, NMA1, NMA2, NMNAT, NNT1, NAMPRT y, opcionalmente, NMAT-1 ó 2, células de la piel se pueden poner en contacto con una composición que comprende una proteína seleccionada del grupo que consiste en NPT1, PNC1, NMA1, NMA2, NMNAT, NNT1, NAMPRT y, opcionalmente, NMAT-1 ó 2, o un ácido nucleico que codifica las mismas, y un vehículo para suministrar el ácido nucleico o la proteína a las células. Nicotinamida ribósido o un homólogo funcional o profármaco del mismo también puede estar *in vivo*.
- 20 15 Compuestos, ácidos nucleicos y proteínas también se pueden suministrar a un tejido u órgano dentro de un sujeto tal como mediante inyección, para prolongar el período de vida de las células o proteger las células frente a determinados estrés.
- 25 20 Un agente tal como una proteína NPT1, PNC1, NMA1, NMA2, NMNAT, NNT1, NAMPRT y/o NMAT-1 ó 2 o ácido nucleico o agente que aumenta el nivel de expresión o actividad de estas proteínas se puede administrar a sujetos con el fin de aumentar generalmente el período de vida de sus células, proteger sus células frente a determinados tipos de estrés, para prevenir o tratar enfermedades de envejecimiento, el proceso de envejecimiento propiamente dicho, enfermedades o afecciones asociadas con la muerte de las células, infección y agentes tóxicos. Por ejemplo, un agente puede ser ingerido por sujetos en calidad de suplementos alimentarios. Un agente puede ser un componente de un complejo mutivitamínico.
- 30 25 Todos los animales pasan típicamente a través de un período de crecimiento y maduración, seguido de un período de declive fisiológico progresivo e irreversible que termina en la muerte. El período de tiempo desde el nacimiento hasta la muerte se conoce como el período de vida de un organismo, y cada uno de los organismos tiene un período de vida medio característico. El envejecimiento es una manifestación física de los cambios que sufre el paso de tiempo según se mide por el porcentaje de período de vida medio.
- 35 30 En algunos casos, las características del envejecimiento pueden ser bastante obvias. Por ejemplo, características de seres humanos de edad incluyen las arrugas en la piel, la canosidad, calvicie y cataratas, así como hipermelanosis, osteoporosis, atrofia cortical cerebral, agotamiento linfoide, atrofia tímica, incidencia incrementada de diabetes tipo II, aterosclerosis, cáncer y enfermedad del corazón. Nehlin et al. (2000) Annals NY Acad Sci 980:176-79. Otros aspectos del envejecimiento de mamíferos incluyen la pérdida de peso, lordocifosis (curvatura anormal de la columna vertebral), ausencia de vigor, atrofia linfoide, densidad ósea disminuida, espesamiento dermal y tejido adiposo subcutáneo, capacidad disminuida de tolerar el estrés (incluido el calor o el frío, heridas, anestesia y ablación de las células precursoras hematopoyéticas), patología del hígado, atrofia de los vellos intestinales, ulceración de la piel, depósitos amiloideos y enfermedades de las articulaciones. Tyner et al. (2002), Nature 415:45-53.
- 40 35 Una observación cuidadosa revela características de envejecimiento en otros eucariotas, incluidos invertebrados. Por ejemplo, características de envejecimiento en el modelo de organismo *C. elegans* incluyen un movimiento lento, flacidez, acumulación de yema, autofluorescencia intestinal (lipofuscina), pérdida de la capacidad de ingerir alimentos o expulsar los desechos, cavidades necróticas en tejidos y aspecto de células germinales.
- 45 40 Los expertos en la técnica reconocerán que el proceso de envejecimiento se manifiesta también al nivel celular, así como en las mitocondrias. El envejecimiento celular se manifiesta en la pérdida de capacidad de multiplicación por dos, niveles incrementados de apoptosis, cambios en el fenotipo diferenciado y cambios en el metabolismo, p. ej., niveles disminuidos de síntesis y renovación de proteínas.
- 50 45 Dada la naturaleza programada del envejecimiento celular y del organismo, es posible evaluar la "edad biológica" de una célula u organismo por medio de características fenotípicas que se correlacionan con la edad. Por ejemplo, la edad biológica se puede deducir de modelos de expresión de genes, resistencia al estrés, (p. ej., estrés oxidativo

- o genotóxico), tasa de proliferación celular y las características metabólicas de células (p. ej., tasas de síntesis y renovación de proteínas, función mitocondrial, biosíntesis de ubiquinona, biosíntesis de colesterol, niveles de ATP dentro de la célula, niveles de un compuesto intermedio del ciclo de Krebs en la célula, metabolismo de la glucosa, metabolismo de ácidos nucleicos, tasas de traducción ribosomales, etc.). Tal como se utiliza en esta memoria, 5 “edad biológica” es una medida de la edad de una célula u organismo basada en las características moléculas de la célula u organismo. La edad biológica es distinta de la “edad temporal”, que se refiere a la edad de una célula u organismo según se mide en días, meses y años.
- 10 La tasa de envejecimiento de un organismo,, p. ej. un invertebrado (p. ej., un gusano o una mosca) o un vertebrado (p. ej. un roedor, p. ej. un ratón) se puede determinar mediante una diversidad de métodos, p. ej. mediante una o más de: (a) verificar el período de vida de la célula o el organismo; (b) verificar la presencia o abundancia de un transcripto génico o producto génico en la célula u organismo que tiene un modelo de expresión dependiente de la edad biológica; (c) evaluar la resistencia de la célula u organismo al estrés, p. ej., el estrés genotóxico (p. ej., etopícida, irradiación UV, exposición a un mutágeno, etcétera) u estrés oxidativo; (d) evaluar uno 15 o más parámetros metabólicos de la célula u organismo; (e) evaluar la capacidad proliferativa de la célula o un conjunto de células presentes en el organismo; y (f) evaluar el aspecto físico o el comportamiento de la célula u organismo. La evaluación de la tasa de envejecimiento puede incluir medir directamente el período de vida medio del grupo de animales (p. ej. un grupo de animales genéticamente emparentados) y comparar la media resultante con el período de vida medio de un grupo testigo de animales (p. ej. un grupo de animales que no recibió el 20 compuesto de ensayo, pero que están genéticamente emparentados con el grupo de animales que sí recibió el compuesto de ensayo). Alternativamente, la tasa de envejecimiento de un organismo se puede determinar midiendo un parámetro relacionado con la edad. Ejemplos de parámetros relacionados con la edad incluyen: aspecto, p. ej. síntomas visibles de la edad; la expresión de uno o más genes o proteínas (p. ej. genes o proteínas que tienen un modelo de expresión relacionado con la edad); resistencia al estrés oxidativo; parámetros 25 metabólicos (p. ej. síntesis o degradación de proteínas, biosíntesis de ubiquinona, biosíntesis de colesterol, niveles de ATP, metabolismo de la glucosa, metabolismo de ácidos nucleicos, tasas de traducción ribosomales, etc.); y proliferación celular (p. ej. células retinianas, células de los huesos, leucocitos, etc.).
- 30 Agentes que prolongan el período de vida de células y las protegen del estrés también pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades, p. ej. enfermedades crónicas asociadas con la muerte de la célula tal como para proteger a las células de la muerte, p. ej. enfermedades asociadas con la muerte de células neurales o la muerte de células musculares. En particular, basado al menos en el hecho de que SIRT1 protege neuronas frente a una degeneración axonal (Araki et al. (2004) Science 305:1010), los agentes se pueden utilizar para prevenir o aliviar 35 una neurodegeneración y neuropatías periféricas asociadas con quimioterapia, tal como quimioterapia de cáncer (p. ej. tratamiento con taxol o cisplatino). Enfermedades neurodegenerativas incluyen enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrópica (ALS), enfermedad de Huntington y distrofia muscular. Así, los agentes se pueden utilizar como agentes neuroprotectores. El agente se puede administrar al tejido u órgano que tiene probabilidad de sufrir la muerte de las células.
- 40 Agentes de este tipo también se pueden administrar a un sujeto que padece una lesión aguda a un órgano o tejido, p. ej. un sujeto que padece apoplejía o infarto de miocardio o un sujeto que padece lesión de la médula espinal. Los agentes también se pueden utilizar para reparar un hígado alcohólico.
- 45 Agentes que prolongan el período de vida de células y las protegen frente al estrés se pueden administrar a sujetos en los que la restricción calórica o los efectos de la misma serían beneficiosos. Sujetos pueden estar padeciendo una enfermedad de envejecimiento, p. ej. apoplejía, enfermedad del corazón, artritis, hipertensión arterial. También pueden ser administrados para tratar una enfermedad metabólica tal como resistencia a la insulina u otro síntoma o precursor de diabetes de tipo II, diabetes de II o complicaciones de la misma. Métodos pueden aumentar la sensibilidad de la insulina o disminuir los niveles de insulina en un sujeto. Un método puede comprender 50 administrar a un sujeto, tal como un sujeto que lo necesite, una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente que aumenta la actividad o el nivel de proteínas de una proteína implicada en la vía salvaje de NAD+, es decir, en la síntesis de NAD+ y la degradación de nicotinamida. Un sujeto que necesite un tratamiento de este tipo puede ser un sujeto que tenga resistencia a la insulina u otro síntoma precursor de diabetes de tipo II, que tenga diabetes de tipo II o que tenga probabilidad de desarrollar cualquiera de estas afecciones. Por ejemplo, el sujeto puede ser un 55 sujeto que tenga resistencia a la insulina, p. ej., que tenga elevados niveles circulantes de insulina y/o afecciones asociadas tales como hiperlipidemia, dislipogénesis, hipercolesterolemia, tolerancia alterada a la glucosa, elevado nivel de azúcar glucosa en sangre, otras manifestaciones de síndrome X, hipertensión, aterosclerosis y lipodistrofia.

Basado, al menos en parte, en los hechos de que NAMPRT está supra-regulada en células expuestas hipoxia y que copias extras del gen NAMPRT disparan la actividad de SIRT1, otro sujeto que puede ser tratado incluye pacientes que padecen una enfermedad cardiaca p. ej., isquemia, enfermedades cardiovasculares, infartos de miocardio, enfermedad cardiaca congestiva. Enfermedades cardiovasculares que se pueden tratar o prevenir incluyen

- 5 cardiomiopatía o miocarditis; tales como cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía metabólica, cardiomiopatía alcohólica, cardiomiopatía inducida por fármacos, cardiomiopatía isquémica y cardiomiopatía hipertensiva. También tratables o prevenibles utilizando los métodos descritos en esta memoria son trastornos ateromatosos de los vasos sanguíneos principales (enfermedad macrovascular) tal como la aorta, las arterias coronarias, las arterias carótidas, las arterias cerebrovasculares, las arterias renales, las arterias iliacas, las arterias femorales y las arterias poplíteas. Otras enfermedades vasculares que se pueden tratar o prevenir incluyen las relacionadas con las arteriolas retinales, las arteriolas glomerulares, vasa nervorum, arteriolas cardiacas y lechos capilares asociados del ojo, el riñón, el corazón y los sistemas nerviosos central y periférico. Los métodos también se pueden utilizar para aumentar los niveles de HDL en plasma de un individuo.

- 10 15 Todavía otros trastornos que se pueden tratar con activadores de sirtuinas incluyen restenosis, p. ej., después de intervención coronaria, y trastornos relacionados con un nivel anormal de colesterol de alta densidad y de baja densidad. Los métodos pueden también utilizarse para tratar o prevenir infecciones virales tales como infecciones por la influenza, herpes o virus del papiloma.

- 20 25 30 Los agentes también se pueden utilizar para ayudar o prevenir la propagación de la enfermedad/infección de un individuo o nivel de población, p. ej. durante un brote de SARS o de influenza.

Basado en al menos el hecho de que SIRT1 desacetila y regula NF- κ B, los métodos descritos en esta memoria se pueden utilizar para tratar afecciones inflamatorias tales como artritis, enfermedad de Crohn, enfermedad del intestino inflamatorio, artritis reumatoide, asma, aterosclerosis, enfermedad coronaria del corazón, lesión por reperfusión procedente de ataque al corazón o apoplejía, colitis ulcerosa y enfermedad inflamatoria intestinal activa (IBD).

También pueden utilizarse como agentes antifúngicos.

- 35 40 45 Otras afecciones que pueden tratarse incluyen trastornos oculares, p. ej. asociados con el envejecimiento del ojo tal como cataratas, glaucoma y degeneración macular. También pueden utilizarse para el tratamiento de enfermedades, p. ej. SIDA; hepatitis fulminante; enfermedades ligadas a la degeneración del cerebro tal como la enfermedad de Creutzfeld-Jakob, retinitis pigmentosa y degeneración cerebelar; mielodisplasia tal como anemia aplásica; enfermedades isquémicas tales como infarto de miocardio y apoplejía; enfermedades hepáticas tales como hepatitis alcohólica, hepatitis B y hepatitis C; enfermedades de las articulaciones tales como osteoartritis; aterosclerosis; alopecia; lesión de la piel debida a la luz UV; liquen plano; atrofia de la piel; catarata y rechazos de injertos.

- 50 55 Basado al menos en el hecho de que las sirtuinas han demostrado estar implicadas en la movilización de las grasas, p. ej., reprimiendo PPAR- γ (Picard et al. (2004) Nature 430:921), métodos descritos en esta memoria para mimetizar la restricción de calorías también pueden utilizarse para estimular la movilización de grasas, p. ej. para tratar la obesidad y cualquier afección que resulte de la misma o para reducir el aumento de peso. Alternativamente, la estimulación del aumento de peso se puede conseguir por los métodos descritos en esta memoria que contrarrestan la restricción de calorías.

Además, los agentes descritos en esta memoria se pueden administrar a sujetos para su protección frente a o el tratamiento de exposición a agentes tóxicos, radiación o cualquier producto de contienda químico. Por ejemplo, los agentes pueden administrarse a sujetos quienes han recibido recientemente o es probable que reciban una dosis de radiación. La dosis de radiación puede recibirse como parte de un proceso relacionado con el trabajo o médico, p. ej. trabajando en una planta de energía nuclear, pilotando un avión, rayos X, escáner CAT o la administración de un colorante radiactivo para la visualización en imágenes médica; en donde el agente puede administrarse como una medida profiláctica. La exposición a la radiación puede recibirse de manera no intencionada, p. ej. como resultado de un accidente industrial, acto terrorista o acto de guerra que implique material radiactivo. En este caso, el agente puede administrarse lo antes posible después de la exposición para inhibir la apoptosis y el subsiguiente desarrollo de síndrome de radiación agudo. Los agentes descritos en esta memoria también podrían utilizarse para proteger células no cancerosas frente a los efectos de la quimioterapia, tal como para proteger neuronas en el caso de prevenir neuropatías, hemotoxicidad, toxicidad renal y toxicidad gastrointestinal debido a la quimioterapia.

Dado que la reparación del ADN también es inhibida por nicotinamida, agentes que reducen los niveles de nicotinamida en células pueden utilizarse para fomentar la reparación de ADN en las células. Por consiguiente, células expuestas a condiciones que pueden desencadenar una lesión del ADN, p. ej. radiación U.V. y bromuro de etido, se pueden proteger poniéndolas en contacto antes, durante y/o después de la exposición al agente lesivo del ADN con un agente que reduce los niveles de nicotinamida en la célula.

Los métodos descritos en esta memoria pueden aplicarse a células de levaduras. Situaciones en las que puede ser deseable prolongar el período de vida de células de levaduras y protegerlas frente a determinados tipos de estrés, incluyen cualquier proceso en el que se utilicen levaduras, p. ej. la producción de cerveza, yogurt y productos de panadería, p. ej. la elaboración de pan. El uso de levaduras con un período de vida prolongado puede resultar en utilizar menos levaduras o hacer que las levaduras sean activas durante períodos de tiempo más prolongados.

Los agentes descritos en esta memoria también se pueden utilizar para mimetizar la restricción de calorías en plantas, p. ej. para aumentar el período de vida, la resistencia al estrés y la resistencia a la apoptosis en plantas. Un agente se puede aplicar a plantas, ya sea sobre una base periódica o en tiempos de estrés, p. ej. sequía, heladas o una infestación de insectos u hongos. Las plantas se pueden modificar genéticamente para producir un agente. Las plantas y los frutos pueden tratarse con un agente antes de la recolección y el transporte para aumentar la resistencia a los deterioros durante el transporte.

Los agentes también se pueden utilizar para aumentar el período de vida, la resistencia al estrés y la resistencia a la apoptosis en insectos. En esta realización, los agentes se aplicarían a insectos útiles, p. ej. abejas y otros insectos que están implicados en la polinización de las plantas. Un agente se puede aplicar a las abejas implicadas en la producción de miel.

También se pueden utilizar dosis mayores de los agentes en calidad de un plaguicida, interfiriendo con la regulación de genes silenciados y la regulación de la apoptosis durante el desarrollo.

Un agente se puede aplicar a plantas utilizando un método conocido en la técnica que asegura que el compuesto esté biodisponible a larvas de insectos y no a las plantas.

Métodos para reducir el período de vida de una célula o hacerla más susceptible a determinados estrés, p. ej. choque térmico, radiactividad, estrés osmótico, lesión de ADN, p. ej. de U.V. y fármacos quimioterapéuticos también se describen en esta memoria. Métodos de este tipo se pueden utilizar siempre que se desee para reducir el período de vida una célula.

Métodos de este tipo pueden incluir disminuir el nivel o actividad de una proteína seleccionada del grupo que consiste en NPT1, PNC1, NMA1, NMA2, NMNAT, NNT1, NAMPRT y, opcionalmente, NMAT-1 ó 2.

Otro método descrito en esta memoria incluye aumentar el nivel de nicotinamida en la célula y/o disminuir la relación de NAD+/nicotinamida, p. ej. poniendo en contacto la célula con nicotinamida o aumentando el nivel o actividad de una enzima que estimula la biosíntesis de nicotinamida, o disminuyendo el nivel o actividad de una enzima que inhibe o degrada nicotinamida, p. ej. disminuyendo el nivel o actividad de NPT1, PNC1, NMA1, NMA2, NMNAT, NNT1, NAMPRT y, opcionalmente, NMAT-1 ó 2. Se puede desear reducir el período de vida de una célula o hacerla más susceptible a determinados estrés durante situaciones tales como el tratamiento de cáncer, enfermedades autoinmunes o cualquier otra situación en la que sea deseable eliminar células en un sujeto.

Nicotinamida u otros compuestos o agentes descritos en esta memoria se pueden administrar directamente a la zona que contiene las células indeseables, p. ej. en un tumor tal como en un paciente de cáncer. Estos métodos también pueden utilizarse para eliminar células o prevenir una proliferación adicional de células indeseables de tumores no malignos, p. ej. verrugas, lunares y fibromas. Por ejemplo, nicotinamida se puede inyectar en una verruga o, alternativamente, se puede incluir en una composición farmacéutica para su aplicación sobre la verruga.

Los métodos pueden también utilizarse para hacer a células tumorales más sensibles a agentes que se basan en matarlas, p. ej. fármacos quimioterapéuticos.

Métodos para disminuir el período de vida de células o aumentar su susceptibilidad a determinados estrés se pueden aplicar a levaduras, p. ej. levaduras que infecten a sujetos. Por consiguiente, una composición que comprende un agente, p. ej. nicotinamida, se puede aplicar a la localización de la infección por levaduras.

Sujetos que se pueden tratar según se describe en esta memoria incluyen eucariotas tales como mamíferos, p. ej. seres humanos, ganado ovino, ganado bovino, ganado equino, porcino, caninos, felinos, primates no humanos, ratones y ratas. Células que pueden tratarse incluyen células eucarióticas, p. ej., de un sujeto descrito

anteriormente, o células vegetales, células de levaduras y células procarióticas, p. ej. células bacterianas.

- También se describen en esta memoria métodos diagnósticos, p. ej. métodos para determinar la salud general de un sujeto. Basado, al menos en parte, en el hecho de que la expresión de los genes descritos en esta memoria se eleva en sujetos que están en ayunas y en células sometidas a diversos estrés, la medición del nivel de la expresión génica puede ser indicativo de si un sujeto está o ha sido expuesto a estrés o es probable que desarrolle una enfermedad asociada con el estrés o cualquiera de las enfermedades descritas en esta memoria. Además, basado, al menos en parte, en el hecho de que NAMPRT se produce en respuesta al estrés celular, el nivel de NAMPRT puede ser un marcador temprano para el cáncer. Por ejemplo, un método diagnóstico puede comprender proporcionar una muestra de un sujeto y determinar el nivel de la expresión génica tal como el nivel de proteínas de una o más de NPT1, PNC1, NMA1, NMA2, NMNAT, NNT1, NAMPRT, NMNAT, NMAT-1 y NMAT-2. Un nivel mayor de expresión génica en una célula o nivel de la proteína en el suero con relación a un testigo es indicativo de que el sujeto sometido a ensayo está o ha sido expuesto a estrés o a una enfermedad relacionada con el mismo tal como las enfermedades descritas en esta memoria. Un control puede ser un valor que representa un nivel medio obtenido de dos o más individuos que se piensa que se encuentran bajo cualesquier condiciones que elevarían o disminuirían el factor particular que se evalúa en el diagnóstico. Un valor control puede ser un valor medio obtenido de 10 o más o de 100 o más individuos. Una diferencia de un factor de al menos aproximadamente 50%, doble, triple, quíntuple, décuple o más puede ser significativo.
- Un ensayo diagnóstico puede comprender obtener una muestra de un fluido corporal, p. ej. sangre o suero, si la proteína a medir existe en forma extracelular soluble, p. ej. NAMPRT. Un ensayo diagnóstico puede comprender también obtener una muestra de una célula y determinar el nivel del transcripto génico, p. ej. ARNm o proteína. La muestra de células puede ser una muestra de células de la sangre, p. ej. células mononucleares de la sangre periférica, células de la piel o células de folículos capilares, frotis de las mejillas, biopsias de tejidos y lpectomías. Métodos para determinar niveles de proteínas o de transcriptos son bien conocidos en la técnica. Métodos para determinar los niveles de proteínas pueden implicar, p. ej., el uso de anticuerpos.
- También se pueden utilizar métodos de diagnóstico para determinar la presencia o probabilidad de desarrollo de una enfermedad o trastorno particular, p. ej. los descritos en esta memoria. Además, los métodos de diagnóstico descritos en esta memoria se pueden utilizar para identificar individuos que han estado o están sometidos a condiciones de estrés, p. ej. como resultado de irradiación.
- Un método de diagnóstico también se puede utilizar para identificar individuos que pueden ser más sensibles a condiciones de estrés con relación a otros individuos. Un método de diagnóstico de este tipo puede implicar exponer a un sujeto a una condición de estrés y evaluar la característica del sujeto antes y después de la exposición a la condición de estrés. La característica puede ser el nivel o la actividad de una proteína descrita en esta memoria, p. ej. NAMPRT, o el nivel de NAD+/NADH o nicotinamida.
- Un sujeto a quien se han diagnosticado niveles elevados de una o más de NPT1, PNC1, NMA1, NMA2, NMNAT, NNT1, NAMPRT, NMNAT, NMAT-1 y NMAT-2 puede luego ser tratado de manera correspondiente, tras lo cual se puede obtener una segunda muestra y se puede someter al método diagnóstico.

7. Composiciones y métodos farmacéuticos

- Compuestos, ácidos nucleicos proteínas, células y otras composiciones se pueden administrar a un sujeto de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican una proteína o una molécula antisentido se pueden administrar a un sujeto según se describe antes, p. ej. utilizando un vector viral. Células se pueden administrar de acuerdo con métodos para administrar un injerto a un sujeto que puede ir acompañado, p. ej., de administración de un fármaco inmunosupresor, p. ej. ciclosporina A. Para principios generales en la formulación medicinal, se hace referencia al lector a Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, por G. Morstyn & W. Sheridan comps., Cambridge University Press, 1996; and Hematopoietic Stem Cell Therapy, E. D. Ball, J. Lister y P. Law, Churchill Livingstone, 2000.
- Agentes farmacéuticos para uso de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria se pueden formular de una manera convencional utilizando uno o más soportes o excipientes fisiológicamente aceptables. Así, proteínas y ácidos nucleicos descritos en esta memoria, así como compuestos o agentes que aumentan el nivel de proteína o de expresión de ácidos nucleicos descritos en esta memoria, y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables se pueden formular para la administración, por ejemplo, mediante inyección, inhalación o insuflación (ya sea a través de la boca o de la nariz) o la administración por vía oral, bucal, parenteral o rectal. El agente se puede administrar

localmente, p. ej. en el sitio en el que están presentes las células diana tal como mediante el uso de un parche.

Los agentes se pueden formular para una diversidad de cargas de administración, incluidas la administración sistémica y tópica o localizada. Técnicas y formulaciones se pueden encontrar generalmente en Remmington's

5 Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA. Para la administración sistémica se prefiere la inyección, incluida intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea. Para la inyección, los agentes se pueden formular en disoluciones líquidas, por ejemplo en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank o solución de Ringer. Además, los agentes se pueden formular en forma sólida y re-disolver o suspender inmediatamente antes del uso. También se incluyen formas liofilizadas.

10 Para la administración por vía oral, las composiciones farmacéuticas pueden adoptar la forma, por ejemplo, de comprimidos, pastillas o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (p. ej. almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetylcelulosa); cargas (p. ej. lactosa, celulosa microcristalina o hidrógeno-fosfato de calcio); lubricantes (p. ej. estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrandes (p. ej. fécula de patata o almidón-glicolato de sodio); o agentes humectantes (p. ej. lauril-sulfato de sodio). Los comprimidos se pueden revestir por métodos bien conocidos en la técnica. Preparados líquidos para la administración por vía oral pueden adoptar la forma de, por ejemplo, disoluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar en forma de un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Preparados líquidos de este tipo se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (p. ej. jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (p. ej. lecitina o acacia); vehículos no acuosos (p. ej. aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (p. ej. p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sóbico). Los preparados pueden contener también sales tampón, agentes saboreantes, colorantes y edulcorantes, según sea apropiado. Preparados para la administración por vía oral pueden formularse de manera adecuada para dar una liberación controlada del compuesto activo.

30 Agentes que se pueden oxidar y perder la actividad biológica, especialmente en una forma líquida o semisólida, se pueden preparar en una atmósfera de nitrógeno o hermética en un tipo de cápsula y/o envase de lámina que excluya el oxígeno (p. ej., Capsugel™).

35 Para la administración por inhalación, los agentes se pueden suministrar convenientemente en forma de una presentación de spray de aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador con el uso de un agente propulsor adecuado, p. ej. diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, p. ej., gelatina para uso en un inhalador o insuflador que contiene una mezcla de polvos del agente y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

40 Los agentes se pueden formular para la administración por vía parenteral mediante inyección p. ej., mediante inyección de bolo o infusión continua. Formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, p. ej. en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, con un conservante añadido. Los agentes pueden adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

45 Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en una forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, p. ej. agua apirógena estéril, antes del uso.

50 Los agentes también se pueden formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, p. ej. que contienen bases para supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

55 Además de las formulaciones descritas previamente, los agentes también se pueden formular como un preparado de depósito. Formulaciones de actuación prolongada de este tipo pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los agentes se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio de iones, o en forma de derivados escasamente solubles, por ejemplo en forma de una sal escasamente soluble. Fórmulas de liberación controlada incluyen también parches, p. ej. parches transdermales. Los parches se pueden utilizar con un aplicador sónico que hace uso de ultrasonidos en una combinación única de formas de onda para introducir moléculas de fármacos a través de la piel que

normalmente no serían suministradas de modo eficaz por vía transdermal.

Composiciones farmacéuticas (incluidos preparados cosméticos) pueden comprender de aproximadamente 0,00001 a 100% tal como de 0,001 a 10% o de 0,1% a 5% en peso de uno o más agentes descritos en esta memoria.

Un agente descrito en esta memoria se puede incorporar en una formulación tópica que contiene un soporte tópico que es generalmente adecuado para la administración tópica de fármacos y que comprende cualquier material conocido en la técnica. El soporte tópico puede seleccionarse con el fin de que proporcione la composición en la forma deseada, p. ej., en forma de un ungüento, loción, crema, microemulsión, gel, aceite, solución o similar, y puede estar constituido por un material que se produzca de forma natural o de origen sintético. El soporte seleccionado no debería afectar adversamente al agente activo ni a otros componentes de la formulación tópica. Ejemplos de soportes tópicos adecuados para uso en esta memoria incluyen agua, alcoholes y otros disolventes orgánicos no tóxicos, glicerol, aceite mineral, silicona, vaselina, lanolina, ácidos grasos, aceites vegetales, parabenos, ceras y similares.

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

Los agentes se pueden incorporar en ungüentos que generalmente son preparados semisólidos que se basan típicamente en petróleo o en otros derivados del petróleo. La base de ungüento específica a utilizar, según se apreciará por los expertos en la técnica, es una que proporcionará el suministro óptimo de fármaco y, preferiblemente, proporcionará asimismo otras características deseadas, p. ej. emoliencia o similar. Al igual que con otros soportes o vehículos, una base para ungüento debería ser inerte, estable, no irritante y no sensibilizante. Tal como se explica en Remington's, las bases para ungüentos pueden agruparse en cuatro clases: bases oleaginosas; bases emulsionables; bases en emulsión; y bases solubles en agua. Bases oleaginosas para ungüentos incluyen, por ejemplo, aceites vegetales, grasas obtenidas de animales e hidrocarburos semisólidos obtenidos a partir del petróleo. Bases emulsionables para ungüentos, también conocidas como bases absorbentes para ungüentos, contienen poco o nada de agua e incluyen, por ejemplo, sulfato de hidroxiesterina, lanolina anhidra y petróleo hidrófilo. Bases en emulsión para ungüentos son emulsiones de agua en aceite (W/O) o emulsiones de aceite en agua (O/W) e incluyen, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerilo, lanolina y ácido esteárico. Bases solubles en agua para ungüentos pueden prepararse a partir de polielenglicos (PEGs) de peso molecular variable; de nuevo se puede hacer referencia a Remington's, *supra*, para una información adicional.

Los agentes se pueden incorporar en lociones que generalmente son preparados a aplicar a la superficie de la piel sin fricción y son típicamente preparados líquidos o semilíquidos en los que partículas sólidas, incluidos el agente activo, están presentes en una base de agua o alcohol. Las lociones son habitualmente suspensiones de sólidos y pueden comprender una emulsión oleosa líquida del tipo de aceite en agua. Lociones son formulaciones preferidas para tratar grandes zonas del cuerpo debido a la facilidad de aplicación de una composición más fluida. Generalmente, es necesario que la materia insoluble en una loción esté finamente dividida. Las lociones contendrán típicamente agentes de suspensión para producir dispersiones mejores, así como compuestos útiles para localizar y mantener el agente activo en contacto con la piel, p. ej. metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio o similar. Una formulación de loción para uso en unión con el presente método puede contener propilenoglicol mezclado con un petróleo hidrófilo tal como el que se puede obtener bajo la marca registrada Aquaphor™ de Beiersdorf, Inc. (Norwalk, Conn.).

Los agentes se pueden incorporar en cremas que generalmente son emulsiones líquidas o semisólidas viscosas, ya sea de aceite en agua o de agua en aceite. Las bases para cremas son lavables con el agua y contienen una fase oleosa, un emulsionante y una fase acuosa. La fase oleosa está constituida generalmente por petróleo y un alcohol graso tal como alcohol cetílico o estearílico; la fase acuosa excede habitualmente, aunque no necesariamente, a la fase oleosa en volumen y, generalmente, contiene un humectante. El emulsionante en una formulación de crema, tal como se explica en Remington's, *supra*, es generalmente un tensioactivo no iónico, aniónico, catiónico o anfótero.

Los agentes se pueden incorporar en microemulsiones que generalmente son dispersiones termodinámicamente estables e isotrópicamente transparentes de dos líquidos inmiscibles tales como aceite y agua, estabilizados mediante una película interfacial de moléculas de tensioactivo (Encyclopedia of Pharmaceutical Technology (Nueva York: Marcel Dekker, 1992), volumen 9). Para la preparación de microemulsiones es necesario un tensioactivo (emulsionante), un co-tensioactivo (co-emulsionante) y una fase oleosa y una fase en agua.

Tensioactivos adecuados incluyen cualesquiera tensioactivos que son útiles en la preparación de emulsiones, p. ej. emulsionantes que se utilizan típicamente en la preparación de cremas. El co-tensioactivo (o "co-emulsionante") se selecciona generalmente del grupo de derivados de poliglicerol, derivados de glicerol y alcoholes grasos. Combinaciones de emulsionante/co-emulsionante preferidas se seleccionan generalmente, aunque no necesariamente, del grupo que consiste en: monoestearato de glicerilo y estearato de polioxietileno, polietilenglicol y palmitoestearato de etilenglicol; y triglicéridos caprílico y cáprico y oleoil macrogolglicéridos. La fase en agua incluye no sólo agua, sino también, típicamente, tampones, glucosa, propilenglicol, polietilenglicoles, preferiblemente polietilenglicoles de bajo peso molecular (p. ej. PEG 300 y PEG 400) y/o glicerol, y similares, mientras que la fase en aceite comprenderá generalmente, por ejemplo, ésteres de ácidos grasos, aceites vegetales modificados, aceites de silicona, mezclas de mono-, di- y tri-glicéridos, mono- y di-ésteres de PEG (p. ej. oleoil macrogolglicéridos), etc.

Los agentes se pueden incorporar en formulaciones de gel que generalmente son sistemas semisólidos que consisten en suspensiones constituidas por pequeñas partículas inorgánicas (sistemas bifásicos) o moléculas orgánicas grandes, distribuidas esencialmente de manera uniforme por todo un líquido de soporte (geles de fase única). Los geles de fase única se pueden preparar, por ejemplo, combinando el agente activo, un líquido soporte y un agente gelificante adecuado tal como tragacanto (al 2 a 5%), alginato de sodio (al 2-10%), gelatina (al 2-15%), metilcelulosa (al 3-5%), carboximetilcelulosa de sodio (al 2-5%), carbómero (al 0,3-5%) o poli(alcohol vinílico) (al 10-20%) juntos y mezclando hasta que se obtiene un producto semisólido característico. Otros agentes gelificantes adecuados incluyen metilhidroxicelulosa, polioxietileno-polioxipropileno, hidroxietilcelulosa y gelatina. A pesar de que los geles emplean comúnmente un líquido de soporte acuoso, se pueden utilizar asimismo alcoholes y aceites en calidad del líquido de soporte.

Diversos aditivos, conocidos por los expertos en la técnica, pueden incluirse en las formulaciones, p. ej. formulaciones tópicas. Ejemplos de aditivos incluyen, pero no se limitan a solubilizantes, potenciadores de la permeación de la piel, opacificantes, conservantes (p. ej., antioxidantes), agentes gelificantes, agentes tampón, tensioactivos (particularmente tensioactivos no iónicos y anfóteros), emulsionantes, emolientes, agentes espesantes, estabilizadores, humectantes, colorantes, fragancias y similares. Es particularmente preferida la inclusión de solubilizantes y/o potenciadores de la permeación de la piel junto con emulsionantes, emolientes y conservantes. Una formulación tópica óptima comprende aproximadamente: 2% en peso a 60% en peso, preferiblemente 2% en peso a 50% en peso de solubilizante y/o potenciador de la permeación de la piel; 2% en peso a 50% en peso, preferiblemente 2% en peso a 20% en peso de emulsionantes; 2% en peso a 20% en peso de emoliente y 0,01 a 0,2% en peso de conservante, constituyendo el agente activo y el soporte (p. ej., agua) el resto de la formulación.

Un potenciador de la permeación de la piel sirve para facilitar el paso de niveles terapéuticos de agente activo a través de una zona de tamaño razonable de piel no destruida. Potenciadores adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo:

ES 2 401 342 T3

Tabla 2. Cepas de levaduras utilizadas en este estudio

	Cepa	Genotipo
5	W303AR5 RAD5	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2,
	YDS878	W303 MATa., ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1., ura3-52, his3-11,15, RDNI::ADE2, RAD5, sir2:TRP1
10	YDS924	W303AR5 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, sir3:HIS3
	YDS882	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, sir4:HIS3
15	YDS1503	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, hi3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, UR93/NPT1
	YDS1504	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his 3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, sir2:TRP1, URA3/NPT1
20	YDS1505	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, sir3:HIS3, URA3/NPT1
	YDS1506	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, sir4:HIS3, URA3/NPT1
25	YDS1496	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, pDBNPT1
	YDS1494	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, sir2:TRP1, pDBNPT1
30	YDS1587	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, sir3:HIS3, pDBNPT1
	YDS1495	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, sir4:HIS3, pDBNPT1
35	YDS1572	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, LEU2/SIR2
	YDS1561	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, URA3/NPT1, LEU2/SIR2
40	YDS1595	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RAD5
	YDS1596	W303 MATa, ADE2, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RAD5
45	YDS1568	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, URA3, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5
	YDS1563	W303 MATa, ade2-1, LEU2, can1-100, trp1-1, URA3, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5
50	YDS1588	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, pSPYGL037
	YDS1589	W303MATA, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, pSPYGR010
55	YDS1590	W303 MATA, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, p306YLR328
	YDS1614	W303 MATA, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, p306YHR074
60	YDS1531	W303 MATA, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, NPT1-HA
	W303cdc25-10	W303MATA, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, cdc25-10
65	YDS1537	W303 MATA, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, cdc25-10, NPTI-HA
	YDS1611	W303 MATA, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, NPTI-GFP
70	YDS1625	W303 MATA, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, NMA1-GFP
	YDS1624	W303 MATA, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5, NMA2-GFP
75	PSY316AT	MATA ura3-53 leu2-3,112, his 3-Δ200 ade2-1,01 can1-100, ADE2-TEL V-R
	YDS1594	PSY316 MATA, ura3-53 leu2-3,112, his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100, ADE2-TEL V-R, sir2:TRP1

(continúa)

	Cepa	Genotipo
5	YDS1544	PSY316 MAT α , ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-101 can1-100, ADE2-TEL V-R, URA3/NPT1
	YDS1548	PSY316 MAT α , ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1100 ADE2-TEL V-R, (4x)URA3/NPT1
	YDS1527	PSY316 MAT α , ura3-53 leu2-3,111 his 3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, pDBNPT1
10	YDS1577	PSY316 MAT α , ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, (4x)URA3/NPT1, LEU2/SIR2
	YDS1573	PSY316 MAT α , ura3-53 leu2-3,112 his 3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, sir2::HIS3, URA3/NPT1
	YDS1591	PSY316MAT α , ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, pSPYGL037
15	YDS1592	PSY316 MAT α , ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-10 ADE2-TEL V-R, pSPYGR010
	YDS1593	PSY316 MAT α , ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade1-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, p306YLR328
	JS209	MAT α , his3Δ200, leu2Δ1, met154200, trp1Δ63, ura3-167
20	JS241	JS209 MAT α , his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167, MET15
	JS237	JS209 MAT α , his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167, RDN1::Ty-MET15
	JS218	JS237 MAT α , his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ100, trp1Δ63, ura3-167, RDN1::Ty-MET15, sir2::HIS3
	YDS1583	JS237 MAT α , his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167, RDN1::Ty-MET15, LEU2/SIR2
	YDS1522	JS237 MAT α , his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ100, trp1Δ63, ura3-167, RDN1::Ty-MET15, p2μSIR2
25	YDS1580	JS237 MAT α , his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167, RDN1::Ty-MET15, npt1Δ::kan'
	YDS1581	JS237 MAT α , his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167, RDN1::Ty-MET15, URA3/NPT1
30	YDS1493	JS237MAT α , his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167, RDN1: Ty-MET15, pDBNPT1

Copias adicionales de *NPT1* se integraron en el locus *URA3* utilizando el plásmido pSPNPT1 linearizado con *StuI*. Los integrantes se identificaron primero mediante PCR. Después se determinó el número de copias de *NPT1* mediante sondeo para ADN de *NPT1* y *ACT1* en borrones de transferencias Southern. La densidad de la banda de *NPT1* se comparó con una banda de *ACT1* utilizando el software ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Cepas que portan una copia adicional de *SIR2* se generaron integrando los plásmidos p306SIR2 o p305SIR2 (17) linearizados con *XcmI*. *SIR2* en un elevado número de copias se introdujo en el plásmido basado en 2 μ , p2μSIR2 (donación de L. Pillus, UCSD). W303AR5 se transformó en prototrofia de Ura $^{+}$ y Leu $^{+}$ integrando pRS306 o pRS305 (45) linearizado con *StuI* y *XcmI*, respectivamente. YDS1595 se generó a partir de W303AR5 seleccionando una colonia que había experimentado un fenómeno de pérdida de *ADE2*. YDS1595 se transformó con pRS402 cortado con *StuI* (que porta el gen *ADE2*) para crear YDS1596. W303cdc25-10 era una donación de S. Lin (M.I.T.) (19). La cepa de delección de *NPT1*, YDS1580, se generó reemplazando el gen de tipo salvaje por el marcador *kan'* según se describe (46). La región codificadora y 650 pb aguas arriba de *PNC1/YGL037* se amplificó mediante PCR a partir de ADN genómico. El fragmento *SacI/NotI* de 1350 pb se clonó en el vector pSR400 para generar pSPYGL037. La región codificadora y 500 pb aguas arriba de *NMA2/YGR010* se amplificaron mediante PCR a partir de un molde genómico, y el fragmento *SacI/NotI* de 1730 pb se clonó en pSP400 para generar pSPYGR010. La región codificadora de *NMA1/YLR328* y 450 pb aguas arriba se amplificaron a partir del molde genómico mediante PCR y el fragmento de 2150 pb se clonó en pRS306 para generar p306YLR328. La región codificadora y 600 pb aguas arriba de *QNS1/YHR074* se amplificó mediante PCR, y el fragmento *SacI/NotI* de 2,8 kb se clonó en pSP400 para producir pSPYHR074. Copias adicionales de *PNC1/YGL037*, *NMA1/YLR328*, *NMA2/YGR010* y *QNS1/YHR074* se integraron en el locus *URA3* de W303AR5 y PSY316AT mediante transformación. Se confirmó mediante secuenciación que todo el ADN amplificado estaba exento de mutaciones.

55 *NPT1* con etiqueta HA se generó utilizando un método de integración etiqueta-*kan'* (47) en cepas W303AR5 y W303cdc25-10 (19). Una casete de proteína verde fluorescente (GFP) se introdujo en el extremo carboxi de Npt1, Nma1 y Nma2, según se describe (48). La funcionalidad de proteínas etiquetadas se confirmó ensayando el silenciamiento de ADNr.

Determinación del período de vida - La determinación del periodo de vida replicativo se realizó según se describe

(16). Las células se hicieron crecer en medio YPD (extracto de levadura al 1%, bactopeptona al 2%, glucosa al 2% p/v) a menos que se establezca de otro modo, con un mínimo de 40 células por experimento. Cada uno de los experimentos se realizó al menos dos veces de forma independiente. La importancia estadística de las diferencias del período de vida se determinó utilizando la prueba de suma de clasificación de Wilcoxon. Se establece que las diferencias son diferentes cuando la confianza es mayor que el 95%.

Determinación de ARNm y proteínas - Se realizaron transferencias Northern y Western utilizando técnicas convencionales. Los transcritos de *NPT1* se detectaron utilizando una sonda derivada del marco de lectura abierto completo del gen *NPT1*. ARNm de *ACT1* se detectó utilizando una sonda de *ACT1* de longitud completa (donación de G. Fink, M.I.T.). La etiqueta del epítopo HA se detectó utilizando el anticuerpo monoclonal HA.11 (CRP, Richmond, CA). La actina se detectó con el anticuerpo monoclonal MAB1501R (Chemicon, Temecula, CA).

Ensayos con levaduras y localización de GFP - Cepas de levaduras se hicieron crecer a 30°C a menos que se establezca de otro modo. El grado de silenciamiento del locus de ADN ribosomal se determinó utilizando dos ensayos. Para el ensayo de silenciamiento de *ADE2*, las células se hicieron crecer previamente en medio sintético completo (SC) (base nitrogenada de levaduras al 1,67%, glucosa al 2%, 40 mg/l de histidina, uridina, triptófano, adenina y leucina) durante 3 días. Las células se resuspendieron en medio SD y se diluyeron en serie 10 veces en solución salina tamponada con fosfato y se salpicaron sobre medio SC que carecía de adenina. Los ensayos de silenciamiento de *MET15* se realizaron en placas que contenían Pb²⁺ tal como se describe previamente (42). El silenciamiento telomérico se sometió a ensayo en medio SC que contenía 0,7 mg/l de adenina. Las células se hicieron crecer durante 3 días y se colocaron a 4°C durante 3 días para mejorar el color. Se realizaron ensayos de choque térmico esencialmente como se describe (14). Las cepas se hicieron crecer previamente durante una noche, en medio completo de SC con histidina limitante (20 mg/ml), se diluyeron hasta 1×10^5 células/ml en 3 ml del mismo medio y se hicieron crecer durante 5 días. Los cultivos se diluyeron 10 veces en medio expirado, se incubaron durante 1 h a 55°C y se salpicaron sobre placas de SC. Las tasas de recombinación de ADN ribosomal se determinaron como se describe previamente (49). Se examinaron al menos 10.000 colonias para cada una de las cepas y cada uno de los experimentos se realizó por triplicado.

Las determinaciones de NAD⁺ y NADH se midieron según se describe en otro lugar (50). Células que expresan fusiones de GFP se hicieron crecer hasta la fase logarítmica media en medio YPD o YPD con bajo contenido en glucosa (al 0,5% p/v) y luego se incubaron en PBS que contenía 20 µM de la cepa de ADN Hoechst 33342 (Sigma) durante 5 min. Las imágenes se capturaron bajo un aumento de 100X en un microscopio de fluorescencia Nikon E600 y se analizaron utilizando el software Photoshop 6.0

35 RESULTADOS

La dosificación incrementada de *NPT1* aumenta la longevidad pero no los niveles de NAD⁺ en estado estacionario – *SIR2* es un componente limitante de la longevidad en levaduras y requiere NAD⁺ para la catálisis. Estudios en *E. coli* han demostrado que PncB cataliza una etapa limitante de la velocidad en la vía salvaje que recicla NAD⁺ (35, 37, 38). Los autores de la invención se preguntaron si copias adicionales del homólogo *pncB* de levaduras, *NPT1*, podrían aumentar la producción de NAD⁺ para dar Sir2 y, por lo tanto, prolongar el período de vida de las levaduras. *NPT1* se integró en el locus *URA3* bajo el control de su promotor nativo. Cepas que portaban una a cuatro copias tandem de *NPT1* se identificaron luego mediante transferencia Southern. Los autores de la invención se refieren a los genotipos resultantes como 2x*PNT1* y 5x*NPT1*, respectivamente.

Para el ensayo del período de vida replicativo, las células se hicieron crecer durante al menos dos días en medio de extracto de levaduras/peptona/glucosa (YPD) de reciente aportación para asegurar que las mismas se habían recuperado por completo de las condiciones de restricción calórica antes del ensayo. Células hijas que emergieron de células madre previamente sin brotes se separaron luego mediante micromanipulación y se puntuaron. Tal como se muestra en la Fig. 1A, la cepa 2x*PNT1* vivía, por término medio, un ~ 40% más que la cepa de tipo salvaje, y la cepa 5x*NPT1* vivía un notable ~ 60% más. La prolongación del período de vida inducido por *NPT1* fue completamente abolida mediante una delección *sir2* y no mejoró significativamente mediante una copia adicional de *SIR2* (Fig. 1B), indicando que la prolongación del período de vida proporcionada por *NPT1* es mediada por Sir2.

Recientemente se ha demostrado que células de tipo salvaje que crecen en medio con bajo contenido en glucosa (al 0,5% p/v) tienen un período de vida medio significativamente mayor que las que crecen en medio de glucosa estándar (al 2%) (19, 32). Tal como se muestra en la Fig. 1C, en medio con bajo contenido en glucosa, el período de vida de la cepa 5x*NPT1* no era significativamente mayor que el de la cepa de tipo salvaje. El hecho de que el efecto de *NPT1* y el bajo contenido en glucosa no eran aditivos sugiere que estos dos regímenes actúan a través

de la misma vía.

- Estudios bioquímicos han demostrado que Sir2 requiere NAD⁺ en calidad de un cofactor. Esto ha conducido a la hipótesis de que el período de vida replicativo se puede prolongar mediante niveles incrementados de NAD⁺.
- 5 Consistente con esta idea, niveles de NAD⁺ han demostrado aumentar significativamente en células viejas, quizás como una defensa frente al envejecimiento o como el resultado de una actividad metabólica disminuida (50). Hasta la fecha, no se han reseñado los niveles intracelulares de NAD⁺ en ninguna cepa de larga vida. Los autores de la invención encontraron que los niveles de NAD⁺ en estado estacionario y las relaciones NAD⁺/NADH en la cepa 10 2xNPT1 no eran significativamente diferentes de los del tipo salvaje (Tabla 1). Los autores también examinaron las cepas Δsir2 y 2xNPT1 Δsir2 y no encontraron de nuevo diferencia alguna con el tipo salvaje, indicando que el fracaso de detectar niveles incrementados de NAD⁺ no era debido a la actividad de Sir2.

Tabla 1. Niveles de NAD⁺ y NADH en estado estacionario en diversas cepas de larga y corta vida

15	Genotipo	NAD ⁺ (mol de a/pg de proteína) ¹	NADH (mol de a/pg de proteína) ¹	Relación NAD ⁺ /NADH	ATP (mol de a/pg de proteína) ¹
20	1xNPT1 (tipo salvaje)	23,7 (3,2)	9,3 (0,8)	2,8 (0,5)	15,5 (3)
	2xNPT1	21,9 (2,0)	6,0 (0,6)	3,3 (0,3)	7,6 (1,6)
	2xNPT1 sir2::TRP1	22,5 (1,6)	7,0 (0,3)	2,4 (0,9)	5,3 (1,1)
25	sir2::TRP1	23,6 (1,2)	7,0 (0,6)	2,8 (1,2)	7,9 (1,9)

¹ media de cinco experimentos independientes (e.t.)

30 *NPT1* y *SIR2* aumentan la resistencia al choque térmico, pero no a otros estrés – Mutaciones en los componentes de la vía de insulina/IGF-1 de *C. elegans* y *Drosophila* permiten a los animales vivir hasta dos veces más tiempo que los testigos (5). En *C. elegans*, esta longevidad está ligada a la resistencia al estrés (4). En contraposición, la mutación *chico* en *Drosophila*, que prolonga el período de vida en ~ 50% en homozigotos, no protege frente al choque térmico ni al estrés oxidativo (51). No se ha examinado el enlace entre la prolongación del período de vida de *sir2.1* y la resistencia al estrés en *C. elegans*, a pesar de que existe evidencia de que en las levaduras el complejo Sir2/3/4 puede estar implicado en una respuesta de este tipo. La mutación *sir4-42* en levaduras aumenta el período de vida replicativo así como la resistencia a la inanición y al choque térmico (52). Esto eleva la posibilidad de que la vía de longevidad de *SIR2* pueda también influir sobre la resistencia al estrés.

35 Para explorar esto, los autores de la invención examinaron la capacidad de que copias extras de *NPT1* y *SIR2* confirieran resistencia a una diversidad de estrés, incluido el choque térmico, la inanición y exposición a sulfonato de metilmetano (MMS) o paraquat. MMS es un agente lesivo de ADN que provoca una diversidad de lesiones en el 40 ADN, mientras que paraquat induce el estrés oxidativo generando especies de oxígeno reactivas. Copias adicionales de *NPT1*, *SIR2*, o de ambas no proporcionaron una resistencia frente a paraquat ni MMS, ni tampoco mejoraron la capacidad de sobrevivir en fase estacionaria.

45 Para someter a ensayo la resistencia al choque térmico, cepas con una copia adicional de *NPT1* o *SIR2* se hicieron crecer hasta la fase estacionaria en medio SC, se sometieron a choque térmico durante 1 hora a 55°C y luego se salpicaron en diluciones décuples seriadas sobre placas SC. Tal como se muestra en la Fig. 2A, las cepas con una sólo copia adicional de *NPT1* o *SIR2* eran significativamente más resistentes al choque térmico que la otra cepa testigo de tipo salvaje por lo demás isogénica. No resultaba evidente efecto aditivo alguno de *NPT1* y *SIR2*, consistente con que estos dos genes actúan en la misma vía. Para proporcionar una medida más cuantitativa de 50 este fenotipo, las cepas se sometieron a choque térmico durante 1 hora, se extendieron en placas para colonias sencillas y el número de colonias se puntuó después de 24 horas como un porcentaje de la muestra no tratada. Tal como se muestra en la Fig. 2B, copias adicionales de *NPT1* y *SIR2*, o ambas proporcionaban una supervivencia ~ 8 veces mayor que el tipo salvaje, consistente con el hallazgo anterior de los autores de esta invención.

55 *NPT1* adicional aumenta el silenciamiento y la estabilidad de ADNr - Los autores de la invención desearon determinar la base molecular de la prolongación del período de vida dependiente de *SIR2* proporcionado por *NPT1* adicional. Un modelo simple predice que la dosificación incrementada de *NPT1* estimularía la vía salvaje de NAD⁺, que a su vez aumentaría la actividad de *SIR2*. Los autores de la invención examinaron así el efecto de copias adicionales de *NPT1* sobre los procesos de silenciamiento dependientes de *SIR2* y la estabilidad en el locus de

ADNr.

Para determinar el efecto de *NPT1* sobre el silenciamiento del ADNr, los autores de la invención utilizaron cepas con un marcador *ADE2* o *MET15* integrado en el locus de ADNr (*RDN1*). Utilizaron dos genes marcadores para

asegurar que los efectos que observaban no se debían simplemente a cambios en la biosíntesis de adenina o metionina. El silenciamiento de *ADE2* resulta en un crecimiento más lento de las células en medios que carecen de adenina y en la acumulación de un pigmento rojo en placas con adenina limitante. El silenciamiento de *MET15* conduce a la producción de un pigmento pardo en medio con contenido en Pb²⁺. Para fines comparativos, se incluyeron cepas con copias adicionales de *SIR2*. Las cepas 2x*NPT1* mostraban niveles mayores de silenciamiento de ADNr que la de tipo salvaje en el ensayo de *ADE2* (Fig. 3A, compara el crecimiento en adenina con el crecimiento sin adenina) y el ensayo con *MET15* (Fig. 3B). La introducción de una copia adicional de *NPT1* en la cepa 2x*SIR2* no aumentaba adicionalmente el silenciamiento, de nuevo consistente con la disposición de estos dos genes en la misma vía. Cepas que portan *SIR2* y *NPT1* en plásmidos basados en 2μ de elevado número de copias también mostraron niveles incrementados de silenciamiento de ADNr (Fig. 3B y C). Una copia adicional de *NPT1* 15 también aumentó el silenciamiento en cepas nulas *sir3* y *sir4* (Fig. 3C). *NPT1* en elevado número de copias tiene un efecto perturbador sobre el silenciamiento de ADNr en la cepa *sir3*, mientras que este efecto no se observó en la cepa *sir4*. Esto se puede explicar por el hecho de que mutantes *sir4* relocalizan Sir2 al ADNr, que puede contrarrestar los niveles de Npt1. Copias adicionales de *NPT1* en un mutante *sir2* provocaron un ligero incremento en el silenciamiento de ADNr que era considerablemente más débil que el silenciamiento dependiente de *SIR2*. La 20 base de este incremento aparente es confusa. Para determinar si esto era un efecto global sobre el silenciamiento, los autores de la invención examinaron el silenciamiento en un locus telomérico. Una copia adicional de *NPT1* se introdujo en PSY316AT, que tiene un marcador *ADE2* insertado en la región subtelomérica del cromosoma V (53). Tal como se muestra en la Fig. 3D, copias adicionales de *NPT1* aumentaron el silenciamiento telomérico de una manera dependiente de *SIR2*.

25 La inestabilidad del ADNr ha demostrado ser una causa principal del envejecimiento replicativo de las levaduras. Para testar si *NPT1* prolonga el período de vida aumentando la estabilidad en este locus, los autores de la invención determinaron la tasa de recombinación de ADNr en cepas 2x*NPT1* y 2x*SIR2*. Esto se consiguió midiendo la tasa de pérdida de un marcador *ADE2* insertado en el ADNr. Tal como se muestra en la Fig. 3E, una copia adicional de *NPT1* disminuía la recombinación de ADNr en 2 veces, de modo similar a las cepas 2x*SIR2* y 2x*NPT1* 30 2x*SIR2*. Cuando se suprimió *sir2* de la cepa 2x*NPT1*, la recombinación de ADNr aumentaba drásticamente a los niveles de una cepa nula *sir2* (Fig. 3F). Estos resultados son consistentes con un modelo en el que *NPT1* prolonga el período de vida replicativo aumentando la capacidad de Sir2 de inhibir la recombinación de ADNr.

35 Una explicación verosímil para el incremento en el silenciamiento de ADNr asociado con copias adicionales de *NPT1* es que la Sir2 telomérica en estas cepas está relocalizada en el ADNr, lo que daría como resultado la pérdida del silenciamiento telomérico. Los autores de la invención han demostrado que copias adicionales de *NPT1* aumentan el silenciamiento telomérico de una manera dependiente de *SIR2*, argumentando en contra de la 40 relocalización de Sir2 procedente de telómeros como el mecanismo de prolongación del período de vida. Otra posible explicación es que *NPT1* adicional supra-regula la expresión de Sir2. Mediante transferencia Western, los autores de la invención encontraron que los niveles en estado estacionario de Sir2 no cambiaban en respuesta a *NPT1* adicional. Una tercera posibilidad para el incremento en el silenciamiento de ADNr es que *NPT1* adicional estimula la actividad global de Sir2. A pesar de que no es actualmente posible medir esta actividad *in vivo*, esta idea es consistente con los hallazgos de los inventores de que *NPT1* adicional potencia cada uno de los procesos 45 dependientes de *SIR2* hasta ahora examinados.

50 *La restricción calórica no altera la expresión o localización de NPT1* – Dando por hecho que *NPT1* adicional y la restricción calórica parecen prolongar el período de vida a través de la misma vía, los autores de la invención testaron si la restricción calórica actúa aumentando la expresión de *NPT1*. Una etiqueta triple del epítopo de hemaglutinina (3xHA) (SEQ ID NO: 49) se añadió al extremo carboxi de *Npt1* integrando una casete de resistencia a 3HA-canamicina en el locus *NPT1* nativo (etiqueta 3xHA descrita como SEQ ID NO: 49). Los autores de la invención confirmaron que la proteína de fusión era funcional, sometiendo a ensayo su capacidad de mantener niveles de tipo salvaje de silenciamiento del ADNr. Después, los niveles de *NPT1* se determinaron en cepas hechas crecer en medio de glucosa (al 0,5%) y en la cepa *cdc25-10* de larga vida, que se considera un mimetismo genético de la restricción calórica (19). Tal como se muestra en la Fig. 4A y B, no se detectó incremento en la 55 expresión de *NPT1* al nivel de ARNm ni de la proteína. De hecho, bajo condiciones de bajo contenido en glucosa, se observó una disminución consistente de ~ 2 veces en la expresión de *NPT1*. Los autores de la invención no detectaron cambios significativos en la expresión de *NPT1* después de choque térmico y exposición a MMS o paraquat (Fig. 4C y D). Concluyeron que la restricción calórica no aumenta la longevidad supra-regulando la

expresión de *NPT1*.

Dando por hecho que la expresión de *NPT1* no se potenció en respuesta a la restricción calórica, los autores de la invención examinaron la posibilidad de que la actividad de esta proteína fuese modulada por otros medios.

- 5 Específicamente, examinaron la localización subcelular de Npt1 etiquetada con GFP en células vivas hechas crecer en medio completo o con bajo contenido en glucosa. Para su sorpresa, Npt1 fue observada por toda la célula con una concentración aparente de la proteína en el núcleo de la mayoría de las células (Fig. 4E). Las regiones amplias de exclusión corresponden a vacuolas. Estos hallazgos aumentan la posibilidad intrigante de que se regenere en el núcleo una fracción significativa de NAD⁺. En medio con bajo contenido en glucosa, el modelo de localización de Npt1-GFP estaba inalterado, indicando que no existía una localización bruta de Npt1 en respuesta a la restricción calórica.

10 Si la hipótesis de los autores de la invención de que la vía salvaje completa de NAD⁺ existe en el compartimiento nuclear, entonces sería de esperar que las otras enzimas en la vía mostraran un modelo de localización similar a Npt1. En base a la vía salvaje bacteriana, se predice que la etapa inmediatamente aguas abajo de *NPT1* es catalizada por una nicotinato mononucleótido adeniltransferasa (NaMAT). Existen dos ORFs de levaduras con una homología similar a NaMATs de otras especies, *YLR0328* e *YGR010* que los autores designan *NMA1* y *NMA2*, respectivamente. Para localizar estas dos proteínas, una casete de GFP se integró en marco delante del codón de terminación de cada uno de los ORFs para generar fusiones C-terminales. Tal como se muestra en la Fig. 4F, 20 Nma2-GFP se concentró en el núcleo en la mayoría de las células, en un modelo idéntico al del Npt1-GFP. Este hallazgo sustenta adicionalmente la hipótesis de los autores de la invención de que NAD⁺ se recicla a partir de nicotinamida por completo dentro del núcleo. El modelo de localización de Nma1 no pudo ser determinado debido a los bajos niveles de expresión.

25 *Identificación de otros genes de longevidad putativos en la vía salvaje de NAD⁺* - El descubrimiento de que Nma2 muestra una localización similar a Npt1 provocó a los autores de la invención testar si otros genes en la vía salvaje de NAD⁺ podrían tener efectos similares a Npt1 cuando eran sobre-expresados. Aunque los genes bacterianos en la vía salvaje de NAD⁺ han sido estudiados en detalle, en *S. cerevisiae* quedan por caracterizar algunos de los genes clave en la vía. *PNC1*, un gen recientemente identificado, codifica una nicotinamidasa que cataliza la 30 conversión de nicotinamida en ácido nicotínico, la etapa inmediatamente situada aguas arriba de *NPT1*. Tal como se discute anteriormente, los dos genes *NMA1* y *NMA2* codifican NaMNATs que catalizan la etapa inmediatamente aguas abajo de *NPT1*. En bacterias, la siguiente etapa en la vía, la generación de NAD⁺, es catalizada por una NAD sintetasa. Un OFR no caracterizado, *QNS1/YHR074* muestra una alta homología con las NAD sintetasas. Cada uno de estos genes de la vía salvaje se integró como una copia sencilla en el locus *URA3* de *W303AR5* y 35 *PSY316AT* y se sometió a ensayo en cuanto al silenciamiento tal como se ha descrito previamente. Copias adicionales de *PNC1*, *NMA1* o *NMA2* aumentaban el silenciamiento de ADNr y telomérico a niveles similares a los de una cepa 2x*NPT1* (Fig. 5B y C). En contraposición, copias adicionales de *QNS1* no tenían efecto alguno sobre el silenciamiento de ADNr (Fig. 5B) ni sobre el silenciamiento telomérico. Tal como se comenta más abajo, estos resultados indican que existen múltiples etapas que pueden afectar a la tasa de la vía y que los dos homólogos 40 *NMA1* y *NMA2* pueden tener funciones solapantes.

DISCUSIÓN

45 *NPT1* codifica un componente clave de la vía salvaje de levaduras que recicla NAD⁺, un cofactor de Sir2. Los autores de la invención han demostrado que copias adicionales de *NPT1* aumentan el período de vida hasta un 60% de una manera dependiente de *SIR2*. Se ha propuesto que la longevidad en levaduras puede asociarse con niveles incrementados de NAD⁺. Sin embargo, los autores han demostrado que en cepas con copias adicionales de *NPT1* los niveles de NAD⁺ en estado estacionario permanecen inalterados. Además de ello, las relaciones NAD⁺/NADH son también similares a células de tipo salvaje, indicando que el estado redox celular total no está 50 tampoco drásticamente alterado.

55 Los autores de la invención demostraron también que mutantes *sir2* tienen niveles de NAD⁺ de tipo salvaje, lo que implica que Sir2 no es un consumidor principal de NAD⁺. No obstante, en virtud de su capacidad de convertir NAD⁺ en nicotinamida, Sir2 debería ser el responsable del flujo incrementado a través de la vía salvaje (Fig. 6). Así, mientras que niveles en estado estacionario de NAD⁺ permanecen constantes, la renovación de esta molécula puede ser elevada. La localización de enzimas etiquetadas con GFP indicó que al menos dos de las enzimas en la vía salvaje de NAD⁺ están concentradas en el núcleo. Consistente con esto, Nma1 y Nma2 han demostrado, mediante rastreo doble híbrido de alto rendimiento, interactuar con Srp1, una proteína que actúa como un receptor para las secuencias de localización nucleares (NLS) (54). El mismo rastreo doble híbrido encontró también que

Nma1 y Nma2 pueden interactuar con ellas mismas y entre sí. Quizás, proteínas Nma existen en forma de dímeros, como es el caso para la NaMNAT de *Bacillus subtilis* (55), o en forma de hexámeros como es el caso para NaMNATs de *Methanococcus jannaschii* (56) y *Methanobacterium thermoautotrophicum* (57). Es digno de señalar que las cepas alteradas para *NMA1* o *NMA2* son viables (58), argumentando que son funcionalmente redundantes.

En vertebrados, la actividad de NaMNAT/NMNAT se observa principalmente en la fracción nuclear de extractos de células del hígado (59), sugiriendo que la compartimentación nuclear de la vía puede ser una propiedad universal de células eucarióticas. Teniendo a la vía salvaje en proximidad a cromatina, puede permitirse que NAD⁺ sea rápidamente regenerada para las proteínas de silenciamiento. Alternativamente, puede permitir la coordinación de una diversidad de actividades nucleares a través de la alteración de agrupaciones nucleares de NAD⁺. El ensayo de estas hipótesis no será una tarea fácil, sino que deberá ser ampliamente asistida por el desarrollo de una sonda molecular para NAD⁺ intracelular.

En levaduras y en muchos metazoos un cierto número de mutantes de larga vida exhiben resistencia al estrés incrementada. Sin embargo, existen muchos ejemplos de mutaciones que prolongan el período de vida, pero que proporcionan poca protección frente al estrés, indicando que esta relación no es directa (4). Por ejemplo, en levaduras la prolongación del período de vida proporcionada por una mutación *cdc 25-10* no va acompañada de una resistencia al choque térmico (19). Los autores de la invención han demostrado que copias adicionales de *NPT1* o *SIR2* prolongan el período de vida, pero no proporcionan protección frente a MMS, paraquat ni a la inanición. Así, en *S. cerevisiae* la longevidad no está ligada a un incremento general en la resistencia al estrés. El único fenotipo relacionado con el estrés que encontraron los autores que se correlacionaba con la longevidad era la resistencia al choque térmico. En base a análisis amplios del genoma de la expresión génica en cepas *sir2Δ* se ha propuesto que Sir2 regula genes distintos a los que se encuentran en los tres loci silenciosos (60), aunque esta interpretación es debatida (61). Si la interpretación es correcta, entonces es verosímil que la resistencia al choque térmico que observaron los autores de la invención en cepas 2x*NPT1* y 2x*SIR2* resulte del silenciamiento mediado por Sir2 de genes que suprimen la resistencia al choque térmico.

En bacterias, el homólogo de Npt1, PncB, cataliza una etapa limitadora de la velocidad en la vía salvaje de NAD⁺ (35, 37, 38). En este estudio, los autores de la invención demuestran que copias adicionales de *PNC1*, *NPT1*, *NMA1* o *NMA2* aumentan tanto el silenciamiento de ADNr y telomérico. La implicación es que, en levaduras, múltiples etapas pueden afectar a la velocidad de la vía. Una propuesta de este tipo es consistente con el análisis del control metabólico, una teoría basada en la observación de que el flujo a través de la mayoría de las vías metabólicas es controlado por múltiples enzimas más que por una sola etapa limitadora de la velocidad (62). De la totalidad de los genes en la vía salvaje, sólo QNS1 no tenía efecto alguno sobre el silenciamiento, sugiriendo que es la única enzima en la vía limitada por la disponibilidad del sustrato. Esto se debe probablemente al hecho de que el sustrato predicho para QNS1, desamido-NAD⁺, es el único intermedio que no puede suministrarse de una fuente externa a la vía salvaje (véase Fig. 6).

En levaduras y metazoos existen múltiples miembros de la familia Sir2, muchos de los cuales han demostrado (o se ha predicho) ser desacetilasas dependientes de NAD⁺ (24, 63). Este hallazgo, combinado con el hecho de que algunos miembros de la familia Sir2 son citoplásmicos (64, 65), sugiere que la acetilación reversible puede ser un mecanismo regulador mucho más prevalente que el que se pensó previamente (66). Esto colocaría a la vía salvaje de NAD⁺ en una posición pivotante, coordinando la actividad de este grupo de proteínas efectoras en respuesta al estado energético celular.

Se acepta ahora ampliamente que existen vías conservadas para la regulación de la longevidad (4, 5). El grado de esta conservación se ejemplifica por el descubrimiento de que copias adicionales de *sir-2.1* de *C. elegans* prolongan también el período de vida en ese organismo (31). Los hallazgos de los autores de la invención demuestran que varios procesos dependientes de *SIR2* pueden ser potenciados mediante la manipulación de la vía salvaje de NAD⁺ en levaduras y que esto puede ser cierto para organismos superiores. Los autores de la invención han identificado homólogos de *NPT1* en cada uno de los genomas que han examinado y todos poseen una región altamente conservada en torno a un residuo histidina que, en *Salmonella*, estimula grandemente la catálisis cuando se fosforila (67). Este modo de regulación puede permitir el diseño de mutaciones o de moléculas pequeñas que aumentan la actividad de Npt1. Juntos, los hallazgos de los autores de esta invención demuestran que Npt1 y otros miembros de la vía salvaje son dianas atractivas para moléculas pequeñas que pueden mimetizar los efectos beneficiosos de la restricción calórica.

REFERENCIAS

1. Masoro, E. J. (2000) Exp Gerontol 35(3), 299-305.

2. Vanfleteren, J. R. y Braeckman, B. P. (1999) *Neurobiol Aging* 20(5), 487-502
3. Zainal, T. A., Oberley, T. D., Allison, D. B., Szweda, L. I. y Weindruch, R. (2000) *Faseb J* 14(12), 1825-36.
4. Kenyon, C. (2001) *Cell* 105, 165-168
5. Guarente, L. y Kenyon, C. (2000) *Nature* 408(6809), 255-62.
5. Kirkwood, T. B. y Rose, M. R. (1991) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 332(1262), 15-24.
7. Barton, A. (1950) *J Gen Microbiol* 4, 84-86
8. Sinclair, D. A., Mills, K. y Guarente, L. (1997) *Science* 277(5330), 1313-6.
9. Mortimer, R. K. y Johnston, J. R. (1959) *Nature* 183, 1751-1752
10. Kennedy, B. K., Austriaco, N. R., Jr. y Guarente, L. (1994) *J Cell Biol* 127(6 Pt 2), 1985-93.
10. Kim, S., Villeponteau, B. y Jazwinski, S. M. (1996) *Biochem Biophys Res Commun* 219(2), 370-6.
12. Ashrafi, K., Lin, S. S., Manchester, J. K. y Gordon, J. I. (2000) *Genes Dev* 14(15), 1872-85.
13. Lin, S. S., Manchester, J. K. y Gordon, J. I. (2001) *J. Biol. Chem.*,
14. Longo, V. D. (1999) *Neurobiol Aging* 20(5), 479-86.
15. Jazwinski, S. M. (2001) *Mech Ageing Dev* 122(9), 865-82.
15. Sinclair, D. A. y Guarente, L. (1997) *Cell* 91(7), 1033-42.
17. Kaeberlein, M., McVey, M. y Guarente, L. (1999) *Genes Dev* 13(19), 2570-80.
18. Park, P. U., Defossez, P. A. y Guarente, L. (1999) *Mol Cell Biol* 19(5), 3848-56
19. Lin, S. J., Defossez, P. A. y Guarente, L. (2000) *Science* 289(5487), 2126-8.
20. Defossez, P. A., Prusty, R., Kaeberlein, M., Lin, S. J., Ferrigno, P., Silver, P. A., Keil, R. L. y Guarente, L. (1999) *Mol Cell* 3(4), 447-55
21. Tanner, K. G., Landry, J., Sternglanz, R. y Denu, J. M. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26), 14178-82.
22. Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M. y Guarente, L. (2000) *Nature* 403(6771), 795-800
23. Smith, J. S., Brachmann, C. B., Celic, I., Kenna, M. A., Muhammad, S., Starai, V. J., Avalos, J. L., Escalante-Semerena, J. C., Grubmeyer, C., Wolberger, C. y Boeke, J. D. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97(12), 6658-63.
25. Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S. T., Heller, R. C., Stebbins, J., Pillus, L. y Sternglanz, R. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97(11), 5807-11.
25. Laurenson, P. y Rine, J. (1992) *Microbiol Rev* 56(4), 543-60.
26. Straight, A. F., Shou, W., Dowd, G. J., Turck, C. W., Deshaies, R. J., Johnson, A. D. y Moazed, D. (1999) *Cell* 97(2), 245-56.
30. Shou, W., Seol, J. H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Chen, Z. W., Jang, J., Charbonneau, H. y Deshaies, R. J. (1999) *Cell* 97(2), 233-44.
28. Shou, W., Sakamoto, K. M., Keener, J., Morimoto, K. W., Traverso, E. E., Azzam, R., Hoppe, G. J., Feldman, R. M. R., DeModena, J., Moazed, D., Charbonneaux, H., Nomura, M. y Deshaies, R. J. (2001) *Mol. Cell.* 8(1), 45-55
35. Tanny, J. C. y Moazed, D. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(2), 415-20,
35. Smith, J. S., Caputo, E. y Boeke, J. D. (1999) *Mol Cell Biol* 19(4), 3184-97.
31. Tissenbaum, H. A. y Guarente, L. (2001) *Nature* 410(6825), 227-30.
32. Jiang, J. C., Jaruga, E., Repnevskaya, M. V. y Jazwinski, S. M. (2000) *Faseb J* 14(14), 2135-7.
33. Foster, J. W., Kinney, D. M. y Moat, A. G. (1979) *J Bacteriol* 137(3), 1165-75.
34. Ghislain, M., Talla, E. y Francois, J. M. (2002) *Yeast* 19(3), 215-224.
40. Wubbolts, M. G., Terpstra, P., van Beilen, J. B., Kingma, J., Meesters, H. A. y Witholt, B. (1990) *J Biol Chem* 265(29), 17665-72.
36. Vinitsky, A., Teng, H. y Grubmeyer, C. T. (1991) *J Bacteriol* 173(2), 536-40.
37. Imsande, J. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 85, 255-273
38. Grubmeyer, C. T., Gross, J. W. y Rajavel, M. (1999) *Methods Enzymol* 308, 28-48
45. Emanuelli, M., Carnevali, F., Lorenzi, M., Raffaelli, N., Amici, A., Ruggieri, S. y Magni, G. (1999) *FEBS Lett* 455(1-2), 13-7.
40. Hughes, K. T., Olivera, B. M. y Roth, J. R. (1988) *J Bacteriol* 170(5), 2113-20.
41. Mills, K. D., Sinclair, D. A. y Guarente, L. (1999) *Cell* 97(5), 609-20.
50. Smith, J. S. y Boeke, J. D. (1997) *Genes Dev* 11(2), 241-54.
43. Lalo, D., Carles, C., Sentenac, A. y Thuriaux, P. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(12), 5524-8.
44. Becker, D. M., Fikes, J. D. y Guarente, L. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88(5), 1968-72.
45. Sikorski, R. S. y Hieter, P. (1989) *Genetics* 122(1), 19-27.
46. Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J. y Hegemann, J. H. (1996) *Nucleic Acids Res* 24(13), 2519-24.
47. De Antoni, A. y Gallwitz, D. (2000) *Gene* 246(1-2), 179-85.
55. Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachet, A., Philippse, P. y Pringle, J. R. (1998) *Yeast* 14(10), 953-61.
49. Keil, R. L. y McWilliams, A. D. (1993) *Genetics* 135(3), 711-8.
50. Ashrafi, K., Sinclair, D., Gordon, J. I. y Guarente, L. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(16), 9100-5.

51. Clancy, D. J., Gems, D., Harshman, L. G., Oldham, S., Stocker, H., Hafen, E., Leevers, S. J. y Partridge, L. (2001) *Science* 292(5514), 104-6.
52. Kennedy, B. K. y Guarente, L. (1996) *Trends Genet* 12(9), 355-9.
53. Gottschling, D. E., Aparicio, O. M., Billington, B. L. y Zakian, V. A. (1990) *Cell* 63(4), 751-62.
- 5 54. Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. y Rothberg, J. M. (2000) *Nature* 403(6770), 623-7.
- 10 55. Olland, A. M., Underwood, K. W., Czerwinski, R. M., Lo, M. C., Aulabaugh, A., Bard, J., Stahl, M. L., Somers, W. S., Sullivan, F. X. y Chopra, R. (2002) *J Biol Chem* 277(5), 3698-707.
- 10 56. D'Angelo, I., Raffaelli, N., Dabusti, V., Lorenzi, T., Magni, G. y Rizzi, M. (2000) *Structure Fold Des* 8(9), 993-1004.
- 15 57. Saridakis, V., Christendat, D., Kimber, M. S., Dharamsi, A., Edwards, A. M. y Pai, E. F. (2001) *J Biol Chem* 276(10), 7225-32.
- 15 58. Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H., Chu, A. M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S. W., E1 Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S. H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J. H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Davis, R. W. y et al. (1999) *Science* 285(5429), 901-6.
- 20 59. Hogeboom, G. y Schneider, W. (1950) *J. Biol. Chem.* 197, 611-620.
- 20 60. Wyrick, J. J., Holstege, F. C., Jennings, E. G., Causton, H. C., Shore, D., Grunstein, M., Lander, E. S. y Young, R. A. (1999) *Nature* 402(6760), 418-21.
- 25 61. Bedalov, A., Gatbonton, T., Irvine, W. P., Gottschling, D. E. y Simon, J. A. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98(26), 15113-8.
- 25 62. Fell, D. (1997) Understanding the Control of Metabolism. *Frontiers in Metabolism* (Snell, K., comp.), Portland Press, Londres
- 25 63. Landry, J., Slama, J. T. y Stemglanz, R. (2000) *Biochem Biophys Res Commun* 278(3), 685-90.
- 25 64. Perrod, S., Cockell, M. M., Laroche, T., Renauld, H., Ducrest, A. L., Bonnard, C. y Gasser, S. M. (2001) *Embo J* 20(1-2), 197-209.
- 30 65. Afshar, G. y Murnane, J. P. (1999) *Gene* 234(1), 161-8.
- 30 66. Shore, D. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26), 14030-2.
- 30 67. Rajavel, M., Lalo, D., Gross, J. W. y Grubmeyer, C. (1998) *Biochemistry* 37(12), 4181-8.

Ejemplo Comparativo 2: Inestabilidad genómica incrementada y envejecimiento acelerado por parte de nicotinamida

35 La proteína Sir2 de *Saccharomyces cerevisiae* es una histona desacetilasa dependiente de NAD⁺ que juega un papel crítico en el silenciamiento transcripcional, la estabilidad del genoma y la longevidad. Un homólogo humano de Sir2, SIRT1, regula la actividad del supresor de tumores p53 e inhibe la apoptosis. La reacción de desacetilación de Sir2 genera dos productos: O-acetyl-ADP-ribosa y nicotinamida, un precursor de ácido nicotínico y una forma de niacina/vitamina B3. Los autores de la invención demuestran aquí que nicotinamida abole por completo el silenciamiento de levaduras y acorta el período de vida replicativo al de un mutante *sir2*. Nicotinamida, pero no ácido nicotínico, inhibe intensamente el silenciamiento en los telómeros, ADNr y loci de tipo apareante de levaduras. Nicotinamida aumenta también la inestabilidad del locus de ADNr y acorta el período de vida de las levaduras al de un mutante *sir2*. Nicotinamida abole también el silenciamiento en células paralizadas en G1, demostrando que se requiere la actividad continua de Sir2 para mantener el silenciamiento. En presencia de nicotinamida, Sir2 ya no se asocia con telómeros ni loci de tipo apareante, pero sigue asociada con el ADNr. Sir2 ya no co-inmunoprecipita con cromatina en los telómeros y en los loci de tipo apareante en presencia de nicotinamida, a pesar de que el modelo de localización de Sir2 está inalterado. Los autores de la invención demuestran que concentraciones fisiológicas de nicotinamida inhiben de forma no competitiva tanto Sir2 como SIRT1 *in vitro*. El grado de inhibición de SIRT1 por parte de nicotinamida ($IC_{50} < 50 \mu\text{M}$) es igual o mejor que el de los inhibidores conocidos más eficaces de esta clase de proteínas. Los autores de la invención proponen que nicotinamida y NAD⁺ pueden unirse simultáneamente a Sir2, previniendo la catálisis y discuten la posibilidad de que la inhibición de Sir2 por parte de nicotinamida sea fisiológicamente relevante.

40 50 55 Los autores de la invención discuten la posibilidad de que nicotinamida nuclear regule negativamente la actividad de Sir2 *in vivo*. Sus hallazgos sugieren que al uso clínico de nicotinamida se le debería otorgar una consideración cuidadosa.

PROCESOS EXPERIMENTALES

Ensayos con levaduras - Todas las cepas de levaduras utilizadas en este estudio se listan en la Tabla 3. Las células se hicieron crecer a 30°C en medio YPD (extracto de levadura al 1% bactopeptona al 2%, glucosa al 2% p/v), a menos que se establezca de otro modo. El grado de silenciamiento en el locus de ADN ribosomal se determinó haciendo crecer cepas *RDN1::MET15* en medio que contiene Pb²⁺ (peptona al 0,3%, extracto de levaduras al 0,5%, glucosa al 4%, acetato de amonio al 0,02% (p/v), Pb(NO₃)₂ al 0,07% y agar al 2%). Se realizaron ensayos de silenciamiento telomérico basados en *ADE2* y en el locus *HM* según se describe previamente (véase el Ejemplo 1). Las frecuencias de recombinación de ADN ribosomal se determinaron tal como se describe previamente (44').

10 **Tabla 3.** Cepas de levaduras utilizadas en este estudio

	Cepa	Genotipo
15	W303AR5	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i>
	YDS878	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>sir2:TRP1</i>
	YDS1572	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>LEU2/SIR2</i>
20	YDS1595	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, <i>RAD5</i>
	YDS1596	W303 MATa, <i>ADE2</i> , leu2-3,112, can1-100, <i>tip1-1</i> , ura3-52, his3-11,15, <i>RAD5</i>
	YDS1097	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, <i>RDN</i> , <i>RADS</i> , <i>GFP-Sir4::URA3</i>
	YDS1099	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, <i>RDN</i> , <i>RAD5</i> , <i>GFP-Sir3::LEU2</i>
25	YDS1109	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, <i>RDN</i> , <i>RAD5</i> , <i>GFP-Sir3::LEU2</i> , <i>sir2:TRP1</i>
	YDS1078	W303 MATa, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, <i>RDN1::ADE2</i> , <i>RAD5</i> , <i>GFP-Sir2::LEU2</i> , <i>sir2:TRP1</i>
30	PSY316AT	MATa, <i>ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R</i>
	YDS1594	PSY316 MATa, <i>ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, sir2:TRP1</i>
	YDS970	PSY316 MATΔ, <i>ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, HMR:: GFP</i>
	YDS 1005	PSY316 MATa, <i>ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 adel-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, HMR::GFP</i>
	YDS1499	PSY316 MATa, <i>ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, HMR:: GFP, sir4:HIS3</i>
35	YDS1690	PSY316 MATa, <i>ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R, HMR::GFP, Δhml::LEU2</i>
	JS209	MATa, <i>his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167</i>
	JS241	JS209 MATa, <i>his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167, Tyl-MET15</i>
	JS237	JS209 MATa, <i>his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167, RDN1::Tyl-MET15</i>
40	JS218	JS237 MATa, <i>his3Δ100, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167, RDN1::Tyl-MET15, sir2::HIS3</i>
	YDS1583	JS237 MATa, <i>his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ200, trp1Δ63, ura3-167, RDN1::Tyl-MET15, LEU2/SIR2</i>

45 La determinación del período de vida replicativo se realizó mediante una micromanipulación según se describe (25'). Se examinó un mínimo de 40 células por experimento y, cada uno de los experimentos se realizó al menos dos veces independientemente. La significancia estadística de las diferencias del período de vida se determinó utilizando la prueba de suma de clasificación de Wilcoxon. Se establece que las diferencias son significativas cuando la confianza es mayor que 95%.

50 La fluorescencia por GFP se cuantificó mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, CA) según se describe (45'). Para experimentos de detención en G1, las células se trajeron con 10 µg/ml de factor alfa durante 3 horas. El contenido en ADN se determinó mediante análisis FACS de células fijadas teñidas con yoduro de propidio (Sigma) según se describe (45'). Típicamente, por cada muestra se analizaron 20.000 células. La adquisición de datos y el análisis se realizaron utilizando el software CELLQuest (Becton Dickinson).

Microscopía de fluorescencia e inmunoprecipitación con cromatina – La fluorescencia por GFP se visualizó en células vivas hechas crecer hasta la fase logarítmica en medio sintético (SC) completo (base nitrogenada de levaduras al 1,67%, glucosa al 2%, 40 mg/litro de cada uno de histidina, uridina, triptófano, adenina y leucina). Las

imágenes se capturaron utilizando un microscopio Nikon Eclipse E600 a un aumento de 1000X y se analizaron con el software Scion Image. La inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se realizó según se describe (45') utilizando los pares de cebadores listados en la Tabla 2 (46'). Se llevaron a cabo reacciones de PCR en un volumen de 50 μ l utilizando una dilución al 1/5000 o una dilución al 1/12500 de ADN de entrada procedente de extractos de células enteras pre-aclaradas y una dilución al 1/50 de ADN inmunoprecipitado. Los parámetros de la PCR eran como sigue. Para pares de cebadores *CUP1* y *ADNr 5S* se realizaron 26 ciclos de PCR con una temperatura de hibridación de 55°C. Para los pares de cebadores *Tel 0.6*, *Tel 1.4* y *HM* se utilizaron 32 ciclos a una temperatura de hibridación de 50°C. Los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis en gel en un gel de agarosa al 2,3% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio

5
10

Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos

	Oligonucleótido	Secuencia	SEQ ID NO:
15	TEL-0,6 Dir	CAGGCAGTCCTTCTATTTC	31
	TEL-0,6 Inv	GCTTGTTAACTCTCCGACAG	32
	TEL-1,4 Dir	AATGTCTTATCAAGACCGAC	33
	TEL-1,4 Inv	TACAGTCCAGAAATCGCTCC	34
20	RDN-SS Dir	GAAAGGATTGCCCGGACAGTTG	35
	RDN-SS Inv	CTTCTCCCAGTAGCCTGTTCC	36
	HML-YA/ZL Dir	GTGGCATTACTCCACTTCAAGTAAG	37
	HML-YA/ZL Inv	CAAGAGCAAGACGATGGGG	38
	CUP1-Dir	TTTCCGCTGAACCCTCCA	39
25	CUP1-Inv	CATTGGCACTCATGACCTTC	40

Ensayos de desacetilación *in vitro* - Levaduras *Sir2p* etiquetadas con GST recombinante (donación de D. Moazed) y *SIRT1* humana recombinante (47') se sometieron a ensayo en cuanto a la actividad de desacetilasa utilizando el kit de ensayo de actividad fluorescente/descubrimiento de fármacos HDAC (AK-500, BIOMOL, Research Laboratories). Este sistema de ensayo permite la detección de una señal fluorescente tras la desacetilación de un sustrato de histona cuando se trata con revelador. La fluorescencia se midió en un lector fluorométrico (series Cytofluor II 400 PerSeptive Biosystems) con excitación establecida a 360 nm y detección de la emisión establecida a 460 nm. Las reacciones consistían en 5 μ g de GST-Sir2 o 2,5 μ g de SIRT1, se incubaron con 250 μ M de sustrato de histona acetilado, DTT 1 mM y un intervalo de concentraciones de NAD⁺ según se describe, en 50 μ l de tampón de ensayo. Reacciones con la levadura y la proteína humana se llevaron a cabo a 30°C y 37°C, respectivamente, durante 30 minutos.

Para ensayos de inhibidor, las reacciones se realizaron en presencia de 200 μ M de NAD⁺ y nicotinamida (0, 50, 150 ó 300 μ M) (Sigma) o 50 μ M de los inhibidores siguientes: ácido nicotínico (Sigma), sirtinol, M15 (Cambridge), esplitomicina (47), TSA (BIOMOL).

40
45

RESULTADOS

La nicotinamida abole el silenciamiento en el *ADNr*, los telómeros y loci de tipo apareante. Nicotinamida es un producto de la desacetilación de Sir2 y es un sustrato clave en la vía salvaje de NAD⁺. En base a la observación previa de los autores de la invención de que la manipulación de la biosíntesis de NAD⁺ puede influir sobre las actividades dependientes de Sir2 (véase el Ejemplo 1), los autores desearon examinar el efecto que tendrían precursores de NAD⁺ sobre el silenciamiento. Se examinaron cepas con un marcador *ADE2* o *MET15* integrado en el locus de *ADNr* (*RDN1*). El silenciamiento de *ADE2* resulta en la acumulación de un pigmento rojo en placas con adenina limitante, mientras que el silenciamiento de *MET15* conduce a la producción de un pigmento pardo en medio con contenido en Pb²⁺. Los autores utilizaron dos genes marcadores para asegurar que los efectos que observaron no se debían simplemente a cambios en la biosíntesis de adenina o metionina. Como testigos se incluyeron cepas con una copia extra sencilla de *SIR2* (2X*SIR2*) o carente de *SIR2* (*sir2::TRP1*) para el silenciamiento incrementado y la carencia de silenciamiento, respectivamente. Tal como se muestra en la Figura 8A, cuando el crecimiento se realiza en presencia de nicotinamida 5 mM, se abole por completo el silenciamiento. El silenciamiento de un marcador *ADE2* en este locus fue abolido similarmente mediante la adición de nicotinamida.

Para someter a ensayo si el efecto de nicotinamida es específico para el *ADNr* o si influye en otras regiones heterocromáticas, los autores de la invención examinaron el silenciamiento en telómeros. Para vigilar el

silenciamiento telomérico, utilizaron una cepa en la que el gen *ADE2* está integrado en la región subtelomérica (Y') del brazo derecho del cromosoma V (22'). En placas con adenina limitante, las colonias tienen sectores rojos/blancos debido a la expresión jaspeada del marcador *ADE2*. En presencia de nicotinamida 5 mM las colonias eran blancas, demostrando una pérdida completa de la represión (Fig. 8B). Los autores vigilaron también el silenciamiento de genes de tipo apareante y encontraron que la nicotinamida abolía asimismo por completo el silenciamiento en este locus.

Ácido nicotínico, un compuesto intermedio en la vía salvaje de NAD^+ , es estructuralmente similar a nicotinamida (véase la Fig. 9B). El ácido nicotínico es recogido de manera eficaz por parte de células de levaduras y recientemente se identificó un transportador específico para este compuesto, *Tna1* (48', 49'). En cada uno de los ensayos anteriores, los autores de la invención examinaron el efecto de ácido nicotínico 5 mM sobre el silenciamiento dependiente de *Sir2*, y en cada caso encontraron que el ácido nicotínico no tenía efecto alguno.

La nicotinamida incrementa la inestabilidad genómica y acorta el período de vida de las levaduras. Los autores de la invención desearon determinar si la pérdida anterior de silenciamiento era debida a la inhibición de la actividad de *Sir2*, en cuyo caso células tratadas con nicotinamida deberían mimetizar a una cepa *sir2Δ*. Levaduras que carecen de un *Sir2* funcional muestran frecuencias incrementadas de recombinación de ADNr. La pérdida de un marcador *ADE2* en el locus de ADNr se vigiló en cepas de tipo salvaje, *2xSIR2* y *sir2*, en presencia y ausencia de nicotinamida. Tal como se muestra en la Figura 9A, el tratamiento de células de tipo salvaje y *2xSIR2* con nicotinamida aumentaba la frecuencia de la pérdida de marcador ~ 7 veces, de manera similar a la de un mutante *sir2*. De manera importante, el tratamiento de la cepa *sir2* no aumentaba adicionalmente la recombinación, argumentando que la pérdida de marcador observada era debida a la inhibición de *Sir2*.

La inestabilidad del locus de ADNr ha demostrado ser una causa principal del envejecimiento replicativo de levaduras (25', 26'). Por lo tanto, los autores de la invención examinaron el efecto de nicotinamida sobre el período de vida de las levaduras. Se hicieron crecer células durante dos días en medio YPD de levaduras reciente para asegurar que dichas células se habían recuperado por completo de las condiciones de restricción de calorías antes del ensayo. Las células hijas que emergieron de células madre previamente sin retoños se separaron luego por micromanipulación y se puntuaron. La Figura 9C muestra las curvas del período de vida representativo tanto del tipo salvaje (triángulos) como del mutante *sir2* de corta vida (círculos). Las células que se hicieron crecer en medio que contenía nicotinamida 5 mM (rombos en negro) tenían un período de vida promedio ~ 45% al de un tipo salvaje, que era equivalente al del mutante *sir2*. El tratamiento de la cepa *sir2* con nicotinamida no acortó adicionalmente el período de vida (cuadrados). En contraposición con estos resultados, los autores de la invención no observaron efecto perjudicial alguno sobre el período de vida replicativo en presencia de ácido nicotínico 5 ó 50 mM (Fig. 9D, rombos en negro y en blanco, respectivamente).

La nicotinamida inhibe el silenciamiento en células no en división. El restablecimiento de dominios de cromatina silenciosos requiere el paso a través de la fase S (50'), pesar de que la activación no parece ser la replicación de ADN (51', 52'). Experimentos con un alelo *SIR3* sensible a la temperatura sugieren que se requiere la presencia del complejo Sir2/3/4 para mantener un estado silenciado a lo largo de todo el ciclo de la célula (50'). Los autores de la invención han demostrado que nicotinamida desreprime los dominios silenciosos en células en ciclo y atenúa el período de vida replicativo. Los autores se preguntaron si el tratamiento con nicotinamida podría tener un efecto similar sobre el silenciamiento en células no en ciclo, paralizadas en G1. Utilizaron una cepa que contenía un informador de GFP integrado en el locus *HMR* que les permitía cuantificar los efectos de nicotinamida sobre el silenciamiento de *HM* en células individuales. Primeramente validaron el sistema en células en ciclo. Tal como se muestra en la Figura 10A, GFP no fue expresado en células no tratadas debido al alto grado de silenciamiento de este locus. Sin embargo, después de 60 minutos en nicotinamida 5 mM, observaron un incremento drástico en el nivel de expresión, que resultó incluso más pronunciado al cabo de 90 minutos (Fig. 10A, segundo y tercer paneles, respectivamente).

Para adquirir una medida más cuantitativa del silenciamiento, las células se analizaron mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Los dos paneles de la parte superior de la Figura 10B muestran los perfiles de expresión de GFP de cultivos asincrónicos de cepas *sir4* y de tipo salvaje. La delección de *SIR4* interrumpe los complejos SIR teloméricos y de los loci de tipo apareante, conduciendo a una redistribución de *Sir2* fuera de estos sitios y hacia el locus de ADNr. Así, el perfil de la cepa *sir4* representa una desrepresión completa del locus *HMR*. La Figura 10B muestra que el crecimiento de células de tipo salvaje en nicotinamida 5 mM conduce a una desrepresión completa de este locus (tercer panel) en comparación con el mutante *sir4*. Células tratadas con ácido nicotínico 5 mM o con el ácido quinolínico estructuralmente relacionado (un sustrato en la vía de síntesis de NAD^+ de novo) no mostraron incremento alguno en la expresión de GFP (Fig. 10B, dos paneles inferiores) demostrando

que el efecto de des-silenciamiento es específico para nicotinamida.

- Utilizando este sistema de ensayo, los autores de la invención pudieron vigilar los efectos de nicotinamida sobre la heterocromatina en células no en ciclo. Una cepa *MATa* que contenía el transgen *GFP* se suprimió para el locus 5 *HMR α* para asegurar que las células no escaparan de la detención en G1 debido a la co-expresión de genes *a* y *α* . Después de la detección en G1 mediante tratamiento con factor *α* las células se expusieron a nicotinamida 5 mM y se examinaron mediante FACS cada 30 min. La figura 10C muestra los perfiles de expresión de células paralizadas en presencia y ausencia de nicotinamida. Sorprendentemente, células paralizadas en G1 mostraron una pérdida del silenciamiento cuando se trataban con nicotinamida. La medición del contenido en ADN mediante 10 FACS confirmó que las células permanecían en G1 durante el tiempo que duraba el experimento (Fig. 10C, columna de la derecha). Estos resultados demuestran que la nicotinamida exógena desreprime la cromatina silenciosa, incluso en células no en división, y sugiere que la heterocromatina es una estructura inestable y dinámica. Esto también indica que la desacetilación continua de histonas es esencial para el mantenimiento del silenciamiento.
- 15 *La nicotinamida provoca que Sir2 se disocie de telómeros y de loci de tipo apareante, pero no de ADNr*. Los autores de la invención han demostrado que nicotinamida desreprime la heterocromatina en todos los tres locis silenciosos en levaduras. A pesar de que la explicación más probable de esas observaciones era que Sir2 es catalíticamente inactivada por nicotinamida, también era posible que Sir2 fuera deslocalizada o que su expresión fuese 20 subregulada. Para acometer esta última posibilidad, los autores de la invención determinaron los niveles de proteínas Sir2 en presencia de nicotinamida (1-5 mM) y encontraron que estaban inalterados. Seguidamente, examinaron el efecto de nicotinamida sobre la localización de una Sir2 etiquetada con GFP. Cultivos en fase logarítmica idénticos se hicieron crecer en presencia o ausencia de nicotinamida 5 mM durante dos horas, durante lo cual se vigiló la localización de GFP-Sir 2 mediante microscopía de fluorescencia. Bajo condiciones normales, 25 Sir2 puede ser visualizada en distintos focos próximos a la periferia nuclear, representando cada uno de los puntos focales un racimo de varios telómeros (53'). En un fondo mutante de *sir2*, Sir3 es liberada de los telómeros y muestra un modelo nuclear difuso (Fig. 11A). Esta cepa servía como referencia para la deslocalización de Sir. Durante el crecimiento en nicotinamida, los autores de la invención no observaron cambio alguno en el modelo de Sir2-GFP, incluso al cabo de dos horas, tiempo en el que las células tratadas mostraron una desrepresión máxima 30 de loci silenciosos (Figs. 11C y D). También examinaron los otros dos miembros del complejo de silenciamiento de Sir, Sir3 y Sir4. Las Figuras 5E y G muestran el modelo de localización de Sir3-GFP y GFP-Sir4 en células no tratadas, respectivamente. El tratamiento con nicotinamida 5 mM durante dos horas no alteró el modelo de fluorescencia por GFP para ninguna de estas proteínas (Figs 11F y H). Estos resultados demuestran por vez primera que la inhibición de Sir2 no resulta en una relocalización total del complejo SIR.
- 35 Con el fin de examinar más estrechamente la asociación entre Sir2 y loci silenciosos en presencia de nicotinamida, los autores de la invención realizaron una immunoprecipitación de cromatina (ChIP) tanto en células tratadas como en no tratadas. Como testigos servían una cepa mutante *sir2* y el gen *CUP1* no silenciado. La Figura 12 muestra los productos de la PCR a partir de ADN de entrada e inmunoprecipitado utilizando un par de cebadores específicos 40 para ADNr 5S. El tratamiento de células con nicotinamida 5 mM no alteraba la cantidad de producto de la PCR obtenido utilizando estos cebadores (compárense las pistas 5 y 6), demostrando que Sir2 permanece asociado con ADNr en presencia de este compuesto.
- 45 Seguidamente examinaron la asociación de Sir2 con el locus *HMR α* silencioso y ADN 0,6 y 1,4 kb desde el telómero de la derecha del cromosoma VI. En presencia de nicotinamida, no se obtuvo producto de PCR alguno utilizando cebadores específicos para *HMR*. De manera similar, la cantidad de producto obtenida de células tratadas con nicotinamida utilizando cebadores específicos para ADN sub-telomérico era equivalente al fondo. Estos resultados demuestran que Sir2 no está asociada con *HMR* ni con el ADN sub-telomérico en células tratadas 50 con nicotinamida. Presumiblemente, esto refleja una diferencia fundamental en los papeles de Sir2 en el complejo RENT en el ADNr y en el complejo SIR hetotrimérico en los telómeros y loci de tipo apareante.

55 *Nicotinamida es un potente inhibidor no competitivo tanto de Sir2 de levaduras como de SIRT1 humana in vitro*. Dado que Sir2 no se deslocalizó ni se subreguló en respuesta a nicotinamida, la explicación más verosímil para los resultados obtenidos por los autores de la invención era que este compuesto actuaba como un inhibidor directo de la actividad de desacetilasa de Sir2. Para explorar adicionalmente esto, y con el fin de obtener un mayor conocimiento en el mecanismo de silenciamiento inducido por nicotinamida, los autores de la invención midieron directamente la actividad de Sir2 *in vitro* en presencia de cantidades variables de este compuesto. Utilizaron un nuevo ensayo de actividad de HDAC de clase III que genera una señal fluorescente tras la desacetilación de un sustrato de histona. Cuando se incuba con sustrato acetilado y NAD⁺, Sir2 etiquetado con GST recombinante

proporciona una fuerte señal fluorescente 10 veces mayor que sin enzima y sin controles de NAD⁺. Utilizando este ensayo, los autores de la invención testaron la capacidad de nicotinamida de inhibir la desacetilación en presencia de concentraciones variables de NAD⁺. Una doble representación recíproca de Lineweaver-Burk de los datos (Fig. 13A) demuestra que nicotinamida es un fuerte inhibidor no competitivo de esta reacción. Se ha obtenido 5 recientemente un resultado similar para Hst2, un homólogo de Sir2 citoplásmico (54'). Los autores desearon determinar si los efectos inhibidores de nicotinamida podrían extenderse a los homólogos de Sir2 de eucariotas superiores. Así, examinaron si la nicotinamida podría también inhibir SIRT1 humana *in vitro*. Utilizando SIRT1 10 recombinante, vigilaron la desacetilación del sustrato en presencia de cantidades variables de nicotinamida y NAD⁺. De manera similar a Sir2, una representación de Lineweaver-Burk de los datos demuestra que nicotinamida inhibe también SIRT1 de una manera no competitiva (Fig. 13B). Estos resultados implican que la nicotinamida no inhibe la desacetilación compitiendo con NAD⁺ para unirse a Sir2/SIRT1, y que nicotinamida y NAD⁺ pueden unirse simultáneamente a la enzima.

Recientemente, varios grupos han aislado compuestos que inhiben proteínas similares a Sir2 tanto *in vitro* como *in vivo* 15 (55', 56'). Entre éstas se encuentran sirtinol, M15 y esplitomicina. Estos compuestos se aislaron en rastreos fenotípicos de alto rendimiento de bancos de moléculas pequeñas en calidad de inhibidores del silenciamiento, a pesar de que ninguno ha sido todavía examinado en cuanto a su capacidad para inhibir la actividad de SIRT1. Para comparar la eficacia de inhibición de estos compuestos con la de nicotinamida, los autores de la invención 20 midieron la actividad de SIRT1 recombinante en presencia de 50 µM de cada uno de estos inhibidores. También incluyeron el inhibidor de HDAC de la clase I/II, TSA, como un control negativo. Como se muestra en la Figura 13C, nicotinamida inhibía SIRT1 con una $\text{IC}_{50} < 50 \mu\text{M}$, un valor que era igual a o menor que el de todos los otros inhibidores que se sometieron a ensayo. Añadiendo una ayuda adicional a los resultados *in vivo* de los autores de la invención, éstos demostraron que el compuesto estructuralmente relacionado, ácido nicotínico, no tenía efecto 25 alguno sobre la actividad de SIRT1 *in vitro* (Fig. 13C).

DISCUSIÓN

Los autores de la invención han demostrado que nicotinamida, un producto de la reacción de desacetilación de 30 Sir2, es un potente inhibidor de la actividad de Sir2 tanto *in vivo* como *in vitro*. La adición de nicotinamida exógena a células de levaduras desreprime los tres loci silenciosos, aumenta la inestabilidad en el locus de ADN ribosomal y acorta el período de vida de levaduras al de un mutante de *sir2*. La inestabilidad de ADNr y los fenotipos del período de vida corto de células tratadas con nicotinamida no se ven aumentados por una mutación de *sir2*, indicando que estos fenotipos son la consecuencia de la inhibición de Sir2. De manera importante, estos resultados 35 indican también que la inestabilidad de ADNr y el período de vida no se ven influenciados por los otros miembros de la familia Sir2 de levaduras, las proteínas Hst.

Los autores de la invención han demostrado recientemente que cepas que portan copias extras de genes de la vía salvaje de NAD⁺ muestran un silenciamiento incrementado y son de larga vida, pero no tienen niveles de NAD⁺ o NADH en estado estacionario incrementados (véase el Ejemplo 1). Los autores de la invención expusieron la 40 hipótesis de que la longevidad incrementada viene mediada por incrementos locales en la disponibilidad de NAD⁺ o el flujo incrementado a través de la vía salvaje. Este último modelo implica que puede existir un reciclaje continuo de NAD⁺ en nicotinamida a través de miembros de la familia Sir2 y/o NMN adenilil transferasas. Los autores de la invención demuestran que nicotinamida abole el silenciamiento en células paralizadas en G1, argumentando que 45 se requiere constitutivamente la actividad de Sir2 para el mantenimiento de la heterocromatina y que Sir2 consume NAD⁺ incluso en células no en ciclo. Esto es consistente con el reciente hallazgo de Bedelov et al. que el gen *Mata* en el locus *HML* silenciado es expresado en células G1 tratadas con esplitomicina (56').

La adición de nicotinamida a células no altera el modelo de localización de ninguna de las proteínas de fusión Sir-GFP que examinaron los autores de la invención (Fig. 11). Esto sugiere que existen interacciones que mantienen la 50 localización de Sir2 independientemente de su actividad. Un examen mas detallado utilizando ChIP demuestra que mientras Sir2 sigue estando unida al ADNr, ya no se asocia con telómeros ni loci de tipo apareante en presencia de este compuesto (Fig. 12). Se ha demostrado previamente que Net1, la subunidad de unión a ADN del complejo RENT, puede asociarse con cromatina, independientemente de Sir2 (57'). Estos hallazgos indican que este complejo puede asemejarse al ADN ribosomal en ausencia de la actividad de desacetilasa de Sir2. En 55 contraposición, los autores demuestran que el complejo Sir2/3/4 heterotrimérico puede no asemejarse a cromatina en ausencia de la actividad catalítica de Sir2. Estos resultados son consistentes con los datos recientes de otros dos grupos utilizando mutantes de Sir2 catalíticamente inactivos (46', 58'). Ambos grupos encuentran que la mutación de la histidina conservada en el dominio catalítico (His-364) evita que Sir2 interactúe con telómeros y loci de tipo apareante *in vivo*. Sin embargo, sigue existiendo la posibilidad de que estas mutaciones afecten también a

la capacidad de Sir2 de interactuar con otras proteínas. Los resultados obtenidos por los autores de la invención demuestran de forma concluyente que se requiere la actividad desacetilasa de Sir2 para su asociación adecuada con telómeros y loci apareantes.

- 5 Los autores de la invención han demostrado que nicotinamida inhibe fuertemente la actividad de desacetilasa tanto de Sir2 de levaduras como del homólogo humano SIRT1 *in vitro*. El hecho de que nicotinamida actúe de forma no competitiva para inhibir Sir2 sugiere que este compuesto no compite con NAD⁺ para la unión. El examen del mecanismo de reacción para la desacetilación de Sir2 y la estructura cristalina de un homólogo Sir2 arqueal proporciona claves en cuanto a un posible mecanismo de inhibición. La desacetilación catalizada por Sir2 consiste en dos etapas de hidrólisis que se piensa están acopladas. La escisión del enlace glicosídico que une nicotinamida al resto ADP-ribosa de NAD⁺ es seguida por la escisión del enlace C-N entre un grupo acetilo y lisina. Un análisis estructural reciente indica que la enzima Sir2 contiene dos sitios de unión NAD⁺ espacialmente distintos (el sitio B y el sitio C), ambos de los cuales están implicados en la catálisis (59'). Los autores proponen que en presencia de una acetil-lisina, NAD⁺ unido al sitio B pueda sufrir un cambio de conformación que lleva al grupo nicotinamida a las proximidades del sitio C, en donde se escinde. El producto de ADP-ribosa de esta reacción vuelve luego al sitio B en donde se produce la desacetilación de la acetil-lisina. Los autores de la invención proponen que a concentraciones elevadas, la nicotinamida se une a y bloquea el sitio C interno, lo que evita el cambio conformacional y la subsiguiente escisión de NAD⁺. Esto explicaría la naturaleza no competitiva del modo de inhibición de este compuesto.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- La invención ha demostrado que la potencia de nicotinamida rivaliza con la de la mayoría de los compuestos aislados de los bancos, más eficaces utilizados en su ensayo. El hecho de que SIRT1 sea inhibido por concentraciones tan bajas de nicotinamida *in vitro* abre la posibilidad de que este modo de inhibición pueda ser fisiológicamente relevante. Se ha reseñado que niveles de nicotinamida en tejidos de mamíferos se encuentran en el intervalo de 11-400 μM (39', 60'-62'). Recientemente, se determinó con una elevada precisión que los niveles de nicotinamida en el fluido cerebroespinal eran 54,2 μM (63'), un valor que es similar a la IC₅₀ para la nicotinamida aquí reseñada. Los autores de la invención proponen que fluctuaciones en los niveles de nicotinamida celular pueden controlar directamente la actividad de las proteínas Sir2 *in vivo*. A su vez, estas fluctuaciones pueden ser reguladas por enzimas implicadas en el metabolismo de nicotinamida.
- El gen PNC1 de levaduras codifica una nicotinamidasa que está situada en una posición clave para regular desacetilasas NAD⁺-dependientes. Al convertir nicotinamida en ácido nicotínico, Pnc1 puede reducir los niveles de este inhibidor y estimular la tasa a la que se regenera NAD⁺ (véase la Fig. 7). De manera interesante, PNC1 es uno de los genes más altamente inducidos en respuesta al estrés y condiciones que se asemejan a la restricción de calorías (64', 65'). Además de ello, PNC1 codifica la única enzima de la vía salvaje cuyo transcripto sufre fluctuaciones dependientes del ciclo celular (66'). Los niveles de PNC1 son los más elevados en M/G1 y caen bruscamente en la fase S. De manera interesante, esto coincide con el establecimiento del silenciamiento dependiente de Sir (51', 52', 67). Estos hechos abren la posibilidad de que altos niveles de Pnc1 inducen el silenciamiento después de la fase S o bajo condiciones de estrés y la restricción de calorías, eliminando los efectos inhibidores de nicotinamida. El hallazgo previo de los autores de la invención de que una sola copia extra de PNC1 aumenta el silenciamiento dependiente de Sir2 (véase el Ejemplo 1), añade un soporte adicional a este modelo. Resultará interesante determinar si los niveles de nicotinamida intracelulares cambian durante el ciclo celular, el estrés o la restricción de calorías.
- Nicotinamida y ácido nicotínico se utilizan a altas dosis (de hasta 10 g/día) con el fin de auto-tratar a una diversidad de afecciones (41'). Ambos se consideran formas de vitamina B3 y a menudo se utilizan de manera indistinta, pero la nicotinamida se ha vuelto la preferida en muchos casos debido a una aparente carencia de efectos secundarios. Además, nicotinamida se encuentra actualmente en ensayos como una terapia para prevenir la recurrencia del cáncer y diabetes dependiente de insulina (tipo I). Los resultados obtenidos por los autores de la invención, que demuestran claramente que nicotinamida puede interrumpir la heterocromatina, incluso en células no en ciclo, abre la preocupación de que puedan existir consecuencias perjudiciales de terapia de nicotinamida a largo plazo en seres humanos.

REFERENCIAS

- 1'. Courey, A. J., S. (2001) Genes Dev 15(21), 2786-96
- 2'. Moazed, D. (2001) Mol Cell 8(3), 489-98.
- 3'. Gasser, S. C. M. (2001) Gene 279(1), 1-16
- 4'. Eberharter, A. B., PB. (2002) Embo Reports 3(3), 224-9

- 5'. Kuo, M. A., CD. (1998) *Bioessays* 20(8), 615-26
- 6'. Bernstein, B. E., Tong, J. K. y Schreiber, S. L. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97(25), 13708-13.
- 7'. Fischle, W. K., V. Dequiedt, F. Verdin, E. (2001) *Biochem Cell Biol* 79(3), 337-48
- 8'. Marks, P. R., R A. Richon, V M. Breslow, R. Miller, T. Kelly, W K. (2001) *Nature Rev Cancer* 1(3), 194-202
- 5 9'. Yoshida, M. F., R. Nishiyama, M. Komatsu, Y. Nishino, N. Horinouchi, S. (2001) *Cancer Chemother Pharmacol* 48(supl), S20-6
- 10' Smith, J. S., Brachmann, C. B., Celic, I., Kenna, M. A., Muhammad, S., Starai, V. J., Avalos, J. L., Escalante-Semerena, J. C., Grubmeyer, C., Wolberger, C. y Boeke, J. D. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12), 6658-63.
- 11'. Tanner, K. G., Landry, J., Sternglanz, R. y Denu, J. M. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26), 14178-82.
- 10 12'. Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S. T., Heller, R. C., Stebbins, J., Pillus, L. y Sternglanz, R. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11), 5807-11.
- 13'. Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M. y Guarente, L. (2000) *Nature* 403(6771), 795-800
- 14'. Brachmann, C. B., Sherman, J. M., Devine, S. E., Cameron, E. E., Pillus, L. y Boeke, J. D. (1995) *Genes Dev* 9(23), 2888-902.
- 15 15'. Tanny, J. C. y Moazed, D. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(2), 415-20.
- 16'. Rine, J. H. I. (1987) *Genetics* 116(1), 9-22
- 17'. Wood, J. G. y Sinclair, D. A. (2002) *Trends Pharmacol Sci* 23(1), 1-4.
- 18'. Strahl-Bolsinger S, H. A., Luo K, Grunstein M. (1997) *Genes Dev* (11), 1
- 19'. Hecht, A. S.-B. S., Grunstein M. (1996) *Nature* 383(6595), 92-6
- 20 20'. Ghidelli, S. D. D., Dhillon N, Kamakaka RT. (2001) *EMBO* 20(16), 4522-35
- 21'. Shou, W., Sakamoto, K. M., Keener, J., Morimoto, K. W., Traverso, E. E., Azzam, R., Hoppe, G. J., Feldman, R. M. R., DeModena, J., Moazed, D., Charbonneaux, H., Nomura, M. y Deshaies, R. J. (2001) *Mol. Cell.* 8(1), 45-55
- 22'. Gottschling, D. E., Aparicio, O. M., Billington, B. L. y Zakian, V. A. (1990) *Cell* 63(4), 751-62.
- 23'. Smith, J. S. y Boeke, J. D. (1997) *Genes Dev* 11(2), 241-54.
- 25 24'. Bryk, M., Banerjee, M., Murphy, M., Knudsen, K. E., Garfinkel, D. J. y Curcio, M. J. (1997) *Genes Dev* 11 (2), 255-69.
- 25'. Sinclair, D. A. y Guarente, L. (1997) *Cell* 91(7), 1033-42.
- 26'. Kaeberlein, M., McVey, M. y Guarente, L. (1999) *Genes Dev* 13(19), 2570-80.
- 27'. Park, P. U., Defossez, P. A. y Guarente, L. (1999) *Mol Cell Biol* 19(5), 3848-56
- 30 28'. Sinclair, D. A., Mills, K. y Guarente, L. (1998) *Trends Biochem Sci* 23(4), 131-4.
- 29'. Gottlieb, S. y Esposito, R. E. (1989) *Cell* 56(5), 771-6.
- 30'. Kennedy, B. K., Austriaco, N. R., Jr., Zhang, J. y Guarente, L. (1995) *Cell* 80(3), 485-96.
- 31'. Lin, S. J., Defossez, P. A. y Guarente, L. (2000) *Science* 289(5487), 2126-8.
- 32'. Anderson, R. M., Bitterman, K. J., Wood, J. G., Medvedik, O., Cohen, H., Lin, S. S., Manchester, J. K., Gordon, J. I. y Sinclair, D. A. (2002) *J Biol Chem* 277(21), 18881-90.
- 33'. Tissenbaum, H. A. y Guarente, L. (2001) *Nature* 410(6825), 227-30.
- 34'. Vaziri, H., Dessain, S. K., Eaton, E. N., Imai, S. I., Frye, R. A., Pandita, T. K., Guarente, L. y Weinberg, R.A. (2001) *Cell* 107(2),149-59.
- 35 35'. Luo, J., Nikolaev, A. Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L. y Gu, W. (2001) *Cell* 107(2), 137-48.
- 40 36'. Moazed, D. (2001) *Curr Opin Cell Biol* 13(2), 232-8.
- 37'. Sauve, A. A., Celic, I., Avalos, J., Deng, H., Boeke, J. D. y Schramm, V. L. (2001) *Biochemistry* 40(51), 15456-63.
- 38'. Borra, M. T., O'Neill, F. J., Jackson, M. D., Marshall, B., Verdin, E., Foltz, K. R. y Denu, J. M. (2002) *J Biol Chem* 277(15), 12632-41.
- 45 39'. Dietrich, L. S. (1971) *Amer J Clin Nut* 24, 800-804
- 40'. Kaanders, J. P. L., Marres HA, Bruaset I, van den Hoogen FJ, Merkx MA, van der Kogel AJ. (2002) *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 52(3), 769-78
- 41'. Knip, M. D. I., Moore WP, Gillmor HA, McLean AE, Bingley PJ, Gale EA. (2000) *Diabetologia* 43(11), 1337-45
- 50 42'. Foster, J. W., Park, Y. K., Penfound, T., Fenger, T. y Spector, M. P. (1990) *J Bacteriol* 172(8), 4187-96.
- 43'. Ghislain, M., Talla, E. y Francois, J. M. (2002) *Yeast* 19(3), 215-224.
- 44'. Keil, R. L. y McWilliams, A. D. (1993) *Genetics* 135(3), 711-8.
- 45'. Mills, K. D., Sinclair, D. A. y Guarente, L. (1999) *Cell* 97(5), 609-20.
- 46'. Hoppe, G. T. J., Rudner AD, Gerber SA, Danaie S, Gygi SP, Moazed D. (2002) *Mol Cell Biol* 22(12), 4167-80
- 55 47'. Langley, E. P. M., Fareta M, Bauer UM, Frye RA, Minucci S, Pelicci PG, Kouzarides T. (2002) *EMBO J* 21(10), 2383-2396
- 48'. Llorente, B. y Dujon, B. (2000) *FEBS Lett* 475(3), 237-41.
- 49'. Sandmeier, J. J., Celic, I., Boeke, J. D. y Smith, J. S. (2002) *Genetics* 160(3), 877-89.
- 50'. Miller, A. N. K. (1984) *Nature* 312(5991), 247-51

- 51'. Kirchmaier, A. L. y Rine, J. (2001) *Science* 291(5504), 646-50.
- 52'. Li, Y. C., Cheng, T. H. y Gartenberg, M. R. (2001) *Science* 291(5504), 650-3.
- 53'. Gasser, S. M., Gotta, M., Renauld, H., Laroche, T. y Cockell, M. (1998) *Novartis Found Symp* 214, 114-26
- 54'. Landry, J., Slama, J. T. y Sternglanz, R. (2000) *Biochem Biophys Res Commun* 278(3), 685-90.
- 5 55'. Grozinger, C. C. E., Blackwell HE, Moazed D, Schreiber SL. (2001) *J Biol Chem* 276(42), 38837-43
- 56'. Bedalov, A., Gatbonton, T., Irvine, W. P., Gottschling, D. E. y Simon, J. A. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98(26), 15113-8.
- 10 57'. Straight, A. F., Shou, W., Dowd, G. J., Turck, C. W., Deshaies, R. J., Johnson, A. D. y Moazed, D. (1999) *Cell* 97(2), 245-56.
- 10 58'. Armstrong, C. K. M., Imai SI, Guarente L. (2002) *Mol Biol Cell* 13(4), 1427-38 59'. Min, J. L. J., Sternglanz R, Xu RM. (2001) *Cell* 105(2), 269-79
- 15 60'. Hoshino, J., Schluter, U. y Kroger, H. (1984) *Biochim Biophys Acta* 801(2), 250-8.
- 61'. Ijichi, H. A. I., A. Hataishi, O. (1966) *J Biol Chem* 241, 3701
- 62'. Hagino, Y. L., J. Henderson, M. (1968) *J Biol Chem* 243, 4980
- 15 63'. Smythe, G. A., Braga, O., Brew, B. J., Grant, R. S., Guillemin, G. J., Kerr, S. J. y Walker, D. W. (2002) *Anal Biochem* 301(1), 21-6.
- 64'. Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D. y Brown, P. O. (2000) *Mol Biol Cell* 11(12), 4241-57.
- 20 65'. Moskina, E. S. C., Maurer CT, Mager WH, Ruis H. (1998) *Yeast* 14(11), 1041-50
- 66'. Spellman, P. T., Sherlock, G., Zhang, M. Q., Iyer, V. R., Anders, K., Eisen, M. B., Brown, P.O., Botstein, D. y Futcher, B. (1998) *Mol Biol Cell* 9(12), 3273-97.
- 67'. Laurenson, P. y Rine, J. (1992) *Microbiol Rev* 56(4), 543-60.
- 68'. Barton, A. (1950) *J Gen Microbiol* 4, 84-86
- 69'. Kennedy, B. K., Austriaco, N. R., Jr. y Guarente, L. (1994) *J Cell Biol* 127(6 Pt 2), 1985-93.

25 **Ejemplo Comparativo 3: La nicotinamida, pero no el ácido nicotínico, se une al bolsillo C de Sir2**

La nicotinamida estaba alojada en la estructura cristalina de Sir2 de *Archaeoglobus fulgidus* (Sir2-Afl) unida a NAD⁺ (Protein Data Bank ID código IIC1, Min et al. (2001). Crystal structure of a SIR2 homolog-NAD complex. *Cell* 105, 269-279). Primeramente se alojó manualmente en el sitio C de Sir2-Afl utilizando QUANTA (MSI, inc.). Subsiguientemente, se realizó un cálculo de minimización de la energía con CHARMM (Brooks et al. (1983) *J. Comput. Chem.* 4, 187-217) con una restricción armónica en Sir2-Afl y NAD⁺ ($F = 2,4 \text{ Kcal/mol.}\text{\AA}^2$). Las Figs 14A-C se realizaron con PYMOL (DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System (2002) DeLano Scientific, San Carlos, CA, EE.UU.).

35 Estos estudios indican que nicotinamida inhibe Sir2 (véanse las Figs. 14A-C) y que el ácido nicotínico no inhibe Sir2 debido a la presencia del residuo D101 (es decir, de carácter ácido) que evita que el ácido nicotínico se aloje en el bolsillo C de Sir2.

40 **Ejemplo Comparativo 4: PNC1 media en la prolongación del período de vida**

Tal como se muestra en la Fig. 17A, PNC1 cataliza una hidrólisis de amida, convirtiendo nicotinamida en ácido nicotínico en la vía salvaje de NAD⁺ (Fig. 17B). La mayoría de las cepas de levaduras de tipo salvaje tienen un período de vida medio de 21-23 divisiones, con un período de vida máximo de ~ 40 divisiones. Una cepa de tipo salvaje que estaba restringida en calorías (glucosa al 0,5%) o estresada térmicamente (37°C) exhibía un período de vida mayor que un control no tratado (glucosa al 2,0% o 30°C, respectivamente) (Fig. 17C y D). La cepa *sir2Δ* tenía un período de vida corto, consistente con los informes previos^{12,13}, y ni la restricción de calorías ni el calor prolongaban el período de vida en esta cepa (Fig. 17C y D). La cepa *pnc1Δ* no exhibía una prolongación del período de vida bajo ninguna de estas condiciones, demostrando que PNC1 es necesaria para la prolongación del período de vida.

55 De manera determinante, bajo condiciones no estresantes (glucosa al 2%, 30°C), una cepa con copias adicionales de PNC1 (5xPNC1) vivía 70% más que la de tipo salvaje y algunas células vivían más de 70 divisiones, que es la prolongación del período de vida reseñado más largo en este organismo (Fig. 17E). Ni la restricción de calorías ni el estrés térmico aumentaban adicionalmente el período de vida de la cepa 5xPNC1. La delección de SIR2 en el fondo de 5xPNC1 acortó el período de vida al de la cepa *sir2Δ* (Fig. 17E). El doble mutante *pnc1Δsir2Δ* tenía asimismo un período de vida similar al mutante *sir2Δ* (Fig. 17E) y su período de vida no se vió afectado por la restricción de glucosa. Esto indica que PNC1 y SIR2 funcionan en la misma vía y que PNC1 aumenta el período de vida a través de SIR2.

Así, estos resultados demuestran que *PNC1* es necesaria para la prolongación del período de vida tanto mediante restricción de calorías como estrés térmico, y que *PNC1* adicional es suficiente para mimetizar estos estímulos. De acuerdo con el modelo de los autores de esta invención, copias adicionales de *PNC1* prolongan el período de vida agotando nicotinamida, mitigando así la inhibición de Sir2.

Ejemplo Comparativo 5. La expresión de PNC1 se incrementa en respuesta a condiciones de estrés

S. cerevisiae fue incubada en diferentes condiciones de estrés y se midió el nivel de expresión de PNC1 realizando transferencias Western. La cantidad de PNC1 medida en células de levadura desarrolladas en medio completo de glucosa (YPD) al 2,0% se estableció en 1. La Tabla que figura a continuación y la Fig. 18 muestran la inducción en diferentes condiciones de crecimiento con relación a este nivel de referencia de expresión:

Condiciones del cultivo		Veces de comparación
15	medio completo (YPD) con glucosa al 2,0%	1
	medio completo (YPD) con glucosa al 0,5%	15
	medio completo (YPD) con glucosa al 0,1%	25
	medio completo definido (SD) + aminoácidos	5
20	medio completo definido (SD) - aminoácidos	20
	con choque térmico en YPD al 2% (37 grados durante 4 horas)	20
	estrés osmótico (NaCl 0,1 M)	15

Se demostró también que la restricción de nitrógeno inducía grandemente la expresión de PNC1. Dado que todas las “condiciones de estrés” anteriores, es decir medio completo de glucosa (YPD) no al 2,0% prolongan el período de vida de *S. cerevisiae* (restricción de calorías), un incremento en PNC1 se correlaciona con un período de vida prolongado en cada estado sometido a ensayo y que se sabe prolonga el período de vida de las levaduras, incluida la restricción de aminoácidos, el estrés por sales y el estrés térmico (Fig. 18C). El análisis de perfiles de ARNm amplios del genoma de la respuesta al estrés (Gash) demostró que PNC1 es uno de los genes que responden con mayor nivel de respuesta al estrés y a la inanición en este organismo. Los niveles de PNC1 también fueron grandemente inducidos en células que portan un alelo cdc25-10 que mimetiza la restricción de calorías reduciendo cAMP (Fig. 18B).

Para someter a ensayo si esta respuesta era específica al estrés medioambiental, los autores de la invención examinaron los niveles de Pnc1 en una cepa desprovista de *BNA6/QPT1*, que se requiere para la síntesis de novo de NAD⁺, pero no para la prolongación del período de vida mediante la restricción de calorías¹². En este mutante, los niveles de Pnc1 estaban inalterados (Fig. 18B). La actividad de Pnc1 en extractos procedentes de células tratadas se correlacionaba con los niveles de Pnc1 en transferencias Western (Fig. 18D), demostrando que estas células tienen tasas incrementadas de la hidrólisis de nicotinamida. Así, *PNC1* es el primer gen de longevidad de levaduras cuya expresión es modulada por estímulos que prolongan el período de vida.

Por consiguiente, métodos en los que el nivel de PNC1 se incrementa para ampliar el período de vida de células o protegerlas frente a estrés, tal como se describe adicionalmente en esta memoria, mimetiza los eventos naturales en células.

Ejemplo Comparativo 6: PNC1 adicional confiere resistencia al estrés agudo

Dado el fuerte enlace entre la longevidad y la resistencia al estrés en otras especies, los autores de la invención sometieron a ensayo si *PNC1* adicional podría también conferir resistencia a una gama de estrés. Un ensayo bien caracterizado de resistencia al estrés en levaduras es la capacidad de las células de tolerar altas concentraciones de sales²⁶. Los autores de la invención encontraron que la cepa 5xPNC1 era drásticamente más resistente que la de tipo salvaje a altos niveles tanto de NaCl (600 mM), como de LiCl (200 mM) (Fig. 19A). También sometieron a ensayo la supervivencia después de la lesión de ADN por parte de radiación UV (5 mJ/cm²) y encontraron de nuevo que *PNC1* adicional confería resistencia (Fig. 19B). Debido a que la lesión de ADN mitocondrial ha sido implicada en el envejecimiento de mamíferos²⁷, los autores de la invención examinaron también la capacidad de *PNC1* adicional de protección frente a este tipo de estrés. Bajo condiciones de respiración obligada (glicerol al 3% en calidad de fuente de carbono) células 5xPNC1 eran más resistentes que las de tipo salvaje a la mutagénesis mitocondrial por parte de bromuro de etidio (Fig. 19C). La resistencia incrementada de la cepa 5xPNC1 a LiCl era dependiente de *SIR2*. De modo impresionante, la resistencia de esta cepa a NaCl, UV y bromuro de etidio era independiente de *SIR2* (Figs. 19A-C). Estos resultados demuestran que *PNC1* fomenta tanto la longevidad como la

resistencia al estrés, y sugiere que *SIR2* no es el único efecto situado aguas debajo de este gen. Así, es probable que nicotinamida regule proteínas que no sean Sir2.

Ejemplo Comparativo 7: Localización celular de PNC1 bajo una diversidad de condiciones de estrés

Los autores de la invención han demostrado previamente que dos enzimas en la vía salvaje de NAD⁺, Npt1 (nicotinamida fosforribosiltransferasa) y Nma2 (nicotinato mononucleótido adeniltransferasa) están concentradas en el núcleo²³. Investigaron si Pnc1, otra enzima de la vía salvaje, tenía una distribución celular similar. Sorprendentemente, en medio completo de glucosa al 2%, Pnc1-GFP se observó en el citoplasma, en el núcleo y en 3-6 focos citoplásmicos discretos por cada célula (Fig. 20A). Células restringidas en calorías o estresadas mostraron un incremento drástico en la intensidad de la fluorescencia, consistente con los datos Western. De manera interesante, bajo condiciones de restricción de aminoácidos o estrés con sales, este modelo fue alterado, estando la fluorescencia predominantemente localizada en los focos (Fig. 20B). Esto sugiere que la localización de Pnc1 está regulada de modos distintos por diferentes estrés.

Para determinar la identidad de los focos, los autores de la invención buscaron marcadores celulares que estuvieran co-localizados con Pnc1-GFP. Observaron un solapamiento significativo con una proteína roja fluorescente (RFP) dirigida al peroxisoma (Fig. 20C). Además, los focos Pnc1-GFP ya no se observaron en un mutante *pex6Δ*, que es incapaz de formar peroxisomas (Fig. 20D). Debido a que los estudios de estrés realizados por los autores de la invención indicaban que la localización de Pnc1 a peroxisomas podría estar regulada, buscaron identificar el transportador responsable de su importación a esta organela. A pesar de que Pex5 importa la amplia mayoría de proteínas peroxisomales, la localización de Pnc1 a peroxisomas requería al transportador Pex7 menos utilizado (Fig. 20D). La localización de Pnc1 a sitios fuera del núcleo es consistente con los resultados de estrés realizados por los autores de la invención, demostrando que nicotinamida regula proteínas distintas de Sir2. La localización peroxisomal es de un interés particular, debido a que estas organelas son una fuente principal de especies de oxígeno reactivo y han estado implicadas en el envejecimiento de mamíferos^{28,29}. Además, en los peroxisomas se produce un cierto número de etapas cruciales en el metabolismo de lípidos, y la señalización de lípidos ha estado recientemente ligada a la tolerancia de sales²⁶. La resistencia a sales del *PNC1* adicional puede ser el resultado de una función peroxisomal de Pnc1.

Ejemplo Comparativo 8: El período de vida y la resistencia al estrés son negativamente regulados por nicotinamida intracelular

Una predicción del modelo de los autores de la invención es que cualquier manipulación de los niveles de nicotinamida intracelular debería ser suficiente para alterar la actividad de Sir2. Un indicador común de la actividad de Sir2 es el grado al que se silencia un gen informador insertado en el ADNr (*RDN1*). Para excluir la posibilidad de que niveles de NAD⁺ fuesen los responsables de cualquier efecto de silenciamiento, los autores de la invención buscaron manipular los niveles de nicotinamida intracelular utilizando un gen externo a la vía salvaje de NAD⁺. En seres humanos, la vía principal del metabolismo de nicotinamida es a través de nicotinamida N-metiltransferasa (NNMT)³⁰. NNMT convierte nicotinamida en N'-metilnicotinamida, que es excretada a través de los riñones³¹. Por homología, identificaron el gen NNMT de *S. cerevisiae*, que denominaron *NNT1*. Nnt1 es un 23% idéntico a un dominio del núcleo de NNMT en mamíferos³⁰ y contiene los cuatro motivos de firma de metiltransferasas S-adenosilmetionina (SAM)-dependientes³².

La delección de *NNT1* provocó un fenotipo de des-silenciamiento similar a la delección de *PNC1*³³ (Fig. 21A). Estos resultados son consistentes con el hallazgo de los autores de la invención de que el silenciamiento de ADNr es abolido en presencia de nicotinamida exógena (Ejemplo 2). Tal como predice, cepas con *NNT1* adicional mostraron un silenciamiento incrementado, similar a las cepas con *PNC1*²³ adicional. Concluyeron que el período de vida, la resistencia al estrés y la actividad de Sir2 pueden ser regulados mediante cambios en la nicotinamida intracelular y los niveles de *NNT1*. Es digno de señalar que a pesar de que *NNT1* puede mimetizar los fenotipos de *PNC1*, a diferencia de *PNC1* su expresión no es modulada, aparentemente, por estímulos que prolongan el período de vida²⁵.

Los autores de la invención han identificado *PNC1* como un gen que responde a la restricción de calorías y al estrés, que aumenta el período de vida y la resistencia al estrés de células agotando nicotinamida intracelular (Figura 21B). Demostraron que la prolongación del período de vida mediante la restricción de calorías es el resultado de una respuesta de defensa celular activa por parte de un gen regulador específico. Una característica atractiva de este mecanismo es que no se basa en la modulación de NAD⁺, un cofactor esencial implicado en la homeostasis celular.

Los autores de la invención no conocen todavía la forma en que un gen implicado en el metabolismo de nicotinamida confiere resistencia a numerosos estrés agudos. Presumiblemente, los beneficios de Pnc1 incrementado se producen a un coste evolutivo, pero todavía tienen que identificar cualquier desventaja selectiva.

5 Tanto los resultados del estrés como de localización implican la existencia de múltiples efectores regulados por nicotinamida. Basado en la enzimología de la inhibición de Sir2 por parte de nicotinamida (Ejemplo 2 y ³⁴), proteínas que escinden NAD⁺ en una reacción en dos etapas son candidatos verosímiles. Ejemplos incluyen los homólogos de Sir2 (Hst1-4) y Tpt1, una 2'-fosfotransferasa NAD⁺-dependiente que facilita la respuesta de 10 proteínas no plegadas³⁵. El perfil de expresión de células con metabolismo de nicotinamida alterado debería ayudar a identificar estos efectores y las vías situadas aguas debajo de la resistencia al estrés.

En mamíferos existe evidencia de un enlace entre el metabolismo de nicotinamida y la resistencia al estrés. Poli(adenosina difosfato-ribosa) polimerasa-1 (PARP) es una enzima nuclear que escinde en NAD⁺ para fijar de manera covalente pol(ADP-ribosa) a proteínas aceptoras. Esta reacción de dos etapas genera nicotinamida que ejerce un efecto inhibidor sobre PARP-1, permitiendo la autorregulación³⁶. Enzimas PARP han sido implicadas en numerosas funciones celulares, que incluyen reparación de la rotura de ADN, regulación de la longitud de telómeros, modificación de histonas y la regulación del nivel transcripcional de proteínas clave incluidas ICAM-1 y óxido nítrico sintasa³⁶. Los resultados de los autores de la invención sugieren que enzimas PARP podrían ser reguladas por el metabolismo de nicotinamida como parte de una respuesta general al estrés. La nicotinamida inhibe también *SIRT1* humana tanto *in vitro* (Ejemplo 2) como *in vivo*¹⁷. *SIRT1* controla negativamente la actividad de p53, indicando que los niveles de nicotinamida pueden regular la apoptosis y la reparación del ADN^{17,18}. Consistente con esto, la expresión de NNMT en células humanas y tejidos se correlaciona con la tumorigénesis³⁷ y la radiorresistencia³⁸.

25 Ejemplo Comparativo 9: Materiales y métodos para los Ejemplos 4-8

Medios y cepas: todas las cepas se hicieron crecer a 30°C en medio completo (YPD) con glucosa al 2,0% (p/v), excepto en los casos en los que se establezca de otro modo. En todos los experimentos, los autores de la invención se aseguraron que los marcadores auxotróficos estuviesen apareados entre cepas, integrando un vector vacío. Todas las delecciones se generaron utilizando una técnica basada en PCR kanMX6³⁹ y confirmada por PCR. Copias adicionales de *PNC1* se integraron tal como se describe previamente²³. El marco de lectura abierta completa y 700 bases de la secuencia de *NNT1* situada aguas arriba (*YLR285w*) se clonaron a partir de ADN genómico a partir de PCR en pSP400⁴⁰, se secuenciaron e integraron en el genoma de las levaduras tal como se describe previamente²³. El número de copias de genes integrados se determinó mediante transferencia Southern.

35 Una casete de GFP se introdujo en marco en el extremo 3' del gen *PNC1* nativo tal como se describe previamente³⁹. El plásmido RFP-PTS1 (pSR421) fue una donación de S. J. Gould (Johns Hopkins U.). Cepas derivadas de PSY316AT se utilizaron para el análisis del período de vida y los ensayos de resistencia al estrés. Cepas derivadas de PSY316AT (*MATα, ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 ade2-1,01 can1-100 ADE2-TEL V-R*: *pnc1Δ* (YDS1741), *sir2Δ* (YDS1750), 5x*PNC1* (YDS1853), 5x*PNC1 sir2Δ* (YDS1851), *pnc1Δ sir2Δ* (YDS1853)).

40 Cepas derivadas de W303 se utilizaron para el análisis de transferencia Western, la microscopía de fluorescencia y los ensayos de silenciamiento dependientes de *SIR2*. Cepas derivadas de W303 (*MATα, ade2-1, leu2-3,112, can1-100, trp1-1, ura3-52, his3-11,15, RDN1::ADE2, RAD5*) incluyen: *PNC1-GFP* (YDS1742), *pnc1Δ* (YDS1911), *unt1Δ* (YDS1747), 2x*PNC1* (YDS1588), 2x*NNT1* (YDS1926), *ADE2* (YDS 1596). Las cepas siguientes se derivaron de *PNC1-GFP* (YDS1742): *bna6Δ* (YDS1857), pSG421 (YDS1916), *pex6Δ* (YDS1869), *pex5Δ* (YDS1870) y *pex7Δ* (YDS1871). La cepa *cdc25-10* era una donación de L Guarente (M.I.T.).

45 Los ensayos de levaduras se realizaron como sigue. Las mediciones del período de vida se realizaron tal como se describe previamente²³, excepto para los experimentos de estrés térmico, en donde las cepas se incubaron después de cada disección a 37°C. Los ensayos de resistencia al estrés se realizaron utilizando células en fase logarítmica media. El silenciamiento se ensayó tal como se describe previamente²³.

50 Análisis de expresión de proteínas se realizaron como sigue: las cepas se trataron previamente bajo las condiciones indicadas y se hicieron crecer hasta fase logarítmica media. Se realizaron transferencias Western según se describe²³ utilizando extractos de células enteras (75 µg). Las proteínas se detectaron utilizando anticuerpos anti-GFP (Santa Cruz) o anticuerpos anti-actina (Chemicon). Las imágenes de microscopía fluorescente se capturaron a la misma exposición (1 s) a un aumento de 100x con una cámara Hamamatsu Orca100 CCD y se procesaron con el software Openlab.

El ensayo de la actividad de nicotinamidasa se realizó como sigue. La actividad de Pnc1 en extractos obtenidos de cultivos en fase logarítmica media previamente tratados se determinó como se describe previamente⁴¹. En síntesis, 0,16 mg de proteína se incubaron con nicotinamida 0 u 8 mM durante 45 min a 30°C en un volumen final de 400 µl que consistía en Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM y MgCl₂ 1 mM. La actividad de Pnc1 se determinó midiendo la 5 concentración final del producto de reacción, amoníaco, utilizando el kit de diagnóstico de amoníaco de Sigma. El amoníaco de la línea base se justificó sustrayendo un testigo sin nicotinamida. La actividad de nicotinamidasa se expresó como nmol de amoníaco producido/min/mg de proteína total. La actividad de Pnc1 se obtuvo sustrayendo el valor de fondo para la cepa *pnc1Δ* (0,06 ± 0,004 mmol/min/mg).

10 Referencias para los Ejemplos 4-9:

1. Masoro, E. J. Exp Gerontol 35, 299-305. (2000).
2. Masoro, E. J. Exp Gerontol 33, 61-6. (1998).
3. Kirkwood, T. B. y Holliday, R. Proc R Soc Lond B Biol Sci 205, 531-46. (1979).
4. Holliday, R. Food Bioessays 10, 125-7. (1989).
5. Kenyon, C. Cell 105, 165-168 (2001).
15. Guarante, L. y Kenyon, C. Nature 408, 255-62. (2000).
7. Kaeberlein, M. y Guarante, Genetics 160, 83-95. (2002).
8. Jiang et al. Faseb J 14, 2135-7. (2000).
9. Swiecilo et al. Acta Biochim Pol 47, 355-64 (2000).
20. 10. Sinclair, D. A. Mech Ageing Dev en prensa. (2002).
11. Moazed, D. Curr Opin Cell Biol 13, 232-8. (2001).
12. Lin et al. Science 289, 2126-8. (2000).
13. Kaeberlein et al. Genes Dev 13, 2570-80. (1999).
14. Sinclair, D. A. y Guarante, L. Cell 91, 1033-42. (1997).
25. 15. Tissenbaum, H. A. y Guarante, L. Nature 410, 227-30. (2001).
16. Rogina et al. Science, en prensa (2002).
17. Vaziri, H. et al. Cell 107, 149-59. (2001).
18. Luo, J. et al. Cell 107, 137-48. (2001).
19. Smith, J. S. et al. Proc Natl Acad Sci USA 97, 6658-63. (2000).
30. 20. Imai et al. Nature 403, 795-800 (2000).
21. Tanny, J. C. y Moazed, D. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 415-20. (2001).
22. Landry, J. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 5807-11. (2000).
23. Anderson, R. M. et al. J Biol Chem 277, 18881-90. (2002).
24. Bitterman et al. J. Biol. Chem. in press (2002).
35. 25. Gasch, A. P. et al. Mol Biol Cell 11, 4241-57. (2000).
26. Betz et al. Eur J Biochem 269, 4033-9. (2002).
27. Melov, S. Ann N Y Acad Sci 908, 219-25. (2000).
28. Masters, C. J. y Crane, D. I. Mech Ageing Dev 80, 69-83. (1995).
29. Perichon et al. Cell Mol Life Sci 54, 641-52. (1998).
40. 30. Aksoy et al. J Biol Chem 269, 14835-40. (1994).
31. Matsubara et al. Neurotoxicol Teratol 24, 593. (2002).
32. Niewmierzycka, A. y Clarke, S. J. Biol Chem 274, 814-24. (1999).
33. Sandmeier et al. Genetics 160, 877-89. (2002).
34. Landry et al. Biochem Biophys Res Commun 278, 685-90. (2000).
45. 35. Spinelli et al. J Biol Chem 274, 2637-44. (1999).
36. Virag, L. y Szabo, C. Pharmacol Rev 54, 375-429. (2002).
37. Lal, A. et al. Cancer Res 59, 5403-7. (1999).
38. Kassem et al. Int J Cancer 101, 454-60. (2002).
39. Longtine, M. S. et al. Yeast 14, 953-61. (1998).
50. 40. Mills et al. Cell 97, 609-20. (1999).
41. Ghislain et al. Yeast 19, 215-224. (2002).

55 **Ejemplo Comparativo 10: Nicotinamida metiltransferasa (NMNAT) humana confiere resistencia a la radiación en células humanas**

NMNAT (BC2.1.1.1; número de registro CAS 9029-74-7), a la que también se alude como nicotinamida N-metiltransferasa, es una enzima que cataliza la reacción S-adenosil-L-metionina + nicotinamida = S-adenosil-L-homocisteína + 1-metilnicotinamida (véase también Cantoni (1951) J. Biol Chem. 203-216). Se encontró que la sobre-expresión de NMNAT humana en células humanas radiosensibles aumenta la radiorresistencia de las

células.

Ejemplo Comparativo 11: Los niveles de PBEF están supra-regulados en el suero de ratas durante la restricción calórica

Este ejemplo describe que PBEF está presente en niveles mayores en el suero de ratas sometidas a restricción calórica.

Ratas Fischer-344 (F344) machos se reprodujeron y criaron en un vivario en el Gerontology Research Center (GRC, Baltimore, MD). A partir del destete (2 semanas), las ratas se alojaron individualmente en jaulas de plástico estándares con un lecho de virutas de madera beta. Los animales testigo se alimentaron con una dieta estándar NIH-31 ad libitum (AL). A un mes de edad, los animales a los que se les restringieron calorías (CR) fueron provistos de una versión reforzada con vitaminas y minerales de la misma dieta a un nivel de un 40% menos de alimentos (en peso) que consumían las ratas AL durante la semana previa. Agua filtrada y acidificada estaba disponible AL para ambos grupos. El vivario se mantuvo a una temperatura de 25°C, con una humedad relativa del 50% en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h (luces encendidas a las 6.00 a.m.). Todo el suero se obtuvo de animales anestesiados a los que se había sometido a ayunas. Las ratas fueron anestesiadas y un catéter de calibre 21 se insertó en la vena de la cola. Después se recogieron 1,5 ml de sangre entera que se dejó coagular (20-30 min), y luego se centrifugó durante 20 min a 2500 rpm. El suero procedente de muestras AL o CR se retiró de la centrifuga y se mezcló. Se analizaron dos agrupaciones diferentes de suero AL y dos agrupaciones diferentes de suero CR. Dos microlitros de suero procedente de cada una de las muestras agrupadas se desnaturizó hirviendo durante 5 minutos en tampón de muestra que contenía SDS y luego se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon™-P, Sigma, P2938), que subsiguientemente fue bloqueada durante 1 hora a la temperatura ambiente utilizando leche desgrasada seca al 5% en TBST. Los borrones fueron sondados utilizando una dilución 1:1000 de anticuerpos monoclonales o policlonales NAMPRT (del Dr. Oberdan Leo) en leche al 0,5% en TBST durante 1 hora a la temperatura ambiente. Después de tres lavados durante 5 minutos en TBST, los borrones se sondearon con los anticuerpos secundarios apropiados conjugados a peroxidasa de rábano picante (Anti-ratón NA931V de Amersham Biosciences o Anti-conejo G21234 de Molecular Probes) en leche al 0,5% en TBST. Después de tres lavados durante 10 minutos en TBST, los borrones se visualizaron mediante quimioluminiscencia utilizando reactivos ECL (Amersham Biosciences, RPN2105) y se detectaron con una película de rayos X (Kodak BioMax XAR, 651454).

Los resultados se muestran en la Figura 22, que muestra niveles mayores de NAMPRT en suero procedente de ratas a las que se restringió calorías.

Ejemplo Comparativo 12: Niveles de PBEF se supran-regulan en respuesta a condiciones de estrés

Este ejemplo demuestra que PBEF es supra-regulado por la inanición de suero y el estrés oxidativo en células MEF y en cardiomiositos mediante inanición de suero e hipoxia.

Cardiomiositos se prepararon a partir de ratas de 1 a 2 días de edad, mediante el uso del Sistema de Aislamiento de Cardiomiositos Neonatales (Worthington Biochemical Corp) y se cultivaron en placas de Petri de 60 mm con medio RPMI 1640 que contenía FCS al 5% y suero de caballo (HS) al 10% durante 72 horas. Despues se retiró el medio y se reemplazó por medio con o sin suero. Para la hipoxia, las células se colocaron en una caja hermética al aire a 37°C, saturada con 95% de N₂/5% de CO₂ durante 18 horas. Las concentraciones de O₂ eran 0,1% (monitor de oxígeno Ohmeda, tipo 5120). Para la normoxia, las células se colocaron en una incubadora a 37°C/5% de CO₂ durante 18 horas antes de la recolección.

MEFs se generaron a partir de embriones de 13,5 días de edad de ratones preñados según se describe previamente (Razani et al., 2001). Las células testigo MEF se cultivaron en DMEM suplementado con FCS al 10%, penicilina al 1%/estreptomicina/fungizona al 0,5% durante 24 horas. Para desproveer de alimentos a las células, las MEFs se lavaron con PBS y se cultivaron en DMEM que contenía BSA al 2%, penicilina al 1%/estreptomicina/fungizona al 0,5% durante 24 horas. Células bajo tratamiento de estrés oxidativo adicional se cultivaron en el mismo medio que contenía 150 micromoles de H₂O₂ durante 1 ó 3 horas antes de la recolección.

Los resultados que se muestran en las Figuras 23 y 24 indican que NAMPRT estuvo supra-regulada por inanición de suero, estrés oxidativo e hipoxia.

Ejemplo Comparativo 13: La transcripción de PBEF se supra-regula sometiendo a ayunas a ratones *in vivo*

Ocho ratones machos Sprague-Dawley, cuatro por cada grupo (testigo frente a ratones en ayunas) se utilizaron para comparar la regulación del gen NAMPRT mediante ayuno. Los ratones testigo se alimentaron ad libitum con una dieta de sacarosa al 78% preparada por parte de Research Diets. Los ratones experimentales se sometieron a 5 ayuno durante 48 horas antes de ser sacrificados. Tejidos del hígado recientes se separaron, se cortaron en trozos pequeños y se empaparon en reactivo DNAlater y se almacenaron a 4°C hasta comenzar la preparación de ARN.

El ARN total se aisló del tejido mediante trizol (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. 1 µg de ARN se utilizó como molde para la transcripción inversa en ADNc. Una PCR en tiempo real se 10 llevó a cabo en el dispositivo LightCycler RT-PCR (Roche Molecular Biochemicals) utilizando el colorante verde SYBR LightCycler DNA Master no específico para vigilar el producto de la PCR. Las copias de ARNm de NAMPRT relativas se normalizaron con las de β-actina. Los cebadores utilizados para amplificar el fragmento NAMPRT eran:

15 AAATCCGCTCGACACTGTCCCTGAA (SEQ ID NO: 23)
TTGGGATCAGCAACTGGGTCTTA (SEQ ID NO: 24).

Los cebadores utilizados para amplificar el fragmento de β-actina eran.

20 TTCCTCCCTGGAGAAGAGCTATGA (SEQ ID NO: 25)
TACTCCTGTTGCTGATCCACATC (SEQ ID NO: 26).

Los resultados que se muestran en la Figura 25 demuestran que la transcripción de NAMPRT está supra-regulada en ratones en ayunas con relación a ratones no en ayunas.

25

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SINCLAIR, DAVID A.
 BITTERMAN, KEVIN J.

5 <120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA PROLONGAR EL PERÍODO DE VIDA Y AUMENTAR LA
 RESISTENCIA AL ESTRÉS DE CÉLULAS Y ORGANISMOS

<130> HMV-085.01

10 <140> 11/053.185
 <141> 08-02-2005

<160> 49

15 <170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1
 <211> 1290
 <212> ADN
 20 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)....(1290)

25 <400> 1

<code>atg tca gaa cca gtg ata aag tct ctt ttg gac aca gac atg tac aag</code> <code>Met Ser Glu Pro Val Ile Lys Ser Leu Leu Asp Thr Asp Met Tyr Lys</code> <code>1 5 10 15</code>	48
<code>att acg atg cat gct gtc ttc act aat ttt cca gat gtt aca gtt</code> <code>Ile Thr Met His Ala Ala Val Phe Thr Asn Phe Pro Asp Val Thr Val</code> <code>20 25 30</code>	96
<code>act tat aaa tat acc aac agg tcg tcc caa ttg acc ttc aat aag gaa</code> <code>Thr Tyr Lys Tyr Thr Asn Arg Ser Ser Gln Leu Thr Phe Asn Lys Glu</code> <code>35 40 45</code>	144
<code>gcc att aat tgg ttg aaa gag caa ttt tcg tat ttg gga aat ttg agg</code> <code>Ala Ile Asn Trp Leu Lys Glu Gln Phe Ser Tyr Leu Gly Asn Leu Arg</code> <code>50 55 60</code>	192
<code>tcc aca gaa gag gaa att gaa tac tta aaa cag gaa atc cca tat ttg</code> <code>Phe Thr Glu Glu Glu Ile Glu Tyr Leu Lys Gln Glu Ile Pro Tyr Leu</code> <code>65 70 75 80</code>	240
<code>cca tcg gca tat att aag tat att agc agt tct aat tac aaa cta cac</code> <code>Pro Ser Ala Tyr Ile Lys Tyr Ile Ser Ser Ser Asn Tyr Lys Leu His</code> <code>85 90 95</code>	288
<code>cct gaa gag cag att tcc ttc act tca gaa gaa atc gag ggc aag ccc</code> <code>Pro Glu Glu Gln Ile Ser Phe Thr Ser Glu Glu Ile Glu Gly Lys Pro</code> <code>100 105 110</code>	336

ES 2 401 342 T3

acc cac tac aaa ttg aaa att tta gtc agt ggt agt tgg aag gat act	384
Thr His Tyr Lys Leu Lys Ile Leu Val Ser Gly Ser Trp Lys Asp Thr	
115 120 125	
atc ctt tat gag atc ccc tta ctg tcc cta ata tca gaa gcg tat ttt	432
Ile Leu Tyr Glu Ile Pro Leu Leu Ser Leu Ile Ser Glu Ala Tyr Phe	
130 135 140	
aaa ttt gtt gac atc gac tgg gac tac gaa aac caa tta gaa caa gct	480
Lys Phe Val Asp Ile Asp Trp Asp Tyr Glu Asn Gln Leu Glu Gln Ala	
145 150 155 160	
gag aag aag gcg gaa act ttg ttt gat aat ggt att aga ttc agt gaa	528
Glu Lys Lys Ala Glu Thr Leu Phe Asp Asn Gly Ile Arg Phe Ser Glu	
165 170 175	
ttt ggt aca aga cgt cgt aga tct ctg aag gct caa gat cta att atg	576
Phe Gly Thr Arg Arg Arg Ser Leu Lys Ala Gln Asp Leu Ile Met	
180 185 190	
caa gga atc atg aaa gct gtg aac ggt aac cca gac aga aac aaa tcg	624
Gln Gly Ile Met Lys Ala Val Asn Gly Asn Pro Asp Arg Asn Lys Ser	
195 200 205	
cta tta tta ggc aca tca aat att tta ttt gcc aag aaa tat gga gtc	672
Leu Leu Leu Gly Thr Ser Asn Ile Leu Phe Ala Lys Lys Tyr Gly Val	
210 215 220	
aag cca atc ggt act gtg gct cac gag tgg gtt atg gga gtc gct tct	720
Lys Pro Ile Gly Thr Val Ala His Glu Trp Val Met Gly Val Ala Ser	
225 230 235 240	
att agt gaa gat tat ttg cat gcc aat aaa aat gca atg gat tgt tgg	768
Ile Ser Glu Asp Tyr Leu His Ala Asn Lys Asn Ala Met Asp Cys Trp	
245 250 255	
atc aat act ttt ggt gca aaa aat gct ggt tta gca tta acg gat act	816
Ile Asn Thr Phe Gly Ala Lys Asn Ala Gly Leu Ala Leu Thr Asp Thr	
260 265 270	
ttt gga act gat gac ttt tta aaa tca ttc cgt cca cca tat tct gat	864
Phe Gly Thr Asp Asp Phe Leu Lys Ser Phe Arg Pro Pro Tyr Ser Asp	
275 280 285	
gct tac gtc ggt gtt aga caa gat tct gga gac cca gtt gag tat acc	912
Ala Tyr Val Gly Val Arg Gln Asp Ser Gly Asp Pro Val Glu Tyr Thr	
290 295 300	
aaa aag att tcc cac cat tac cat gac gtg ttg aaa ttg cct aaa ttc	960
Lys Lys Ile Ser His His Tyr His Asp Val Leu Lys Leu Pro Lys Phe	
305 310 315 320	
tcg aag att atc tgt tat tcc gat tct ttg aac gtc gaa aag gca ata	1008
Ser Lys Ile Ile Cys Tyr Ser Asp Ser Leu Asn Val Glu Lys Ala Ile	
325 330 335	
act tac tcc cat gca gct aaa gag aat gga atg cta gcc aca ttc ggt	1056

ES 2 401 342 T3

Thr Tyr Ser His Ala Ala Lys Glu Asn Gly Met Leu Ala Thr Phe Gly			
340	345	350	
att ggc aca aac ttt act aat gat ttt cgt aag aag tca gaa ccc cag Ile Gly Thr Asn Phe Thr Asn Asp Phe Arg Lys Lys Ser Glu Pro Gln			1104
355	360	365	
gtt aaa agt gag ccg tta aac atc gtt atc aaa cta tta gaa gta aat Val Lys Ser Glu Pro Leu Asn Ile Val Ile Lys Leu Leu Glu Val Asn			1152
370	375	380	
ggt aat cac gct atc aaa att tct gat aac tta ggt aaa aat atg gga Gly Asn His Ala Ile Lys Ile Ser Asp Asn Leu Gly Lys Asn Met Gly			1200
385	390	395	400
gat cct gcc act gtg aag aga gtg aaa gag gaa ttg gga tat act gaa Asp Pro Ala Thr Val Lys Arg Val Lys Glu Glu Leu Gly Tyr Thr Glu			1248
405	410	415	
cga agt tgg agt ggt gat aac gaa gcg cac aga tgg acc taa Arg Ser Trp Ser Gly Asp Asn Glu Ala His Arg Trp Thr			1290
420	425		
<210> 2			
<211> 429			
<212> PRT			
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
<400> 2			
Met Ser Glu Pro Val Ile Lys Ser Leu Leu Asp Thr Asp Met Tyr Lys			
1	5	10	15
Ile Thr Met His Ala Ala Val Phe Thr Asn Phe Pro Asp Val Thr Val			
20	25	30	
Thr Tyr Lys Tyr Thr Asn Arg Ser Ser Gln Leu Thr Phe Asn Lys Glu			
35	40	45	
Ala Ile Asn Trp Leu Lys Glu Gln Phe Ser Tyr Leu Gly Asn Leu Arg			
50	55	60	
Phe Thr Glu Glu Glu Ile Glu Tyr Leu Lys Gln Glu Ile Pro Tyr Leu			
65	70	75	80
Pro Ser Ala Tyr Ile Lys Tyr Ile Ser Ser Ser Asn Tyr Lys Leu His			
85	90	95	
Pro Glu Glu Gln Ile Ser Phe Thr Ser Glu Glu Ile Glu Gly Lys Pro			
100	105	110	
Thr His Tyr Lys Leu Lys Ile Leu Val Ser Gly Ser Trp Lys Asp Thr			
115	120	125	
Ile Leu Tyr Glu Ile Pro Leu Leu Ser Leu Ile Ser Glu Ala Tyr Phe			
130	135	140	

ES 2 401 342 T3

Lys Phe Val Asp Ile Asp Trp Asp Tyr Glu Asn Gln Leu Glu Gln Ala
 145 150 155 160
 Glu Lys Lys Ala Glu Thr Leu Phe Asp Asn Gly Ile Arg Phe Ser Glu
 165 170 175
 Phe Gly Thr Arg Arg Arg Ser Leu Lys Ala Gln Asp Leu Ile Met
 180 185 190
 Gln Gly Ile Met Lys Ala Val Asn Gly Asn Pro Asp Arg Asn Lys Ser
 195 200 205
 Leu Leu Leu Gly Thr Ser Asn Ile Leu Phe Ala Lys Lys Tyr Gly Val
 210 215 220
 Lys Pro Ile Gly Thr Val Ala His Glu Trp Val Met Gly Val Ala Ser
 225 230 235 240
 Ile Ser Glu Asp Tyr Leu His Ala Asn Lys Asn Ala Met Asp Cys Trp
 245 250 255
 Ile Asn Thr Phe Gly Ala Lys Asn Ala Gly Leu Ala Leu Thr Asp Thr
 260 265 270
 Phe Gly Thr Asp Asp Phe Leu Lys Ser Phe Arg Pro Pro Tyr Ser Asp
 275 280 285

 Ala Tyr Val Gly Val Arg Gln Asp Ser Gly Asp Pro Val Glu Tyr Thr
 290 295 300
 Lys Lys Ile Ser His His Tyr His Asp Val Leu Lys Leu Pro Lys Phe
 305 310 315 320
 Ser Lys Ile Ile Cys Tyr Ser Asp Ser Leu Asn Val Glu Lys Ala Ile
 325 330 335
 Thr Tyr Ser His Ala Ala Lys Glu Asn Gly Met Leu Ala Thr Phe Gly
 340 345 350
 Ile Gly Thr Asn Phe Thr Asn Asp Phe Arg Lys Lys Ser Glu Pro Gln
 355 360 365
 Val Lys Ser Glu Pro Leu Asn Ile Val Ile Lys Leu Leu Glu Val Asn
 370 375 380
 Gly Asn His Ala Ile Lys Ile Ser Asp Asn Leu Gly Lys Asn Met Gly
 385 390 395 400
 Asp Pro Ala Thr Val Lys Arg Val Lys Glu Glu Leu Gly Tyr Thr Glu
 405 410 415
 Arg Ser Trp Ser Gly Asp Asn Glu Ala His Arg Trp Thr
 420 425

ES 2 401 342 T3

<210> 3
 <211> 651
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(651)

<400> 3
 atg aag act tta att gtt gtt gat atg caa aat gat ttt att tca cct 48
 Met Lys Thr Leu Ile Val Val Asp Met Gln Asn Asp Phe Ile Ser Pro
 1 5 10 15

tta ggt tcc ttg act gtt cca aaa ggt gag gaa tta atc aat cct atc 96
 Leu Gly Ser Leu Thr Val Pro Lys Gly Glu Glu Leu Ile Asn Pro Ile
 20 25 30

tcg gat ttg atg caa gat gct gat aga gac tgg cac agg att gtg gtc 144
 Ser Asp Leu Met Gln Asp Ala Asp Arg Asp Trp His Arg Ile Val Val
 35 40 45

acc aga gat tgg cac cct tcc aga cat att tcg ttc gca aag aac cat 192
 Thr Arg Asp Trp His Pro Ser Arg His Ile Ser Phe Ala Lys Asn His
 50 55 60

aaa gat aaa gaa ccc tat tca aca tac acc tac cac tct cca agg cca 240
 Lys Asp Lys Glu Pro Tyr Ser Thr Tyr Thr His Ser Pro Arg Pro
 65 70 75 80

ggc gat gat tcc acg caa gag ggt att ttg tgg ccc gta cac tgt gtg 288
 Gly Asp Asp Ser Thr Gln Glu Gly Ile Leu Trp Pro Val His Cys Val
 85 90 95

aaa aac acc tgg ggt agt caa ttg gtt gac caa ata atg gac caa gtg 336
 Lys Asn Thr Trp Gly Ser Gln Leu Val Asp Gln Ile Met Asp Gln Val
 100 105 110

gtc act aag cat att aag att gtc gac aag ggt ttc ttg act gac cgt 384
 Val Thr Lys His Ile Lys Ile Val Asp Lys Gly Phe Leu Thr Asp Arg
 115 120 125

gaa tac tac tcc gcc ttc cac gac atc tgg aac ttc cat aag acc gac 432
 Glu Tyr Tyr Ser Ala Phe His Asp Ile Trp Asn Phe His Lys Thr Asp
 130 135 140

atg aac aag tac tta gaa aag cat cat aca gac gag gtt tac att gtc 480
 Met Asn Lys Tyr Leu Glu Lys His His Thr Asp Glu Val Tyr Ile Val
 145 150 155 160

ggt gta gct ttg gag tat tgt gtc aaa gcc acc gcc att tcc gct gca 528
 Gly Val Ala Leu Glu Tyr Cys Val Lys Ala Thr Ala Ile Ser Ala Ala
 165 170 175

gaa cta ggt tat aag acc act gtc ctg ctg gat tac aca aga ccc atc 576
 Glu Leu Gly Tyr Lys Thr Thr Val Leu Leu Asp Tyr Thr Arg Pro Ile
 180 185 190

ES 2 401 342 T3

agc gat gat ccc gaa gtc atc aat aag gtt aag gaa gag ttg aag gcc 624
 Ser Asp Asp Pro Glu Val Ile Asn Lys Val Lys Glu Glu Leu Lys Ala
 195 200 205

 cac aac atc aat gtc gtg gat aaa taa 651
 His Asn Ile Asn Val Val Asp Lys
 210 215

 <210> 4
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

 <400> 4
 Met Lys Thr Leu Ile Val Val Asp Met Gln Asn Asp Phe Ile Ser Pro
 1 5 10 15

 Leu Gly Ser Leu Thr Val Pro Lys Gly Glu Glu Leu Ile Asn Pro Ile
 20 25 30

 Ser Asp Leu Met Gln Asp Ala Asp Arg Asp Trp His Arg Ile Val Val
 35 40 45

 Thr Arg Asp Trp His Pro Ser Arg His Ile Ser Phe Ala Lys Asn His
 50 55 60

 Lys Asp Lys Glu Pro Tyr Ser Thr Tyr Thr Tyr His Ser Pro Arg Pro
 65 70 75 80

 Gly Asp Asp Ser Thr Gln Glu Gly Ile Leu Trp Pro Val His Cys Val
 85 90 95

 Lys Asn Thr Trp Gly Ser Gln Leu Val Asp Gln Ile Met Asp Gln Val
 100 105 110

 Val Thr Lys His Ile Lys Ile Val Asp Lys Gly Phe Leu Thr Asp Arg
 115 120 125

 Glu Tyr Tyr Ser Ala Phe His Asp Ile Trp Asn Phe His Lys Thr Asp
 130 135 140

 Met Asn Lys Tyr Leu Glu Lys His His Thr Asp Glu Val Tyr Ile Val
 145 150 155 160

 Gly Val Ala Leu Glu Tyr Cys Val Lys Ala Thr Ala Ile Ser Ala Ala
 165 170 175

 Glu Leu Gly Tyr Lys Thr Thr Val Leu Leu Asp Tyr Thr Arg Pro Ile
 180 185 190

 Ser Asp Asp Pro Glu Val Ile Asn Lys Val Lys Glu Glu Leu Lys Ala
 195 200 205

 His Asn Ile Asn Val Val Asp Lys
 210 215

ES 2 401 342 T3

```

<210> 5
<211> 1206
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1206)

<400> 5
atg gat ccc aca aga gct ccg gat ttc aaa ccg cca tct gca gac gag 48
Met Asp Pro Thr Arg Ala Pro Asp Phe Lys Pro Pro Ser Ala Asp Glu
    1           5           10          15

gaa ttg att cct cca ccc gac ccg gaa tct aaa att ccc aaa tct att 96
Glu Leu Ile Pro Pro Pro Asp Pro Glu Ser Lys Ile Pro Lys Ser Ile
    20          25          30

cca att att cca tac gtc tta gcc gat gcg aat tcc tct ata gat gca 144
Pro Ile Ile Pro Tyr Val Leu Ala Asp Ala Asn Ser Ser Ile Asp Ala
    35          40          45

cct ttt aat att aag agg aag aaa aag cat cct aag cat cat cat cac 192
Pro Phe Asn Ile Lys Arg Lys Lys Lys His Pro Lys His His His His
    50          55          60

cat cat cac agt cgt aaa gaa ggc aat gat aaa aaa cat cag cat att 240
His His His Ser Arg Lys Glu Gly Asn Asp Lys Lys His Gln His His Ile
    65          70          75          80

cca ttg aac caa gac gac ttt caa cca ctt tcc gca gaa gtg tct tcc 288
Pro Leu Asn Gln Asp Asp Phe Gln Pro Leu Ser Ala Glu Val Ser Ser
    85          90          95

gaa gat gat gac gcg gat ttt aga tcc aag gag aga tac ggt tca gat 336
Glu Asp Asp Asp Ala Asp Phe Arg Ser Lys Glu Arg Tyr Gly Ser Asp
    100         105         110

tca acc aca gaa tca gaa act aga ggt gtt cag aaa tat cag att gct 384
Ser Thr Glu Ser Glu Thr Arg Gly Val Gln Lys Tyr Gln Ile Ala
    115         120         125

gat tta gaa gaa gtt cca cat gga atc gtt cgt caa gca aga acc ttg 432
Asp Leu Glu Glu Val Pro His Gly Ile Val Arg Gln Ala Arg Thr Leu
    130         135         140

gaa gac tac gaa ttc ccc tca cac aga tta tcg aaa aaa tta ctg gat 480
Glu Asp Tyr Glu Phe Pro Ser His Arg Leu Ser Lys Lys Leu Leu Asp
    145         150         155         160

cca aat aaa ctg ccg tta gta ata gta gca tgt ggg tct ttt tca cca 528
Pro Asn Lys Leu Pro Leu Val Ile Val Ala Cys Gly Ser Phe Ser Pro
    165         170         175

```

ES 2 401 342 T3

atc acc tac ttg cat cta aga atg ttt gaa atg gct tta gat gca atc Ile Thr Tyr Leu His Leu Arg Met Phe Glu Met Ala Leu Asp Ala Ile 180	185	190	576	
tct gaa caa aca agg ttt gaa gtc ata ggt gga tat tac tcc cct gtt Ser Glu Gln Thr Arg Phe Glu Val Ile Gly Gly Tyr Tyr Ser Pro Val 195	200	205	624	
agt gat aac tat caa aag caa ggc ttg gcc cca tcc tac cat aga gta Ser Asp Asn Tyr Gln Lys Gln Gly Leu Ala Pro Ser Tyr His Arg Val 210	215	220	672	
cgt atg tgt gaa ttg gcc tgc gaa aga acc tca tct tgg ttg atg gtg Arg Met Cys Glu Leu Ala Cys Glu Arg Thr Ser Ser Trp Leu Met Val 225	230	235	240	720
gat gca tgg gag tca ttg caa cct tca tac aca aga act gcc aag gtc Asp Ala Trp Glu Ser Leu Gln Pro Ser Tyr Thr Arg Thr Ala Lys Val 245	250	255	768	
ttg gat cat ttc aat cac gaa atc aat att aag aga ggt ggt gta gct Leu Asp His Phe Asn His Glu Ile Asn Ile Lys Arg Gly Gly Val Ala 260	265	270	816	
act gtt act gga gaa aaa att ggt gtg aaa ata atg ttg ctg gct ggt Thr Val Thr Gly Glu Lys Ile Gly Val Lys Ile Met Leu Leu Ala Gly 275	280	285	864	
ggt gac cta ata gag tca atg ggt gaa cca aac gtt tgg gcg gac gcc Gly Asp Leu Ile Glu Ser Met Gly Glu Pro Asn Val Trp Ala Asp Ala 290	295	300	912	
gat tta cat cac att ctc ggt aat tac ggt tgt ttg att gtc gaa cgt Asp Leu His His Ile Leu Gly Asn Tyr Gly Cys Leu Ile Val Glu Arg 305	310	315	320	960
act ggt tct gat gta agg tct ttt ttg tta tcc cat gat att atg tat Thr Gly Ser Asp Val Arg Ser Phe Leu Leu Ser His Asp Ile Met Tyr 325	330	335	1008	
gaa cat aga agg aat att ctt atc atc aag caa ctc atc tat aat gat Glu His Arg Arg Asn Ile Leu Ile Ile Lys Gln Leu Ile Tyr Asn Asp 340	345	350	1056	
att tct tcc acg aaa gtt cgt cta ttt atc aga cgc gcc atg tct gta Ile Ser Ser Thr Lys Val Arg Leu Phe Ile Arg Arg Ala Met Ser Val 355	360	365	1104	
caa tat ttg tta cct aat tcg gtc atc agg tat atc caa gaa cat aga Gln Tyr Leu Leu Pro Asn Ser Val Ile Arg Tyr Ile Gln Glu His Arg 370	375	380	1152	
cta tat gtg gac caa acc gaa cct gtt aag caa gtt ctt gga aac aaa Leu Tyr Val Asp Gln Thr Glu Pro Val Lys Gln Val Leu Gly Asn Lys 385	390	395	400	1200

ES 2 401 342 T3

gaa tga			1206													
Glu																
<210> 6																
<211> 401																
<212> PRT																
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>																
<400> 6																
Met	Asp	Pro	Thr	Arg	Ala	Pro	Asp	Phe	Lys	Pro	Pro	Ser	Ala	Asp	Glu	
1					5				10				15			
Glu	Leu	Ile	Pro	Pro	Pro	Asp	Pro	Glu	Ser	Lys	Ile	Pro	Lys	Ser	Ile	
	20					25				30						
Pro	Ile	Ile	Pro	Tyr	Val	Leu	Ala	Asp	Ala	Asn	Ser	Ser	Ile	Asp	Ala	
	35					40				45						
Pro	Phe	Asn	Ile	Lys	Arg	Lys	Lys	His	Pro	Lys	His	His	His	His	His	
	50					55				60						
His	His	His	Ser	Arg	Lys	Glu	Gly	Asn	Asp	Lys	Lys	His	Gln	His	Ile	
	65					70				75			80			
Pro	Leu	Asn	Gln	Asp	Asp	Phe	Gln	Pro	Leu	Ser	Ala	Glu	Val	Ser	Ser	
	85						90				95					
Glu	Asp	Asp	Asp	Ala	Asp	Phe	Arg	Ser	Lys	Glu	Arg	Tyr	Gly	Ser	Asp	
	100						105				110					
Ser	Thr	Thr	Glu	Ser	Glu	Thr	Arg	Gly	Val	Gln	Lys	Tyr	Gln	Ile	Ala	
	115					120				125						
Asp	Leu	Glu	Glu	Val	Pro	His	Gly	Ile	Val	Arg	Gln	Ala	Arg	Thr	Leu	
	130					135				140						
Glu	Asp	Tyr	Glu	Phe	Pro	Ser	His	Arg	Leu	Ser	Lys	Lys	Leu	Leu	Asp	
	145					150				155			160			
Pro	Asn	Lys	Leu	Pro	Leu	Val	Ile	Val	Ala	Cys	Gly	Ser	Phe	Ser	Pro	
	165						170				175					
Ile	Thr	Tyr	Leu	His	Leu	Arg	Met	Phe	Glu	Met	Ala	Leu	Asp	Ala	Ile	
	180					185				190						
Ser	Glu	Gln	Thr	Arg	Phe	Glu	Val	Ile	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Ser	Pro	Val	
	195					200				205						
Ser	Asp	Asn	Tyr	Gln	Lys	Gln	Gly	Leu	Ala	Pro	Ser	Tyr	His	Arg	Val	
	210					215				220						
Arg	Met	Cys	Glu	Leu	Ala	Cys	Glu	Arg	Thr	Ser	Ser	Trp	Leu	Met	Val	
	225					230				235			240			
Asp	Ala	Trp	Glu	Ser	Leu	Gln	Pro	Ser	Tyr	Thr	Arg	Thr	Ala	Lys	Val	

ES 2 401 342 T3

245	250	255
Leu Asp His Phe Asn His Glu Ile Asn Ile Lys Arg Gly Gly Val Ala		
260	265	270
Thr Val Thr Gly Glu Lys Ile Gly Val Lys Ile Met Leu Leu Ala Gly		
275	280	285
Gly Asp Leu Ile Glu Ser Met Gly Glu Pro Asn Val Trp Ala Asp Ala		
290	295	300
Asp Leu His His Ile Leu Gly Asn Tyr Gly Cys Leu Ile Val Glu Arg		
305	310	315
320		
Thr Gly Ser Asp Val Arg Ser Phe Leu Leu Ser His Asp Ile Met Tyr		
325	330	335
Glu His Arg Arg Asn Ile Leu Ile Ile Lys Gln Leu Ile Tyr Asn Asp		
340	345	350
Ile Ser Ser Thr Lys Val Arg Leu Phe Ile Arg Arg Ala Met Ser Val		
355	360	365
Gln Tyr Leu Leu Pro Asn Ser Val Ile Arg Tyr Ile Gln Glu His Arg		
370	375	380
Leu Tyr Val Asp Gln Thr Glu Pro Val Lys Gln Val Leu Gly Asn Lys		
385	390	395
400		
Glu		

<210> 7
<211> 1188
<212> DNA
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1188)

<400> 7		
atg gat ccc acc aaa gca ccc gat ttt aaa ccg cca cag cca aat gaa		48
Met Asp Pro Thr Lys Ala Pro Asp Phe Lys Pro Pro Gln Pro Asn Glu		
1	5	10
		15
gaa cta caa cca ccg cca gat cca aca cat acg ata cca aaa tct gga		96
Glu Leu Gln Pro Pro Asp Pro Thr His Thr Ile Pro Lys Ser Gly		
20	25	30
ccc ata gtt cca tat gtt tta gct gat tat aat tct tcg atc gat gct		144
Pro Ile Val Pro Tyr Val Leu Ala Asp Tyr Asn Ser Ser Ile Asp Ala		
35	40	45
cct ttc aat ctc gac att tac aaa acc ctg tcg tca agg aaa aaa aac		192
Pro Phe Asn Leu Asp Ile Tyr Lys Thr Leu Ser Ser Arg Lys Asn		

ES 2 401 342 T3

50	55	60	
gcc aac tca agc aac cga atg gac cat att cca tta aat act act agt gac Ala Asn Ser Ser Asn Arg Met Asp His Ile Pro Leu Asn Thr Ser Asp			240
65	70	75	80
ttc cag cca cta tct cgg gat gta tca tcg gag gag gaa agt gaa ggg Phe Gln Pro Leu Ser Arg Asp Val Ser Ser Glu Glu Glu Ser Glu Gly			288
85	90	95	
caa tcg aat gga att gac gct act cta cag gat gtt acg atg act ggg Gln Ser Asn Gly Ile Asp Ala Thr Leu Gln Asp Val Thr Met Thr Gly			336
100	105	110	
aat ttg ggg gta ctg aag agc caa att gct gat ttg gaa gaa gtt cct Asn Leu Gly Val Leu Lys Ser Gln Ile Ala Asp Leu Glu Glu Val Pro			384
115	120	125	
cac aca att gta aga caa gcc aga act att gaa gat tac gaa ttt cct His Thr Ile Val Arg Gln Ala Arg Thr Ile Glu Asp Tyr Glu Phe Pro			432
130	135	140	
gta cac aga ttg acg aaa aag tta caa gat cct gaa aaa ctg cct ctg Val His Arg Leu Thr Lys Lys Leu Gln Asp Pro Glu Lys Leu Pro Leu			480
145	150	155	160
atc atc gtt gct tgt gga tca ttt tct ccc ata aca tac cta cat ttg Ile Ile Val Ala Cys Gly Ser Phe Ser Pro Ile Thr Tyr Leu His Leu			528
165	170	175	
aga atg ttt gaa atg got tta gat gat atc aat gag caa acg cgt ttt Arg Met Phe Glu Met Ala Leu Asp Asp Ile Asn Glu Gln Thr Arg Phe			576
180	185	190	
gaa gtg gtt ggt tat ttt tct cca gta agt gat aac tat caa aag Glu Val Val Gly Gly Tyr Phe Ser Pro Val Ser Asp Asn Tyr Gln Lys			624
195	200	205	
cga ggg tta gcc cca gct tat cat cgt gtc cgc atg tgc gaa tta gca Arg Gly Leu Ala Pro Ala Tyr His Arg Val Arg Met Cys Glu Leu Ala			672
210	215	220	
tgc gag cgg aca tca tct tgg tta atg gtt gat gcc tgg gaa tct tta Cys Glu Arg Thr Ser Ser Trp Leu Met Val Asp Ala Trp Glu Ser Leu			720
225	230	235	240
caa tca agt tat aca agg aca gca aaa gtc ttg gac cat ttc aat cat Gln Ser Ser Tyr Thr Arg Thr Ala Lys Val Leu Asp His Phe Asn His			768
245	250	255	
gaa ata aat atc aag aga ggt gga atc atg act gta gat ggt gaa aaa Glu Ile Asn Ile Lys Arg Gly Gly Ile Met Thr Val Asp Gly Glu Lys			816
260	265	270	
atg ggc gta aaa atc atg tta ttg gca ggc ggt gat ctt atc gaa tcc Met Gly Val Lys Ile Met Leu Leu Ala Gly Gly Asp Leu Ile Glu Ser			864
275	280	285	

ES 2 401 342 T3

atg ggc gag cct cat gtg tgg gct gat tca gac ctg cac cat att ttg Met Gly Pro His Val Trp Ala Asp Ser Asp Leu His His Ile Leu 290 295 300	912
ggt aat tat gga tgt ttg atc gtg gaa agg act ggt tct gat gtt agg Gly Asn Tyr Gly Cys Leu Ile Val Glu Arg Thr Gly Ser Asp Val Arg 305 310 315 320	960
tcc ttc ttg ctt tcc cat gat atc atg tat gaa cac aga aga aat atc Ser Phe Leu Leu Ser His Asp Ile Met Tyr Glu His Arg Arg Asn Ile 325 330 335	1008
ctt att atc aaa caa ctt att tac aat gat att tcc tct acg aaa gtg Leu Ile Lys Gln Leu Ile Tyr Asn Asp Ile Ser Ser Thr Lys Val 340 345 350	1056
cgg ctt ttc atc aga cgt gga atg tca gtt caa tat ctt ctt cca aac Arg Leu Phe Ile Arg Arg Gly Met Ser Val Gln Tyr Leu Leu Pro Asn 355 360 365	1104
tct gtc atc cgt tac atc caa gag tat aat cta tac att aat caa agt Ser Val Ile Arg Tyr Ile Gln Glu Tyr Asn Leu Tyr Ile Asn Gln Ser 370 375 380	1152
gaa ccg gtc aag cag gtc ttg gat agc aaa gag tga Glu Pro Val Lys Gln Val Leu Asp Ser Lys Glu 385 390 395	1188
<210> 8	
<211> 395	
<212> PRT	
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<400> 8	
Met Asp Pro Thr Lys Ala Pro Asp Phe Lys Pro Pro Gln Pro Asn Glu 1 5 10 15	
Glu Leu Gln Pro Pro Pro Asp Pro Thr His Thr Ile Pro Lys Ser Gly 20 25 30	
Pro Ile Val Pro Tyr Val Leu Ala Asp Tyr Asn Ser Ser Ile Asp Ala 35 40 45	
Pro Phe Asn Leu Asp Ile Tyr Lys Thr Leu Ser Ser Arg Lys Lys Asn 50 55 60	
Ala Asn Ser Ser Asn Arg Met Asp His Ile Pro Leu Asn Thr Ser Asp 65 70 75 80	
Phe Gln Pro Leu Ser Arg Asp Val Ser Ser Glu Glu Glu Ser Glu Gly 85 90 95	
Gln Ser Asn Gly Ile Asp Ala Thr Leu Gln Asp Val Thr Met Thr Gly 100 105 110	

ES 2 401 342 T3

Asn	Leu	Gly	Val	Leu	Lys	Ser	Gln	Ile	Ala	Asp	Leu	Glu	Glu	Val	Pro
115								120						125	
His	Thr	Ile	Val	Arg	Gln	Ala	Arg	Thr	Ile	Glu	Asp	Tyr	Glu	Phe	Pro
130								135				140			
Val	His	Arg	Leu	Thr	Lys	Lys	Leu	Gln	Asp	Pro	Glu	Lys	Leu	Pro	Leu
145					150						155			160	
Ile	Ile	Val	Ala	Cys	Gly	Ser	Phe	Ser	Pro	Ile	Thr	Tyr	Leu	His	Leu
						165				170				175	
Arg	Met	Phe	Glu	Met	Ala	Leu	Asp	Asp	Ile	Asn	Glu	Gln	Thr	Arg	Phe
						180				185			190		
Glu	Val	Val	Gly	Gly	Tyr	Phe	Ser	Pro	Val	Ser	Asp	Asn	Tyr	Gln	Lys
					195				200			205			
Arg	Gly	Leu	Ala	Pro	Ala	Tyr	His	Arg	Val	Arg	Met	Cys	Glu	Leu	Ala
					210			215				220			
Cys	Glu	Arg	Thr	Ser	Ser	Trp	Leu	Met	Val	Asp	Ala	Trp	Glu	Ser	Leu
					225			230			235			240	
Gln	Ser	Ser	Tyr	Thr	Arg	Thr	Ala	Lys	Val	Leu	Asp	His	Phe	Asn	His
					245				250			255			
Glu	Ile	Asn	Ile	Lys	Arg	Gly	Gly	Ile	Met	Thr	Val	Asp	Gly	Glu	Lys
					260				265			270			
Met	Gly	Val	Lys	Ile	Met	Leu	Leu	Ala	Gly	Gly	Asp	Leu	Ile	Glu	Ser
					275			280				285			
Met	Gly	Glu	Pro	His	Val	Trp	Ala	Asp	Ser	Asp	Leu	His	His	Ile	Leu
					290			295			300				
Gly	Asn	Tyr	Gly	Cys	Leu	Ile	Val	Glu	Arg	Thr	Gly	Ser	Asp	Val	Arg
					305			310			315			320	
Ser	Phe	Leu	Leu	Ser	His	Asp	Ile	Met	Tyr	Glu	His	Arg	Arg	Asn	Ile
					325				330			335			
Leu	Ile	Ile	Lys	Gln	Leu	Ile	Tyr	Asn	Asp	Ile	Ser	Ser	Thr	Lys	Val
					340				345			350			
Arg	Leu	Phe	Ile	Arg	Arg	Gly	Met	Ser	Val	Gln	Tyr	Leu	Leu	Pro	Asn
					355				360			365			
Ser	Val	Ile	Arg	Tyr	Ile	Gln	Glu	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Ile	Asn	Gln	Ser
					370			375			380				
Glu	Pro	Val	Lys	Gln	Val	Leu	Asp	Ser	Lys	Glu					
					385			390			395				

<210> 9

ES 2 401 342 T3

```

<211> 952
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (118)..(912)

<400> 9
tgaactctgg atgctgttag cctgagactc aggaagacaa cttctgcagg gtcactccct 60
ggcttctgga ggaaagagaa ggagggcagt gctccagtgg tacagaagtg agacata 117
atg gaa tca ggc ttc acc tcc aag gac acc tat cta agc cat ttt aac 165
Met Glu Ser Gly Phe Thr Ser Lys Asp Thr Tyr Leu Ser His Phe Asn
    1           5           10          15

cct cgg gat tac cta gaa aaa tat tac aag ttt ggt tct agg cac tct 213
Pro Arg Asp Tyr Leu Glu Lys Tyr Lys Phe Gly Ser Arg His Ser
    20          25          30

gca gaa agc cag att ctt aag cac ctt ctg aaa aat ctt ttc aag ata 261
Ala Glu Ser Gln Ile Leu Lys His Leu Leu Lys Asn Leu Phe Lys Ile
    35          40          45

ttc tgc cta gac ggt gtg aag gga gac ctg ctg att gac atc ggc tct 309
Phe Cys Leu Asp Gly Val Lys Gly Asp Leu Leu Ile Asp Ile Gly Ser
    50          55          60

ggc ccc act atc tat cag ctc ctc tct gct tgt gaa tcc ttt aag gag 357
Gly Pro Thr Ile Tyr Gln Leu Leu Ser Ala Cys Glu Ser Phe Lys Glu
    65          70          75          80

atc gtc gtc act gac tac tca gac cag aac ctg cag gag ctg gag aag 405
Ile Val Val Thr Asp Tyr Ser Asp Gln Asn Leu Gln Glu Leu Glu Lys
    85          90          95

tgg ctg aag aaa gag cca gag gcc ttt gac tgg tcc cca gtg gtg acc 453
Trp Leu Lys Lys Glu Pro Glu Ala Phe Asp Trp Ser Pro Val Val Thr
    100         105         110

tat gtg tgt gat ctt gaa ggg aac aga gtc aag ggt cca gag aag gag 501
Tyr Val Cys Asp Leu Glu Gly Asn Arg Val Lys Gly Pro Glu Lys Glu
    115         120         125

gag aag ttg aga cag gcg gtc aag cag gtg ctg aag tgt gat gtg act 549
Glu Lys Leu Arg Gln Ala Val Lys Gln Val Leu Lys Cys Asp Val Thr
    130         135         140

cag agc cag cca ctg ggg gcc gtc ccc tta ccc ccg gct gac tgc gtg 597
Gln Ser Gln Pro Leu Gly Ala Val Pro Leu Pro Pro Ala Asp Cys Val
    145         150         155         160

ctc agc aca ctg tgt ctg gat gcc gcc tgc cca gac ctc ccc acc tac 645
Leu Ser Thr Leu Cys Leu Asp Ala Ala Cys Pro Asp Leu Pro Thr Tyr
    165         170         175

```

ES 2 401 342 T3

ES 2 401 342 T3

Glu	Lys	Leu	Arg	Gln	Ala	Val	Lys	Gln	Val	Leu	Lys	Cys	Asp	Val	Thr
130							135				140				
Gln	Ser	Gln	Pro	Leu	Gly	Ala	Val	Pro	Leu	Pro	Pro	Ala	Asp	Cys	Val
145				150				155				160			
Leu	Ser	Thr	Leu	Cys	Leu	Asp	Ala	Ala	Cys	Pro	Asp	Leu	Pro	Thr	Tyr
165					170			175							
Cys	Arg	Ala	Leu	Arg	Asn	Leu	Gly	Ser	Leu	Leu	Lys	Pro	Gly	Gly	Phe
180					185				190						
Leu	Val	Ile	Met	Asp	Ala	Leu	Lys	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Met	Ile	Gly	Glu
195			200							205					
Gln	Lys	Phe	Ser	Ser	Leu	Pro	Leu	Gly	Arg	Glu	Ala	Val	Glu	Ala	Ala
210				215					220						
Val	Lys	Glu	Ala	Gly	Tyr	Thr	Ile	Glu	Trp	Phe	Glu	Val	Ile	Ser	Gln
225				230					235			240			
Ser	Tyr	Ser	Ser	Thr	Met	Ala	Asn	Asn	Glu	Gly	Leu	Phe	Ser	Leu	Val
				245				250				255			
Ala	Arg	Lys	Leu	Ser	Arg	Pro	Leu								
				260											

<210> 11
<211> 1240
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (38)..(1144)

<400> 11																	
gagctcgca	g	cgcgcggccc	c	tgtcctccg	g	ccccgag	a	tg	a	at	cct	g	cg	g	aa	55	
Met	Asn	Pro	Ala	Ala	Glu												
1					5												
gcc	gag	ttc	aac	atc	ctc	ctg	gcc	acc	gac	tcc	tac	aag	gtt	act	cac	103	
Ala	Glu	Phe	Asn	Ile	Leu	Leu	Ala	Thr	Asp	Ser	Tyr	Lys	Val	Thr	His		
10				15													
tat	aaa	caa	tat	cca	ccc	aaa	aca	aca	agc	aaa	gtt	tat	tcc	tac	ttt	gaa	151
Tyr	Lys	Gln	Tyr	Pro	Pro	Asn	Thr	Ser	Lys	Val	Tyr	Ser	Tyr	Phe	Glu		
25				30													
tgc	cgt	gaa	aag	aag	aca	gaa	aac	tcc	aaa	tta	agg	aag	gtg	aaa	tat	199	
Cys	Arg	Glu	Lys	Lys	Thr	Glu	Asn	Ser	Lys	Leu	Arg	Lys	Val	Lys	Tyr		
40					45						50						
gag	gaa	aca	gta	ttt	tat	ggg	ttg	cag	tac	att	ctt	aat	aag	tac	tta	247	

ES 2 401 342 T3

Glu Glu Thr Val Phe Tyr Gly Leu Gln Tyr Ile Leu Asn Lys Tyr Leu			
55	60	65	70
aaa ggt aaa gta gta acc aaa gag aaa atc cag gaa gcc aaa gat gtc			
Lys Gly Lys Val Val Thr Lys Glu Lys Ile Gln Glu Ala Lys Asp Val			
75	80	85	
295			
tac aaa gaa cat ttc caa gat gat gtc ttt aat gaa aag gga tgg aac			
Tyr Lys Glu His Phe Gln Asp Asp Val Phe Asn Glu Lys Gly Trp Asn			
90	95	100	
343			
tac att ctt gag aag tat gat ggg cat ctt cca ata gaa ata aaa gct			
Tyr Ile Leu Glu Lys Tyr Asp Gly His Leu Pro Ile Glu Ile Lys Ala			
105	110	115	
391			
gtt cct gag ggc ttt gtc att ccc aga gga aat gtt ctc ttc acg gtg			
Val Pro Glu Gly Phe Val Ile Pro Arg Gly Asn Val Leu Phe Thr Val			
120	125	130	
439			
gaa aac aca gat cca gag tgt tac tgg ctt aca aat tgg att gag act			
Glu Asn Thr Asp Pro Glu Cys Tyr Trp Leu Thr Asn Trp Ile Glu Thr			
135	140	145	150
487			
att ctt gtt cag tcc tgg tat cca atc aca gtg gcc aca aat tct aga			
Ile Leu Val Gln Ser Trp Tyr Pro Ile Thr Val Ala Thr Asn Ser Arg			
155	160	165	
535			
gag cag aag aaa ata ttg gcc aaa tat ttg tta gaa act tct ggt aac			
Glu Gln Lys Lys Ile Leu Ala Lys Tyr Leu Leu Glu Thr Ser Gly Asn			
170	175	180	
583			
tta gat ggt ctg gaa tac aag tta cat gat ttt ggc tac aga gga gtc			
Leu Asp Gly Leu Glu Tyr Lys Leu His Asp Phe Gly Tyr Arg Gly Val			
185	190	195	
631			
tct tcc caa gag act gct ggc ata gga gca tct gct cac ttg gtt aac			
Ser Ser Gln Glu Thr Ala Gly Ile Gly Ala Ser Ala His Leu Val Asn			
200	205	210	
679			
tcc aaa gga aca gat aca gta gca gga ctt gct cta att aaa aaa tat			
Phe Lys Gly Thr Asp Thr Val Ala Gly Leu Ala Leu Ile Lys Lys Tyr			
215	220	225	230
727			
tat gga acg aaa gat cct gtt cca ggc tat tct gtt cca gca gca gaa			
Tyr Gly Thr Lys Asp Pro Val Pro Gly Tyr Ser Val Pro Ala Ala Glu			
235	240	245	
775			
cac agt acc ata aca gct tgg ggg aaa gac cat gaa aaa gat gct ttt			
His Ser Thr Ile Thr Ala Trp Gly Lys Asp His Glu Lys Asp Ala Phe			
250	255	260	
823			
gaa cat att gta aca cag ttt tca tca gtg cct gta tct gtg gtc agc			
Glu His Ile Val Thr Gln Phe Ser Ser Val Pro Val Ser Val Val Ser			
265	270	275	
871			
gat agc tat gac att tat aat gcg tgt gag aaa ata tgg ggt gaa gat			
919			

ES 2 401 342 T3

Asp Ser Tyr Asp Ile Tyr Asn Ala Cys Glu Lys Ile Trp Gly Glu Asp			
280	285	290	
ct a aga cat tta ata gta tcg aga agt aca cag gca cca cta ata atc			967
Leu Arg His Leu Ile Val Ser Arg Ser Thr Gln Ala Pro Leu Ile Ile			
295	300	305	310
aga cct gat tct gga aac cct ctt gac act gtg tta aag gtt ttg gag			1015
Arg Pro Asp Ser Gly Asn Pro Leu Asp Thr Val Leu Lys Val Leu Glu			
315	320	325	
att tta ggt aag aag ttt cct gtt act gag aac tca aag ggt tac aag			1063
Ile Leu Gly Lys Phe Pro Val Thr Glu Asn Ser Lys Gly Tyr Lys			
330	335	340	
ttg ctg cca cct tat ctt aga gtt att caa ggg gat gga gta gat att			1111
Leu Leu Pro Pro Tyr Leu Arg Val Ile Gln Gly Asp Gly Val Asp Ile			
345	350	355	
aat acc tta caa gag gta tgt gtt tta tat taa aagtttcaat aaggcatttc			1164
Asn Thr Leu Gln Glu Val Cys Val Leu Tyr			
360	365		
ttataattaa gtttgttat gtttgataaa gaacacaata taaatacaaa aaaaaaaaaa			1224
aaaaaaaaaaa aaaaaa			1240
<210> 12			
<211> 368			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 12			
Met Asn Pro Ala Ala Glu Ala Glu Phe Asn Ile Leu Leu Ala Thr Asp			
1	5	10	15
Ser Tyr Lys Val Thr His Tyr Lys Gln Tyr Pro Pro Asn Thr Ser Lys			
20	25	30	
Val Tyr Ser Tyr Phe Glu Cys Arg Glu Lys Lys Thr Glu Asn Ser Lys			
35	40	45	
Leu Arg Lys Val Lys Tyr Glu Glu Thr Val Phe Tyr Gly Leu Gln Tyr			
50	55	60	
Ile Leu Asn Lys Tyr Leu Lys Gly Lys Val Val Thr Lys Glu Lys Ile			
65	70	75	80
Gln Glu Ala Lys Asp Val Tyr Lys Glu His Phe Gln Asp Asp Val Phe			
85	90	95	
Asn Glu Lys Gly Trp Asn Tyr Ile Leu Glu Lys Tyr Asp Gly His Leu			
100	105	110	
Pro Ile Glu Ile Lys Ala Val Pro Glu Gly Phe Val Ile Pro Arg Gly			
115	120	125	

ES 2 401 342 T3

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

<210> 13
 <211> 1011
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> CDS
 <222> (4)..(936)

ES 2 401 342 T3

<400> 13
 ccg atg ttg gcg cca gca gct ggt gag ggc cct ggg gtg gac ctg gcg 48
 Met Leu Ala Pro Ala Ala Gly Glu Gly Pro Gly Val Asp Leu Ala
 1 5 10 15

 gcc aaa gcc cag gtg tgg ctg gag cag gtg tgt gcc cac ctg ggg ctg 96
 Ala Lys Ala Gln Val Trp Leu Glu Gln Val Cys Ala His Leu Gly Leu
 20 25 30

 ggg gtg cag gag cca cat cca ggc gag cgg gca gcc ttt gtg gcc tat 144
 Gly Val Gln Glu Pro His Pro Gly Glu Arg Ala Ala Phe Val Ala Tyr
 35 40 45

 gcc ttg gct ttt ccc cgg gcc ttc cag ggc ctc ctg gac acc tac agc 192
 Ala Leu Ala Phe Pro Arg Ala Phe Gln Gly Leu Leu Asp Thr Tyr Ser
 50 55 60

 gtg tgg agg agt ggt ctc ccc aac ttc cta gca gtc gcc ttg gcc ctg 240
 Val Trp Arg Ser Gly Leu Pro Asn Phe Leu Ala Val Ala Leu Ala Leu
 65 70 75

 gga gag ctg ggc tac cgg gca gtg ggc gtg agg ctg gac agt ggt gac 288
 Gly Glu Leu Gly Tyr Arg Ala Val Gly Val Arg Leu Asp Ser Gly Asp
 80 85 90 95

 ctg cta cag cag gct cag gag atc cgc aag gtc ttc cga gct gct gca 336
 Leu Leu Gln Gln Ala Gln Glu Ile Arg Lys Val Phe Arg Ala Ala Ala
 100 105 110

 gcc cag ttc cag gtg ccc tgg ctg gag tca gtc ctc atc gta gtc agc 384
 Ala Gln Phe Gln Val Pro Trp Leu Glu Ser Val Leu Ile Val Val Ser
 115 120 125

 aac aac att gac gag gag gcg ctg gcc cga ctg gcc cag gag ggc agt 432
 Asn Asn Ile Asp Glu Glu Ala Leu Ala Arg Leu Ala Gln Glu Gly Ser
 130 135 140

 gag gtg aat gtc att ggc att ggc acc agt gtg gtc acc tgc ccc caa 480
 Glu Val Asn Val Ile Gly Ile Gly Thr Ser Val Val Thr Cys Pro Gln
 145 150 155

 cag cct tcc ctg ggt ggc gtc tat aag ctg gtg gcc gtg ggg ggc cag 528
 Gln Pro Ser Leu Gly Gly Val Tyr Lys Leu Val Ala Val Gly Gly Gln
 160 165 170 175

 cca cga atg aag ctg acc gag gac ccc gag aag cag acg ttg cct ggg 576
 Pro Arg Met Lys Leu Thr Glu Asp Pro Glu Lys Gln Thr Leu Pro Gly
 180 185 190

 agc aag gct ttc cgg ctc ctg ggc tct gac ggg tct cca ctc atg 624
 Ser Lys Ala Ala Phe Arg Leu Leu Gly Ser Asp Gly Ser Pro Leu Met
 195 200 205

 gac atg ctg cag tta gca gaa gag cca gtg cca cag gct ggg cag gag 672
 Asp Met Leu Gln Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Gln Ala Gly Gln Glu
 210 215 220

ES 2 401 342 T3

ES 2 401 342 T3

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

<210> 15
 <211> 1073
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (71)..(688)

 <400> 15
 ggcacgaggg gtccccccgc ctcacctgca gagggccgt tccggctcg aaccggcac 60
 cttccggaaa atg gcg gct gcc agg ccc agc ctg ggc cga gtc ctc cca 109
 Met Ala Ala Ala Arg Pro Ser Leu Gly Arg Val Leu Pro
 1 5 10
 gga tcc tct gtc ctg ttc ctg tgt gac atg cag gag aag ttc cgc cac 157

ES 2 401 342 T3

Gly Ser Ser Val Leu Phe Leu Cys Asp Met Gln Glu Lys Phe Arg His			
15	20	25	
aac atc gcc tac ttc cca cag atc gtc tca gtg gct gcc cgc atg ctc			205
Asn Ile Ala Tyr Phe Pro Gln Ile Val Ser Val Ala Ala Arg Met Leu			
30	35	40	45
aag gtg gcc cgg ctg ctt gag gtg cca gtc atg ctg acg gag cag tac			253
Lys Val Ala Arg Leu Leu Glu Val Pro Val Met Leu Thr Glu Gln Tyr			
50	55	60	
cca caa ggc ctg ggc ccc acg gtg ccc gag ctg ggg act gag ggc ctt			301
Pro Gln Gly Leu Gly Pro Thr Val Pro Glu Leu Gly Thr Glu Gly Leu			
65	70	75	
cgg ccg ctg gcc aag acc tgc ttc agc atg gtg cct gcc ctg cag cag			349
Arg Pro Leu Ala Lys Thr Cys Phe Ser Met Val Pro Ala Leu Gln Gln			
80	85	90	
gag ctg gac agt cgg ccc cag ctg cgc tct gtg ctg ctc tgt ggc att			397
Glu Leu Asp Ser Arg Pro Gln Leu Arg Ser Val Leu Leu Cys Gly Ile			
95	100	105	
gag gca cag gcc tgc atc ttg aac acg acc ctg gac ctc cta gac cgg			445
Glu Ala Gln Ala Cys Ile Leu Asn Thr Thr Leu Asp Leu Leu Asp Arg			
110	115	120	125
ggg ctg cag gtc cat gtg gtg gac gcc tgc tcc tca cgc agc cag			493
Gly Leu Gln Val His Val Val Asp Ala Cys Ser Ser Arg Ser Gln			
130	135	140	
gtg gac cgg ctg gtg gct ctg gcc cgc atg aga cag agt ggt gcc ttc			541
Val Asp Arg Leu Val Ala Leu Ala Arg Met Arg Gln Ser Gly Ala Phe			
145	150	155	
ctc tcc acc agc gaa ggg ctc att ctg cag ctt gtg ggc gat gcc gtc			589
Leu Ser Thr Ser Glu Gly Leu Ile Leu Gln Leu Val Gly Asp Ala Val			
160	165	170	
cac ccc cag ttc aag gag atc cag aaa ctc atc aag gag ccc gcc cca			637
His Pro Gln Phe Lys Glu Ile Gln Lys Leu Ile Lys Glu Pro Ala Pro			
175	180	185	
gac agc gga ctg ctg ggc ctc ttc caa ggc cag aac tcc ctc ctc cac			685
Asp Ser Gly Leu Leu Gly Leu Phe Gln Gly Gln Asn Ser Leu Leu His			
190	195	200	205
tga actccaaaccc tgccttgagg gaagaccacc ctcctgtcac ccggacctca			738
gtgaaagccc gttcccccca tccctggatc ccaagagtgg tgcgatccac caggagtgcc			798
gcccccttgt gggggggggc agggtgctgc cttccattg gacagctgct cccggaaaatg			858
caaatacgagac tcctggaaac tgggtggaa ttggctgagc caagatggag gcggggctcg			918

gccccgggcc acttcacggg gcgggaaggg gaggggaaga agagtcttag actgtggac 978
 acggactcgc agaataaaca tatatgtggc aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa 1038
 aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaa 1073

<210> 16
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
Met Ala Ala Ala Arg Pro Ser Leu Gly Arg Val Leu Pro Gly Ser Ser
1 5 10 15
Val Leu Phe Leu Cys Asp Met Gln Glu Lys Phe Arg His Asn Ile Ala
20 25 30
Tyr Phe Pro Gln Ile Val Ser Val Ala Ala Arg Met Leu Lys Val Ala
35 40 45
Arg Leu Leu Glu Val Pro Val Met Leu Thr Glu Gln Tyr Pro Gln Gly
50 55 60
Leu Gly Pro Thr Val Pro Glu Leu Gly Thr Glu Gly Leu Arg Pro Leu
65 70 75 80
Ala Lys Thr Cys Phe Ser Met Val Pro Ala Leu Gln Gln Glu Leu Asp
85 90 95
Ser Arg Pro Gln Leu Arg Ser Val Leu Leu Cys Gly Ile Glu Ala Gln
100 105 110
Ala Cys Ile Leu Asn Thr Thr Leu Asp Leu Leu Asp Arg Gly Leu Gln
115 120 125
Val His Val Val Val Asp Ala Cys Ser Ser Arg Ser Gln Val Asp Arg
130 135 140
Leu Val Ala Leu Ala Arg Met Arg Gln Ser Gly Ala Phe Leu Ser Thr
145 150 155 160
Ser Glu Gly Leu Ile Leu Gln Leu Val Gly Asp Ala Val His Pro Gln
165 170 175
Phe Lys Glu Ile Gln Lys Leu Ile Lys Glu Pro Ala Pro Asp Ser Gly
180 185 190
Leu Leu Gly Leu Phe Gln Gly Gln Asn Ser Leu Leu His
195 200 205

<210> 17
 <211> 1825
 <212> DNA

ES 2 401 342 T3

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (144)..(983)

<400> 17

agagtgcac cgagatgttc cactcgctgg cgtccgggcc gctggtgatc tccggtagca 60
 ctcgggcccgg cggacagtga gggcgacaca acaaggagg tgtcacagtt ttccatTTAG 120
 atcaacaact tcaagttctt acc atg gaa aat tcc gag aag act gaa gtg gtt 173
 Met Glu Asn Ser Glu Lys Thr Glu Val Val
 1 5 10

ctc ctt gct tgt tca ttc aat ccc atc acc aac atg cac ctc agg 221
 Leu Leu Ala Cys Gly Ser Phe Asn Pro Ile Thr Asn Met His Leu Arg
 15 20 25

ttg ttt gag ctg gcc aag gac tac atg aat gga aca gga agg tac aca 269
 Leu Phe Glu Leu Ala Lys Asp Tyr Met Asn Gly Thr Gly Arg Tyr Thr
 30 35 40

gtt gtc aaa ggc atc atc tct cct gtt ggt gat gcc tac aag aag aaa 317
 Val Val Lys Gly Ile Ile Ser Pro Val Gly Asp Ala Tyr Lys Lys Lys
 45 50 55

gga ctc att cct gcc tat cac cgg gtc atc atg gca gaa ctt gct acc 365
 Gly Leu Ile Pro Ala Tyr His Arg Val Ile Met Ala Glu Leu Ala Thr
 60 65 70

aag aat tct aaa tgg gtg gaa gtt gat aca tgg gaa agt ctt cag aag 413
 Lys Asn Ser Lys Trp Val Glu Val Asp Thr Trp Glu Ser Leu Gln Lys
 75 80 85 90

gag tgg aaa gag act ctg aag gtg cta aga cac cat caa gag aaa ttg 461
 Glu Trp Lys Glu Thr Leu Lys Val Leu Arg His His Gln Glu Lys Leu
 95 100 105

gag gct agt gac tgt gat cac cag cag aac tca cct act cta gaa agg 509
 Glu Ala Ser Asp Cys Asp His Gln Gln Asn Ser Pro Thr Leu Glu Arg
 110 115 120

cct gga agg aag agg aag tgg act gaa aca caa gat tct agt caa aag 557
 Pro Gly Arg Lys Arg Lys Trp Thr Glu Thr Gln Asp Ser Ser Gln Lys
 125 130 135

aaa tcc cta gag cca aaa aca aaa gct gtg cca aag gtc aag ctg ctg 605
 Lys Ser Leu Glu Pro Lys Thr Lys Ala Val Pro Lys Val Lys Leu Leu
 140 145 150

tgt ggg gca gat tta ttg gag tcc ttt gct gtt ccc aat ttg tgg aag 653
 Cys Gly Ala Asp Leu Leu Glu Ser Phe Ala Val Pro Asn Leu Trp Lys
 155 160 165 170

agt gaa gac atc acc caa atc gtg gcc aac tat ggg ctc ata tgt gtt 701
 Ser Glu Asp Ile Thr Gln Ile Val Ala Asn Tyr Gly Leu Ile Cys Val

ES 2 401 342 T3

175	180	185				
act cg	gct gga aat gat	gct cag aag ttt atc tat	gaa tcg gat gtg	749		
Thr Arg Ala Gly Asn Asp	Ala Gln Lys Phe Ile Tyr	Glu Ser Asp Val				
190	195	200				
ctg tgg aaa cac	cgg aac att cac	gtg gtg aat gaa tgg atc	gct	797		
Leu Trp Lys His Arg Ser	Asn Ile His Val Val Asn	Glu Trp Ile Ala				
205	210	215				
aat gac atc tca tcc aca	aaa atc cgg aga gcc ctc	aga agg ggc cag		845		
Asn Asp Ile Ser Ser Thr	Lys Ile Arg Arg Ala	Leu Arg Arg Gly Gln				
220	225	230				
agc att cgc tac ttg	gta cca gat ctt gtc	caa gaa tac att gaa aag		893		
Ser Ile Arg Tyr Leu Val Pro	Asp Leu Val Gln Glu Tyr	Ile Glu Lys				
235	240	245	250			
cat aat ttg tac agc tct	gag agt gaa gac agg aat	gct ggg gtc atc		941		
His Asn Leu Tyr Ser Ser	Glu Ser Glu Asp Arg	Asn Ala Gly Val Ile				
255	260	265				
ctg gcc cct ttg cag	aga aac act gca gaa gct aag aca tag			983		
Leu Ala Pro Leu Gln Arg Asn Thr	Ala Glu Ala Lys Thr					
270	275					
gaattctaca	gcatgatatt	tcagacttcc	catttgggaa	tctgaaacaa	tctggagtt	1043
aataactggg	gaaagaagtt	gtgatctgtt	gcctaaacta	aagctaaaaa	gttagtaaa	1103
aatcgctgg	gcacagtggc	tcacgcctgt	agtcccagct	acttgggagg	ctgagggcagg	1163
agaatca	ccccaggt	ggtggaggtt	gcagtgagcc	aagattgcac	cattgcactc	1223
cagcctggcg	acagagcaag	actctgtctc	aaaaaaaaaa	aaaaaattta	gtaaaaatca	1283
atggtaagct	aaaataagtt	tttgtttgtt	tat	tttgagatggag	tctctactaa	1343
aaatacaaaa	aattagccag	gcatggtgcc	gcataactat	aatcccagct	acttgggagg	1403
ctgaggcagg	agaatcgctt	gaacccggga	ggcacaggtt	ccagtgggcc	aagttgtgc	1463
cactgcactc	cagcctggc	aaaaaagcaa	aactccatct	caaagagaaa	aaaaaaaaag	1523
accgggtgtg	gtggctcaca	cctgtaatcc	cagcactttg	ggaggcctaa	gtgggtggat	1583
cacgtgaggt	caagagttca	agaccagcct	ggccaatatg	gtgaaacccc	atctctacta	1643
agaatacaaa	aaattagctg	agcatggtgg	tgggctcctg	tagtcccagc	tacttgggag	1703
gctgaggcag	gagaatcgct	tgaacctggg	aggcagaggt	tgcagtaagc	caagatcg	1763
ccattgcact	ccagcctggg	tgacagagcg	agactccatc	tcaaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1823
aa						1825

ES 2 401 342 T3

<210> 18
 <211> 279
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Met Glu Asn Ser Glu Lys Thr Glu Val Val Leu Leu Ala Cys Gly Ser
 1 5 10 15

Phe Asn Pro Ile Thr Asn Met His Leu Arg Leu Phe Glu Leu Ala Lys
 20 25 30

Asp Tyr Met Asn Gly Thr Gly Arg Tyr Thr Val Val Lys Gly Ile Ile
 35 40 45

Ser Pro Val Gly Asp Ala Tyr Lys Lys Gly Leu Ile Pro Ala Tyr
 50 55 60

His Arg Val Ile Met Ala Glu Leu Ala Thr Lys Asn Ser Lys Trp Val
 65 70 75 80

Glu Val Asp Thr Trp Glu Ser Leu Gln Lys Glu Trp Lys Glu Thr Leu
 85 90 95

Lys Val Leu Arg His His Gln Glu Lys Leu Glu Ala Ser Asp Cys Asp
 100 105 110

His Gln Gln Asn Ser Pro Thr Leu Glu Arg Pro Gly Arg Lys Arg Lys
 115 120 125

Trp Thr Glu Thr Gln Asp Ser Ser Gln Lys Lys Ser Leu Glu Pro Lys
 130 135 140

Thr Lys Ala Val Pro Lys Val Lys Leu Leu Cys Gly Ala Asp Leu Leu
 145 150 155 160

Glu Ser Phe Ala Val Pro Asn Leu Trp Lys Ser Glu Asp Ile Thr Gln
 165 170 175

Ile Val Ala Asn Tyr Gly Leu Ile Cys Val Thr Arg Ala Gly Asn Asp
 180 185 190

Ala Gln Lys Phe Ile Tyr Glu Ser Asp Val Leu Trp Lys His Arg Ser
 195 200 205

Asn Ile His Val Val Asn Glu Trp Ile Ala Asn Asp Ile Ser Ser Thr
 210 215 220

Lys Ile Arg Arg Ala Leu Arg Arg Gly Gln Ser Ile Arg Tyr Leu Val
 225 230 235 240

Pro Asp Leu Val Gln Glu Tyr Ile Glu Lys His Asn Leu Tyr Ser Ser
 245 250 255

Glu Ser Glu Asp Arg Asn Ala Gly Val Ile Leu Ala Pro Leu Gln Arg
 260 265 270

ES 2 401 342 T3

Asn Thr Ala Glu Ala Lys Thr
275

```

<210> 19
<211> 5690
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (338)...(1261)

<400> 19
atataaaactc taaggaagac agtgatggag tgaagtggc tgggggcat agagaggatg 60
gggtgggca ccaggcgaga gatgcgaagg aagccagaac gaaaagagag cgaccgagga 120
gagaagagag cagagcaata caaaagcagc ctggatcta gccggagctg caagcgtaa 180
ggggaggcgg agagtgacgc gtttgcgtc tggagcggct cttggagtc cacagcatcc 240
accgccggag cctcgccctc ctttctccct ctgcagacac aacgagacac aaaaagagag 300
gcaaccccta gaccacccg aaggaccat ctgcacc atg acc gag acc acc aag 355
Met Thr Glu Thr Thr Lys
1 5

acc cac gtt atc ttg ctc gcc tgc ggc agc ttc aat ccc atc acc aaa 403
Thr His Val Ile Leu Leu Ala Cys Gly Ser Phe Asn Pro Ile Thr Lys
10 15 20

ggg cac att cag atg ttt gaa aga gcc agg gat tat ctg cac aaa act 451
Gly His Ile Gln Met Phe Glu Arg Ala Arg Asp Tyr Leu His Lys Thr
25 30 35

gga agg ttt att gtg att ggc ggg att gtc tcc cct gtc cac gac tcc 499
Gly Arg Phe Ile Val Ile Gly Gly Ile Val Ser Pro Val His Asp Ser
40 45 50

tat gga aaa cag ggc ctc gtg tca agc cgg cac cgt ctc atc atg tgt 547
Tyr Gly Lys Gln Gly Leu Val Ser Ser Arg His Arg Leu Ile Met Cys
55 60 65 70

cag ctg gcc gtc cag aat tct gat tgg atc agg gtg gac cct tgg gag 595
Gln Leu Ala Val Gln Asn Ser Asp Trp Ile Arg Val Asp Pro Trp Glu
75 80 85

tgc tac cag gac acc tgg cag acg acc tgc agc gtg ttg gaa cac cac 643
Cys Tyr Gln Asp Thr Trp Gln Thr Cys Ser Val Leu Glu His His
90 95 100

cgg gac ctc atg aag agg gtg act ggc tgc atc ctc tcc aat gtc aac 691
Arg Asp Leu Met Lys Arg Val Thr Gly Cys Ile Leu Ser Asn Val Asn
105 110 115

```

ES 2 401 342 T3

aca cct tcc atg aca cct gtg atc gga cag cca caa aac gag acc ccc Thr Pro Ser Met Thr Pro Val Ile Gly Gln Pro Gln Asn Glu Thr Pro	120	125	130	739	
cag ccc att tac cag aac agc aac gtg gcc acc aag ccc act gca gcc Gln Pro Ile Tyr Gln Asn Ser Asn Val Ala Thr Lys Pro Thr Ala Ala	135	140	145	150	787
aag atc ttg ggg aag gtg gga gaa agc ctc agc cgg atc tgc tgt gtc Lys Ile Leu Gly Lys Val Gly Glu Ser Leu Ser Arg Ile Cys Cys Val	155	160	165		835
cgc ccg ccg gtg gag cgt ttc acc ttt gta gat gag aat gcc aat ctg Arg Pro Pro Val Glu Arg Phe Thr Phe Val Asp Glu Asn Ala Asn Leu	170		175	180	883
ggc acg gtg atg cgg tat gaa gag att gag cta cgg atc ctg ctg ctg Gly Thr Val Met Arg Tyr Glu Glu Ile Glu Leu Arg Ile Leu Leu Leu	185	190	195		931
tgt ggt agt gac ctg ctg gag tcc ttc tgc atc cca ggg ctc tgg aac Cys Gly Ser Asp Leu Leu Glu Ser Phe Cys Ile Pro Gly Leu Trp Asn	200	205	210		979
gag gca gat atg gag gtg att gtt ggt gac ttt ggg att gtg gtg gtg Glu Ala Asp Met Glu Val Ile Val Gly Asp Phe Gly Ile Val Val Val	215	220	225	230	1027
ccc cgg gat gca gcc gac aca gac cga atc atg aat cac tcc tca ata Pro Arg Asp Ala Ala Asp Thr Asp Arg Ile Met Asn His Ser Ser Ile	235	240	245		1075
ctc cgc aaa tac aaa aac aac atc atg gtg gtg aag gat gac atc aac Leu Arg Lys Tyr Lys Asn Asn Ile Met Val Val Lys Asp Asp Ile Asn	250	255	260		1123
cat ccc atg tct gtt gtc agc tca acc aag agc agg ctg gcc ctg cag His Pro Met Ser Val Val Ser Ser Thr Lys Ser Arg Leu Ala Leu Gln	265	270	275		1171
cat ggg gac ggc cat gtt gtg gat tac ctg tcc cag ccg gtc atc gac His Gly Asp Gly His Val Val Asp Tyr Leu Ser Gln Pro Val Ile Asp	280	285	290		1219
tac atc ctc aaa agc cag ctg tac atc aat gcc tcc ggc tag Tyr Ile Leu Lys Ser Gln Leu Tyr Ile Asn Ala Ser Gly	295	300	305		1261
cagccccctcg tcctccggca acacaatggc ccctccatct ttgtcagccc cctgtttctc					1321
tcctgcctct ctgtttctcc atctcctcgt cttgactgtt ttccctactt gctgacttaa					1381
ccccccatag tgtgggggac ctgcagagaa ccatggcatt ccctattcca cagtcatctt					1441
tggacagact ttctcttagt ctccgggttg ggggtgggtg aggaaatggg gtggagtcg					1501
gggaaagtgc agtccttgg aatgtactgg tgcgtctc ccagcatgct ctagagaggc					1561

ggctctggtg cccatcctcc cagcacgctc tggggaggcg gctctggtgc ccacatccc 1621
 agcatgctct agagaggcgg ctctggtgcc ctcctccca gcatgctctg gggaggcggc 1681
 tctggctctt gccttcccag catgccctt actacaaagg gctattttc ttttcttct 1741
 tttgtttatt tattttctt tgttcaactcc ctgtagaact tggatgaaat cagtgtccat 1801
 gtttcttat gttttagtc ttgatgtgct cctgtggat tacttcccct ctgataggac 1861
 attgttagcca gcctcagcac tcagttagtt catcagggcc acacccagta gagaaggcca 1921
 agcaacacctcc acttcttcag caccacacac acgcacacac acacacacgc acacatgcgt 1981
 gtgcacccgc gcacgcacat acacacacac atatagcagt agcagcagca gcagcagcag 2041
 cagcaacctt tgatcaggag tgagattttc gggttctgaa acctggaca cagactgtg 2101
 aatagtcggt tttctcagaa taatttgaat ctgtttctt agtttcaaattt gaccatttcc 2161
 ctgatgctct gagcttatga tcacacagag ccagtcatac ctcatttccct ggtggcatct 2221
 gttcatttac ctttgtggac tgttagctgat ggcacagtgc gggttcccta ccagccaggg 2281
 gtttccaagg gacctttgga ggccatgctt agacacattc ctgtacactga gaacaaccac 2341
 ataggcagga ccagatccac atcgtgcagt cgtgtcataa aaaaacaaaa caaaacaaaa 2401
 aaacactagg agtccactca accctggagg tctttgctaa ttggaattat gtattgtctg 2461
 ttgggctggg aaatgtctct ttcatattgt aagtccagga tgaacttagga gaaagcaatt 2521
 ttttgcctg atgataactg atgattttca ccctctctag ctgaggttaac tcagacagt 2581
 catgaggtca gtttcttctt gagaaggcagt gccttggctt ttttctgtg gttggttcta 2641

 gccccctgcag agcctgggag ctgcaggaac tgtctgagaa aatctcccta atagggagt 2701
 gggttcccaag aagggagatc tgggaggggt caggagccac taagttgctt cactccttt 2761
 ttctctaatt ttctacccctc ctctctgttc ctgcagacag ttttgcacgc tttgcttctg 2821
 gttacttaggg tctcatgcgt gtcctgcttg gagagccata aggaaattgc tgtcttgc 2881
 tttgtgtctc tcatccagtc tctggctttt gggattctgg tctttgagaa atagtcctg 2941
 agtatttagga tacttttatac aaaatctagt accagctacg gccagaaagg gccaggtggg 3001
 acctgaaagc aaagacaatg ttcttacca cacgttac acatgcaaca tccttcaatt 3061
 gcgggaaaag gaacttgatt taacagaaga acatggtaga gcagcatcca gaaagtctgt 3121
 tattcctctt ggatttttg aaataatctt cagaggaagg aaggaaaatc ctatgggg 3181
 gtatcagtgt ttgacttaggg atcatgaaat aataaactga aaaaaacttt agatccagt 3241

tgatccaaca ctttccttta aaagttgagg gagcagaggc ccatggatt aaatggctgg 3301
 tccaggtcag ccagcaggtg tagggcctga caagaacata ttgtttccct gaccctagg 3361
 ccgtcacacc acaccctcca ttcctcatg ttgctgacca ggtgccata tgatttctac 3421
 acttcccaag ccttaccctg gcatcttct tttaaattat atctgtccca ggtgctctcc 3481
 acacatagga tggtaatgcc agtcccaggg gagggtgtga tagtaaggaa ggccactgtt 3541
 aggtttcctt tagaaataaa gagatctcag cagcttgaa gaaatcccag aagcggaaact 3601
 ccatcaatcc aagaaagagt tgctttgtgg aaggtgaagg aagacccaca gagtgctcag 3661
 gatgatgcta ttgctggaga gcgaaaagatg gaacagcctt gtccaggcag aacagtcata 3721
 agccagggaaa tgaaacaaag gaaaacaggt gcctgaattt cctggggaaa catggcttgt 3781
 ttaaggactt ggagttatgg atggaattt tgggacccac gtgagcagac ctgaggaagg 3841
 ctcgatttct tttgttctt ggtccactct gtcactctgc tctggtaag cccccatttgg 3901
 tctacagccc atgagaagga atgaggctgg ttctgcactc tcagcatgca gtccgaaagc 3961
 atgtgggagt ggggagggaa agtgagatga attaagacaa agaacaggtg ccatagaagt 4021
 agatttctag gaatgaagtg gggcagatct tatctttgtg gattacagggc actgtactaa 4081
 aaacaggttt cctatttaat ataaaaagaa agtgaatctt cttttggata gaatcatcca 4141
 ttcccatcgc cgcacccccc accccccaaa cacacacaca cacacacaca cacacacaca 4201
 cacacacaca cacacacaca cgccctactc ttcatttgct aggggaaggt cacagcacaa 4261
 ctaaatccag gacaggacat tgtgaccatg acccagccac agtcaataacc agaaagatga 4321
 ttcagagtct gaagtggtgc cccaggtgcc aacaggataa cctctacccc cgcactttgt 4381
 ctctgggtc ctgttccttc ctgcaaagcc caatccaaga ctggcatggc tcagaggttg 4441
 tgagaaaggc atggactgga acaatcatgt ccagaggggt ctggagcttt gtttcctgtt 4501
 caccagcaaa aaatgtctct cccatttttc tgaaagtggc tgatgtaaaga acaggcagaa 4561
 gaaaaaccct ttttgtcaat aactctgtcc ttaaggaatg gtcctctggg agggctgtgc 4621
 tgctagtggg tacctcagtc acacacccccc aaccccaggc agcctctaga gccttcttgc 4681
 tttcattttc cttgaatgta cataggaaca agggggaaag tctcttactg aagtgcctga 4741
 aacccaaagc tagagctct agagacgccc ttcttcctgt ctcagcttgg ccagccttcc 4801
 aacaatgttc tctagttca agctccagct tctcagaaag aattaaagaa cttgctgttc 4861
 aaattaagta gaaagtgaga ctcataata actgaactac agaaaaggc agagaattac 4921

ES 2 401 342 T3

agggagaaaa aacttgtact taccagccca attctactct cctcaaactg acacacacac 4981
acacacacac acacacacac acacacacac acacacactc ttttagggga ctaagagaga 5041
gaagcatgtt attacatttt actcatccaa acagtaatgc aaaaataaaa cggtagaata 5101
tgaaaagctc aggatctctc ccaaggctac ctactgcagg agggccaaca ggtgagatgg 5161
gaagaatgga aacagggacc gatTTTGTAG ctcatacaat taggacacct taggaatagc 5221
attgttagtaa tggtgatgaa tatgctctgc caaattcattc cagtctgcac catcttatag 5281
ctgcccagca cactcgactg ttcatgtggt ctctttgtag tgtgagtttggagtgcccta 5341
ttagcctgtt ctggtagga atgagtaac ggctttcc ctcaacccctta gtctagtc 5401
agggctgagg attcagctgg atccacatgg tcttgagggt tggcatgagg agggggaaagc 5461
tttttgaat cgcttttga tcacataatc tgccattta agagtaagat ttgctttatg 5521
gaaatcaatt cattaataaa aaatgatatt caagttgcaa taccattca cagtgaarda 5581
ttttgagttac aatTTTGTG ctagaatagt catggcaag agtttatgc aaaatgtttc 5641
aattatgtta ataaataaga caatgcwaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 5690

<210> 20
<211> 307
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 20
Met Thr Glu Thr Thr Lys Thr His Val Ile Leu Leu Ala Cys Gly Ser
1 5 10 15

Phe Asn Pro Ile Thr Lys Gly His Ile Gln Met Phe Glu Arg Ala Arg
20 25 30

Asp Tyr Leu His Lys Thr Gly Arg Phe Ile Val Ile Gly Gly Ile Val
35 40 45

Ser Pro Val His Asp Ser Tyr Gly Lys Gln Gly Leu Val Ser Ser Arg
 50 55 60

His Arg Leu Ile Met Cys Gln Leu Ala Val Gln Asn Ser Asp Trp Ile
65 70 75 80

Arg Val Asp Pro Trp Glu Cys Tyr Gln Asp Thr Trp Gln Thr Thr Cys
 85 90 95

Ser Val Leu Glu His His Arg Asp Leu Met Lys Arg Val Thr Gly Cys
100 105 110

Ile Leu Ser Asn Val Asn Thr Pro Ser Met Thr Pro Val Ile Gly Gln
115 120 125

ES 2 401 342 T3

Pro	Gln	Asn	Glu	Thr	Pro	Gln	Pro	Ile	Tyr	Gln	Asn	Ser	Asn	Val	Ala
130															
														140	
Thr	Lys	Pro	Thr	Ala	Ala	Lys	Ile	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Glu	Ser	Leu
145															
															160
Ser	Arg	Ile	Cys	Cys	Val	Arg	Pro	Pro	Val	Glu	Arg	Phe	Thr	Phe	Val
165															175
Asp	Glu	Asn	Ala	Asn	Leu	Gly	Thr	Val	Met	Arg	Tyr	Glu	Glu	Ile	Glu
180															190
Leu	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ser	Asp	Leu	Leu	Glu	Ser	Phe	Cys
195															205
Ile	Pro	Gly	Leu	Trp	Asn	Glu	Ala	Asp	Met	Glu	Val	Ile	Val	Gly	Asp
210															220
Phe	Gly	Ile	Val	Val	Val	Pro	Arg	Asp	Ala	Ala	Asp	Thr	Asp	Arg	Ile
225															240
Met	Asn	His	Ser	Ser	Ile	Leu	Arg	Lys	Tyr	Lys	Asn	Asn	Ile	Met	Val
245															255
Val	Lys	Asp	Asp	Ile	Asn	His	Pro	Met	Ser	Val	Val	Ser	Ser	Thr	Lys
260															270
Ser	Arg	Leu	Ala	Leu	Gln	His	Gly	Asp	Gly	His	Val	Val	Asp	Tyr	Leu
275															285
Ser	Gln	Pro	Val	Ile	Asp	Tyr	Ile	Leu	Lys	Ser	Gln	Leu	Tyr	Ile	Asn
290															300
Ala	Ser	Gly													
305															

<210>	21														
<211>	2376														
<212>	DNA														
<213>	Homo sapiens														
<220>															
<221>	CDS														
<222>	(28) .. (1503)														
<400>	21														
cgcgcgcccc	ctgtcctccg	gcccgag	atg	aat	cct	gcg	gca	gaa	gcc	gag	ttc	54			
Met	Asn	Pro	Ala	Ala	Glu	Ala	Glu	Phe							
1															5
aac	atc	ctc	ctg	gcc	acc	gac	tcc	tac	aag	gtt	act	cac	tat	aaa	caa
Asn	Ile	Leu	Leu	Ala	Thr	Asp	Ser	Tyr	Lys	Val	Thr	His	Tyr	Lys	Gln
10															25
tat	cca	ccc	aac	aca	agc	aaa	gtt	tat	tcc	tac	ttt	gaa	tgc	cgt	gaa
150															

ES 2 401 342 T3

Tyr Pro Pro Asn Thr Ser Lys Val Tyr Ser Tyr Phe Glu Cys Arg Glu			
30	35	40	
aag aag aca gaa aac tcc aaa tta agg aag gtg aaa tat gag gaa aca			198
Lys Lys Thr Glu Asn Ser Lys Leu Arg Lys Val Lys Tyr Glu Glu Thr			
45	50	55	
gta ttt tat ggg ttg cag tac att ctt aat aag tac tta aaa ggt aaa			246
Val Phe Tyr Gly Leu Gln Tyr Ile Leu Asn Lys Tyr Leu Lys Gly Lys			
60	65	70	
gta gta acc aaa gag aaa atc cag gaa gcc aaa gat gtc tac aaa gaa			294
Val Val Thr Lys Glu Lys Ile Gln Glu Ala Lys Asp Val Tyr Lys Glu			
75	80	85	
cat ttc caa gat gat gtc ttt aat gaa aag gga tgg aac tac att ctt			342
His Phe Gln Asp Asp Val Phe Asn Glu Lys Gly Trp Asn Tyr Ile Leu			
90	95	100	105
gag aag tat gat ggg cat ctt cca ata gaa ata aaa gct gtt cct gag			390
Glu Lys Tyr Asp Gly His Leu Pro Ile Glu Ile Lys Ala Val Pro Glu			
110	115	120	
ggc ttt gtc att ccc aga gga aat gtt ctc ttc acg gtg gaa aac aca			438
Gly Phe Val Ile Pro Arg Gly Asn Val Leu Phe Thr Val Glu Asn Thr			
125	130	135	
gat cca gag tgt tac tgg ctt aca aat tgg att gag act att ctt gtt			486
Asp Pro Glu Cys Tyr Trp Leu Thr Asn Trp Ile Glu Thr Ile Leu Val			
140	145	150	
cag tcc tgg tat cca atc aca gtg gcc aca aat tct aga gag cag aag			534
Gln Ser Trp Tyr Pro Ile Thr Val Ala Thr Asn Ser Arg Glu Gln Lys			
155	160	165	
aaa ata ttg gcc aaa tat ttg tta gaa act tct ggt aac tta gat ggt			582
Lys Ile Leu Ala Lys Tyr Leu Leu Glu Thr Ser Gly Asn Leu Asp Gly			
170	175	180	185
ctg gaa tac aag tta cat gat ttt ggc tac aga gga gtc tct tcc caa			630
Leu Glu Tyr Lys Leu His Asp Phe Gly Tyr Arg Gly Val Ser Ser Gln			
190	195	200	
gag act gct ggc ata gga gca tct gct cac ttg gtt aac ttc aaa gga			678
Glu Thr Ala Gly Ile Gly Ala Ser Ala His Leu Val Asn Phe Lys Gly			
205	210	215	
aca gat aca gta gca gga ctt gct cta att aaa aaa tat tat gga acg			726
Thr Asp Thr Val Ala Gly Leu Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Tyr Gly Thr			
220	225	230	
aaa gat cct gtt cca ggc tat tct gtt cca gca gca gaa cac agt acc			774
Lys Asp Pro Val Pro Gly Tyr Ser Val Pro Ala Ala Glu His Ser Thr			
235	240	245	
ata aca gct tgg ggg aaa gac cat gaa aaa gat gct ttt gaa cat att			822
Ile Thr Ala Trp Gly Lys Asp His Glu Lys Asp Ala Phe Glu His Ile			

ES 2 401 342 T3

250	255	260	265	
gta aca cag ttt tca tca gtg cct gta tct gtg gtc agc gat agc tat Val Thr Gln Phe Ser Ser Val Pro Val Ser Val Val Ser Asp Ser Tyr				870
270	275	280		
gac att tat aat gcg tgt gag aaa ata tgg ggt gaa gat cta aga cat Asp Ile Tyr Asn Ala Cys Glu Lys Ile Trp Gly Glu Asp Leu Arg His				918
285	290	295		
tta ata gta tcg aga agt aca cag gca cca cta ata atc aga cct gat Leu Ile Val Ser Arg Ser Thr Gln Ala Pro Leu Ile Ile Arg Pro Asp				966
300	305	310		
tct gga aac cct ctt gac act gtg tta aag gtt ttg gag att tta ggt Ser Gly Asn Pro Leu Asp Thr Val Leu Lys Val Leu Glu Ile Leu Gly				1014
315	320	325		
aag aag ttt cct gtt act gag aac tca aag ggt tac aag ttg ctg cca Lys Lys Phe Pro Val Thr Glu Asn Ser Lys Gly Tyr Lys Leu Leu Pro				1062
330	335	340	345	
cct tat ctt aga gtt att caa ggg gat gga gta gat att aat acc tta Pro Tyr Leu Arg Val Ile Gln Gly Asp Gly Val Asp Ile Asn Thr Leu				1110
350	355	360		
caa gag att gta gaa ggc atg aaa caa aaa atg tgg agt att gaa aat Gln Glu Ile Val Glu Gly Met Lys Gln Lys Met Trp Ser Ile Glu Asn				1158
365	370	375		
att gcc ttc ggt tct ggt gga ggt ttg cta cag aag ttg aca aga gat Ile Ala Phe Gly Ser Gly Gly Leu Leu Gln Lys Leu Thr Arg Asp				1206
380	385	390		
ctc ttg aat tgt tcc ttc aag tgt agc tat gtt gta act aat ggc ctt Leu Leu Asn Cys Ser Phe Lys Cys Ser Tyr Val Val Thr Asn Gly Leu				1254
395	400	405		
ggg att aac gtc ttc aag gac cca gtt gct gat ccc aac aaa agg tcc Gly Ile Asn Val Phe Lys Asp Pro Val Ala Asp Pro Asn Lys Arg Ser				1302
410	415	420	425	
aaa aag ggc cga tta tct tta cat agg acg cca gca ggg aat ttt gtt Lys Lys Gly Arg Leu Ser Leu His Arg Thr Pro Ala Gly Asn Phe Val				1350
430	435	440		
aca ctg gag gaa gga aaa gga gac ctt gag gaa tat ggt cag gat ctt Thr Leu Glu Glu Gly Lys Asp Leu Glu Glu Tyr Gly Gln Asp Leu				1398
445	450	455		
ctc cat act gtc ttc aag aat ggc aag gtg aca aaa agc tat tca ttt Leu His Thr Val Phe Lys Asn Gly Lys Val Thr Lys Ser Tyr Ser Phe				1446
460	465	470		
gat gaa ata aga aaa aat gca cag ctg aat att gaa ctg gaa gca gca Asp Glu Ile Arg Lys Asn Ala Gln Leu Asn Ile Glu Leu Glu Ala Ala				1494

475	480	485	
cat cat tag gctttatgac tgggtgtgtg ttgtgtgtat gtaatacata			1543
His His			
490			
 atgtttattt tacagatgtg tggggtttgt gttttatgtat acattacagc caaatttattt 1603			
gttggtttat ggacatactg cccttcatt tttttcttt tccagtgtt aggtgatctc 1663			
aaatttaggaa atgcatttaa ccatgtaaaa gatgagtgt aaagtaagct ttttagggcc 1723			
ctttgccaat aggttagtcat tcaatctggt attgatcttt tcacaaataa cagaactgag 1783			
aaactttat atataactga tgatcacata aaacagattt gcataaaaatt accatgattt 1843			
ctttatgtt atattaact tgtatTTTt tacaaacaag attgtgtaag atatatttga 1903			
agtttcagtg atttaacagt ct当地caact tttcatgatt tttatgagca cagactttca 1963			
agaaaaatact tgaaaataaa ttacattgcc ttttgc当地 taatcagcaa ataaaacatg 2023			
gc当地aaca agttgttgtt gttattgtac aatttgaaaa ttatgtcggg acataacccta 2083			
tagaattact aaccttactg ccccttgc当地 aatatgtatt aatcattcta cattaaagaa 2143			
aataatggtt ct当地tggaa tgtctaggca ctgtacagtt attatatact ttgggtgtt 2203			
tattgtacca gtgaaatgcc aaatttgaaa ggcctgtact gcaattttat atgtcagaga 2263			
ttgc当地gtgg ct当地aatatg cacctcaaga ttttaaggag ataatgttt tagagagaat 2323			
ttctgcttcc actatagaat atatacataa atgtaaaaata cttacaaaag tgg			2376
 <210> 22			
<211> 491			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
 <400> 22			
Met Asn Pro Ala Ala Glu Ala Glu Phe Asn Ile Leu Leu Ala Thr Asp			
1	5	10	15
 Ser Tyr Lys Val Thr His Tyr Lys Gln Tyr Pro Pro Asn Thr Ser Lys			
20	25	30	
 Val Tyr Ser Tyr Phe Glu Cys Arg Glu Lys Lys Thr Glu Asn Ser Lys			
35	40	45	
 Leu Arg Lys Val Lys Tyr Glu Glu Thr Val Phe Tyr Gly Leu Gln Tyr			
50	55	60	
 Ile Leu Asn Lys Tyr Leu Lys Gly Lys Val Val Thr Lys Glu Lys Ile			
65	70	75	80
 Gln Glu Ala Lys Asp Val Tyr Lys Glu His Phe Gln Asp Asp Val Phe			

ES 2 401 342 T3

85	90	95
Asn Glu Lys Gly Trp Asn Tyr Ile Leu Glu Lys Tyr Asp Gly His Leu		
100	105	110
Pro Ile Glu Ile Lys Ala Val Pro Glu Gly Phe Val Ile Pro Arg Gly		
115	120	125
Asn Val Leu Phe Thr Val Glu Asn Thr Asp Pro Glu Cys Tyr Trp Leu		
130	135	140
Thr Asn Trp Ile Glu Thr Ile Leu Val Gln Ser Trp Tyr Pro Ile Thr		
145	150	155
Val Ala Thr Asn Ser Arg Glu Gln Lys Lys Ile Leu Ala Lys Tyr Leu		
165	170	175
Leu Glu Thr Ser Gly Asn Leu Asp Gly Leu Glu Tyr Lys Leu His Asp		
180	185	190
Phe Gly Tyr Arg Gly Val Ser Ser Gln Glu Thr Ala Gly Ile Gly Ala		
195	200	205
Ser Ala His Leu Val Asn Phe Lys Gly Thr Asp Thr Val Ala Gly Leu		
210	215	220
Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Tyr Gly Thr Lys Asp Pro Val Pro Gly Tyr		
225	230	235
Ser Val Pro Ala Ala Glu His Ser Thr Ile Thr Ala Trp Gly Lys Asp		
245	250	255
His Glu Lys Asp Ala Phe Glu His Ile Val Thr Gln Phe Ser Ser Val		
260	265	270
Pro Val Ser Val Val Ser Asp Ser Tyr Asp Ile Tyr Asn Ala Cys Glu		
275	280	285
Lys Ile Trp Gly Glu Asp Leu Arg His Leu Ile Val Ser Arg Ser Thr		
290	295	300
Gln Ala Pro Leu Ile Ile Arg Pro Asp Ser Gly Asn Pro Leu Asp Thr		
305	310	320
Val Leu Lys Val Leu Glu Ile Leu Gly Lys Lys Phe Pro Val Thr Glu		
325	330	335
Asn Ser Lys Gly Tyr Lys Leu Leu Pro Pro Tyr Leu Arg Val Ile Gln		
340	345	350
Gly Asp Gly Val Asp Ile Asn Thr Leu Gln Glu Ile Val Glu Gly Met		
355	360	365
Lys Gln Lys Met Trp Ser Ile Glu Asn Ile Ala Phe Gly Ser Gly Gly		
370	375	380

Gly Leu Leu Gln Lys Leu Thr Arg Asp Leu Leu Asn Cys Ser Phe Lys
 385 390 395 400
 Cys Ser Tyr Val Val Thr Asn Gly Leu Gly Ile Asn Val Phe Lys Asp
 405 410 415
 Pro Val Ala Asp Pro Asn Lys Arg Ser Lys Lys Gly Arg Leu Ser Leu
 420 425 430
 His Arg Thr Pro Ala Gly Asn Phe Val Thr Leu Glu Glu Gly Lys Gly
 435 440 445
 Asp Leu Glu Glu Tyr Gly Gln Asp Leu Leu His Thr Val Phe Lys Asn
 450 455 460
 Gly Lys Val Thr Lys Ser Tyr Ser Phe Asp Glu Ile Arg Lys Asn Ala
 465 470 475 480
 Gln Leu Asn Ile Glu Leu Glu Ala Ala His His
 485 490

	<210>	23	
	<211>	24	
5	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
10	<223>	Descripción de la Secuencia Artificial: cebador sintético	
	<400>	23	
		aaatccgctc gacactgtcc tgaa	24
15	<210>	24	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
20	<223>	Descripción de la Secuencia Artificial: cebador sintético	
	<400>	24	
		ttgggatcag caactgggtc ctta	24
25	<210>	25	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia Artificial	
30	<220>		
	<223>	Descripción de la Secuencia Artificial: cebador sintético	
	<400>	25	
		ttccctccctg gagaagagct atga	24
35	<210>	26	

ES 2 401 342 T3

```

<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador sintético

<400> 26
tactcctgct tgctgatcca catc 24

10 <210> 27
<211> 1172
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (211)..(810)

<400> 27
aaaggggcct ctggtgaccg cccctacctg gcatccctct aacccaggag gagcgtgggg 60
aaaggggctg tgggcctctc ggggagcgag ctgcggtag cggcgcaactg ggtacaggcg 120
cgcgttggc tgtcgccctctc tccgctgtgt ttgggaggac tcgaactggc gccaggaaat 180
attaggaagc tgtgattttc aaagctaatt atg aaa aca ttt atc att gga atc 234
Met Lys Thr Phe Ile Ile Gly Ile
1 5

282 agt ggt gtg aca aac agt ggc aaa aca aca ctg gct aag aat ttg cag
Ser Gly Val Thr Asn Ser Gly Lys Thr Thr Leu Ala Lys Asn Leu Gin
10 15 20

330 aaa cac ctc cca aat tgc agt gtc ata tct cag gat gat ttc ttc aag
Lys His Leu Pro Asn Cys Ser Val Ile Ser Gln Asp Asp Phe Phe Lys
25 30 35 40

378 cca gag tct gag ata gag aca gat aaa aat gga ttt ttg cag tac gat
Pro Glu Ser Glu Ile Glu Thr Asp Lys Asn Gly Phe Leu Gln Tyr Asp
45 50 55

426 gtg ctt gaa gca ctt aac atg gaa aaa atg atg tca gcc att tcc tgc
Val Leu Glu Ala Leu Asn Met Glu Lys Met Met Ser Ala Ile Ser Cys
60 65 70

474 tgg atg gaa agc gca aga cac tct gtg gta tca aca gac cag gaa agt
Trp Met Glu Ser Ala Arg His Ser Val Val Ser Thr Asp Gln Glu Ser

```

ES 2 401 342 T3

75	80	85	
gct gag gaa att ccc att tta atc atc gaa ggt ttt ctt ctt ttt aat Ala Glu Glu Ile Pro Ile Leu Ile Ile Glu Gly Phe Leu Leu Phe Asn 90 95 100			522
tat aag ccc ctt gac act ata tgg aat aga agc tat ttc ctg act att Tyr Lys Pro Leu Asp Thr Ile Trp Asn Arg Ser Tyr Phe Leu Thr Ile 105 110 115 120			570
cca tat gaa gaa tgt aaa agg agg agg agt aca agg gtc tat cag cct Pro Tyr Glu Glu Cys Lys Arg Arg Ser Thr Arg Val Tyr Gln Pro 125 130 135			618
cca gac tct ccg gga tac ttt gat ggc cat gtg tgg ccc atg tat cta Pro Asp Ser Pro Gly Tyr Phe Asp Gly His Val Trp Pro Met Tyr Leu 140 145 150			666
aag tac aga caa gaa atg cag gac atc aca tgg gaa gtt gtg tac ctg Lys Tyr Arg Gln Glu Met Gln Asp Ile Thr Trp Glu Val Val Tyr Leu 155 160 165			714
gat gga aca aaa tct gaa gag gac ctc ttt ttg caa gta tat gaa gat Asp Gly Thr Lys Ser Glu Glu Asp Leu Phe Leu Gln Val Tyr Glu Asp 170 175 180			762
cta ata caa gaa cta gca aag caa aag tgt ttg caa gtg aca gca taa Leu Ile Gln Glu Leu Ala Lys Gln Lys Cys Leu Gln Val Thr Ala 185 190 195			810,
agacggaaca caacaaatcc ttccctgaagt gaattaggaa actccaagga gtaatttaag 870 aaccttcacc aagatacat gtatactgtg gtacaatgac agccattgtt tcatatgttt 930 gatttttatt gcacatggtt ttcccaacat gtggaacaat aaatatccat gccaatggac 990 aggactgtac cttagcaagt tgctccctct ccagggagcg catagataca gcagagctca 1050 cagtgagtca gaaagtctcc actttctgaa catagctcta taacaatgtat tgtcaaactt 1110 ttctaactgg agctcagagt aagaaataaa gattacatca caatccaaaa aaaaaaaaaa 1170 aa			1172
<210> 28			
<211> 199			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 28			
Met Lys Thr Phe Ile Ile Gly Ile Ser Gly Val Thr Asn Ser Gly Lys 1 5 10 15			
Thr Thr Leu Ala Lys Asn Leu Gln Lys His Leu Pro Asn Cys Ser Val 20 25 30			

ES 2 401 342 T3

Ile Ser Gln Asp Asp Phe Phe Lys Pro Glu Ser Glu Ile Glu Thr Asp
35 40 45

Lys Asn Gly Phe Leu Gln Tyr Asp Val Leu Glu Ala Leu Asn Met Glu
50 55 60

Lys Met Met Ser Ala Ile Ser Cys Trp Met Glu Ser Ala Arg His Ser
65 70 75 80

Val Val Ser Thr Asp Gln Glu Ser Ala Glu Glu Ile Pro Ile Leu Ile
85 90 95

Ile Glu Gly Phe Leu Leu Phe Asn Tyr Lys Pro Leu Asp Thr Ile Trp
100 105 110

Asn Arg Ser Tyr Phe Leu Thr Ile Pro Tyr Glu Glu Cys Lys Arg Arg
115 120 125

Arg Ser Thr Arg Val Tyr Gln Pro Pro Asp Ser Pro Gly Tyr Phe Asp
130 135 140

Gly His Val Trp Pro Met Tyr Leu Lys Tyr Arg Gln Glu Met Gln Asp
145 150 155 160

Ile Thr Trp Glu Val Val Tyr Leu Asp Gly Thr Lys Ser Glu Glu Asp
165 170 175

Leu Phe Leu Gln Val Tyr Glu Asp Leu Ile Gln Glu Leu Ala Lys Gln
180 185 190

Lys Cys Leu Gln Val Thr Ala
195

<210> 29
<211> 1134
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (301)..(993)

<400> 29
aatcatcttg ttggccctga cctcggttggaa aaacgaagct ccccgccagg tccccggcctc 60
tagggctgct gtgcgggggg ggggtggcctg gagctatttc cattcgccgg cggaaacagg 120
tgccggcgcc tccgccccat ccccaggggc cgccctcccccc gggggcggcct ccaggctgcc 180
gagacctata aaggcgccag gttttctcaa tgaagccggg acgcactccg gagccactg 240
cgtggtcgca ccctaccgg gctgccttgg aagtctccc cgccgccccct ccgcaccggc 300
atg aag ctc atc gtg ggc atc gga ggc atg acc aac ggc ggc aag acc 348
Met Lys Leu Ile Val Gly Ile Gly Met Thr Asn Gly Gly Lys Thr

ES 2 401 342 T3

1	5	10	15	
acg ctg acc aac agc ctg ctc aga gcc ctg ccc aac tgc tgc gtg atc				396
Thr Leu Thr Asn Ser Leu Leu Arg Ala Leu Pro Asn Cys Cys Val Ile				
20	25	30		
cat cag gat gac ttc ttc aag ccc caa gac caa ata gca gtt ggg gaa				444
His Gln Asp Asp Phe Phe Lys Pro Gln Asp Gln Ile Ala Val Gly Glu				
35	40	45		
gac ggc ttc aaa cag tgg gac gtg ctg gag tct ctg gac atg gag gcc				492
Asp Gly Phe Lys Gln Trp Asp Val Leu Glu Ser Leu Asp Met Glu Ala				
50	55	60		
atg ctg gac acc gtg cag gcc tgg ctg agc agc ccg cag aag ttt gcc				540
Met Leu Asp Thr Val Gln Ala Trp Leu Ser Ser Pro Gln Lys Phe Ala				
65	70	75	80	
cgt gcc cac ggg gtc agc gtc cag cca gag gcc tcg gac acc cac atc				588
Arg Ala His Gly Val Ser Val Gln Pro Glu Ala Ser Asp Thr His Ile				
85	90	95		
ctc ctc ctg gaa ggc ttc ctg ctc tac agc tac aag ccc ctg gtg gac				636
Leu Leu Leu Glu Gly Phe Leu Leu Tyr Ser Tyr Lys Pro Leu Val Asp				
100	105	110		
ttg tac agc cgc cgg tac ttc ctg acc gtc ccg tat gaa gag tgc aag				684
Leu Tyr Ser Arg Arg Tyr Phe Leu Thr Val Pro Tyr Glu Glu Cys Lys				
115	120	125		
tgg agg aga agt acc cgc aac tac aca gtc cct gat ccc ccc ggc ctc				732
Trp Arg Arg Ser Thr Arg Asn Tyr Thr Val Pro Asp Pro Pro Gly Leu				
130	135	140		
ttc gat ggc cac gtg tgg ccc atg tac cag aag tat agg cag gag atg				780
Phe Asp Gly His Val Trp Pro Met Tyr Gln Lys Tyr Arg Gln Glu Met				
145	150	155	160	
gag gcc aac ggt gtg gaa gtg gtc tac ctg gac ggc atg aag tcc cga				828
Glu Ala Asn Gly Val Glu Val Val Tyr Leu Asp Gly Met Lys Ser Arg				
165	170	175		
gag gag ctc ttc cgt gaa gtc ctg gaa gac att cag aac tcg ctg ctg				876
Glu Glu Leu Phe Arg Glu Val Leu Glu Asp Ile Gln Asn Ser Leu Leu				
180	185	190		
aac cgc tcc cag gaa tca gcc ccc tcc ccg gct cgc cca gcc agg aca				924
Asn Arg Ser Gln Glu Ser Ala Pro Ser Pro Ala Arg Pro Ala Arg Thr				
195	200	205		
cag gga ccc gga cgc gga tgc ggc cac aga acg gcc agg cct gca gcg				972
Gln Gly Pro Gly Arg Gly Cys Gly His Arg Thr Ala Arg Pro Ala Ala				
210	215	220		
tcc cag cag gac agc atg tga gcgtttccct atgggggtgt ctgtacgtag				1023
Ser Gln Gln Asp Ser Met				
225	230			

gagagtggag gccccactcc cagttggcg tcccgagct cagggactga gccccaaagac 1083
 gcctctgtaa cctcgctgca gcttcagtag taaactgggt cctgttttt t 1134

<210> 30
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 Met Lys Leu Ile Val Gly Ile Gly Gly Met Thr Asn Gly Gly Lys Thr
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Asn Ser Leu Leu Arg Ala Leu Pro Asn Cys Cys Val Ile
 20 25 30

His Gln Asp Asp Phe Phe Lys Pro Gln Asp Gln Ile Ala Val Gly Glu
 35 40 45

Asp Gly Phe Lys Gln Trp Asp Val Leu Glu Ser Leu Asp Met Glu Ala
 50 55 60

Met Leu Asp Thr Val Gln Ala Trp Leu Ser Ser Pro Gln Lys Phe Ala
 65 70 75 80

Arg Ala His Gly Val Ser Val Gln Pro Glu Ala Ser Asp Thr His Ile
 85 90 95

Leu Leu Leu Glu Gly Phe Leu Leu Tyr Ser Tyr Lys Pro Leu Val Asp
 100 105 110

Leu Tyr Ser Arg Arg Tyr Phe Leu Thr Val Pro Tyr Glu Glu Cys Lys
 115 120 125

Trp Arg Arg Ser Thr Arg Asn Tyr Thr Val Pro Asp Pro Pro Gly Leu
 130 135 140

Phe Asp Gly His Val Trp Pro Met Tyr Gln Lys Tyr Arg Gln Glu Met
 145 150 155 160

Glu Ala Asn Gly Val Glu Val Val Tyr Leu Asp Gly Met Lys Ser Arg
 165 170 175

Glu Glu Leu Phe Arg Glu Val Leu Glu Asp Ile Gln Asn Ser Leu Leu
 180 185 190

Asn Arg Ser Gln Glu Ser Ala Pro Ser Pro Ala Arg Pro Ala Arg Thr
 195 200 205

Gln Gly Pro Gly Arg Gly Cys Gly His Arg Thr Ala Arg Pro Ala Ala
 210 215 220

Ser Gln Gln Asp Ser Met
 225 230

<210> 31

5 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético
 <400> 31
caggcagtcc tttctatttc 20

15 <210> 32
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético
 <400> 32
gcttgttaac tctccgacag 20

25 <210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético
 <400> 33
aatgtcttat caagaccggac 20

35 <210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético
 <400> 34
tacagtccag aaatcgctcc 20

45 <210> 35
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético
 <400> 35
gaaaggattt gccccggacacat ttgt 24
 <210> 36
 <211> 24

	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 36	
	cttcttccca gtagcctgtt cttt	24
10		
	<210> 37	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 37	
20	gtggcattac tccacttcaa gtaag	25
	<210> 38	
	<211> 19	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
30	<400> 38	
	caagagcaag acgatgggg	19
	<210> 39	
	<211> 20	
35	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
40	<400> 39	
	tttcccgctg aaccgttcca	20
	<210> 40	
	<211> 20	
45	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
50	<400> 40	
	cattggcact catgacacctc	20

ES 2 401 342 T3

<210> 41
<211> 40
<212> PRT
<213> Drosophila melanogaster

<400> 41
Phe Asp Gly Thr Ser Asn Val Leu Ala Gly Lys Leu Phe Asn Ile Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly Thr His Ala His Ala Tyr Ile Thr Ser Phe Ser Ser Ile
20 25 30

Gly Glu Leu Lys Thr Arg Leu Ile
35 40

<210> 42
<211> 40
<212> PRT
<213> Caenorhabditis elegans

<400> 42
Phe Asp Ala Thr Ser Asn Val Leu Ala Gly Lys Leu Tyr Gly Ile Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly Thr Gln Ala His Ser Phe Ile Cys Ser Phe Ser Ser Pro
20 25 30

Ala Glu Leu Lys Val Arg Leu Leu
35 40

<210> 43
<211> 40
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43
Phe Asp Ser Ser Ser Asn Val Leu Ala Gly Gln Leu Arg Gly Val Pro

ES 2 401 342 T3

1	5	10	15
Val Ala Gly Thr Leu Ala His Ser Phe Val Thr Ser Phe Ser Gly Ser			
20		25	30
Glu Val Pro Pro Asp Pro Met Leu			
35		40	
<210> 44			
<211> 37			
<212> PRT			
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
<400> 44			
Leu Leu Leu Gly Thr Ser Asn Ile Leu Phe Ala Lys Lys Tyr Gly Val			
1	5	10	15
Lys Pro Ile Gly Thr Val Ala His Glu Trp Val Met Gly Val Ala Ser			
20		25	30
Ile Ser Glu Asp Tyr			
35			
<210> 45			
<211> 221			
<212> PRT			
<213> <i>Homo sapiens</i>			
<400> 45			
Met Ala Ala Ala Arg Pro Ser Leu Gly Arg Val Leu Pro Gly Ser Ser			
1	5	10	15
Val Leu Phe Leu Cys Asp Met Gln Glu Lys Phe Arg His Asn Ile Ala			
20		25	30
Tyr Phe Pro Gln Ile Val Ser Val Ala Ala Arg Met Leu Lys Val Ala			
35		40	45
Arg Leu Leu Glu Val Pro Val Met Leu Thr Glu Gln Tyr Pro Gln Gly			
50	55		60
Leu Gly Pro Thr Val Pro Glu Leu Gly Thr Glu Gly Leu Arg Pro Leu			
65	70	75	80
Ala Lys Thr Cys Phe Ser Met Val Pro Ala Leu Gln Gln Glu Leu Asp			
85		90	95
Ser Arg Pro Gln Leu Arg Ser Val Leu Leu Cys Gly Ile Glu Ala Gln			
100		105	110
Ala Cys Ile Leu Asp Pro Arg Ser Tyr Pro Gly Leu Ala Leu Thr Ser			
115		120	125
Leu Tyr Pro Gln Asn Thr Thr Leu Asp Leu Leu Asp Arg Gly Leu Gln			
130		135	140

ES 2 401 342 T3

Val His Val Val Val Asp Ala Cys Ser Ser Arg Ser Gln Val Asp Arg
 145 150 155 160

Leu Val Ala Leu Ala Arg Met Arg Gln Ser Gly Ala Phe Leu Ser Thr
 165 170 175

Ser Glu Gly Leu Ile Leu Gln Leu Val Gly Asp Ala Val His Pro Gln
 180 185 190

Phe Lys Glu Ile Gln Lys Leu Ile Lys Glu Pro Ala Pro Asp Ser Gly
 195 200 205

Leu Leu Gly Leu Phe Gln Gly Gln Asn Ser Leu Leu His
 210 215 220

<210> 46

<211> 241

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Tyr Gly Asp Gln Ile Asp Met His Arg Lys Phe Val Val Gln Leu Phe
 1 5 10 15

Ala Glu Glu Trp Gly Gln Tyr Val Asp Leu Pro Lys Gly Phe Ala Val
 20 25 30

Ser Glu Arg Cys Lys Val Arg Leu Val Pro Leu Gln Ile Gln Leu Thr
 35 40 45

Thr Leu Gly Asn Leu Thr Pro Ser Ser Thr Val Phe Phe Cys Cys Asp
 50 55 60

Met Gln Glu Arg Phe Arg Pro Ala Ile Lys Tyr Phe Gly Asp Ile Ile
 65 70 75 80

Ser Val Gly Gln Arg Leu Leu Gln Gly Ala Arg Ile Leu Gly Ile Pro
 85 90 95

Val Ile Val Thr Glu Gln Tyr Pro Lys Gly Leu Gly Ser Thr Val Gln
 100 105 110

Glu Ile Asp Leu Thr Gly Val Lys Leu Val Leu Pro Lys Thr Lys Phe
 115 120 125

Ser Met Val Leu Pro Glu Val Glu Ala Ala Leu Ala Glu Ile Pro Gly
 130 135 140

Val Arg Ser Val Val Leu Phe Gly Val Glu Thr His Val Cys Ile Gln
 145 150 155 160

Gln Thr Ala Leu Glu Leu Val Gly Arg Gly Val Glu Val His Ile Val
 165 170 175

ES 2 401 342 T3

Ala	Asp	Ala	Thr	Ser	Ser	Arg	Ser	Met	Met	Asp	Arg	Met	Phe	Ala	Leu
180														190	
Glu	Arg	Leu	Ala	Arg	Thr	Gly	Ile	Ile	Val	Thr	Thr	Ser	Glu	Ala	Val
195														205	
Leu	Leu	Gln	Leu	Val	Ala	Asp	Lys	Asp	His	Pro	Lys	Phe	Lys	Glu	Ile
210														220	
Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Ala	Ser	Ala	Pro	Glu	Ser	Gly	Leu	Leu	Ser	Lys
225														240	
Val															
<210> 47															
<211> 199															
<212> PRT															
<213> Homo sapiens															
<400> 47															
Met	His	Arg	Lys	Phe	Val	Val	Gln	Leu	Phe	Ala	Glu	Glu	Trp	Gly	Gln
1														15	
Tyr	Val	Asp	Leu	Pro	Lys	Gly	Phe	Ala	Val	Ser	Glu	Arg	Cys	Lys	Val
20														30	
Arg	Leu	Val	Pro	Leu	Gln	Ile	Gln	Leu	Thr	Thr	Leu	Gly	Asn	Leu	Thr
35														45	
Pro	Ser	Ser	Thr	Val	Phe	Phe	Cys	Cys	Asp	Met	Gln	Glu	Arg	Phe	Arg
50														60	
Pro	Ala	Ile	Lys	Tyr	Phe	Gly	Asp	Ile	Ile	Ser	Val	Gly	Gln	Arg	Leu
65														80	
Leu	Gln	Gly	Ala	Arg	Ile	Leu	Gly	Ile	Pro	Val	Ile	Val	Thr	Glu	Gln
85														95	
Tyr	Pro	Lys	Gly	Leu	Gly	Ser	Thr	Val	Gln	Glu	Ile	Asp	Leu	Thr	Gly
100														110	
Val	Lys	Leu	Val	Leu	Pro	Lys	Thr	Lys	Phe	Ser	Met	Val	Leu	Pro	Glu
115														125	
Val	Glu	Ala	Ala	Leu	Ala	Glu	Ile	Pro	Gly	Val	Arg	Ser	Val	Val	Leu
130														140	
Phe	Gly	Val	Glu	Thr	His	Val	Cys	Ile	Gln	Gln	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu
145														160	
Val	Gly	Arg	Gly	Val	Glu	Val	His	Ile	Val	Ala	Asp	Ala	Thr	Ser	Ser
165														175	
Arg	Ser	Met	Met	Asp	Arg	Met	Phe	Ala	Arg	Leu	Thr	Ser	Arg	Ser	Asn
180														190	

Gly Asp His Ser Asp His Glu
 195

<210> 48
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Drosophila melanogaster

<400> 48
 Ser Gln Asp Ser Asn Asp Asn Leu Thr Ser Cys Ser Leu Cys Val Cys
 1 5 10 15

Val Cys Gln Ser Leu Arg Ile Val Arg Pro Val Asn Ala Phe Leu Ile
 20 25 30

Val Asp Val Gln Asn Asp Phe Ile Ser Gly Ser Leu Asp Ile Ser Asn
 35 40 45

Cys Ser Ala Gln Gln Gln Gly His Glu Ile Leu Glu Pro Ile Asn Lys
 50 55 60

Leu Leu Asp Thr Val Asp Phe Asp Ala Val Phe Tyr Ser Leu Asp Trp
 65 70 75 80

His Pro Ser Asp His Val Ser Phe Ile Asp Asn Val Lys Met Arg Pro
 85 90 95

Met Asp Glu Ser Ser Ala Leu Asp Ser Asp Ser Ala Lys Val Phe Asp
 100 105 110

Thr Val Ile Phe Ala Gly Pro Pro Met Lys Gln Arg Leu Trp Pro
 115 120 125

Arg His Cys Val Gln Asp Ser Trp Gly Ala Glu Leu His Lys Asp Leu
 130 135 140

Lys Val Val Asp His Gly Ile Lys Val Tyr Lys Gly Thr Asn Pro Glu
 145 150 155 160

Val Asp Ser Tyr Ser Val Phe Trp Asp Asn Lys Lys Leu Ser Asp Thr
 165 170 175

Thr Leu Asn Ala Gln Leu Lys Met Lys Gly Ala Thr Asp Ile Tyr Val
 180 185 190

Cys Gly Leu Ala Tyr Asp Val Cys Val Gly Ala Thr Ala Val Asp Ala
 195 200 205

Leu Ser Ala Gly Tyr Arg Thr Ile Leu Ile Asp Asp Cys Cys Arg Gly
 210 215 220

Thr Asp Val His Asp Ile Glu His Thr Lys Glu Lys Val Asn Thr Ser
 225 230 235 240

Asp Gly Val Ile Val His Thr Asn Gln Val Lys Ala Met Ala Glu Gly

ES 2 401 342 T3

245

250

255

Arg Asp Arg Arg Pro Glu Leu Gly Tyr Lys Leu Ala Met Glu Leu Lys
260 265 270

Ser Pro Asp Ser Val Leu Ser Gln Arg Asn Gly Phe Arg Pro Ser Tyr
275 280 285

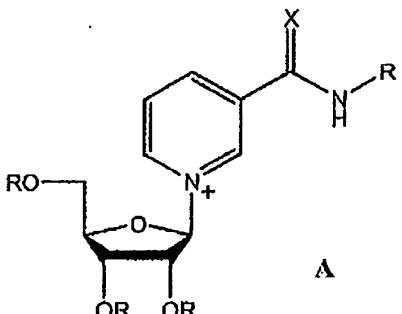
5 <210> 49
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: etiqueta 3xHA sintética

<400> 49
His Ala His Ala His Ala
1 5

REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto de fórmula A:

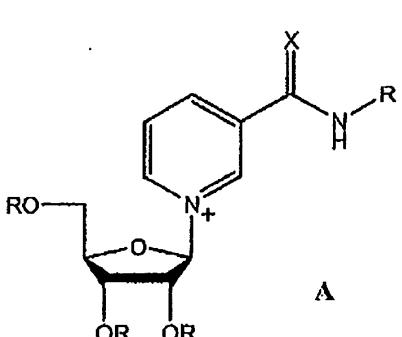


- 5 en donde
R representa, independientemente para cada caso, H, acetilo, benzoilo, acilo, fosfato, sulfato, (alcoxi)metilo, triarilmethyl, (trialquil)sililo, (dialquil)(aryl)sililo, (alquil)(diaril)sililo o (triaryl)sililo; y
X representa O o S,
10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad neurodegenerativa.

2.- El compuesto para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad neurodegenerativa de acuerdo con la reivindicación 1, que es nicotinamida ribósido.

15 3.- El compuesto para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad neurodegenerativa de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Huntington y distrofia muscular.

20 4.- Uso de un compuesto de fórmula A:



- 25 en donde
R representa, independientemente para cada caso, H, acetilo, benzoilo, acilo, fosfato, sulfato, (alcoxi)metilo, triarilmethyl, (trialquil)sililo, (dialquil)(aryl)sililo, (alquil)(diaril)sililo o (triaryl)sililo; y
X representa O o S,
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
para aumentar el período de vida de una célula o su resistencia al estrés, en donde la célula se pone en contacto
30 con el compuesto, y en donde la célula está *in vitro*.

5.- El uso de la reivindicación 4, en donde la célula es una célula eucariótica.

6.- El uso de la reivindicación 5, en donde la célula es una célula humana.

35 7.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en donde el compuesto es nicotinamida ribósido.

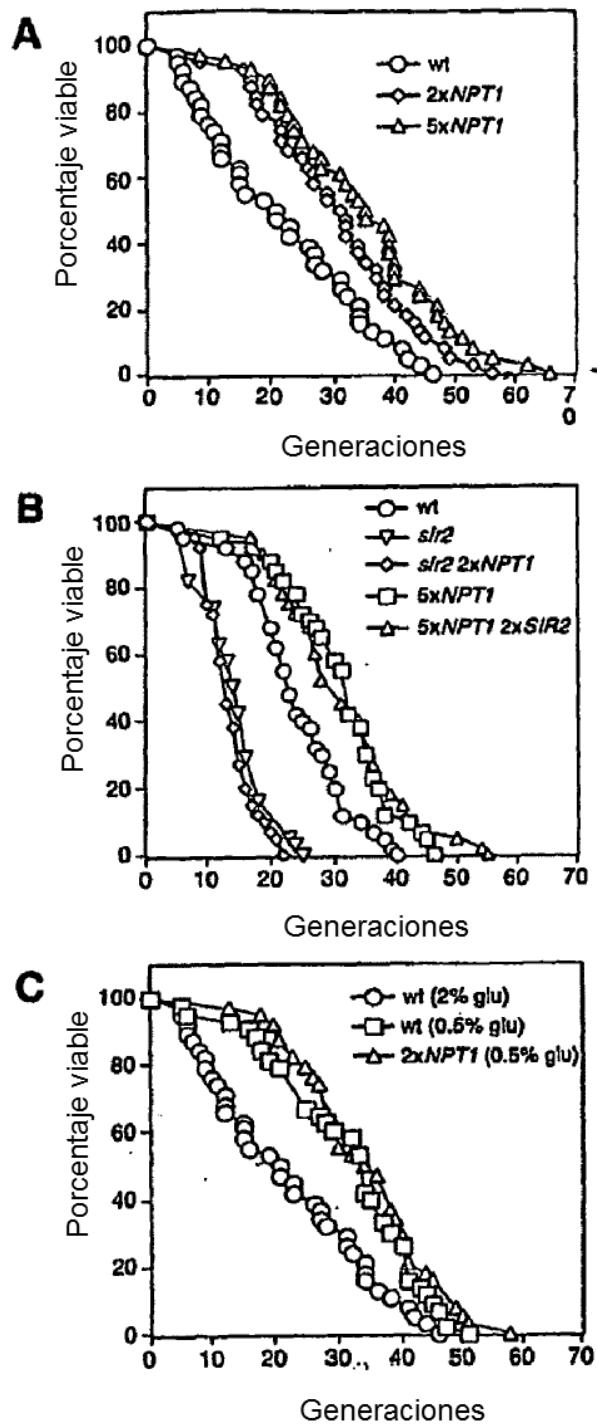


Figura 1

Figura 2

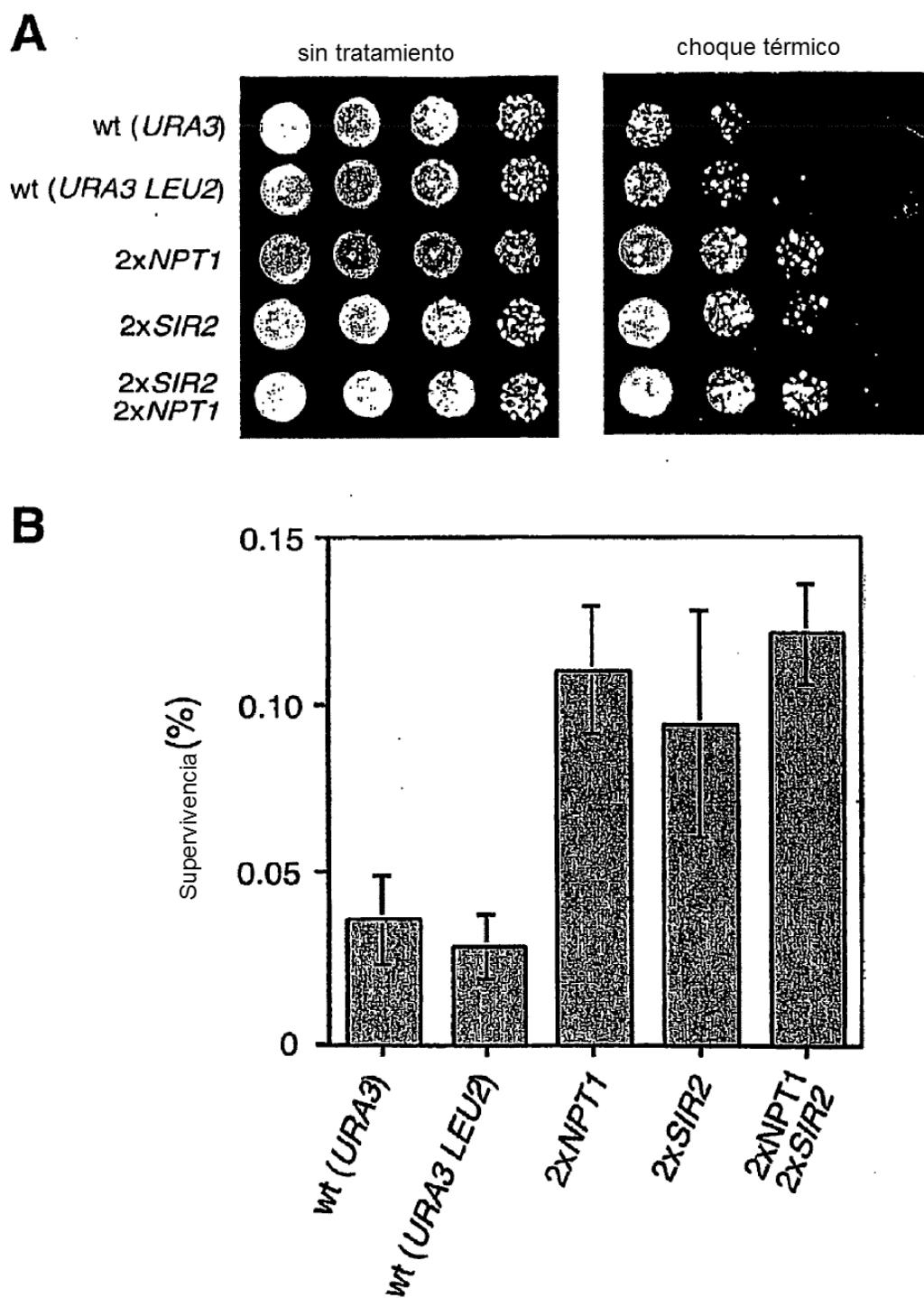


Figura 3

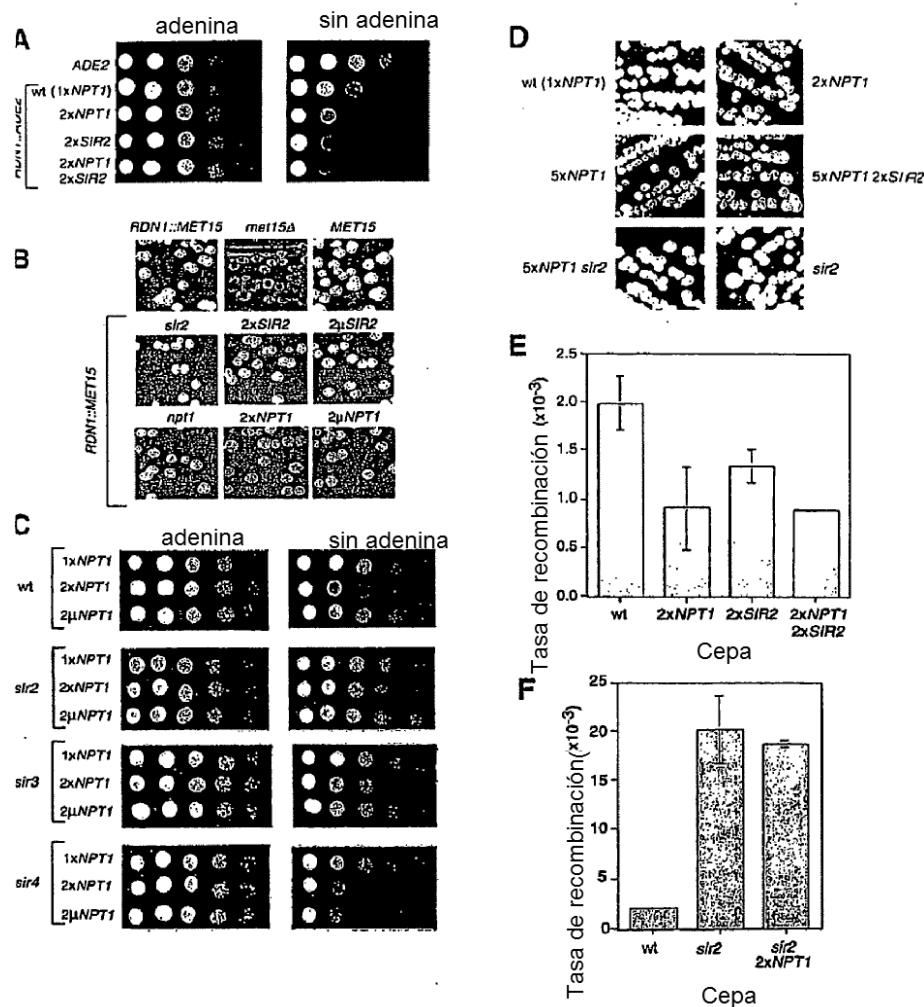


Figura 4

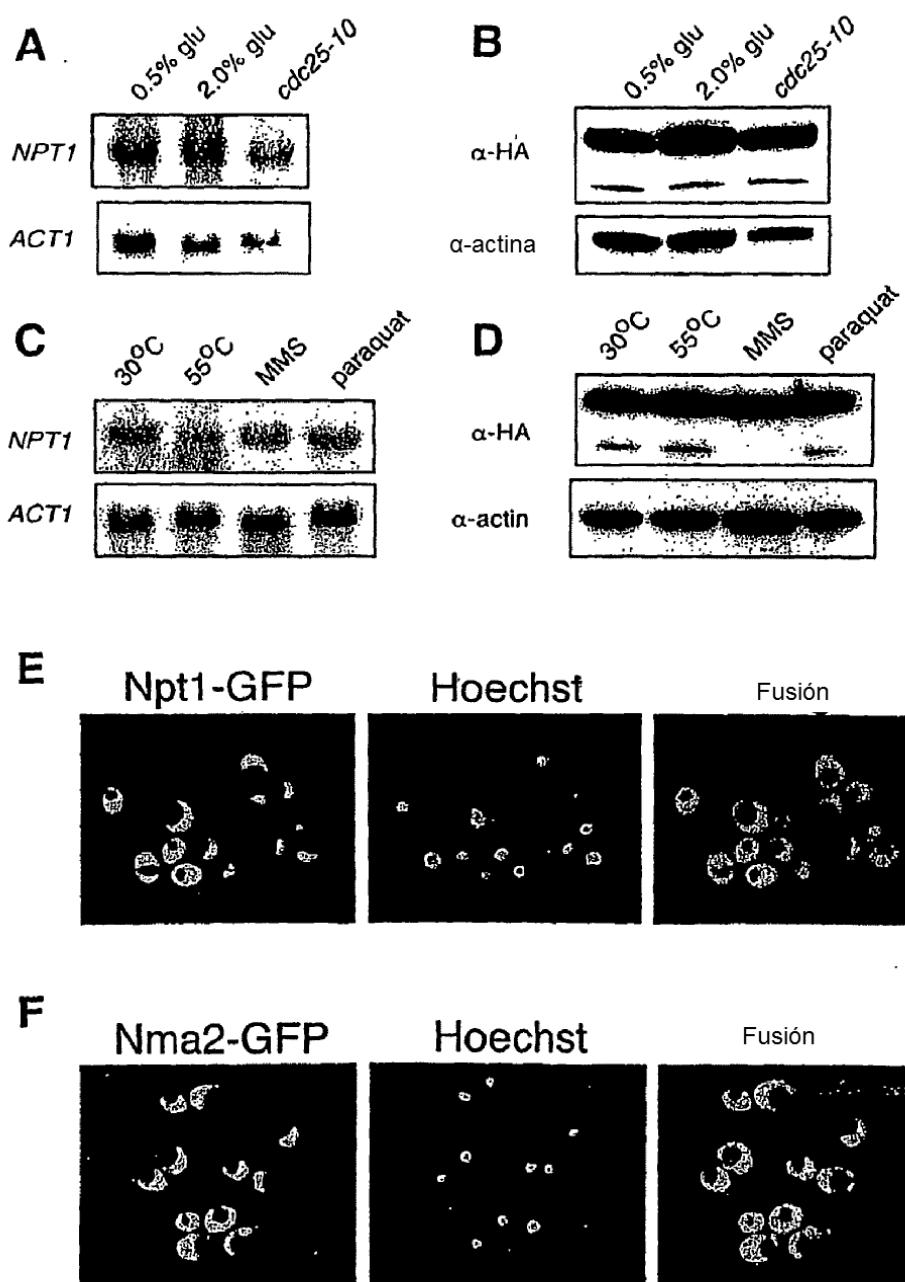


Figura 5

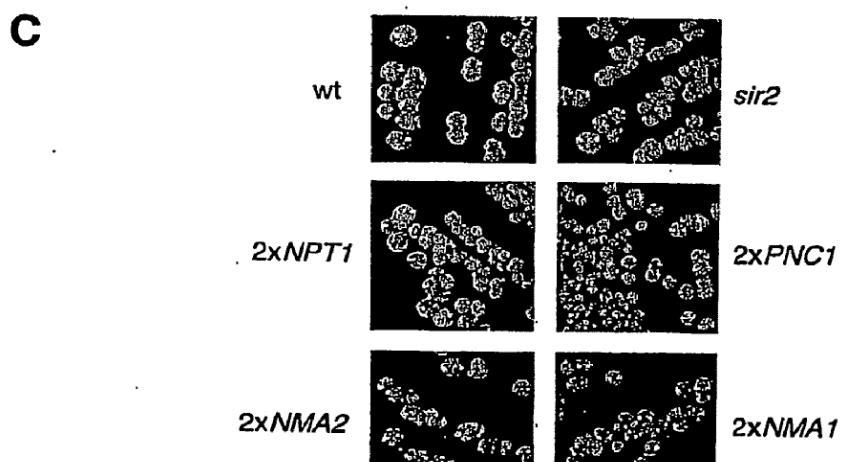
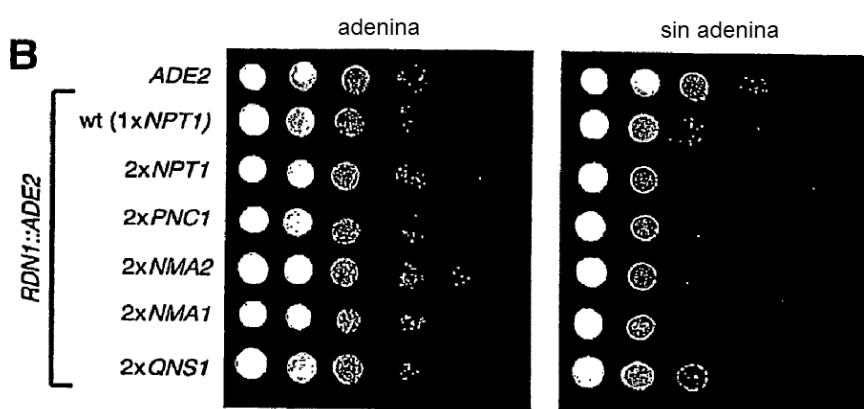
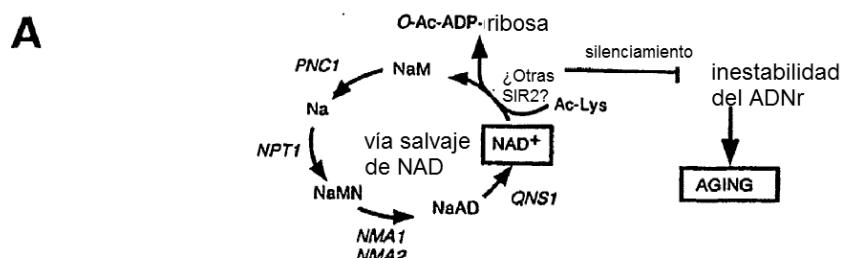


Figura 6

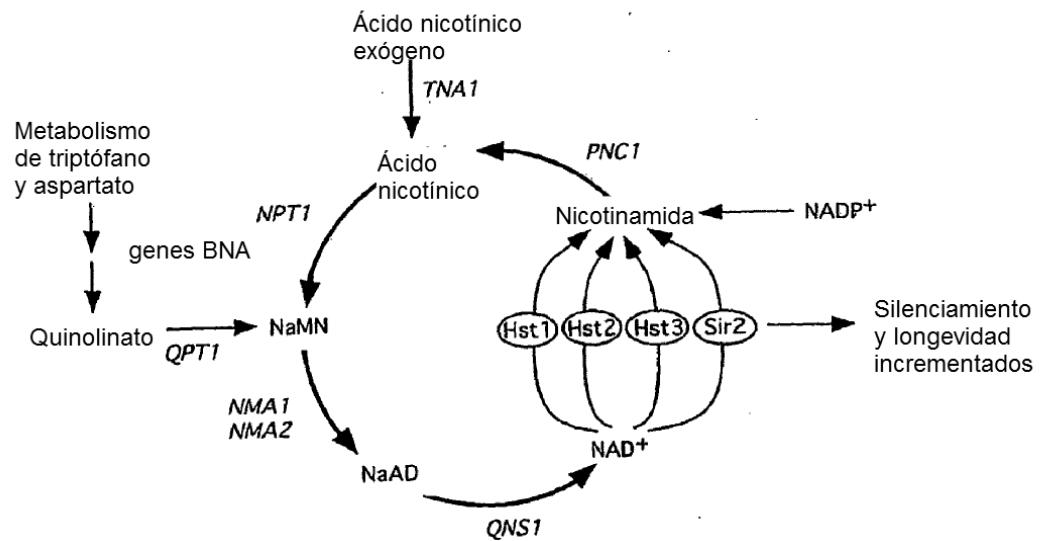


Figura 7

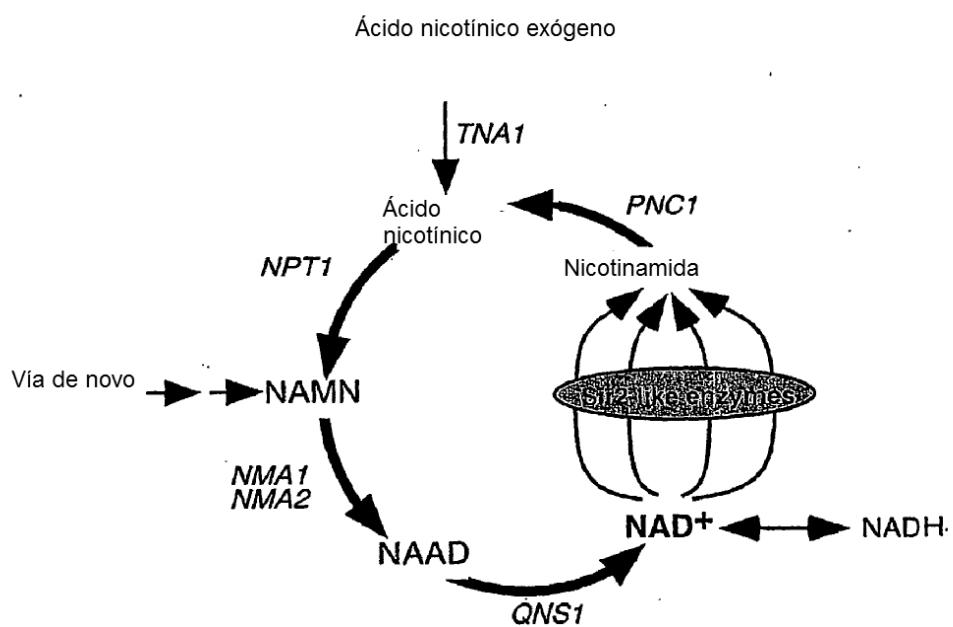


Figura 8

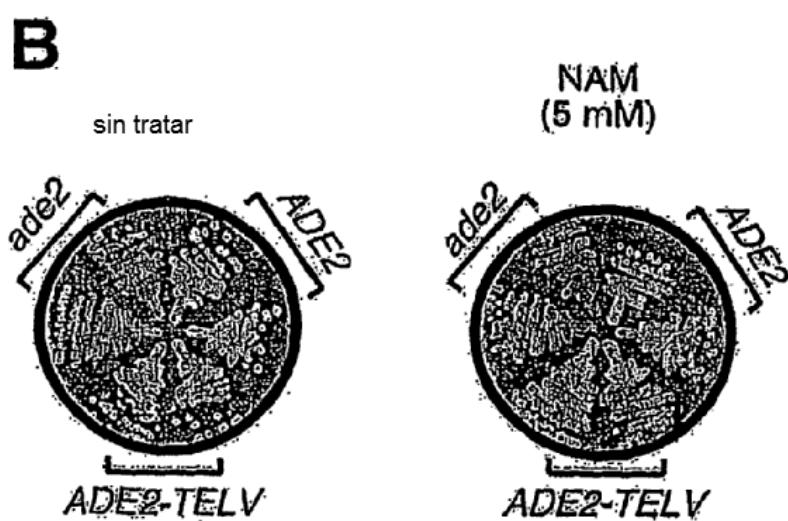
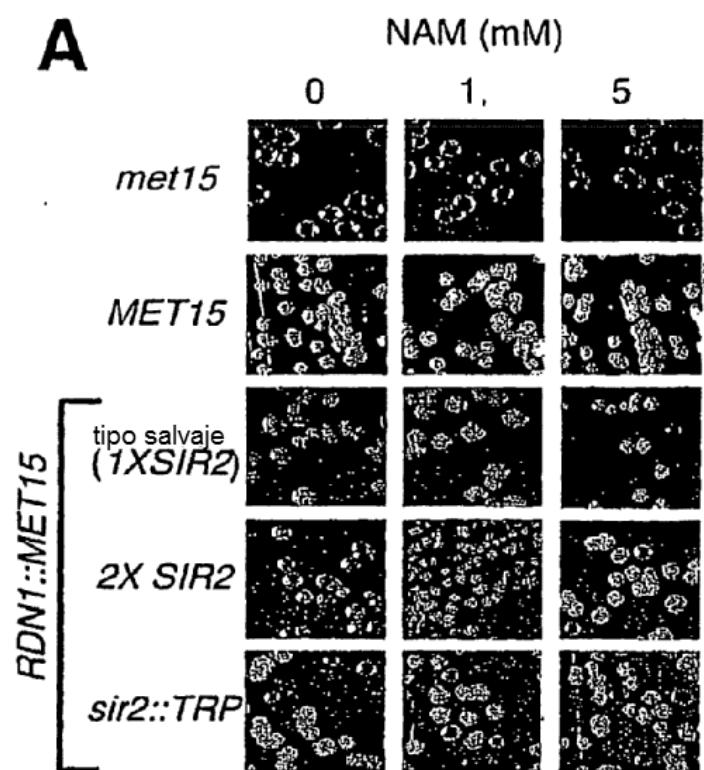
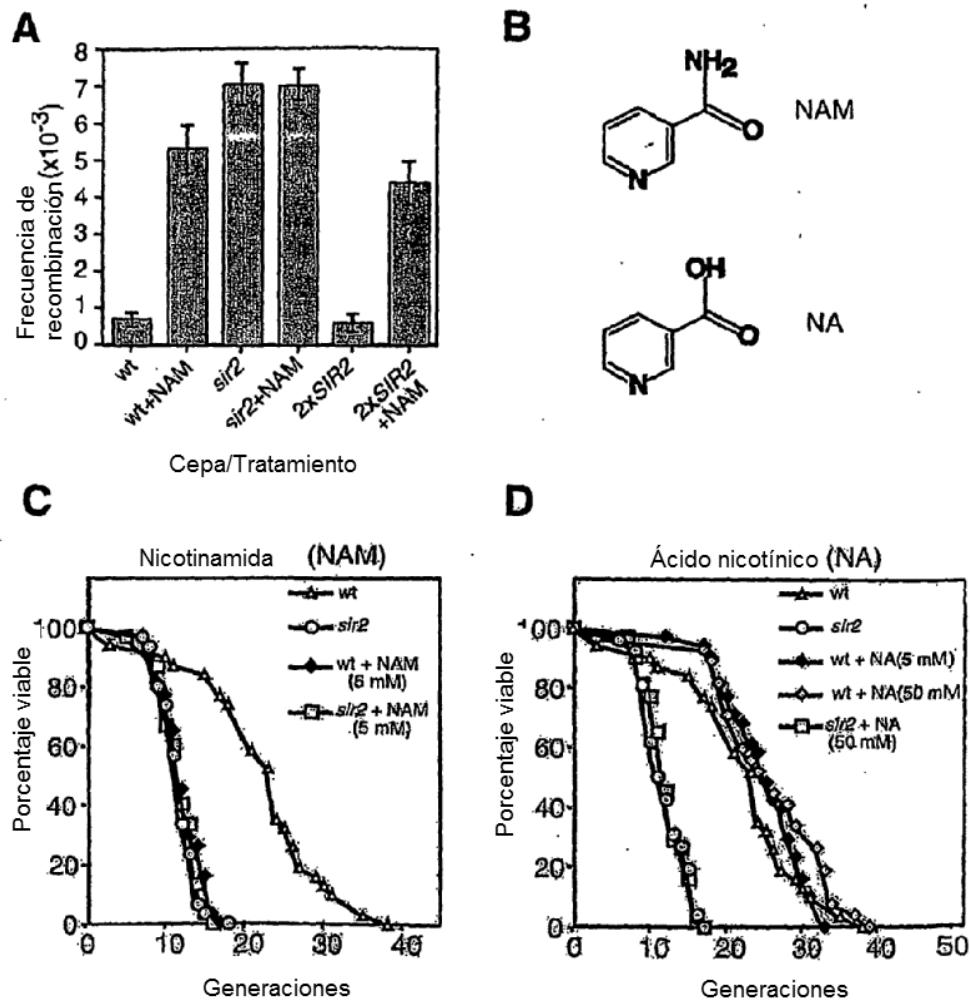


Figura 9



A

Figura 10A

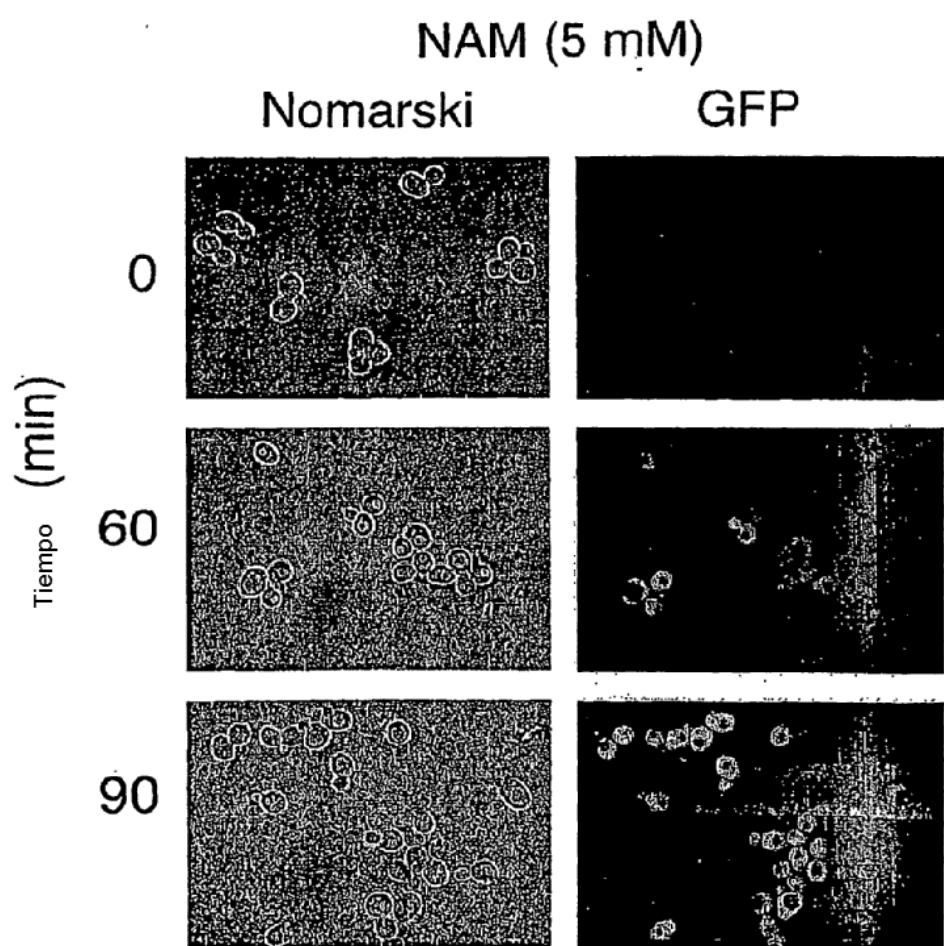


Figura 10 B y C

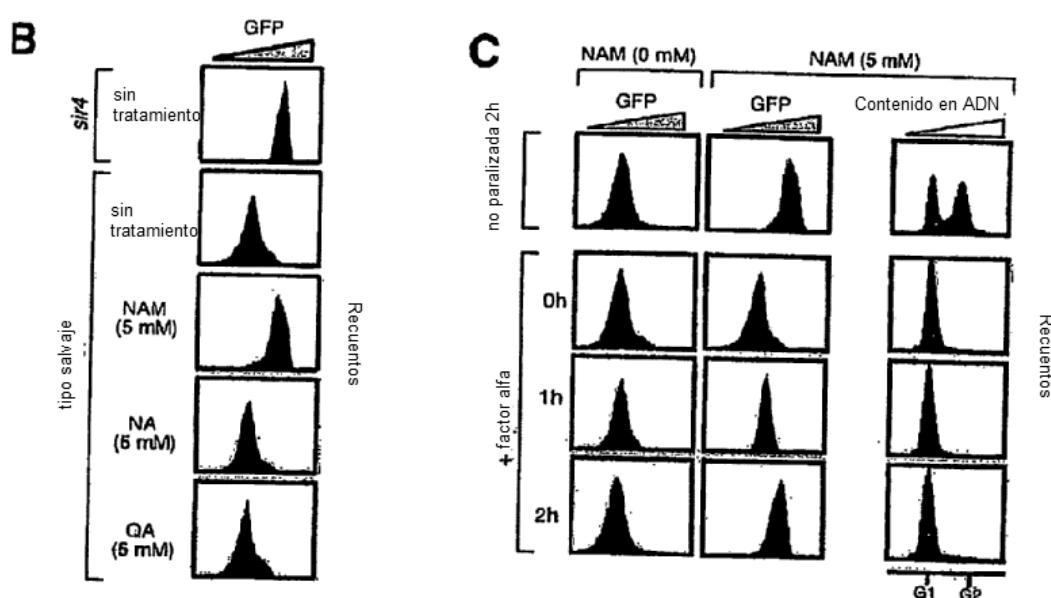


Figura 11

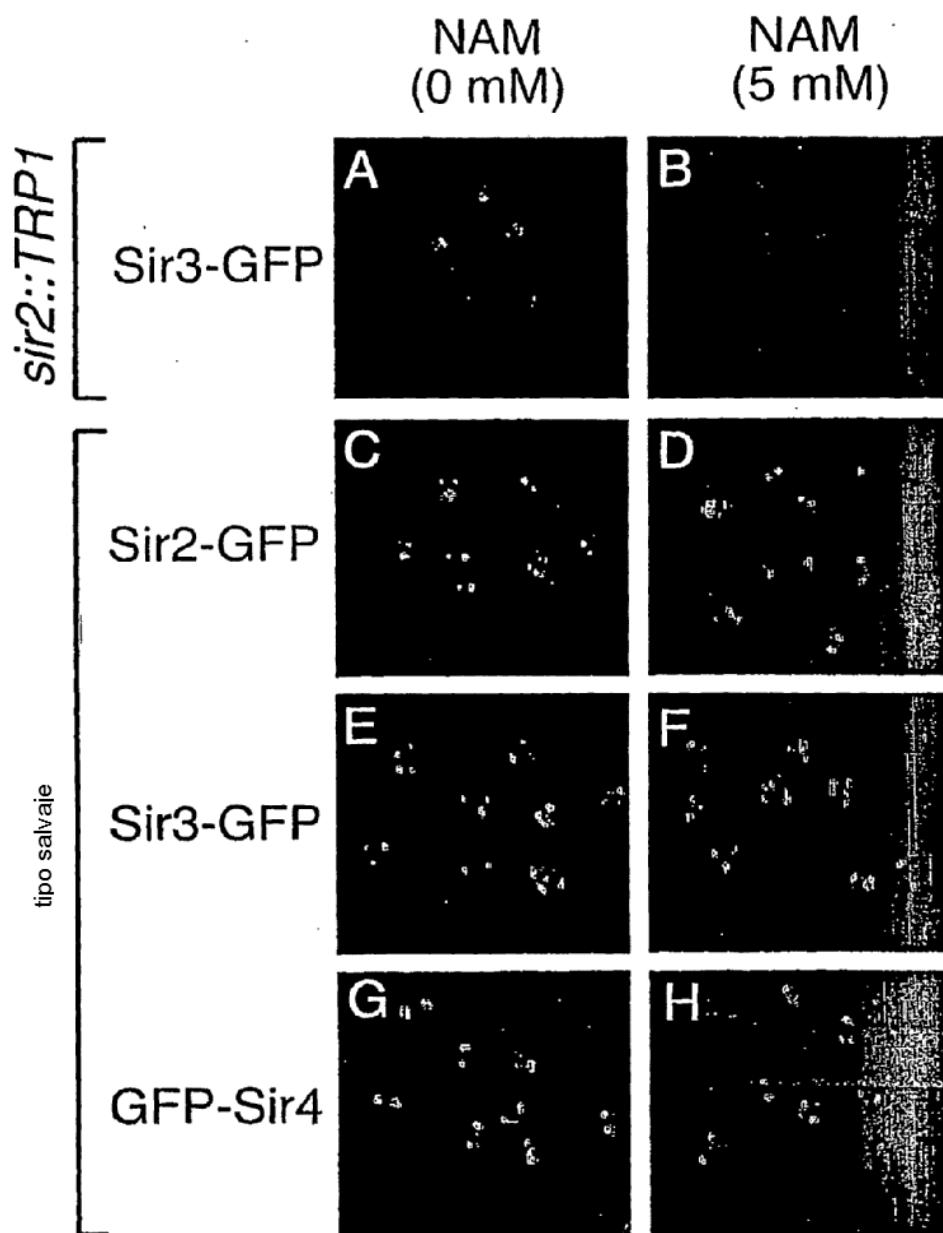


Figura 12

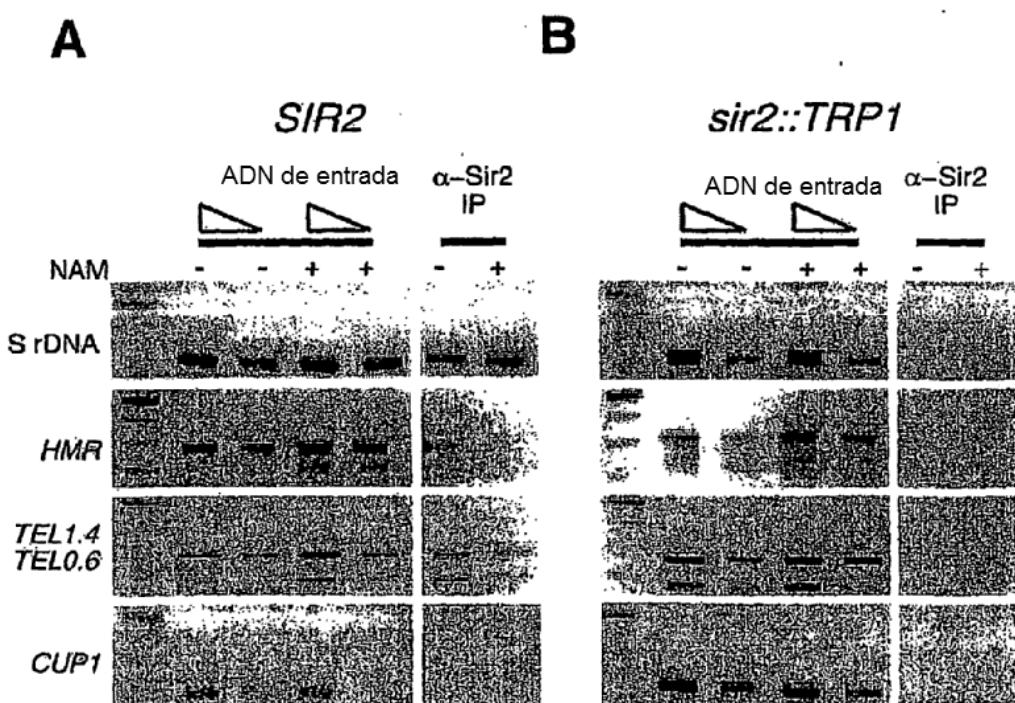


Figura 13

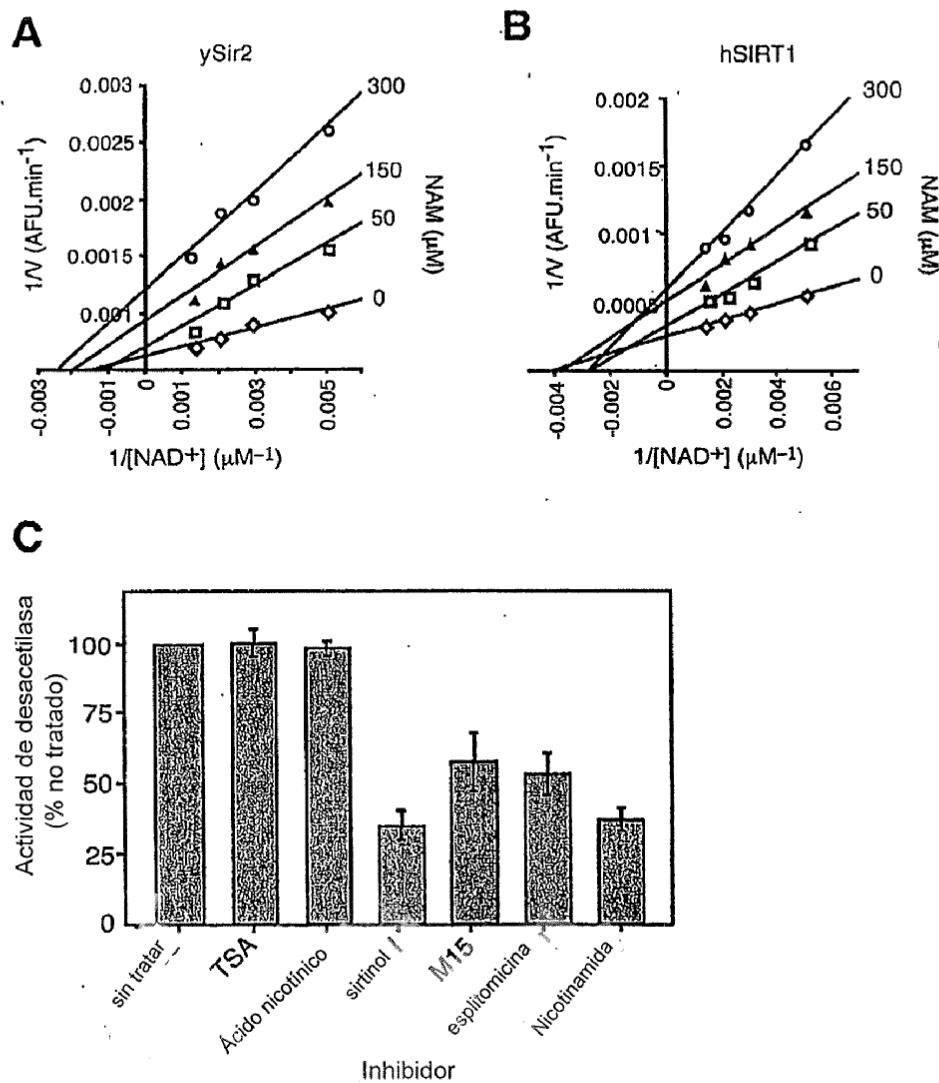


Figura 14

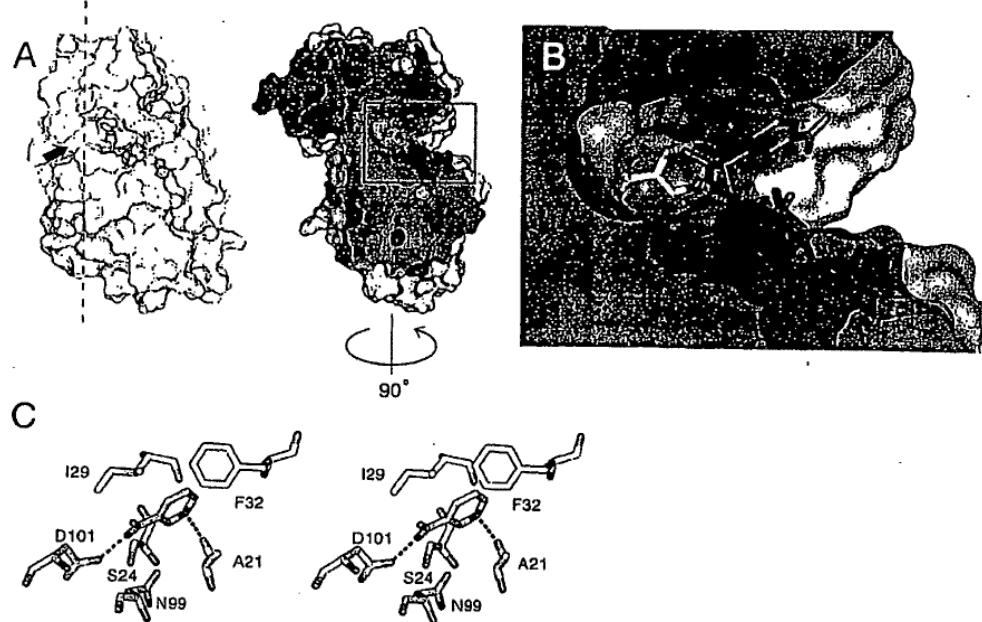


Figura 15

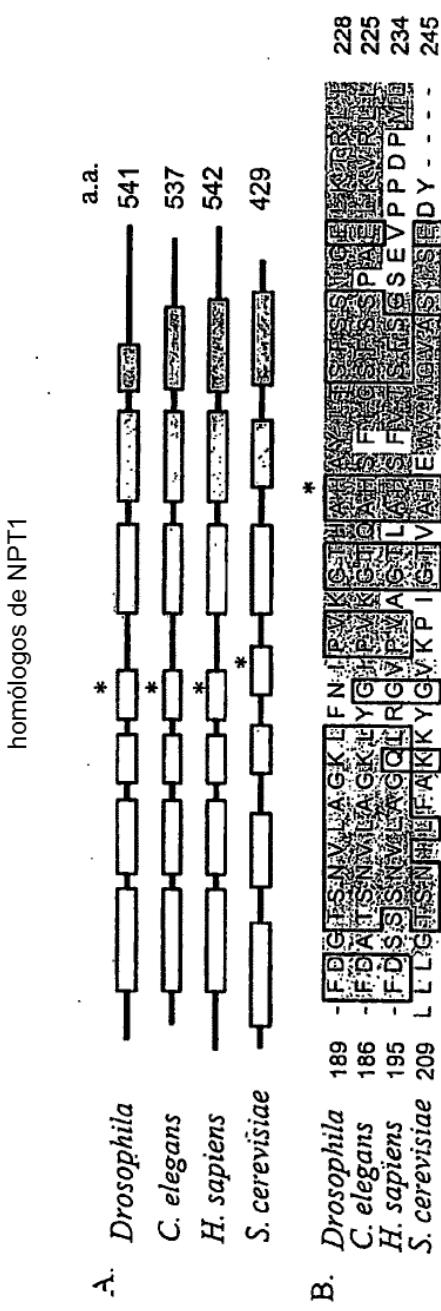


Figura 16

Figura 17

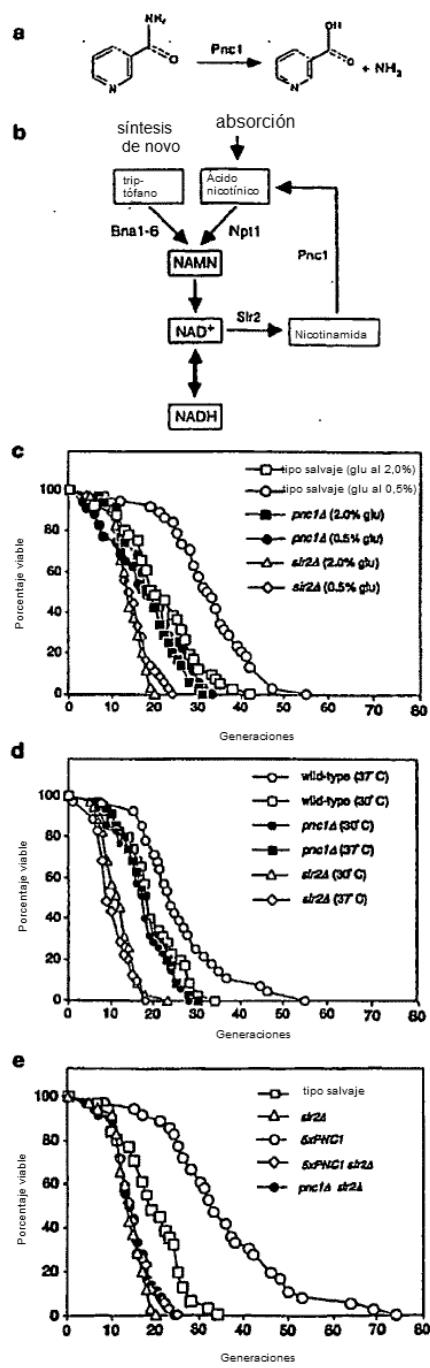


Figura 18

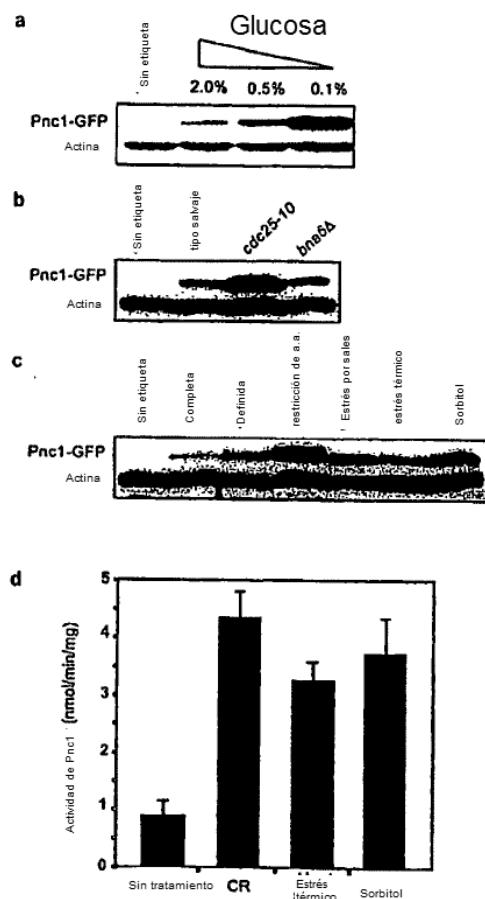


Figura 19

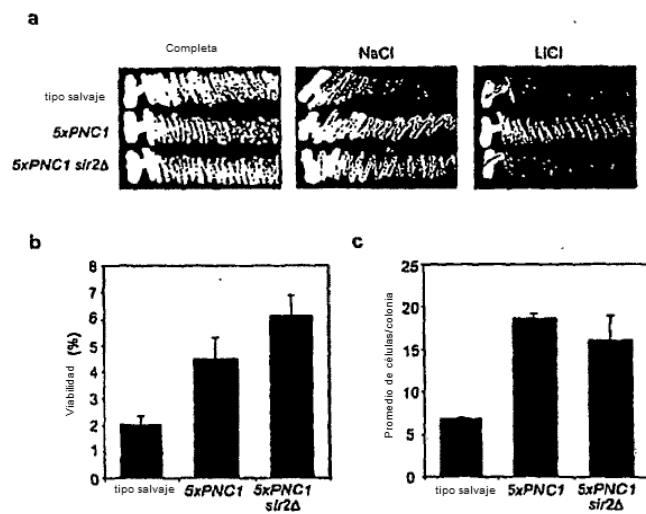


Figura 20

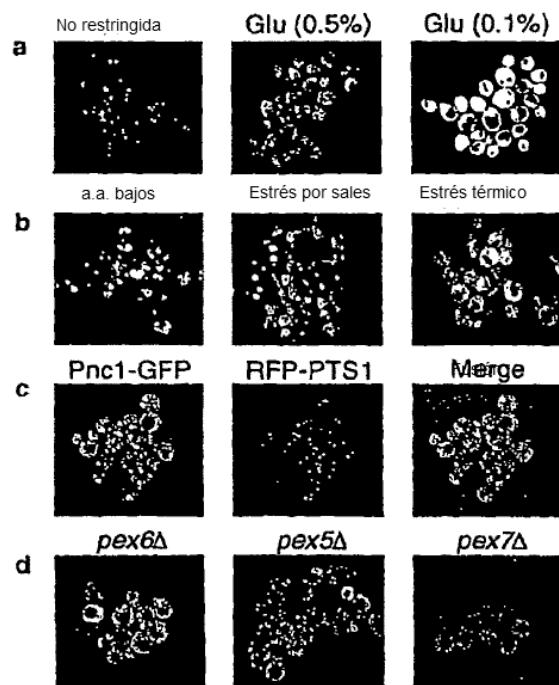


Figura 21

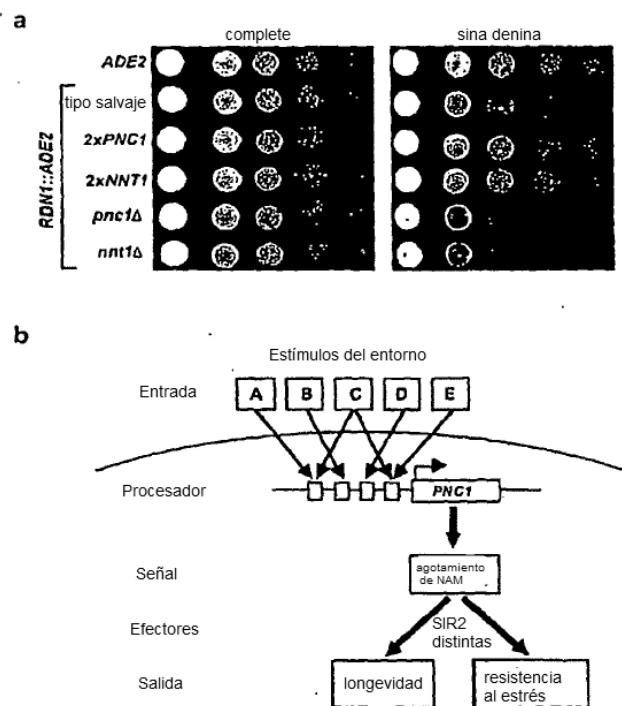
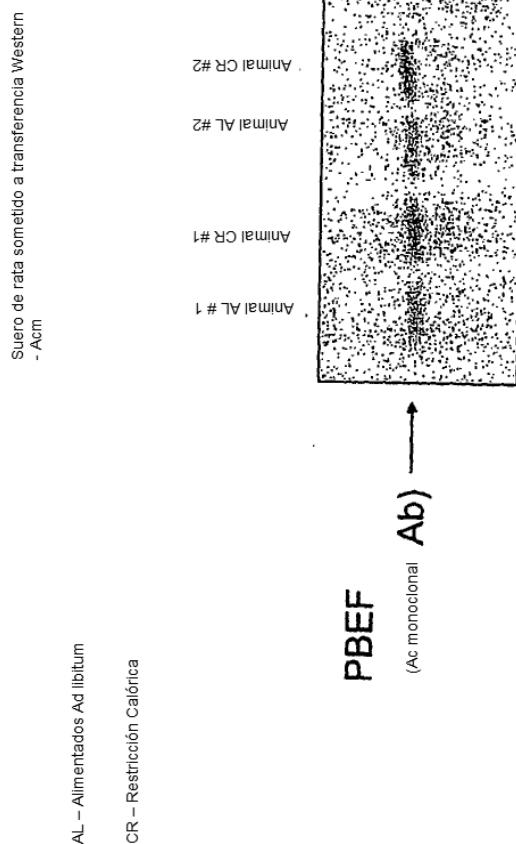
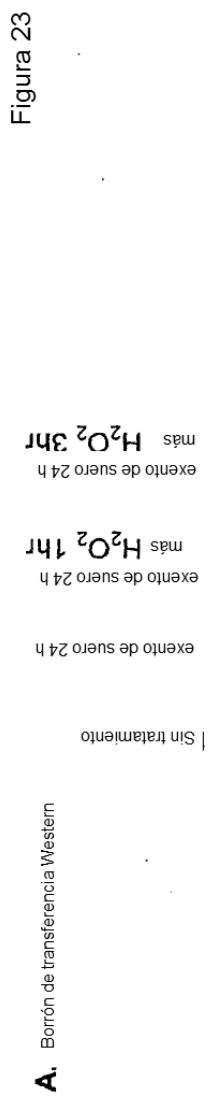


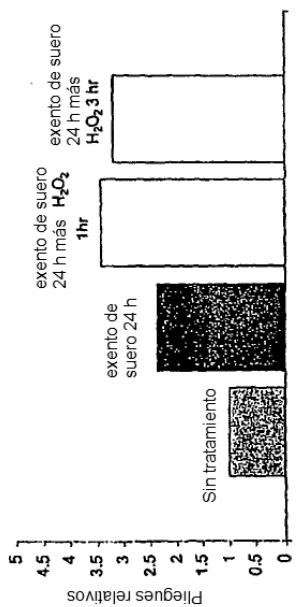
Figura 22
PBEF es mayor en el suero de ratas sometidas a restricción calórica



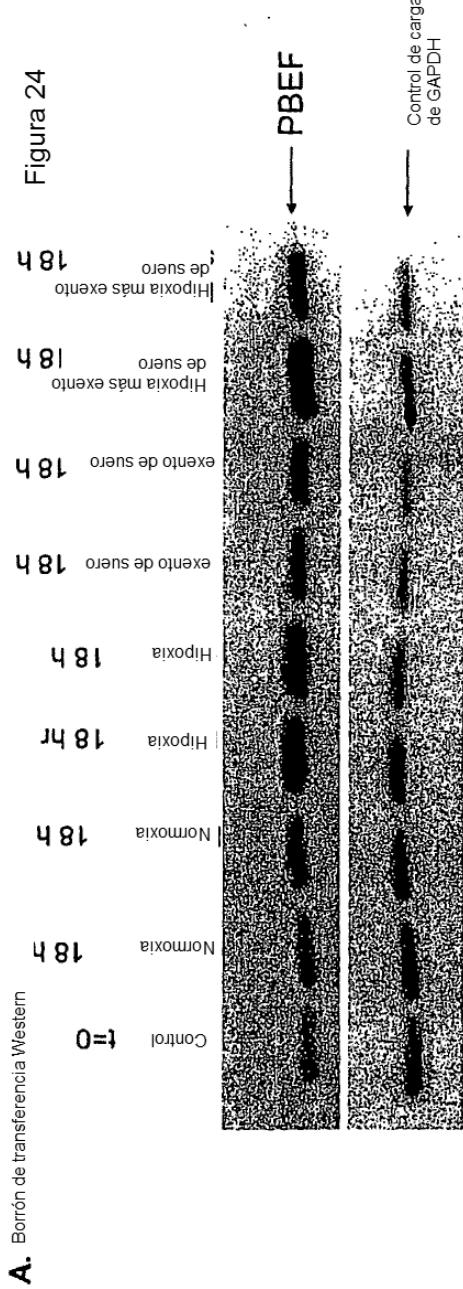
PBEF está supra-regulado por inanición de suero y estrés oxidativo en MEFs



B. Pliegues relativos de PBEF en MEFs tras estrés por integración



PBEF está supra-regulado en cardiomocitos por inanición de suero e hipoxia



B. Incremento relativo de pliegues de PBEF en cardiomocitos por estrés

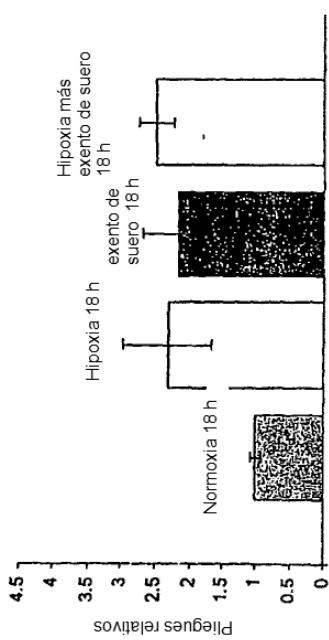
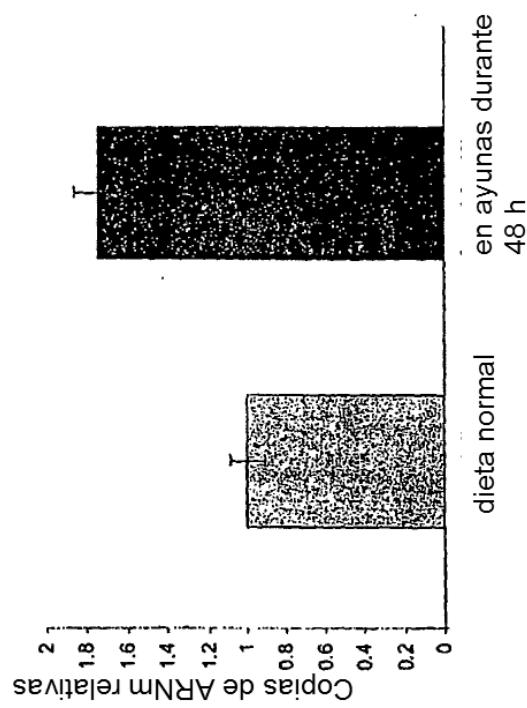


Figura 25

La transcripción de PBEF está supra-regulada mediante ayuno *in vivo* en ratas



Las copias de ARNm de PBEF relativas se midieron mediante RT-PCR en tiempo real en comparación con copias de beta-actina.