

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
10 de marzo de 2022 (10.03.2022)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2022/049320 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

A61K 31/7076 (2006.01) A61P 9/14 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2021/070638

(22) Fecha de presentación internacional:

03 de septiembre de 2021 (03.09.2021)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P202030906 04 de septiembre de 2020 (04.09.2020) ES

(71) Solicitantes: **FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL 12 DE OCTUBRE** [ES/ES]; Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital 12 de Octubre (IIS i+12), Centro de Actividades Ambulatorias, Bloque D - 6ª Planta, Avda de Córdoba, s/n 28041 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID** [ES/ES]; Ciudad Universitaria de Cantoblanco, Calle Einstein 3, 28049 Madrid (ES).

(72) Inventores: **MITTELBRUM HERRERO, María**; Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital 12 de Octubre (IIS i+12), Centro de Actividades Ambulatorias, Bloque D - 6ª Planta, Avda de Córdoba, s/n 28041 Madrid (ES). **OLLER PEDROSA, Jorge**; Universidad Autónoma de Madrid, Ciudad Universitaria de Cantoblanco, Calle Einstein 3, 28049 Madrid (ES). **GABANDÉ RODRÍGUEZ, Enrique**; Universidad Autónoma de Madrid, Ciudad Universitaria de Cantoblanco, Calle Einstein 3, 28049 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **ILLESCAS TABOADA, Manuel**; C/ Príncipe de Vergara, 197, Oficina 1º A, 28002 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG,

KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: NAD+ PRECURSORS FOR USE IN THE PREVENTION AND/OR TREATMENT OF HEREDITARY AORTIC ANEURYSMS

(54) Título: PRECURSORES DE NAD+ PARA USO EN LA PREVENCIÓN Y/O TRATAMIENTO DE ANEURISMAS AÓRTICOS HEREDITARIOS

(57) Abstract: The invention relates to a nicotinamide adenine dinucleotide (NAD+) precursor, or a pharmaceutical composition comprising same, for use in the prevention of the development of hereditary aortic aneurysms characterised by the presence of impaired mitochondrial respiration, and/or the treatment thereof. The invention also relates to a nutraceutical composition comprising a nicotinamide adenine dinucleotide (NAD+) precursor for use in preventing the development of hereditary aortic aneurysms characterised by the presence of impaired mitochondrial respiration.

(57) Resumen: Se describe un precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD+), o una composición farmacéutica que lo comprende, para uso en la prevención de la aparición y/o el tratamiento de aneurismas aórticos hereditarios que se caracterizan por la presencia de una respiración mitocondrial deficiente. Adicionalmente, también se describe una composición nutracéutica que comprende un precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD+), para uso en la prevención de la aparición de aneurismas aórticos hereditarios que se caracterizan por la presencia de una respiración mitocondrial deficiente



WO 2022/049320 A1

PRECURSORES DE NAD⁺ PARA USO EN LA PREVENCIÓN Y/O TRATAMIENTO DE ANEURISMAS AÓRTICOS HEREDITARIOS

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a un precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), o a una composición farmacéutica que lo comprende, para uso en la prevención de la aparición y/o el tratamiento de un aneurisma aórtico de etiología hereditaria que se caracteriza por la presencia de una respiración mitocondrial deficiente. Adicionalmente, la presente invención también se refiere a una composición nutracéutica que comprende un precursor de
10 nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), para uso en la prevención de la aparición de un aneurisma aórtico de etiología hereditaria que se caracteriza por la presencia de una respiración mitocondrial deficiente.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 El aneurisma aórtico (AA) es una patología vascular compleja caracterizada por una dilatación permanente de la pared de los vasos sanguíneos.

En función de su etiología, pueden distinguirse dos tipos de AA: aneurismas aórticos causados por un proceso degenerativo, asociado a factores de riesgo cardiovasculares y los aneurismas aórticos asociados a desórdenes hereditarios (AAH). Estos últimos están asociados con
20 mutaciones heredables de varios genes, incluyendo aquellos que codifican para proteínas de la matriz extracelular (MEC), miembros de la vía de señalización TGFβ y componentes actomiosínicos citoesqueléticos de células vasculares lisas musculares (CMLVs).

Existen principalmente cinco desordenes autosómicos dominantes, conocidos actualmente, que afectan a la estructura de las paredes arteriales: el síndrome de Marfan, el síndrome de
25 Loeys-Dietz, el síndrome de Ehlers-Danlos de tipo vascular, el síndrome de Cutis laxa y las formas Familiares de Disecciones y Aneurismas Torácicos no sindrómicos. El síndrome de Marfan es el AAH más común, está relacionado con mutaciones en la proteína extracelular fibrilina-1 y sus síntomas típicos cardiovasculares son la dilatación aórtica y la disección y prolapso de la válvula mitral. Sus alteraciones cardiovasculares están acompañadas por
30 características patologías musculoesqueléticas y la luxación del cristalino.

El AAH es un proceso típicamente asintomático que, por ello, no suele estar diagnosticado y su progresión se encuentra asociada a consecuencias devastadoras, tales como la ruptura aórtica y una muerte repentina debida a una hemorragia incontrolada. Desafortunadamente, solamente existen a día de hoy tratamientos farmacológicos limitados para retrasar la
35 progresión de dichos AAH, pero no existe ningún tratamiento para revertirlos. De hecho, las

únicas opciones capaces de prevenir la ruptura por aneurisma son las reparaciones endovasculares o cirugía. Por dicho motivo existe una necesidad urgente para identificar los mecanismos moleculares involucrados en los AA y, en particular, en los AA hereditarios para desarrollar enfoques farmacológicos que no solo prevengan, sino que reviertan también dichos aneurismas aórticos.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

Un aspecto de la presente invención se refiere a un precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), para uso en la prevención de la aparición y/o el tratamiento de un aneurisma aórtico de etiología hereditaria que se caracteriza por la presencia de una respiración mitocondrial deficiente.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y al menos un excipiente nutracéuticamente aceptable, para uso en la prevención de la aparición y/o el tratamiento de un aneurisma aórtico de etiología hereditaria que se caracteriza por la presencia de una respiración mitocondrial deficiente.

Adicionalmente, la presente invención también se refiere a una composición nutracéutica que comprende un precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y al menos un excipiente nutracéuticamente aceptable, para uso en la prevención de la aparición de un aneurisma aórtico de etiología hereditaria que se caracteriza por la presencia de una respiración mitocondrial deficiente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Declive de la función mitocondrial en síndrome de Marfan

Análisis de secuenciación de ARN de cuatro ratones *Fbn1*^{C1039G/+} con tres ratones *Fbn1*^{+/+} de la misma camada (ratones macho de 20 semanas de edad). (1A) Predicción de las principales vías canónicas predichas por análisis IPA (Ingenuity Pathway Analysis) en base a genes regulados diferencialmente. Las vías relativas al metabolismo están marcadas en **negrita**; P<0,01. (1B) Activación o inhibición de reguladores principales predichos por análisis IPA (desviaciones>-2 corregidas y puntuación z-> 4; P<0,05). (1C) Expresión de genes que codifican complejos mitocondriales (Co) y enzimas de beta-oxidación de ácidos grasos, y genes relacionados con la función mitocondrial y la glicolisis; p<0,05. (1D) Análisis RT-qPCR de la expresión de ARNm de Tfam y (1E) análisis PCRq del contenido relativo de ADNmt, en extractos aórticos de ratones *Fbn1*^{C1039G/+} y *Fbn1*^{+/+} de 20 semanas de edad. (1F) Análisis RT-qPCR de la expresión de ARNm de Tfam y PPargc1 y (1G) análisis qPCR del contenido

relativo de ANDmt, en CMLVs transducidas con *shFbn1*- y respecto a *shControl*. (1H) Tasa de consumo de oxígeno (OCR) en CMLVs *shFbn1*- y *shControl* en condiciones de respiración basal (centro) y después de la adición del inhibidor del complejo V oligomicina (I) y fluoro-carbonil ciano-fenilhidrazona (FCCP) (II) para medir la respiración máxima (derecha), seguido de una combinación de rotenona y antimicina A (III). (1I) Niveles de lactato extracelular en sobrenadantes de CMLVs *shFbn1*- y *shControl*. Análisis de muestras de aortas ascendentes humanas de pacientes de síndrome de Marfan y de donantes control. (1J) contenido ADNmt y (1K) expresión de ARNm de genes que codifican componentes de complejos mitocondriales y de genes relacionados con la función mitocondrial y la glicolisis. (1L) Inmunohistoquímica y cuantificación. Análisis de fibroblastos dérmicos primarios de 4 pacientes de síndrome de Marfan y 4 individuos sanos (control): (1M y 1N) OCR en fibroblastos dérmicos procedentes de muestras humanas con síndrome de Marfan y controles en condiciones de respiración basal y después de la adición de oligomicina (I), (FCCP) (II) y una combinación de rotenona y antimicina A (III); (1O) niveles extracelulares de lactato; (1P) análisis qPCR del contenido de ADNmt y análisis PCTq-RT de la expresión de ARNm de *TFAM* y *PPARGC1A*; (1Q) análisis RT-qPCR de la expresión de ARNm de *MT-ND1*, *SDHA*, *CYCS*, *MT-CO1*, *MY-ATP6* (gráfica superior), *UCP2*, *HIF1A*, y *MYC* (gráfica inferior). Los datos de (1D-R) son medias $\pm$ error medio estándar. La significación estadística fue evaluada por el test de t-Student. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001 frente los ratones controles, ratones *Fbn1*^{+/+} (D, E), *shControl* (F, G, H, I), o donantes sanos (J-Q).

Figura 2: Niveles del ARNm de *Fbn1*.

Expresión del ARNm de *Fbn1* después de transducción con *shFbn1* o *shControl*.

Figura 3: La ablación condicional de *Tfam* en CMLVs produce una predisposición a aneurismas y disecciones aórticas similares a los ratones modelo de AAH.

(3A) Análisis PCRq-RT de la expresión de *Tfam* (izquierda) y análisis qPCR del contenido de ADNmt (derecha) en extractos de aortas de ratones *SM-Tfam*^{+/+} y *SM-Tfam*^{-/-} después de tratamiento con tamoxifeno (Tmx) durante 28 semanas. (3B) Porcentaje de supervivencia después de tratamiento con inyecciones de Tmx en ratones *SM-Tfam*^{+/+} y *SM-Tfam*^{-/-}; n=20. (3C) Evolución de la presión sanguínea (BP diastólica –derecha– y sistólica –izquierda– después de tratamiento con inyecciones de Tmx en ratones *SM-Tfam*^{+/+} y *SM-Tfam*^{-/-}. (3D) Evolución de los diámetros máximos de la aorta ascendente (AsAo -izquierda) y aorta abdominal (AbAo -derecha) después de tratamiento con Tmx en ratones *SM-Tfam*^{+/+} y *SM-Tfam*^{-/-}. (3E) Diseño experimental para los ensayos de la figura 3H: 56 días (8 semanas)

después de tratamiento con inyecciones de Tmx, se implantaron minibombas de infusión del hipertensor Angiotensina-II (AngII), en 6 ratones *SM-Tfam*^{+/+} y 10 ratones *SM-Tfam*^{-/-}. El análisis por ultrasonidos y de la presión sanguínea (BP) se llevó a cabo 6 veces (triángulos vacíos). (3F) Evolución de la presión sanguínea sistólica (arriba-izquierda) y diastólica (arriba-derecha) y de los diámetros máximos AsAo (abajo-izquierda) y AbAo (abajo-derecha) después de la infusión de AngII. (3G) Incidencia de aneurismas aórticos (izquierda) y porcentaje de supervivencia (derecha) de ratones *SM-Tfam*^{+/+} y *SM-Tfam*^{-/-} con AngII de la misma cohorte que los ratones de 3E. (3H) Incidencia y localización de disecciones aórticas (izquierda) y hematomas intramurales (HIM) (derecha) en la misma cohorte de ratones mostrada en 3E. (A, C, D, F) Se muestran datos con media $\pm$ error estándar medio. La significación estadística fue analizada mediante el método de t-Student (A), mediante rango-logarítmico (Mantel-Cox) (B,) o mediante ANOVA bidireccional (C, D, F).

Figura 4: Ablación in vitro de *Tfam* en CMLVs.

CMLVs primarias de ratones *Tfam*flx/flx fueron transducidas con vectores lentivirales que expresan GFP (proteína fluorescente verde, LV-Mock) o con que expresan Cre (LV-Cre) y fueron analizadas 10 días después. (4A) Análisis de RT-qPCR de expresión de ARNm relativa de *Tfam*, *Mt-Nd1*, *Mt-Co1* y *Slc2a1*. (4B) Análisis qPCR del contenido de ADNmt relativo. (4C) Tasa de consumo de oxígeno (OCR) en condiciones de respiración basales (abajo-izquierda) y después de la adición de oligomicina (I) y FCCP (II) para medir la respiración máxima (abajo-derecha), seguido de una combinación de rotenona y antimicina A (III). (4D) Niveles de lactato extracelular normalizado. (4E) Evaluación por PCRq-RT de la expresión relativa de ARNm de los genes contráctiles del músculo liso *Myh11*, *Acta2*, *Cnn1*, y *Smtn*. (4F) Evaluación de RT-qPCR de la expresión relativa de ARNm de genes de fenotipo sintético de CMLVs: *Spp1*, *Nos2*, *Mmp9*, y *Mmp2*.

Figura 5: El tratamiento con nicotinamida ribonucleósido mejora la homeostasis aórtica en un modelo de ratón de síndrome de Marfan

(5A) Diseño experimental: ratones macho controles (*Fbn1*^{+/+}) y del modelo de Síndrome de Marfan (*Fbn1*^{C1039G/+}) de 16 semanas fueron tratados con nicotinamida ribonucleósido (NR) o con vehículo durante 28 días (flechas). El análisis ecográficos y de presión sanguínea se llevó a cabo 5 veces (triángulos): n=9. (5B) Evolución del diámetro máximo de AsAo (arriba-izquierda) y AbAo (arriba-derecha) y de la presión sanguínea diastólica (abajo-izquierda) y sistólica (abajo-derecha) durante el tratamiento con NR; n=9. (5C) Cuantificación de las rupturas de bandas elásticas en AsAo (izquierda) y AbAo (centro) y del grosor de la media

aórtica (derecha). (5D) Análisis RT-qPCR de ARNm de *Tfam* (izquierda) y *mt-Co1* (derecha). (5E) Análisis del contenido relativo de ADNmt. $P < 0,05$, cambios en escala logarítmica. El análisis estadístico fue evaluado mediante ANOVA bidireccional (C) o unidireccional (E-G). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ para ratones *Fbn1*^{C1039G/+} frente a ratones control *Fbn1*^{+/+}; # $P < 0.05$, ##### $P < 0.00001$ para ratones *Fbn1*^{C1039G/+}NR frente a ratones control *Fbn1*^{C1039G/+}.

Figura 6: El tratamiento con nicotinamida ribonucleósido mejora la respiración mitocondrial y el fenotipo contráctil en células de síndrome de Marfan (MFS)

Se trataron CMLVs primarias, transducidas con *shFbn1* o *shControl*, con nicotinamida ribonucleósido (NR) durante 5 días. (6A) Tasa de consumo de oxígeno (OCR) en CMLVs *shFbn1* y *shControl* incubadas con o sin NR, en condiciones de respiración basales (abajo-izquierda) y después de la adición de oligomicina (I) y FCCP (II) para medir la respiración máxima (abajo-derecha), seguido de una combinación de rotenona y antimicina A (III). (6B) Niveles extracelulares de lactato. (6C) Análisis de qPCR del contenido de ADNmt. (6D) Análisis RT-qPCR de la expresión de ARNm de *Tfam* (izquierda), *Ppargc1a* (centro) y *Mt-Co1* (derecha). (6E) Análisis RT-qPCR de la expresión de ARNm de *Mmp9*, *Mmp2*, *Spp1*, and *Col1a1*. Efecto del tratamiento con NR en fibroblastos dérmicos de 4 pacientes de síndrome de Marfan y 4 donantes sanos (control); las células fueron tratadas con NR durante 5 días. (6F) OCR (izquierda) en condiciones de respiración basales (centro) después de la adición de oligomicina (I) y FCCP (II) para medir la respiración máxima (derecha), seguido por una combinación de rotenona y antimicina A (III). (6G) Niveles de lactato extracelulares. (6H) Análisis PCRq del contenido de ADNmt. (6I) Análisis de expresión de ARNm de *MTCO1*, *MT-ND6*, *TFAM*, y *HIF1A*. (6J) Análisis de expresión de ARNm de *COL1A1*, *ACAN*, *CNN2*, y *TGFB3*. La significación estadística fue evaluada por ANOVA unidireccional: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ frente a *ShControl* (A-E) o frente Control (F-J); # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ frente a *ShFbn1* (A-E) o frente a MFS (F-J).

Figura 7: El tratamiento con NR de modelos *in vitro* de formas Familiares de Disecciones y Aneurismas Aórticos Torácicos no sindrómicos (FTAAD) y de síndrome de Loeys-Dietz (LDS).

Efecto de NR en CMLVs primarias de ratón que sobreexpresan ACTA2^{R178H} (7A1) o TGFB2^{G317W} (7A2) como modelos de FTAAD y LDS respectivamente. Las CMLVs fueron tratadas 5 días con NR. (7A) OCR (izquierda) en condiciones de respiración basales (centro) y después de la adición de oligomicina (I) y FCCP (II) para medir la respiración máxima (derecha), seguido de una combinación de rotenona y antimicina A (III). El panel inferior

muestra los niveles extracelulares de lactato. (7B) Análisis qPCR del contenido relativo de ADNmt. (7C) Análisis RT-qPCR de expresión de ARNm de *Tfam*, *Mt-Co1* y *Ppargc1a*. (7D) Análisis RT-qPCR de expresión de ARNm de *Mmp9*, *Mmp2*, *Spp1*, y *Col1a1*. Los datos mostrados son las medias $\pm$ error medio estándar. La significación estadística fue evaluada por ANOVA unidireccional: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001 frente a Control; # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001, #### P < 0.0001 frente a tratamiento con NR.

Figura 8: Tratamiento con NR en ratones hembra modelo de síndrome de Marfan.

(8A) Diseño experimental: Ratones hembra *Fbn1*^{+/+} and *Fbn1*^{C1039G/+} de 16 semanas de edad fueron tratados con vehículo o NR durante 28 días: n=4 ratones *Fbn1*^{+/+}; n=3 ratones *Fbn1*^{C1039G/+} tratados con vehículo; n=3 ratones *Fbn1*^{C1039G/+} tratados con NR. Un análisis por ecografía y de presión sanguínea (BP) fue llevado a cabo 5 veces (triángulos). (8B) Diámetros máximos de AsAo (aorta ascendente – arriba/izquierda) y AbAo (aorta abdominal – arriba/derecha) y la BP diastólica (abajo/derecha) y sistólica (abajo/izquierda) después de tratamiento con NR. (8C) Cuantificación de las rupturas de elastina en la AsAo (izquierda) y el grosor de la capa media aórtica(derecha). La significación estadística fue evaluada por ANOVA bidireccional (8B) o unidireccional (8C). *P < 0.05, **P < 0.01, ****P < 0.0001 para *Fbn1*^{C1039G/+} frente a *Fbn1*^{C1039G/+} tratados con NR.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

A pesar de que los aneurismas aórticos hereditarios son enfermedades que presentan diferencias de etiología significativas, la presente invención muestra que los cambios de fenotipo contráctil que ocurren en estas enfermedades hereditarias están modulados por un declive en el metabolismo mitocondrial de las células musculares lisas vasculares (CMLVs) y que, potenciar el metabolismo mitocondrial es un enfoque terapéutico adecuado para restablecer la homeostasis de las CMLVs y prevenir la evolución y desarrollo de aneurismas aórticos en dichos pacientes. En la presente invención se describe cómo los precursores de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) son capaces de incrementar la función de la respiración mitocondrial, previniendo y proporcionando tratamiento para enfermedades que cursan con una respiración mitocondrial deficiente y, en concreto, para la prevención de la aparición y tratamiento de los aneurismas aórticos hereditarios.

Por tanto, la presente invención se refiere a un precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), para uso en la prevención de la aparición y/o el tratamiento de un aneurisma aórtico de etiología hereditaria (AAH) que se caracteriza por la presencia de una respiración mitocondrial deficiente.

La presente invención divulga varios ensayos *in vitro* e *in vivo* realizadas con muestras de pacientes humanos de síndrome de Marfan, modelos de ratón de síndrome de Marfan y modelos de CMLVs de otros AAH tales como el síndrome de Loeys-Dietz y de formas Familiares de Disecciones y Aneurismas Torácicos no sindrómicos. Dichos ensayos muestran
5 cómo, en todos los casos, los AAH muestran una etiología común en la que existe un declive de la respiración mitocondrial.

El modelo animal de Síndrome de Marfan, el ratón *Fbn1*^{C1039G/+} reproduce la dilatación aórtica, aneurismas y las características histológicas de la degeneración aórtica de la media encontrada en pacientes con síndrome de Marfan. Tal como muestra el ejemplo 1, relativo a
10 los mecanismos moleculares subyacentes de la formación de AA de etiología hereditaria, se llevaron a cabo análisis transcripcionales de aortas de ratones *Fbn1*^{C1039G/+}. Los niveles de ADNmt y del ARNm *Tfam* en aortas *Fbn1*^{C1039G/+} mostró un contenido de ADNmt menor del normal. Además, dicho modelo mostró una reducción de la respiración mitocondrial, acompañado por un aumento de la producción extracelular de lactato, un indicador de
15 glicolisis.

Por otro lado, para modelizar el síndrome de Marfan *in vitro*, se silenció el gen *Fbn1* en CMLVs primarias murinas. Los datos obtenidos *in vitro* confirmaron los datos obtenidos con los ratones modelo de Marfan. Además, el análisis de flujo de la tasa de consumo de oxígeno (OCR), reveló una reducción de la respiración mitocondrial en células con *Fbn1*-silenciado,
20 acompañado por un aumento de la producción extracelular de lactato, un indicador de glicolisis.

Para confirmar estas observaciones en muestras humanas, se midió el ADNmt y la expresión de los genes de función mitocondrial en aortas de pacientes de síndrome de Marfan. A este respecto, los datos del ejemplo 1 indican que las muestras de aneurismas aórticos de
25 pacientes de síndrome de Marfan mostraron niveles significativamente más bajos de ADNmt y transcripción reducida de genes codificadores de complejos mitocondriales o que involucran la función mitocondrial, mostrando, además, una regulación aumentada de genes involucrados en el desacoplamiento mitocondrial y la reconducción glicolítica del metabolismo. Además, el análisis de la actina muscular lisa (SMA) permitió confirmar que la regulación
30 disminuida de los genes mitocondriales era específica a CMLVs.

Los datos obtenidos en el ejemplo 1 muestran que, tanto las aortas de ratones de síndrome de Marfan, como las aortas de pacientes humanos sufren un declive en la respiración mitocondrial. Además, este declive de la respiración mitocondrial implica una pérdida de actividad de fosforilación oxidativa (OXPHOS) que se compensa con un aumento en la tasa
35 de glicólisis.

Así, para investigar si la reconducción del metabolismo hacia la glicolisis en AAH, y en particular en el síndrome de Marfan, juega un papel en la adquisición de un fenotipo sintético (responsable de síntesis de material que forma la matriz extracelular, tales como colágeno metaloproteinasas y proteoglicanos) y, en la progresión de la enfermedad aórtica. Se forzó el metabolismo glicolítico en CMLVs mediante depleción de *Tfam* *in vitro* e *in vivo* (ejemplo 2).

Para los experimentos *in vitro* se transdujeron CMLVs aórticas de ratones *Tfam*^{flox/flox} con vectores lentivirales codificando la recombinasa Cre (LV-Cre). Los resultados obtenidos del análisis de dichas CMLVs muestran que la respiración mitocondrial controla las propiedades contráctiles de dichas células promoviendo un cambio del metabolismo hacia un fenotipo secretor.

Por otro lado, para analizar el efecto de la eliminación de *Tfam* en CMLVs, *in vivo*, se cruzaron ratones *Tfam*^{flox/flox} con ratones que expresan la proteína de fusión Cre^{ERT2} bajo el promotor (*Myh11-Cre*^{ERT2}) de miosina de músculo liso (*Myh11*) con el fin de llevar a cabo una abrogación efectiva de la expresión de *Tfam* en aortas de ratones *Myh11-Cre*^{ERT2} *Tfam*^{flox/flox} (*SM-Tfam*^{-/-}), pero no en ratones *Myh11-Cre*^{ERT2} *Tfam*^{wt/wt} (*SM-Tfam*^{+/+}) usados como control. Así, para evaluar la respuesta de ratones *SM-Tfam*^{-/-} a un test hipertensivo, se infundió AngII en ratones *SM-Tfam*^{-/-} y *SM-Tfam*^{+/+} 56 días después de tratamiento con tamoxifeno. El análisis histológico de las secciones aórticas torácicas y abdominales mostraron un incremento del diámetro aórtico, disecciones aórticas, hematomas intramurales, formación de falso lumen y características de degeneración de la media, incluyendo fragmentación de fibras elásticas y arquitectura vascular, que demuestran que el declive de la respiración mitocondrial en CMLVs induce aneurismas aórticos y disecciones letales en modelos animales modelo de síndrome de Marfan.

Así, la presente invención muestra, tanto *in vitro* como *in vivo*, como en dichas enfermedades el desarrollo de aneurismas aórticos de etiología hereditaria se encuentra promovido por una disfunción de la respiración mitocondrial específicamente en CMLVs.

En una realización preferente de la invención, la enfermedad o patología que se caracteriza por la presencia de una respiración mitocondrial deficiente es un aneurisma aórtico de etiología hereditaria (AAH) y, en particular, dicho AAH se selecciona entre el grupo que consiste en: síndrome de Marfan, síndrome de Loeys-Dietz, síndrome de Ehlers-Danlos de tipo vascular, síndrome de *Cutis laxa* y formas Familiares de Disecciones y Aneurismas Torácicos no sindrómicos.

A este respecto, la presente invención muestra como el uso de precursores de NAD⁺ es un enfoque terapéutico efectivo para mejorar la disfunción mitocondrial en aneurismas aórticos

de etiología hereditaria, tanto previniendo el desarrollo de dichos aneurismas, como revirtiendo sus efectos.

En concreto, los ejemplos de la presente invención muestran como nicotinamida ribonucleósido (NR) es uno de los diferentes precursores de NAD⁺ y, que presenta una buena biodisponibilidad y propiedades farmacocinéticas, es capaz de mejorar el metabolismo mitocondrial de manera rápida, restaurar el perfil transcripcional, normalizando las funciones aórticas, restableciendo las propiedades contráctiles de las CMLVs y reduciendo la dilatación aórtica, *in vitro* y en *in vivo*, en modelos animales de aneurismas aórticos hereditarios, previniendo disecciones aórticas letales. Más en concreto, los ejemplos 3 y 4 de la presente invención muestra, *in vivo*, como NR previene, pero también revierte, el desarrollo de aneurismas aórticos en modelos animales (ratones) de síndrome de Marfan y, también, *in vitro*, en CMLVs modelos de síndrome de Marfan, de síndrome de Loeys-Dietz y de formas Familiares de Disecciones y Aneurismas Torácicos no sindrómicos.

Así, el ejemplo 3 de la presente invención muestra como NR mejora del metabolismo mitocondrial y restablece la contractibilidad en CMLVs que tienen mutaciones de aneurismas aórticos hereditarios. Por un lado, el tratamiento con NR incrementó la respiración mitocondrial y disminuyó la producción de lactato en CMLVs modelo de síndrome de Marfan (*shFbn1*-CMLVs), restableciendo los niveles encontrados en CMLVs de control, incrementando la contractibilidad de dichas células.

Por otro lado, para imitar formas Familiares de Disecciones y Aneurismas Torácicos y de síndrome de Loeys-Dietz, se usaron vectores lentivirales para sobreexpresar *ACTA2*^{R179H} y *TGFBR2*^{G357W}, respectivamente, en CMLVs, que dio como resultado una reducción de la tasa de consumo de oxígeno, el contenido de ADNmt y la expresión de ARNm de los reguladores mitocondriales, mientras que incrementó los niveles de lactato extracelular. A este respecto, el tratamiento de dichas CMLVs modelos de formas Familiares de Disecciones y Aneurismas Torácicos y de síndrome de Loeys-Dietz, con NR, incrementó la respiración mitocondrial, el contenido de ADNmt y la expresión de ARNm de los reguladores mitocondriales, mientras que disminuyó los niveles de lactato extracelular. Además, el uso de NR también permitió incrementar la contractibilidad en dichas células.

Estos datos indican que en las CMLVs afectadas por aneurismas aórticos de origen genético se produce una pérdida de actividad de fosforilación oxidativa hacia la glicólisis, y que la mejora del estado metabólico mitocondrial *in vitro* con NR restaura su fenotipo de contractibilidad.

Por otro lado, el ejemplo 4 muestra como el tratamiento con NR restablece la firma transcripcional (perfil de expresión génica) y propiedades contráctiles del músculo liso aórtico

en ratones modelo de síndrome de Marfan y revierte completamente la remodelación defectuosa de la pared aórtica, la dilatación aórtica y la degeneración medial.

Por ello, la presente invención se refiere a un precursor de NAD⁺ para uso en la prevención de la aparición y/o el tratamiento de un aneurisma aórtico de etiología hereditaria que se caracteriza por la presencia de una respiración mitocondrial deficiente .

Además, la presente invención se refiere al uso de un precursor de NAD⁺ en la elaboración de un medicamento para la prevención de la aparición y/o el tratamiento de un aneurisma aórtico de etiología hereditaria que se caracteriza por la presencia de una respiración mitocondrial deficiente.

La presente invención también describe un método para la prevención de la aparición y/o tratamiento de un aneurisma aórtico de etiología hereditaria que se caracteriza por la presencia de una respiración mitocondrial, en donde dicho método comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva de un precursor de NAD⁺.

Se entiende como cantidad efectiva, en relación con los usos terapéuticos descritos en la presente invención, como aquella que proporciona un efecto terapéutico sin proporcionar efectos tóxicos inaceptables en el paciente. La cantidad o dosis efectiva del medicamento depende del compuesto y de la condición o enfermedad tratada y de, por ejemplo, la edad, peso y condición clínica del paciente tratado, la forma de administración, el historial clínico del paciente, la gravedad de la enfermedad y la potencia del compuesto administrado.

En una realización particular, y a efectos de la presente invención, el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) se selecciona entre: niacina (NA) o ácido nicotínico; nicotinamida (NAM); nicotinamida ribósido (NR); nicotinamida mononucleótido (NMN); ácido nicotínico mononucleótido; y ácido nicotínico adenina dinucleótido; o combinaciones de los mismos.

En una realización preferente de la invención el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es niacina (NA) o ácido nicotínico. La niacina es, a efectos de la presente invención la vitamina B3.

En otra realización preferente de la invención el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es nicotinamida (NAM).

En otra realización preferente de la invención el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es nicotinamida mononucleótido (NMN).

En otra realización preferente de la invención el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es ácido nicotínico mononucleótido.

En otra realización preferente de la invención el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es ácido nicotínico adenina dinucleótido.

En una realización muy preferente de la invención, el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es nicotinamida ribósido (NR).

- 5 Los precursores de NAD⁺ descritos en la presente invención pueden ser utilizados también en composiciones farmacéuticas.

Así, otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, para uso en la prevención de la aparición y/o el tratamiento de un aneurisma aórtico de etiología hereditaria que se caracteriza por la presencia de una respiración mitocondrial deficiente.

El término “comprende” indica que incluye un grupo de determinadas características (por ejemplo, un grupo de características A, B y C) se interpreta que significa que incluye esas características (A, B y C), pero que no excluye la presencia de otras características (por ejemplo, las características D o E), siempre que no hagan impracticable la reivindicación. Adicionalmente, los términos “contiene”, “incluye”, “tiene” o “engloba”, y las formas en plural de los mismos, deben tomarse como sinónimos del término “comprende” con los propósitos de la presente invención. Por otro lado, si se usa la expresión “consiste(n) en”, entonces no están presentes características adicionales en el aparato/método/producto, aparte de las que siguen a dicha expresión. En este sentido, con los propósitos de la presente invención, el término “comprende” puede ser reemplazado por cualquiera de los términos “consisten en”, o “consiste esencialmente en”. Por consiguiente, “comprende” puede referirse a un grupo de características A, B y C, que pueden incluir adicionalmente otras características, tales como E y D, con la condición de que dichas características no hagan impracticable la reivindicación, pero dicho término “comprende” también incluye la situación en la que el grupo de características “consiste en” o “consiste esencialmente” en A, B y C.

Por otro lado, el término “sujeto” se refiere, a efectos de la presente invención, a un humano o a un animal.

El término “farmacéuticamente aceptable” se refiere, a efectos de la presente invención, a aquel autorizado o autorizable por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal o enumerado en la farmacopea europea, estadounidense u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

Una realización de la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende al menos un precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y al menos

un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la elaboración de un medicamento para la prevención de la aparición y/o el tratamiento de un aneurisma aórtico de etiología hereditaria que se caracteriza por la presencia de una respiración mitocondrial deficiente.

- Otra realización se refiere a un método para la prevención de la aparición y/o tratamiento de un aneurisma aórtico de etiología hereditaria que se caracteriza por la presencia de una respiración mitocondrial deficiente, en donde dicho método comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende al menos un precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 5 El excipiente incluido en las composiciones farmacéuticas descritas en la presente invención se refiere, a un componente inerte tal como, pero sin limitarse a, codisolventes, tensioactivos, aceites, humectantes, emolientes, conservantes, estabilizadores y antioxidantes. Puede usarse cualquier tampón farmacológicamente aceptable, tal como TRIS o cualquier tampón fosfato.
- 10 Dichas composiciones pueden incluirse en cápsulas, comprimidos, saquitos o sobres o cualquier otro tipo de presentación.
- Para elaborar dichas composiciones, se puede utilizar técnicas convencionales para la preparación de composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, el compuesto de interés puede ser mezclado con un vehículo o diluido en un vehículo o contenido en un vehículo en forma de ampolla, cápsula, comprimido, sobre, saquito u otro recipiente. Cuando el vehículo sirve como disolvente, puede ser sólido, semi-sólido o líquido y actuar como excipiente o medio para dicho compuesto activo. El compuesto de interés puede ser adsorbido en un medio granular sólido. Algunos ejemplos de vehículos adecuados son agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, aceite de ricino polihidroxietoxilado, aceite de cacahuete, aceite de oliva, lactosa, terra alba, sacarosa, ciclodextrinas, amilosa, estearato de magnesio, talco, 20 gelatina, agar, pectina, acacia, ácido esteárico, éteres de alquilo de celulosa, ácido silicio, ácidos grasos, aminas de ácidos grasos, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, esteres grasos de pentaeritrol, polietileno, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Asimismo, el vehículo o soporte puede incluir materiales de liberación sostenida conocidos en el estado de la técnica, tales como gliceril monoestearato o diesterato solo o mezclado con una cera. Las formulaciones pueden también incluir agentes humectantes, emulsificadores, agentes de suspensión, preservantes, edulcorantes o saborizantes. Las composiciones pueden ser formuladas para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del agente activo después de que sea administrada al paciente empleando métodos conocidos en el estado de la técnica.
- 35

Las composiciones farmacéuticas pueden ser esterilizadas y mezcladas, si así se desea, con agentes adicionales, emulsificantes, sal para influenciar la presión osmótica, tampones y/o sustancias colorantes que no reaccionan de manera adversa con los compuestos activos.

Una realización se refiere al modo de administración, que puede ser cualquier modo que
5 transporta de manera efectiva el compuesto de interés al lugar deseado de acción, tal como oral, rectal o parenteral.

Para administración oral, se pueden preparar tanto formas de dosificación sólidas como líquidas. Para preparar composiciones sólidas como comprimidos, el compuesto de interés se mezcla en una formulación con otros ingredientes convencionales tales como talco, estearato
10 de magnesio, fosfato bicálcico, silicato de aluminio y magnesio, almidón, lactosa, acacia, metilcelulosa y materiales similares funcionalmente tales como vehículos y diluyentes farmacéuticos.

Las cápsulas pueden ser preparadas mezclando el compuesto de interés con un disolvente inerte farmacéuticamente y rellenando la mezcla en una gelatina dura de tamaño apropiado.
15 Cápsulas blandas se preparan con máquinas de encapsulación de suspensiones del compuesto de interés con un aceite vegetal, una parafina ligera o un aceite inerte aceptables. Pueden ser preparadas también, formas de dosificación líquidas tales como jarabes, elixires y suspensiones. Las formas solubles en agua pueden ser disueltas en un vehículo acuoso junto con azúcar, aromas saborizantes y conservantes para formar un jarabe. Un elixir es
20 preparado usando un vehículo hidroalcohólico (p.ej. etanol) con edulcorantes adecuados tales como azúcar o sacarina, junto con agentes aromáticos saborizantes. Las suspensiones pueden ser preparadas con un vehículo acuoso y la ayuda de un agente de suspensión tal como acacia, tragacanto, metilcelulosa y similares.

Para aplicación parenteral son evidentes para el experto en la materia, el uso de soluciones
25 o suspensiones inyectables, para uso intradérmico, intramuscular, intravascular y subcutáneo.

Además del compuesto de interés las composiciones pueden incluir otros diluyentes y excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo vehículos de utilización común en composiciones farmacéuticas de uso habitual en humanos o animales. El diluyente se selecciona de manera que no afecte a la actividad biológica de la composición.

30 Ejemplos de diluyentes usados especialmente en formulaciones inyectables son soluciones salinas orgánicas e inorgánicas, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, las composiciones pueden incluir aditivos como otros excipientes, agentes adyuvantes, estabilizadores no terapéuticos y no inmunogénicos y similares.

Ejemplos de excipientes que pueden incluirse en la formulación incluyen, pero no se limitan a

codisolventes, tensioactivos, aceites, humectantes, emolientes, conservantes, estabilizantes y antioxidantes. Se puede utilizar cualquier tampón fisiológicamente aceptable, tal como Tris o tampones de fosfato. Cantidades efectivas de diluyentes o aditivos o excipientes son aquellas que son efectivas para obtener una formulación farmacéuticamente aceptable en
5 términos de solubilidad y actividad biológica.

Otra realización se refiere al régimen de dosificación. El término dosis unitaria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para un sujeto en donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico adecuado en asociación con el diluyente, soporte o vehículo adecuado.

10 Una realización preferida dada a conocer en el presente documento se refiere a la vía de administración, que puede ser cualquier vía que transporte de manera eficaz el compuesto dado a conocer anteriormente en el presente documento, al sitio de acción apropiado o deseado, tal como oral, nasal, tópica, pulmonar, transdérmica o parenteral, por ejemplo, rectal, subcutánea.

15 Los precursores de NAD⁺, o las composiciones farmacéuticas que los comprenden, descritos en la presente invención, pueden ser utilizados antes de, en combinación con, o después de otro tratamiento o terapia que sea útil en la prevención de la aparición y/o tratamiento de un aneurisma aórtico de etiología hereditaria que se caracteriza por la presencia de una respiración mitocondrial deficiente. En una realización de la invención dicho tratamiento o
20 terapia es un hipotensor o un inhibidor de la ruta de Angiotensina. Preferentemente el hipotensor es un betabloqueante. Ejemplos no limitantes de betabloqueantes incluyen, pero no se limitan a Atenolol, Acebutolol, Betaxolol, Bisoprolol, Esmolol, Nebivol, entre otros. También preferentemente el inhibidor de la ruta de Angiotensina se puede seleccionar entre Losartan, Olmesartan, Valsartan o Irbesartan, entre otros.

25 Además, los precursores de NAD⁺, o las composiciones farmacéuticas que los comprenden, descritos en la presente invención, pueden ser utilizados antes de, en combinación con, o después de otro componente terapéutico o compuesto activo adicional. Dicho componente terapéutico o compuesto activo adicional proporciona actividades biológicas aditivas o sinérgicas. Con los propósitos de la presente descripción, los términos “compuesto activo” o
30 “componente terapéutico” deben tomarse como sinónimos y significar una entidad química o biológica que ejerce efectos terapéuticos cuando se administra a seres humanos o animales.

Los precursores de NAD⁺ descritos en la presente invención pueden ser utilizados también como nutracéuticos o en composiciones nutracéuticas. Este es el caso, por ejemplo, de la vitamina B3 y sus derivados.

Así, otro aspecto de la invención se refiere a una composición nutracéutica que comprende al menos un precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y al menos un excipiente nutracéuticamente aceptable, para uso en la prevención de la aparición de un aneurisma aórtico de etiología hereditaria que se caracteriza por la presencia de una respiración mitocondrial deficiente.

Adicionalmente, la presente invención también se refiere a un método de prevención de la aparición de un aneurisma aórtico de etiología hereditaria que se caracteriza por la presencia de una respiración mitocondrial deficiente, en donde dicho método comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva de una composición nutracéutica que comprende al menos un precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y al menos un excipiente nutracéuticamente aceptable.

Se entiende como cantidad efectiva, en relación con los usos nutracéuticos descritos en la presente invención, como aquella que proporciona un efecto un efecto beneficioso para la salud del sujeto que lo ingiere, en especial en la prevención de la aparición de enfermedades, sin proporcionar efectos tóxicos inaceptables en el sujeto.

El término “nutracéuticamente aceptable” se refiere, a efectos de la presente invención, a todo aquello que es adecuado para su utilización en productos nutracéuticos.

A efectos de la presente invención el término “nutracéutico” o “composición nutracéutica” se refiere a un suplemento dietético, para ser tomado por sí solo, o en combinación con otros alimentos, y que produce un efecto beneficioso para la salud del sujeto que lo ingiere, en especial en la prevención de enfermedades.

A efectos de la presente invención se entiende como composición nutracéutica una composición alimenticia, para ser ingerida de manera separada o con la alimentación, que tiene un efecto medicinal sobre la salud humana.

En concreto, el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) se selecciona entre: niacina (NA) o ácido nicotínico; nicotinamida (NAM); nicotinamida ribósido (NR); nicotinamida mononucleótido (NMN); ácido nicotínico mononucleótido; y ácido nicotínico adenina dinucleótido; o combinaciones de los mismos.

En una realización preferente de la invención el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es niacina (NA) o ácido nicotínico. La niacina es, a efectos de la presente invención la vitamina B3.

En otra realización preferente de la invención el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es nicotinamida (NAM).

En otra realización preferente más de la invención el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es nicotinamida mononucleótido (NMN).

En otra realización preferente más de la invención el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es ácido nicotínico mononucleótido.

- 5 En otra realización preferente más de la invención el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es ácido nicotínico adenina dinucleótido.

En una realización particularmente preferente el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es nicotinamida ribonucleósido (NR).

- 10 En otra realización preferente de la composición nutracéutica para uso según la invención, la composición nutracéutica está incorporada en un preparado alimentario.

La composición nutracéutica para uso según la invención puede también incluirse en una variedad de preparados alimentarios, por ejemplo, productos derivados de la leche, yogur, cuajada, queso (por ejemplo, queso fresco, crema, procesados, blandos y duros), leche fermentada, leche en polvo, un producto fermentado a base de leche, un helado, un producto
15 basado en cereal fermentado, polvo a base de leche, bebidas, y un alimento para mascotas.

El término "preparados alimentarios" se utiliza aquí en su sentido más amplio, incluyendo cualquier tipo de producto, en cualquier forma de presentación, que puede ser ingerido por un animal, pero exceptuando productos farmacéuticos y de veterinaria. Ejemplos de otros preparados alimentarios son los productos cárnicos (por ejemplo, patés, salchichas de
20 frankfurt y de salami o carne para untar), chocolate para untar, rellenos (por ejemplo, trufa, crema) y glaseados, chocolate, confitería (por ejemplo, caramelo, fondant o toffee), productos de panadería (pasteles, pastas), salsas y sopas, zumos de frutas y blanqueadores de café. Preparados alimentarios particularmente interesantes incluyen suplementos alimenticios y fórmulas infantiles.

- 25 La composición nutracéutica para uso según la invención también podría ser utilizada como ingrediente en otros productos de alimentación. Por consiguiente, en otro aspecto de la invención, se proporcionan preparados alimentarios que contienen la composición de la invención junto con cantidades apropiadas de ingredientes comestibles. Preferiblemente, la composición nutracéutica para uso según la invención es un suplemento alimenticio. A efectos
30 de la presente invención el término "suplemento alimenticio" se refiere a aquella fracción de alimento que se utiliza para completar la alimentación humana o animal. Si la composición nutracéutica para uso según la invención se utiliza como un suplemento alimenticio, puede administrarse como tal, o puede mezclarse con un líquido potable adecuado, tales como agua, yogur, leche o zumo de frutas, o puede mezclarse con sólidos o alimentos líquidos. En este

contexto, el suplemento alimenticio puede estar en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, polvos, suspensiones, bolsitas, pastillas, dulces, barras, jarabes y formas correspondientes de la administración, por lo general en forma de dosis unitaria.

5 EJEMPLOS

Los ejemplos descritos a continuación tienen carácter ilustrativo y no pretenden limitar el ámbito de la presente invención.

Se detallan a continuación los materiales y métodos utilizados en los ejemplos descritos en el presente documento.

10

Materiales y métodos

Ratones y procedimientos utilizados con animales

El modelo animal de ratón con el alelo *Fbn1*^{C1039G/+} fue previamente descrito por Habashi, J.P., et al (Science, 2006. 312(5770): p. 117-21). Para la ablación específica de *Tfam* en el músculo liso, se cruzaron ratones *Tfam*^{flox/flox} con ratones portadores del alelo *MyH11-Cre*^{ERT2} que expresa una recombinasa Cre inducible por tamoxifeno bajo secuencias reguladoras del promotor de miosina de cadena pesada de músculo liso (*Myh11*). Hermanos de camada con fenotipo silvestre fue usada como control para los ratones de Marfan y los *Tfam*^{wt/wt} *MyH11-Cre*^{ERT2} como control de los *Tfam*^{flox/flox} *MyH11-Cre*^{ERT2}. Para la eliminación condicional de *Tfam* en músculo liso, ratones *Myh11-Cre*^{ERT2} *TFAM*^{Wt/Wt} y *Myh11-Cre*^{ERT2} *Tfam*^{flox/flox} de 3-4 semanas recibieron inyecciones (i.p.) de 1 mg tamoxifeno (Sigma Aldrich) durante 5 días consecutivos. AngII fue disuelta en salino a una concentración de 1 µg Kg⁻¹ min⁻¹ usando minibombas osmóticas subcutáneas (Model 2004, Alzet Corp). La nicotinamida ribonucleósido (Novalix) fue administrada de manera intraperitoneal a una concentración de 1000 mg/Kg en medio salino en días alternos. Los ratones se alojaron en instalaciones libres de patógenos para animales del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC) y del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) siguiendo los estándares de cuidado animal de dichas instituciones. Los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité de Ética del CNIC y del CBMSO-Universidad Autónoma de Madrid (UAM) y por la Comunidad de Madrid (Rf. PROEX 283/16) conforme a la Directiva europea 2010/63EU y la Recomendación 2007/526/EC con relación a la protección de animales usados para experimentación y otras tareas científicas, en vigor a través del Real Decreto 1201/2005.

Determinación de la presión arterial y captación de imágenes *in vivo*.

La presión arterial sanguínea (PS) fue medida mediante en la cola mediante el uso de BP-2000 Blood Pressure Analysis System (Visitech Systems, Apex, NC, USA). Los ratones fueron adiestrados para medir la PS cada día durante 5 días consecutivos. Después del periodo de adiestramiento, la PS fue medida un día antes del tratamiento para determinar el valor basal de PS en cada cohorte de ratones. Se tomaron 15 medidas consecutivas de PS sistólica y diastólica y las últimas 10 tomas de cada ratón fueron grabadas y se obtuvo el valor medio. Para las imágenes de ultrasonido *in vivo*, se monitorizó el diámetro aórtico en ratones anestesiados con isoflurano (2%) con un ecógrafo de ultrasonidos de alta frecuencia VEVO 2100 (VisualSonics, Toronto, Canadá) con una resolución de 30 micras. Los diámetros aórticos internos máximos fueron medidos en diástole usando el software VEVO 2100, versión 1.5.0.

Procedimientos celulares.

El aislamiento y cultivo de células vasculares musculares lisas (VSMC) primarias de ratón fue descrito por Esteban, V., et al. (J Exp Med, 2011. 208(10): p. 2125-39). El tejido fue digerido con una solución de collagenasa y elastasa hasta que se obtuvo una única suspensión celular. Todos los experimentos con CMLVs primarias fueron llevados a cabo durante los pases 2-7. La transducción lentiviral se llevó a cabo en CMLVs durante 5 hr con una multiplicidad de infección= 3. El medio se reemplazó a continuación con DMEM fresco suplementado con 10% SFB y las células fueron cultivadas durante 7 días, tratadas con NR durante 3 días más y en ausencia de suero durante 16 hr. Las líneas celulares HEK-293T (CRL-1573) y de Jurkat (Clone E6-1, TIB-152), necesarias para la producción de titulaciones elevadas de lentivirus y para la titulación de lentivirus respectivamente, fueron adquiridas de ATTC. Se compraron en Coriell Cell Repositories: 4 machos aparentemente sanos de control (GM00024, GN01717, GM03652, GM23963) y 4 machos y fibroblastos incompatibles de pacientes de síndrome de Marfan con disección aórtica, dos con mutaciones puntuales *FBN1* (GM21499, GM21946) y dos con mutaciones haploinsuficientes-*FBN1* (GM21983, GM21978). Los experimentos se llevaron a cabo durante pases 5-10. Todas las células eran negativas en micoplasma. Para la inmunotinción las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% durante 10 minutos y permeabilizadas con Triton X-100 al 0,3% en PBS durante 10 minutos. Se incubaron las muestras durante 15 minutos con 1/500 647-Phalloidine (Millipore) y DAPI. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio Zeiss-LSM-800 con un objetivo de inmersión de aceite de 40x y software ZEN.

Producción de lentivirus e infección.

La secuencia codificante Cre y GFP fue obtenida mediante amplificación por PCR y clonada en el vector lentiviral pHRSIN (Oller et al. 2015 Mol Cell Biol 2015 3409-22). Los lentivirus expresando ARNsh dirigido a *Fbn1* murino y el ARNsh de control fueron comprados de Sigma Aldrich. Los lentivirus que expresan mutaciones *ACTA2*^{R179H} y *TGFBR2*^{G317W} y los controles fueron suministrados por Mark Lindsay. Lentivirus pseudo-tipados fueron producidos mediante transfección transitoria de células HEK-293T con fosfato cálcico y concentrados del sobrenadante de cultivo por ultracentrifugación (2 hr a 128,000xg; Ultraclear Tubes; SW28 rotor y Optima L-100 XP Ultracentrifuge; Beckman). Los virus fueron suspendidos en PBS frío estéril y titulados mediante transducción de células Jurkat durante 48 hr. La eficiencia de transducción (células expresando GFP y células resistentes en Puromicina) y la muerte celular (tinción con yoduro de propidio) fueron cuantificadas mediante citometría de flujo (Oller et al., Nat Med, 2017. 23(2): p. 200-212).

Análisis de flujo extracelular y ensayos metabólicos.

La tasa de consumo de oxígeno (OCR) fue medida con un XF-96 Extracellular Flux Analyzers (Seahorse Bioscience) en 25.000 CMLVs aórticas de ratón o en 50.000 fibroblastos humanos fueron sembrados en un medio DMEM no tamponado que contenía glucosa 25 mM y CaCl₂ 1mM. Se tomaron 3 medidas en condiciones basales y con la adición de oligomicina (1 mM), fluoro-carbonil ciano-fenilhidrazona (FCCP, 1,5 mM) y rotenona (100 nM) + antimicina A (1 mM). El lactato extracelular fue determinado con Accutrend ® Plus system (Roche). Se analizaron 20 µL de medio condicionado después de 48 horas de activación. Las medidas de lactato se normalizaron con los extractos celulares de proteínas.

PCR en tiempo real y cuantitativa.

Las aortas fueron extraídas después de perfusión con 5 ml de solución salina, y la capa adventicia se descartó. Se homogeneizó el tejido congelado con nitrógeno líquido usando aglutinante frío y un homogeneizador automático de microesferas (MagNA Lyzer, Roche). El ARN total fue aislado con TRIzol (Life Technologies). El ARN total (1 µg) fue digerido primero con ADNasa y la transcripción reversa efectuada con Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher). Para los análisis de niveles de ADNmt, se extrajo el ADNtotal de células y tejidos con el SurePrep kit (Fisher Scientific) o con TRIzol respectivamente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN fue amplificado usando cebadores específicos para el citocromo c oxidasa subunidad 1 (mt-Co1) y ARNr 16S mitocondrial, y normalizado con genes de control *B2M* y *H2K* nucleares. La PCRq de tiempo real cuantitativa se llevó a cabo con los cebadores de las tablas 1A (cebadores de ratón) y 1B (cebadores humanos):

Tabla 1A: Cebadores de ratón

SEC ID No.	Gen	Sentido	SEC ID No.	Antisentido
1	<i>Acta2</i>	ATCGTCCACCGCAAATGC	2	AAGGAACTGGAGGCGCTG
3	<i>Col1a1</i>	GCTCCTCTTAGGGGCCACT	4	CCACGTCTCACCATTGGGG
5	<i>Cnn1</i>	AACTTCATGGATGGCCTCAAA	6	ACCCGGCTGCAGCTTGT
7	<i>Fbn1</i>	GGAATGACATCAGCAGGCAC	8	TACACAAATCCTTTGGGGCA
9	<i>Mmp2</i>	CAAGTTCCCCGGCGATGTC	10	TTCTGGTCAAGGTCACCTGTC
11	<i>Mmp9</i>	CACCACAGCCAACTATGACCA	12	CAGGAAGACGAAGGGGAAGAC
13	<i>Myh11</i>	TCAACGCCAACCGCAGGAAGCTG	14	TGCTAAGCAGTCTGCTGGGCT
15	<i>mt-Co1</i>	CTCGCCTAATTTATTCCACTTCA	16	GGGGCTAGGGGTAGGGTTAT
17	<i>mt-Nd1</i>	CTAGCAGAAACAAACCGGGC	18	CCGGCTGCGTATTCTACGTT
19	<i>Nos2</i>	CTTTGCCACGGACGAGAC	20	TCATTGTACTCTGAGGGCTGAC
21	<i>Smtn</i>	TCACTACCTTCAGCCATGCCT	22	GCCATTAGCTGCTTCCACTGT
23	<i>Spp1</i>	ATGAGATTGGCAGTGATTG	24	CATCCTTTTCTTCAGAGGAC
25	<i>Tagln</i>	CTATGAAGGTAAGGATATGGC	26	TCTGTGAAGTCCCTCTTATG
27	<i>Tfam</i>	CAGGAGGCAAAGGATGATTC	28	CCAAGACTTCATTTATTGTCTG
29	<i>Ppargc1a</i>	GGCACGCAGCCCTATTCA	30	CGACACGGAGAGTTAAAGGAAGA
Al menos dos dianas diferentes fueron utilizadas para normalizar entre los siguientes:				
31	<i>b2m</i>	TACATACGCCTGCAGAGTTAAGCA	32	TGATCACATGTCTCGATCCAG)
33	<i>pp1a</i>	ACGCCACTGTGCTTTTC	34	GCAAACAGCTCGAAGGAGAC
35	<i>Ywhaz</i>	TACTTGGCCGAGGTTGCT	36	TGCTGTGACTGGTCCACAAT
37	<i>Bactin</i>	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	38	ACCAGAGGCATACAGGGACA
Para ADNmt				
15	<i>mt-Co1</i>	CTCGCCTAATTTATTCCACTTCA	16	GGGGCTAGGGGTAGGGTTAT
17	<i>mt-Nd1</i>	CTAGCAGAAACAAACCGGGC	18	CCGGCTGCGTATTCTACGTT
39	<i>16s Mt-ARNr</i>	CCGCAAGGGAAAGATGAAAGAC	40	TCGTTTGGTTTCGGGGTTTC
41	<i>Hk2</i>	GCCAGCCTCTCCTGATTTTAGTGT	42	GGGAACACAAAAGACCTCTTCTGG

Tabla 1B: Cebadores humanos

SEC ID No.	Gen	Sentido	SEC ID No.	Antisentido
43	<i>ACAN</i>	TCGAGGACAGCGAGGCC	44	TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA
45	<i>CNN2</i>	CGACTGGAAGACACGTTTGG	46	AGGCTTGGAGATTTTGGGAG
47	<i>COL1A1</i>	ATGTCTAGGGTCTAGACATGTTCA	48	CCTTGCCGTTGTCGCAGACG
49	<i>CYCS</i>	-GCCTGCCTGATCCTCCAAAT	50	AAGGTAGCGGATGATTCAGCC-
51	<i>HIF1A</i>	GTGGATTACCACAGCTGA	52	GCTCAGTTAACTTGATCCA
53	<i>MMP2</i>	CTCAGATCCGTGGTGAGATCT	54	CTTTGGTTCTCCAGCTTCAGG

Las reacciones de PCRq se llevaron a cabo por triplicado con una master mix SYBR (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para examinar la especificidad de la sonda, se llevaron a cabo análisis curva-fusión de post-amplificación. Para cada reacción se tomó solamente una temperatura de fusión (T_m). La cantidad de ARNm diana en las mezclas se estimó con el método de cuantificación relativa $1-CT$, usando *B2M*, *YWHAZ* y *PP1A* para la normalización. Las relaciones de duplicación se calcularon en base a los niveles de expresión del ARNm del control.

10 Inmunoblot

Para el análisis mediante inmunoblot o transferencia de Western, las células fueron lisadas a 4 °C en tampón RIPA que contenía inhibidores de proteasa y fosfatasa (Sigma). Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana Immobilon PVDF (Millipore) con un tamaño de poro de 0,45 μ m. Las membranas PVDF se bloquearon con TBS-T (50 μ M Tris, 150 mM NaCl y Tween-20 0,1%) que contenía 5% (p/v) de leche. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios a una dilución de 1/500 a 1/1000 seguido de lavados con TBS-T e incubación con anticuerpos secundarios conjugados HRP (GE Healthcare). La señal se visualizó por quimioluminiscencia aumentada con el sustrato Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore) y el sistema de imagen ImageQuant LAS 4000. Se usaron los siguientes anticuerpos: anti-TFAM (Proteintec), Anti-MT-CO1 (Millipore), anti-VDAC (Abcam), anti- α -tubulina (Cell Signaling).

Preparación de la librería y secuenciado Illumina

Las aortas fueron extraídas después de perfusión con una solución salina fría y la capa adventicia fue descartada. El tejido congelado fue homogeneizado y se aisló el ARN total con Trizol (Roche). Se preparó ARN de librerías de acuerdo con las instrucciones del kit “NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep kit for Illumina” (New England Biolabs), siguiendo el

protocolo "Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module". El rendimiento total de ARN total al principio del protocolo era >300 ng cuantificado por un Agilent 2100 Bioanalyzer usando el kit RNA 6000 nano LabChip. Las librerías obtenidas se validaron y cuantificaron con un Agilent 2100 Bioanalyzer usando un kit ADN7500 LabChip y un grupo de librerías equimolar fue titulado mediante PCR cuantitativo usando el "Kapa-SYBR FAST qPCR kit forLightCycler480" (Kapa BioSystems) y un estándar de referencia para la cuantificación. El grupo de librerías fue desnaturalizado antes de ser sembrado con una densidad 2,2 pM en una celda de flujo, donde se formaron clústeres que se secuenciaron usando un "NextSeq™ 500 High Output Kit", en un secuenciador NextSeq500 en una sola lectura 1x75. Se obtuvieron aproximadamente 15 millones de lecturas después de filtrado para cada muestra. Los archivos Fastq se alinearon contra un genoma versión Mm usando un alineador STAR (base Space Sequence Hub, Illumina) y los perfiles de expresión fueron determinados usando CuffDiff2. Para identificar las funciones biológicas celulares, clústeres de genes y reguladores se usó un Ingenuity Pathway Analysis (IPA).

Histología aórtica.

Después de llevar a cabo la eutanasia de los ratones por inhalación con CO₂, se llevó a cabo la perfusión de las aortas con solución salina. Se aislaron a continuación las aortas y se fijaron con formalina al 10% durante la noche a 4 °C. Las secciones parafinadas (5 µm) de los órganos fijados se tiñeron con Masson-Tricrome, alcian azul o Verhoeff elastic–van Gieson (EVG), o se usaron para inmunohistoquímica o para inmunofluorescencia. Las fibras elásticas se tiñeron con un kit de tinción de elastina modificado Verhoeff Van Gieson (Sigma Aldrich). Se contaron las roturas de lámina elástica, definidas como interrupciones en las fibras elásticas, para la capa medial completa de tres secciones transversales consecutivas en cada ratón, usando 4-16 ratones en cada experimento, y se calculó el número medio de roturas. Para las inmunotinciones las secciones desparafinadas fueron rehidratadas, hervidas para recuperar antígenos (tampón citrato 10 mM, Triton-x al 0,05%, pH= 6) y bloqueadas durante 45 minutos en PBS con suero de cabra normal al 10%, suero de caballo al 5%, Triton-x al 0,05% y BSA al 2%. Las muestras fueron incubadas para inmunohistoquímica o para inmunofluorescencia con los siguientes anticuerpos: anti-SMA (1/500, C6198, Sigma), anti-TFAM policlonal (1/300, Prointech), anti-MT-ND1 policlonal (1/300, Proteintech), anti-Mt-CO1 monoclonal (1/300 Invitrogene), anti-HIF1A y anti-MYC policlonales (1/500 Novus biologicals). La especificidad fue determinada mediante sustitución de anticuerpos primarios con IgG (Santa Cruz) no relacionados. Para la inmunohistoquímica, se bloquearon peroxidasa endógena y biotina con 1% H₂O₂-metanol durante 10 minutos y un kit de bloqueo de biotina (Vector Laboratories), respectivamente. Se desarrolló el color al mismo tiempo en todas las

muestras con DAB (Vector Laboratories) y las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina y montadas en DPX (fluka). Para inmunofluorescencia, se usaron anticuerpos secundarios anti-conejo conjugado a cabra Alexa-Fluor-546 y anti-conejo conjugado a cabra Alexa- Fluor-647 (BD Pharmigen). Para la determinación de F-actina, la aortas fijadas se integraron en OCT (Tissue-Tek Sakura), se incubaron secciones transversales de 5 µm durante 30 minutos con 1:1000 Phalloidine-657 (Millipore), y después de 10 minutos de incubación con Triton X-100 0,3% en PBS. Se montaron las secciones con DAPI en un medio de montaje Citifluor AF4 (Aname). Las imágenes se tomaron con 1024 × 1024 pixels y 8 bits usando un microscopio Zeiss-LSM800 con objetivos de inmersión de aceite de 40x.

10 Zimografía en gelatina

Sobrenadantes de cultivos celulares fueron preparados como describe Oller, J., et al. (Nat Med, 2017. 23(2): p. 200-212). Los extractos (15 µg) se fraccionaron en condiciones no reductoras en 10% gel SDS-poliacrilamida que contenía 0.1% gelatina. Los geles fueron lavados tres veces con 2,5% Triton X-100 durante 2 horas a temperatura ambiente, incubados durante la noche a 37 °C en 50 mM Tris-HCl pH= 7,5, 10 mM CaCl₂ y 200 mM NaCl, y teñidos con azul Coomassie. Las áreas de actividad MMP o gelatinolítica se visualizaron en forma de bandas transparentes. Las imágenes fueron analizadas con software Quantity One (Bio-Rad).

Muestras humanas

El estudio fue aprobado por el comité de ética e investigación clínica del Instituto de Salud Carlos III y la Universidad de Cantabria (B2017/BMD-3676 AORTASANA-CM, ref. 27/2013; respectivamente). Las aortas usadas como control se obtuvieron de manera anónima de donantes de órganos para trasplantes después de que se obtuvo consentimiento por escrito de las familias. Durante la preparación del corazón para trasplante, se recogió para el estudio el exceso de tejido aórtico ascendiente. Se obtuvieron las muestras de pacientes durante cirugía de raíz aórtica, electiva o de emergencia, por una disección de aneurisma aórtico. Se recogieron los datos clínicos del paciente manteniendo su anonimato. Los tejidos fueron fijados inmediatamente, se guardaron a temperatura ambiente 48 h y se incluyeron en parafina. La extracción de ADN y ARN de las secciones parafinadas se llevó a cabo con el kit All Prep DNA/RNA FFPE (Quiagen).

Análisis estadísticos

Se usó el software GraphPad Prism 6.01 para el análisis. Las diferencias se analizaron mediante medidas unidireccionales, bidireccionales, o por medidas repetidas con un análisis de varianza bidireccional (ANOVA) y con el test post hoc de Newmann (experimentos con grupos ≥ 3), de manera adecuada. Para las curvas de supervivencia, se analizaron las

diferencias con un test de log-rank (Mantel-Cox). La significación estadística fue asignada a $*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$ y $****P<0,0001$. El tamaño de muestra se escogió de manera empírica en base a experiencia previa en el cálculo de variabilidad experimental, no se usó un método estadístico para predeterminar el tamaño de la muestra. Valores atípicos se identificaron y se excluyeron usando el software GraphPad Prism. El número de animales usados se describe en las correspondientes leyendas de las figuras. Todos los experimentos fueron llevados a cabo con al menos 3 réplicas biológicas. Los grupos experimentales fueron equilibrados en función de edad animal, género y peso. Los animales fueron genotipados antes de los experimentos y, todos ellos estuvieron reclusos juntos y tratados de la misma manera. Se escogieron tests apropiados de acuerdo con la distribución de los datos. La varianza fue comparable entre grupos en los experimentos descritos en el presente documento. Para el resto de los experimentos, no se usó ninguna aleatorización para asignar animales a grupos experimentales.

Ejemplo 1: Cambios metabólicos en el síndrome de Marfan.

El modelo animal de ratón *Fbn1*^{C1039G/+} reproduce la dilatación aórtica, aneurismas y las características histológicas de la degeneración aórtica de capa medial encontrada en pacientes con síndrome de Marfan. Para identificar los mecanismos moleculares subyacentes de la formación de AA de etiología hereditaria se llevaron a cabo análisis transcripcionales de aortas de ratones *Fbn1*^{C1039G/+}. Gracias a Ingenuity Pathway Analysis (IPA), se observó que 6 de los 10 mecanismos canónicos más alterados se relacionan con el metabolismo, incluyendo la fosforilación oxidativa, disfunción mitocondrial, β -oxidación de ácidos grasos (FAO) y el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), tal como se muestra en la figura 1A. La predicción IPA de los reguladores importantes describió reguladores típicos encontrados del síndrome de Marfan (MFS) como la sintasa de óxido nítrico inducible (Nos2) y el factor de crecimiento beta 1 (Tgfb1). Este análisis apuntó hacia un aumento de la actividad del regulador glicolítico Factor Inducible por Hipoxia (Hif1a) y a una reducción de la actividad de los reguladores de la biogénesis y de la función mitocondrial, incluyendo *Tfam* (Figura 1B). Las aortas *Fbn1*^{C1039G/+} mostraron una reducción de la expresión de todas las subunidades de complejos mitocondriales, incluidos los genes de codificación de núcleo y mitocondrias, así como los genes relativos a la FAO y a la biogénesis y función mitocondrial (*Tfam*, *Ppara*, *Pparg*, *Ppargc1a*, *Ppargc1b*, y *Sod2*). Por el contrario, los genes involucrados en el desacoplamiento mitocondrial (*Ucp2*) y la reconducción glicolítica del metabolismo (*Hif1a*, *Myc*) estaban aumentados (Figura 1C). El análisis de PCR-RTq confirmó la expresión reducida de *Tfam* (Figura 1D). Los niveles de ADNmt del control de *Tfam* y el análisis del contenido de ADNmt relativo en aortas *Fbn1*^{C1039G/+} mostró un contenido de ADNmt menor del normal (Figura 1E).

Para modelizar el síndrome de Marfan *in vitro*, se silenció *Fbn1* en vectores lentivirales en CMLVs primarias murinas (Figura 2). Las *shFbn1*-CMLVs tenían una expresión reducida de manera significativa de *Tfam* y *Ppargc1a*, confirmando los datos obtenidos con los ratones modelo de Marfan (Figura 1F), que estaba correlacionada con una reducción en el contenido de ADNmt (Figura 1G). El análisis de flujo de la velocidad de consumo de oxígeno (OCR), índice de la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS), reveló una reducción de la respiración mitocondrial en células con *Fbn1*-silenciado (Figura 1H). Esto estaba acompañado por un aumento de la producción extracelular de lactato, un indicador de glicolisis (Figura 1I).

Para confirmar estas observaciones en muestras humanas, se midió el ADNmt y la expresión de los genes de función mitocondrial en aortas de pacientes de síndrome de Marfan. En comparación con muestras control de sujetos sanos, las muestras de aneurismas aórticos de pacientes de síndrome de Marfan mostraron niveles significativamente más bajos de ADNmt (Figura 1J) y transcripción reducida de genes codificadores de complejos mitocondriales (*MT-ND1*, *SDHA*, *SDHB*, *CYCS*, *MTCO1*, y *MT-ATP6*) o que involucran la función mitocondrial (*TFAM*, *PPARA*, *PPARG* y *PPARG1A*). Además, las muestras de aneurisma mostraron una regulación aumentada de genes involucrados en el desacoplamiento mitocondrial y la reconducción glicolítica del metabolismo (Figura 1K). El análisis histológico de las proteínas mitocondriales *MT-ND1*, *SDHA*, y *TFAM* y de los genes relacionados con la glicolisis *HIF1A* and *MYC* (figura 1L). La co-inmunotinción de actina muscular lisa (SMA) confirmó que la regulación disminuida de los genes mitocondriales era específica a CMLVs. Además, el análisis *in vitro* de la capacidad respiratoria mitocondrial en cultivos de fibroblastos primarios dérmicos de individuos de síndrome de Marfan y de cuatro donantes sanos mostró la relación entre el síndrome de Marfan y una OCR reducida, elevada producción de lactato y menor contenido de ADNmt (Figuras 1M, 1N y 1P). En línea con las conclusiones obtenidas en aortas humanas de síndrome de Marfan, fibroblastos primarios dérmicos de síndrome de Marfan mostraron un contenido bajo de ARNm de *MTND1*, *SDHA*, *MT-CO1*, *MT-AP6*, *TFAM*, y *PRARGC1A*, y una expresión elevada de *UCP2*, *HIF1A* y *MYC* (Fig. 1Q). Estos datos sugieren que las aortas de ratones de síndrome de Marfan y de pacientes humanos sufren un declive en la respiración mitocondrial y una reconducción del metabolismo hacia la glicólisis.

Ejemplo 2: el metabolismo glicolítico en CMLVs causa aneurisma aórtico similares a los encontrados en síndrome de Marfan

Para investigar si la reconducción del metabolismo hacia la glicolisis en el síndrome de Marfan juega un papel en la adquisición de un fenotipo sintético y la progresión de la enfermedad aórtica, se forzó la conversión de células CMLVs en células glicolíticas mediante depleción de

Tfam *in vitro* e *in vivo*. Para los experimentos *in vitro* se transdujeron CMLVs aórticas de ratones *Tfam*^{flox/flox} con vectores lentivirales codificando la recombinasa Cre (LV-Cre). La eliminación de *Tfam* se confirmó analizando los niveles de ARNm de *Tfam* y los niveles de proteína (Fig. 4A y B) frente a un control que no codificaba la recombinasa Cre (LV-Mock). De acuerdo con su papel regulador de los niveles de ADNmt, la eliminación de *Tfam* en CMLVs produjo una reducción del contenido de ADNmt, una expresión reducida de los genes codificados por ADNmt *Mt-Co1* y *Mt-Nd1*, una OCR reducida y un incremento de producción de lactato (figuras 4A-D). También se observaron disminuciones drásticas de la expresión de ARNm de genes involucrados en la contractibilidad, tales como miosina de cadena pesada de músculo liso (*Myh11*), actina de músculo liso (*Acta2*), transgelina (*Tgln*), calponina (*Cnn1*) y smoothelin (*Smtn*) (fig. 4E). Además, esto estuvo acompañada de una expresión de ARNm de genes relacionados con el fenotipo de secreción, tales como osteopoyetina1 (*Spp1*), metaloproteínasa-9 (*Mmp9*) y la sintasa de óxido nítrico inducible (*Nos2*) (Fig. 4F). La expresión aumentada de *Mmp9* estaba acompañada de un incremento marcado de la actividad enzimática de *Mmp9* en sobrenadantes celulares (Fig. 4F). Estos datos sugieren que la respiración mitocondrial controla las propiedades contráctiles de las CMLVs, mientras que las condiciones glicolíticas mueven estas células hacia un fenotipo secretor.

Para analizar el efecto de la eliminación de *Tfam* en CMLVs *in vivo*, se cruzaron ratones *Tfam*^{flox/flox} con ratones que expresan la proteína de fusión Cre^{ERT2} bajo el promotor (*Myh11-Cre*^{ERT2}) de miosina de músculo liso (*Myh11*). El análisis después de 28 semanas de tratamiento con tamoxifeno (Tmx) confirmó una abrogación efectiva de la expresión de *Tfam* en aortas de ratones *Myh11-Cre*^{ERT2} *Tfam*^{flox/flox}, pero no en ratones *Myh11-Cre*^{ERT2} *Tfam*^{wt/wt} (ratones *SM-Tfam*^{-/-} y *SM-Tfam*^{+/+}, respectivamente), tratados con tamoxifeno (Fig. 3A). La eliminación de *Tfam* estuvo acompañada por un menor contenido de ADNmt (Figura 3A). El análisis de vida media mostró un descenso significativo en la supervivencia con un 100% de mortalidad en ratones *SM-Tfam*^{-/-} antes de las 33 semanas después del tratamiento con tamoxifeno (Fig. 3B). El análisis longitudinal del fenotipo vascular reveló una presión sanguínea menor junto con un diámetro aórtico mayor (Fig 3C y D). El análisis histológico de ratones *SM-Tfam*^{-/-} 28 semanas después de tratamiento con tamoxifeno reveló disecciones aórticas, hematomas intramurales (IMH) y degeneración medial con degradación de lámina de elastina y acumulación de proteoglicano en la aorta ascendente.

Para evaluar cómo responden ratones *SM-Tfam*^{-/-} a un test hipertensivo, se infundió AngII en ratones *SM-Tfam*^{-/-} y *SM-Tfam*^{+/+} 56 días después de tratamiento con tamoxifeno (fig. 3E). El análisis de la presión sanguínea mostró un incremento suave en ratones *SM-Tfam*^{-/-} (Fig. 3F). Además, mediante ecografías se apreció un incremento rápido del diámetro de las aortas

ascendente (AsAo) y abdominal (AbAo) de los ratones *SM-Tfam*^{-/-}, apoyando la predisposición de dichos ratones a desarrollar aneurismas aórticos. De manera más importante, el tratamiento de *SM-Tfam*^{-/-} con AngII produjo aneurismas aórticos y disecciones aórticas letales rápidamente, reduciendo la supervivencia media (Fi. 3G). El análisis post mortem reveló la presencia de hematomas intramurales (HIM) y rupturas aórticas con hemotórax o hemoabdomen (Fig. 3H). El análisis histológico de las secciones aórticas torácicas y abdominales mostraron un incremento del diámetro aórtico, disecciones aórticas, HIM, formación de lumen falsa y características de degeneración medial, incluyendo fragmentación de fibras elásticas y arquitectura vascular que demuestran que el declive de la respiración mitocondrial en CMLVs induce aneurismas aórticos y disecciones letales en modelos animales de Marfan.

Ejemplo 3: La mejora del metabolismo mitocondrial restablece la contractibilidad en CMLVs que tienen mutaciones de aneurismas aórticos hereditarios.

NAD⁺ es un cofactor de varios enzimas con funciones críticas en la actividad mitocondrial y en la salud metabólica, y la suplementación con precursores de NAD⁺ ha estado propuesta como estrategia para mejorar las funciones mitocondriales en varias enfermedades relacionadas con el declive mitocondrial (Verdin et al., Science, 2015. 350(6265): p. 1208-13; Prolla et al., Cell Metab, 2014. 19(2): p. 178-80). Para investigar el potencial terapéutico de una potenciación del metabolismo mitocondrial con NAD⁺ en aneurismas aórticos hereditarios se trataron *shFbn1*-CMLVs con nicotinamida ribósido (NR). NR incrementó la OCR y disminuyó la producción de lactato en *shFbn1*-CMLVs a niveles encontrados en *shFbn1*-CMLVs de control (Fig. 6A y B). Estudios previos habían indicado que NR controla el metabolismo mitocondrial incrementado la expresión de *Ppargc1a* y *Tfam* a través de la actividad de sirtuina. La exposición de *shFbn1*-CMLVs a NR durante 5 días incrementó la expresión de *Pparg1a* y *Tfam* mostrando una correlación con un incremento en el ADNmt y la expresión de ADNmt codificante del transcrito de *Mt-Co1* (Fig. 6C, D). El tratamiento de *shFbn1*-CMLVs con NR también incrementó la intensidad de fluorescencia de actina polimerizada (F-actina), un índice de contractibilidad de CMLVs, mientras que disminuyó la expresión y actividad de la matriz pro-remodeladora de las metaloproteinasas Mmp9 y Mmp2 y de los genes pro-fibróticos *Spp1* y Collagen1 (*Col1a1*) (Fig. 6E), a la vez que restauró el contenido de ADNmt y los niveles de ARNm de *MT-CO1*, *MT-ND6*, *TFAM*, y *HIF1A* (Fig. 6I). Adicionalmente, el tratamiento con NR redujo la expresión de las proteínas de colageno1 la matriz extracelular (MEC) (*COL1A1*) y de agrecano (ACAN) y de los factores pro-fibróticos TGFB3 y del factor de crecimiento de tejido conectivo (CNN2) (Fig. 6J).

Para explorar si el metabolismo mitocondrial también se ve afectado en otros aneurismas aórticos hereditarios, se obtuvieron modelos de otros aneurismas aórticos hereditarios mediante la sobreexpresión de mutaciones causantes de dichas enfermedades en CMLVs primarios. Para imitar formas familiares de disecciones y aneurismas torácicos y de síndrome de Loeys-Dietz, se usaron vectores lentivirales para sobreexpresar *Acta2*^{R179H} y *TGFBR2*^{G357W}, respectivamente. La sobreexpresión de *Acta2*^{R179H} y *TGFBR2*^{G357W} redujo el OCR, el contenido de ADNmt y la expresión de ARNm de los reguladores mitocondriales, mientras que incrementó los niveles de lactato extracelular (Fig. 7A-C), sugiriendo que las mutaciones de aneurismas aórticos fuerzan un uso predominante de la glicólisis como fuente de energía celular. La incubación de las células con NR revirtió el efecto de ambas mutaciones para dichos parámetros metabólicos (Fig. 7A-C). Además, el uso de NR también permitió incrementar la contractibilidad, medida por la polimerización de F-actina mientras que produjo una disminución de la expresión y reducir la actividad de la matriz de metaloproteinasas y de otros marcadores de secreción (Fig. 7D). Estos datos indican que en las CMLVs afectadas por aneurismas aórticos de origen genético se produce un cambio del metabolismo de OXPHOS hacia la glicólisis, y que la mejora del estado metabólico mitocondrial *in vitro* restaura su fenotipo de contractibilidad.

Ejemplo 4: El tratamiento con nicotinamida ribósido revierte el aneurisma en un modelo de ratón de síndrome de Marfan

Se evaluó el potencial terapéutico de NR para prevenir y revertir el desarrollo de aneurismas en ratones modelo de síndrome de Marfan modulando su metabolismo mitocondrial. Ratones *Fbn1*^{C1039G/+} de 16 semanas de edad recibieron inyecciones intraperitoneales de NR en días alternos durante 28 días (Fig. 5A; Fig. 8A). La dilatación aórtica y la presión sanguínea se normalizaron completamente después de 7 días de tratamiento en ratones macho y hembra (Fig. 5B, Fig. 8B). Además, el tratamiento con NR fue capaz de revertir características histológicas de degeneración en dicho modelo de síndrome de Marfan, tales como el espesor medial, la fragmentación de fibras elásticas, la deposición de proteoglicanos y la polimerización de actina (Fig. 5C y Fig. 8C). El tratamiento con NR también restauró la expresión de ARNm de *Tfam* y *Mt-Co1* el contenido de ADNmt a niveles normales (Fig. 5D y E).

Para caracterizar el efecto del tratamiento con NR a nivel molecular, se llevó a cabo la secuenciación de ARN en aortas de ratones modelo de síndrome de Marfan y en ratones de control sanos. La agrupación jerárquica y el análisis transcriptómico reveló que el tratamiento con NR revirtió los cambios transcripcionales observados en aortas *Fbn1*^{C1039G/+}, cambiando

los niveles de expresión a niveles más cercanos a los del control que a los de ratones *Fbn1*^{C1039G/+}. El tratamiento con NR incrementó los niveles de expresión de algunos factores de transcripción involucrados en el mantenimiento del fenotipo contráctil y en los genes relacionados con el aparato de contracción del músculo liso, tales como la actina de músculo liso (Acta2) y calponina1 (Cnn1) (Fig 5F). Así, el potenciamiento de las funciones mitocondriales con NR restablece rápidamente la firma transcripcional y propiedades contráctiles del músculo liso aórtico en ratones modelo de síndrome de Marfan y revierte completamente la remodelación de la pared aórtica, la dilatación aórtica y la degeneración medial.

REIVINDICACIONES

1. Precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), para uso en la prevención de la aparición y/o el tratamiento de un aneurisma aórtico de etiología hereditaria (AAH) que se caracteriza por la presencia de una respiración mitocondrial deficiente.
5
2. Precursor de nicotinamida adenina dinucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el aneurisma aórtico de etiología hereditaria (AAH) se selecciona entre el grupo que consiste en: síndrome de Marfan, síndrome de Loeys-Dietz, síndrome de Ehlers-Danlos de tipo vascular, síndrome de *Cutis laxa* y formas Familiares de
10 Disecciones y Aneurismas Torácicos no sindrómicos.
3. Precursor de nicotinamida adenina dinucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) se selecciona entre: niacina (NA) o ácido nicotínico; nicotinamida (NAM);
15 nicotinamida ribósido (NR); nicotinamida mononucleótido (NMN); ácido nicotínico mononucleótido; y ácido nicotínico adenina dinucleótido; o combinaciones de los mismos.
4. Precursor de nicotinamida adenina dinucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido
20 (NAD⁺) es niacina (NA) o ácido nicotínico.
5. Precursor de nicotinamida adenina dinucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es nicotinamida (NAM).
25
6. Precursor de nicotinamida adenina dinucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es nicotinamida ribósido (NR).
- 30 7. Precursor de nicotinamida adenina dinucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es nicotinamida mononucleótido (NMN).

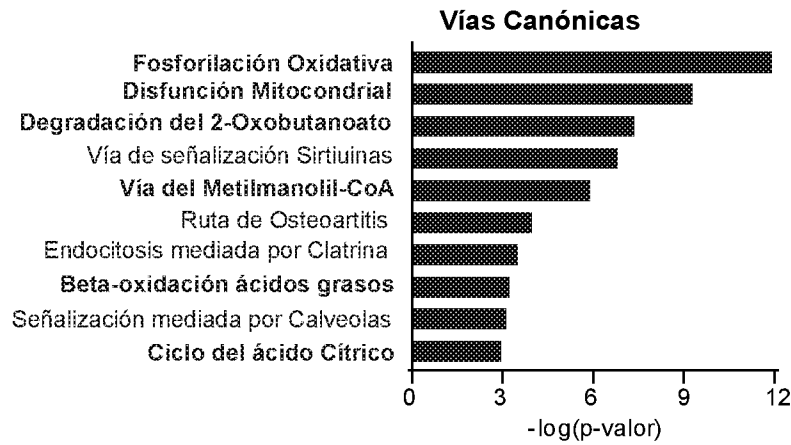
8. Precursor de nicotinamida adenina dinucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es el ácido nicotínico mononucleótido.
- 5 9. Precursor de nicotinamida adenina dinucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es el ácido nicotínico adenina dinucleótido.
- 10 10. Composición farmacéutica que comprende al menos un precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, para uso en la prevención de la aparición y/o el tratamiento de un aneurisma aórtico de etiología hereditaria (AAH) que se caracteriza por la presencia de una respiración mitocondrial deficiente.
- 15 11. Composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el aneurisma aórtico de etiología hereditaria (AAH) se selecciona entre el grupo que consiste en: síndrome de Marfan, síndrome de Loeys-Dietz, síndrome de Ehlers-Danlos de tipo vascular, síndrome de *Cutis laxa* y formas Familiares de Disecciones y Aneurismas Torácicos no sindrómicos.
- 20 12. Composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en el que el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) se selecciona entre el grupo que consiste en: niacina (NA) o ácido nicotínico; nicotinamida (NAM); nicotinamida ribósido (NR); nicotinamida mononucleótido (NMN); ácido nicotínico mononucleótido; y ácido nicotínico adenina dinucleótido; o combinaciones de los mismos.
- 25 13. Composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es niacina (NA) o ácido nicotínico.
- 30 14. Composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es nicotinamida (NAM).

15. Composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es nicotinamida ribósido (NR).
- 5 16. Composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es nicotinamida mononucleótido (NMN).
- 10 17. Composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es el ácido nicotínico mononucleótido.
- 15 18. Composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es el ácido nicotínico adenina dinucleótido.
- 20 19. Composición nutracéutica que comprende al menos un precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y al menos un excipiente nutracéuticamente aceptable, para uso en la prevención de la aparición de un aneurisma aórtico de etiología hereditaria (AAH) que se caracteriza por la presencia de una respiración mitocondrial deficiente.
- 25 20. Composición nutracéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el aneurisma aórtico de etiología hereditaria (AAH) se selecciona entre el grupo que consiste en: síndrome de Marfan, síndrome de Loeys-Dietz, síndrome de Ehlers-Danlos de tipo vascular, síndrome de *Cutis laxa* y formas Familiares de Disecciones y Aneurismas Torácicos no sindrómicos.
- 30 21. Composición nutracéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 o 20, en el que el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) se selecciona entre el grupo que consiste en: niacina (NA) o ácido nicotínico; nicotinamida (NAM); nicotinamida ribósido (NR); nicotinamida mononucleótido (NMN); ácido nicotínico mononucleótido; y ácido nicotínico adenina dinucleótido; o combinaciones de los mismos.
- 35 22. Composición nutracéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el que el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es niacina (NA) o ácido nicotínico.

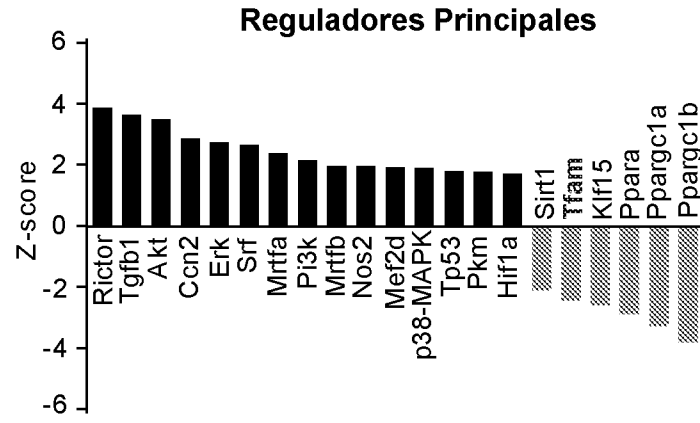
23. Composición nutracéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el que el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es nicotinamida (NAM).
- 5 24. Composición nutracéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el que el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es nicotinamida ribósido (NR).
- 10 25. Composición nutracéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el que el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es nicotinamida mononucleótido (NMN).
- 15 26. Composición nutracéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el que el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es el ácido nicotínico mononucleótido.
- 20 27. Composición nutracéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el que el precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es el ácido nicotínico adenina dinucleótido.

FIGURA 1

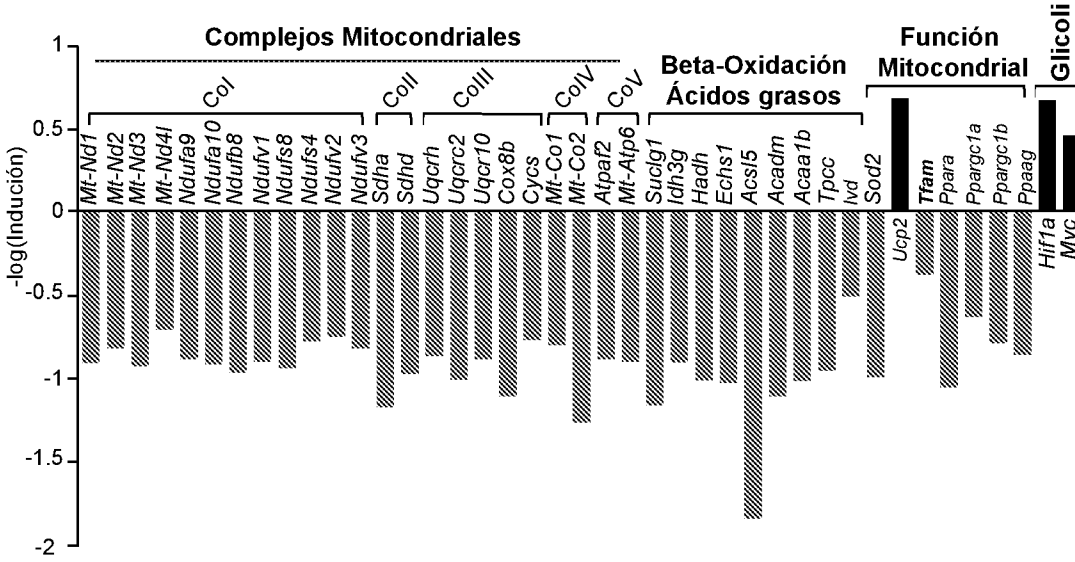
A



B



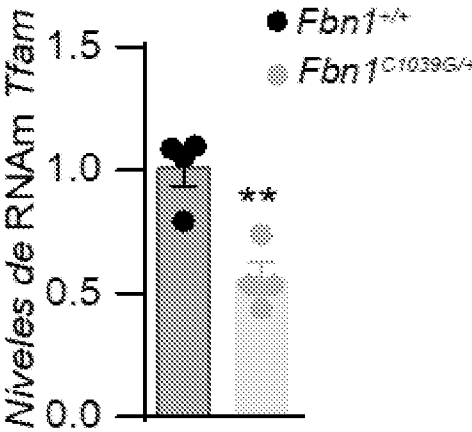
C



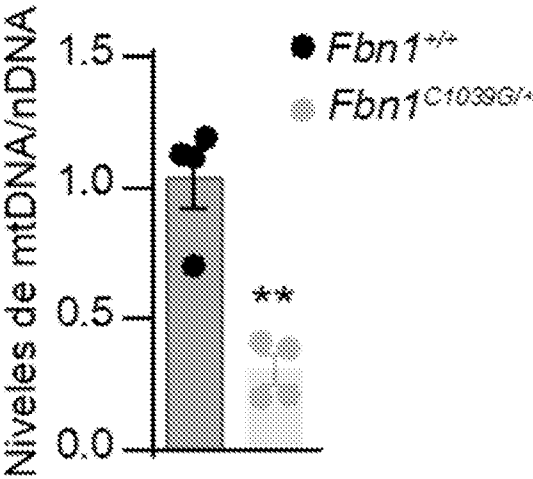
2/25

FIGURA 1 (cont.)

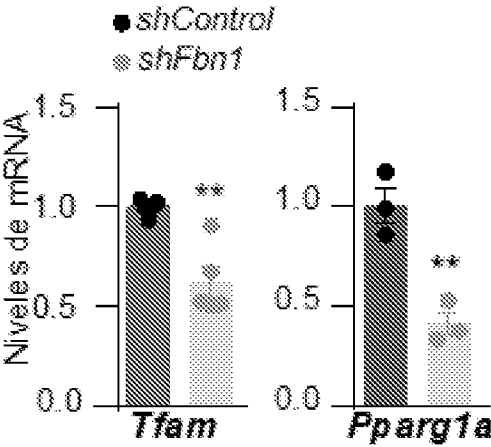
D



E



F



G

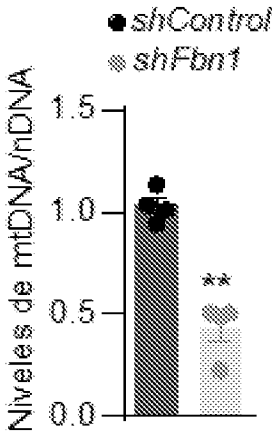
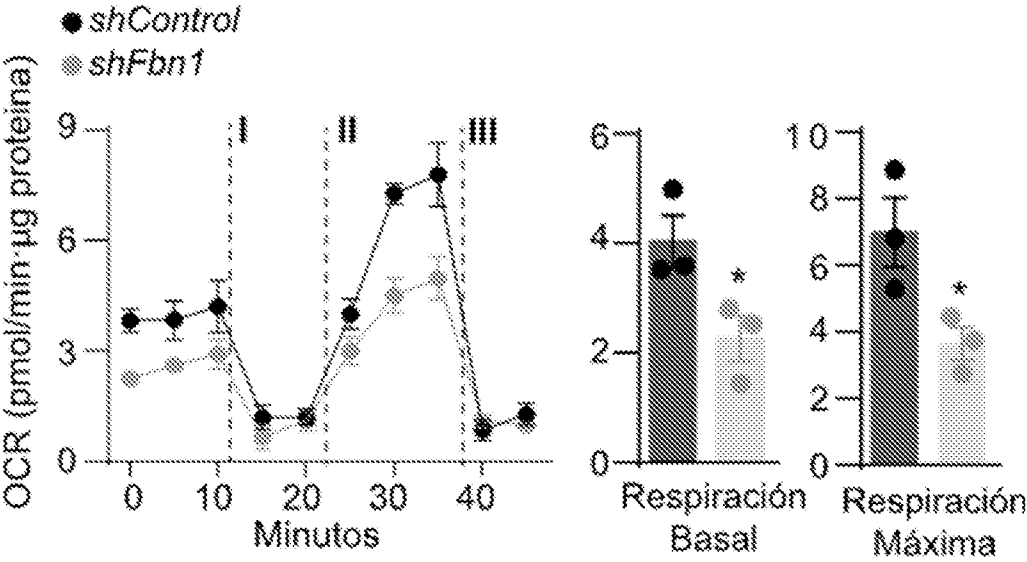
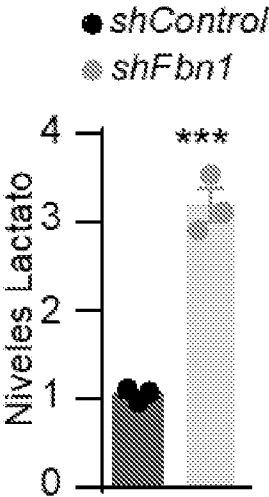


FIGURA 1 (cont.)

H



I



J

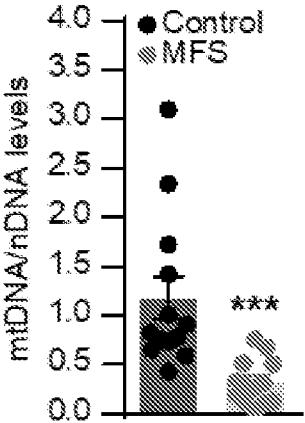
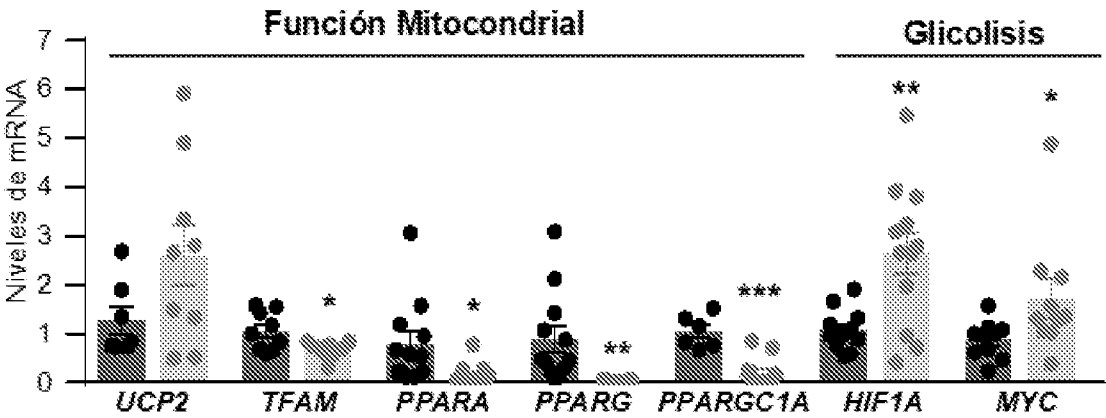
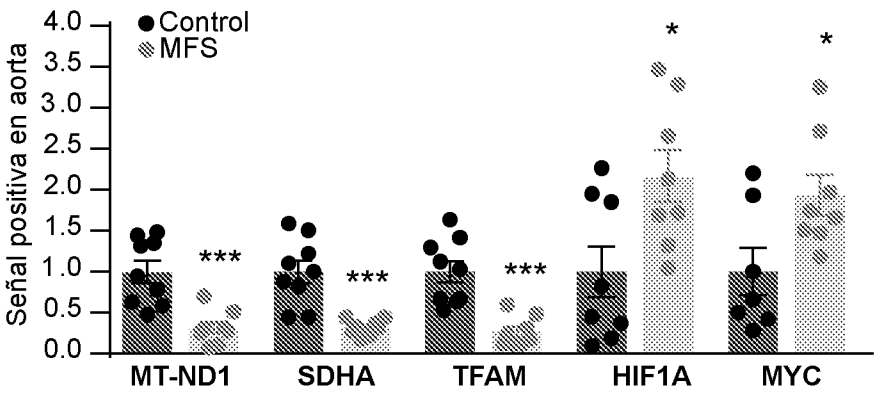


FIGURA 1 (cont.)

K



L



M

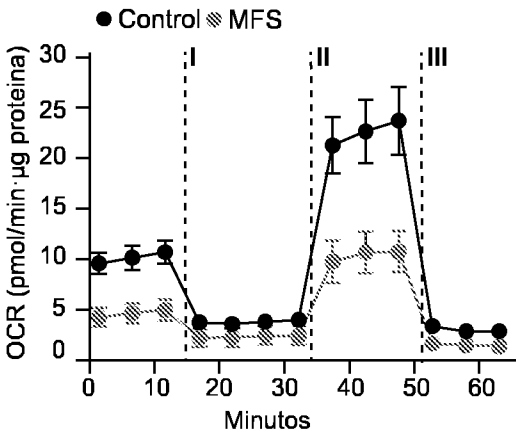
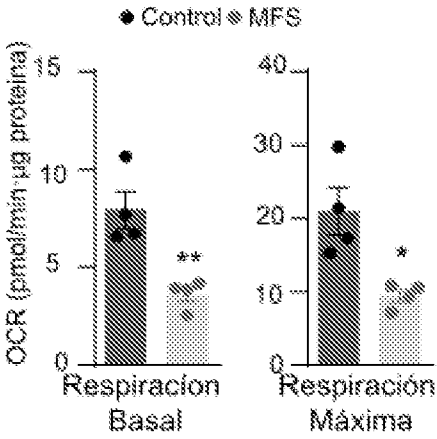
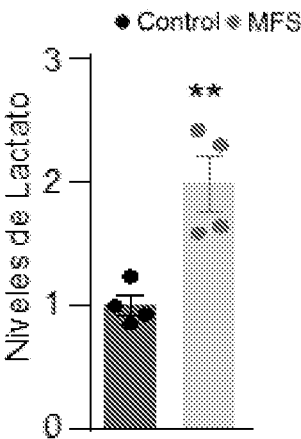


FIGURA 1 (cont.)

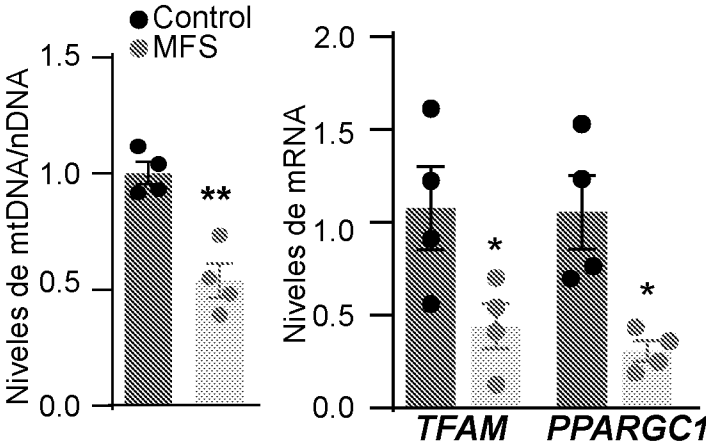
N



O



P



6/25

FIGURA 1 (cont.)

Q

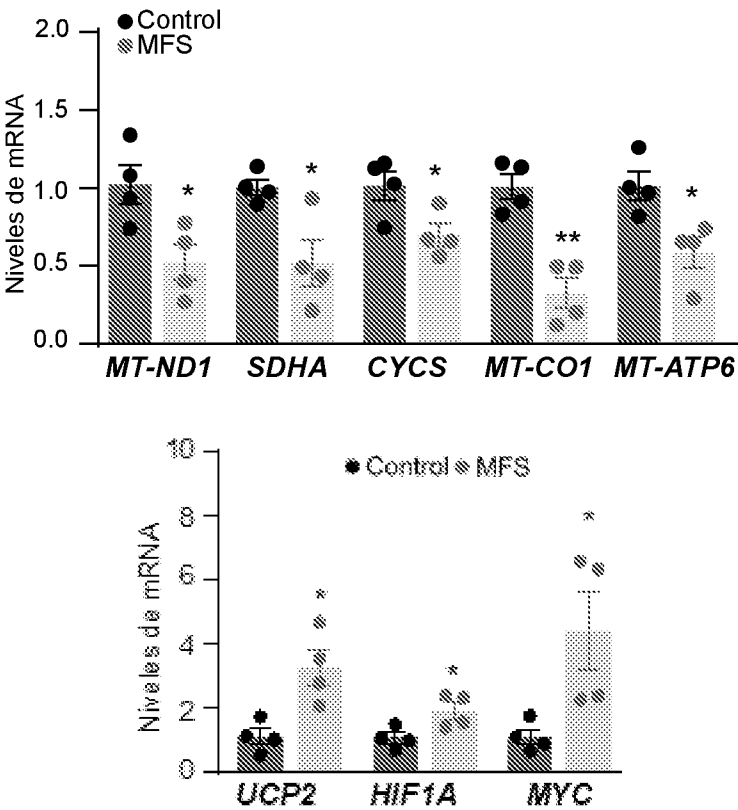


FIGURA 2

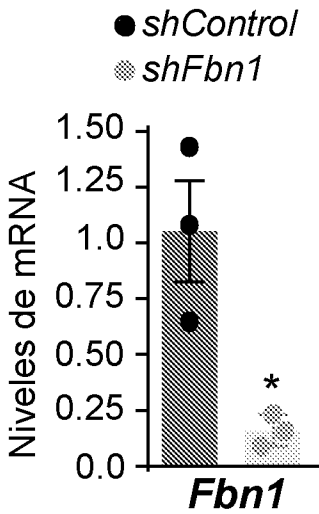


FIGURA 3

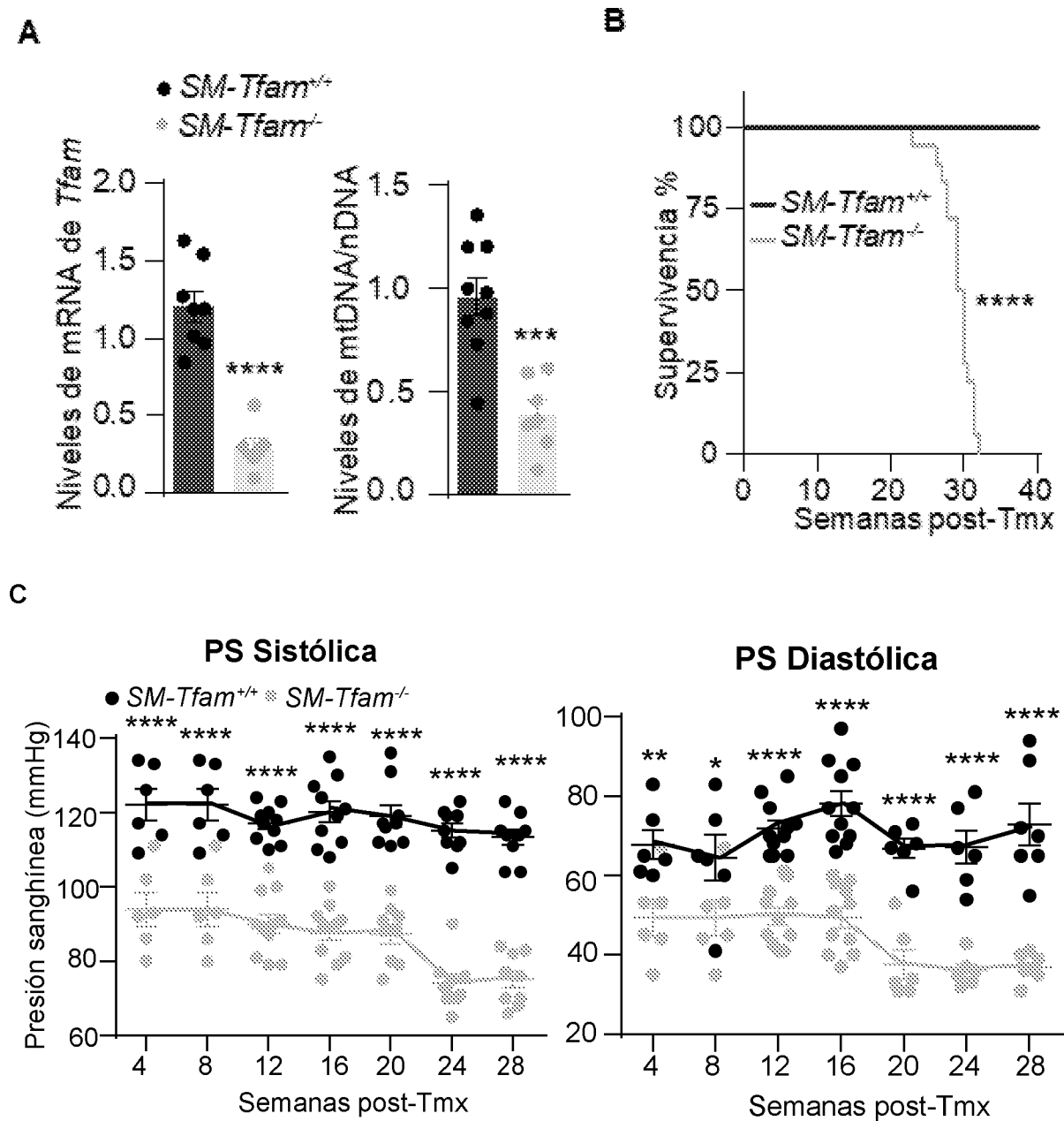
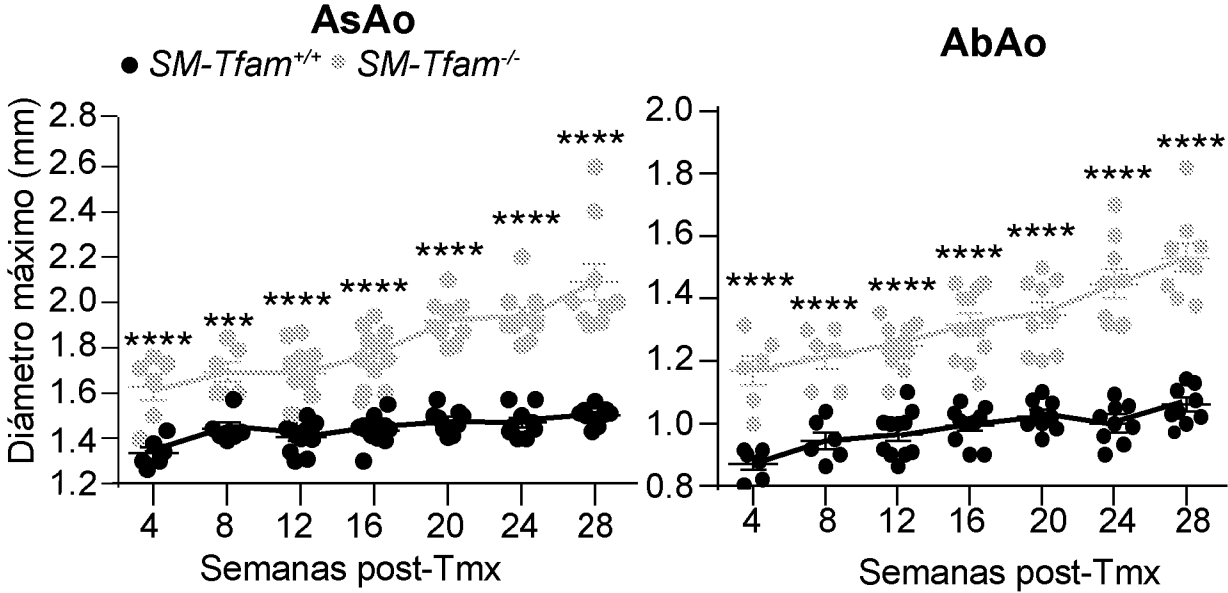
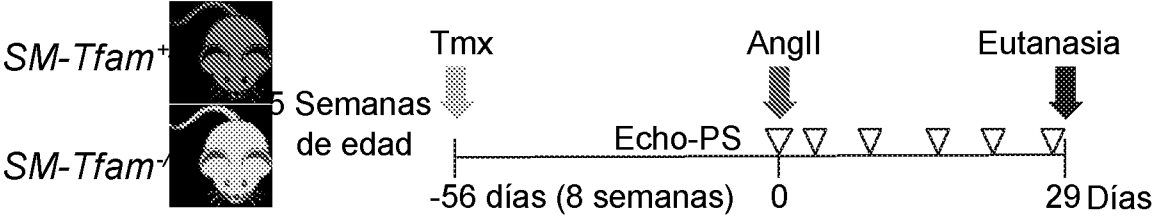


FIGURA 3 (cont.)

D



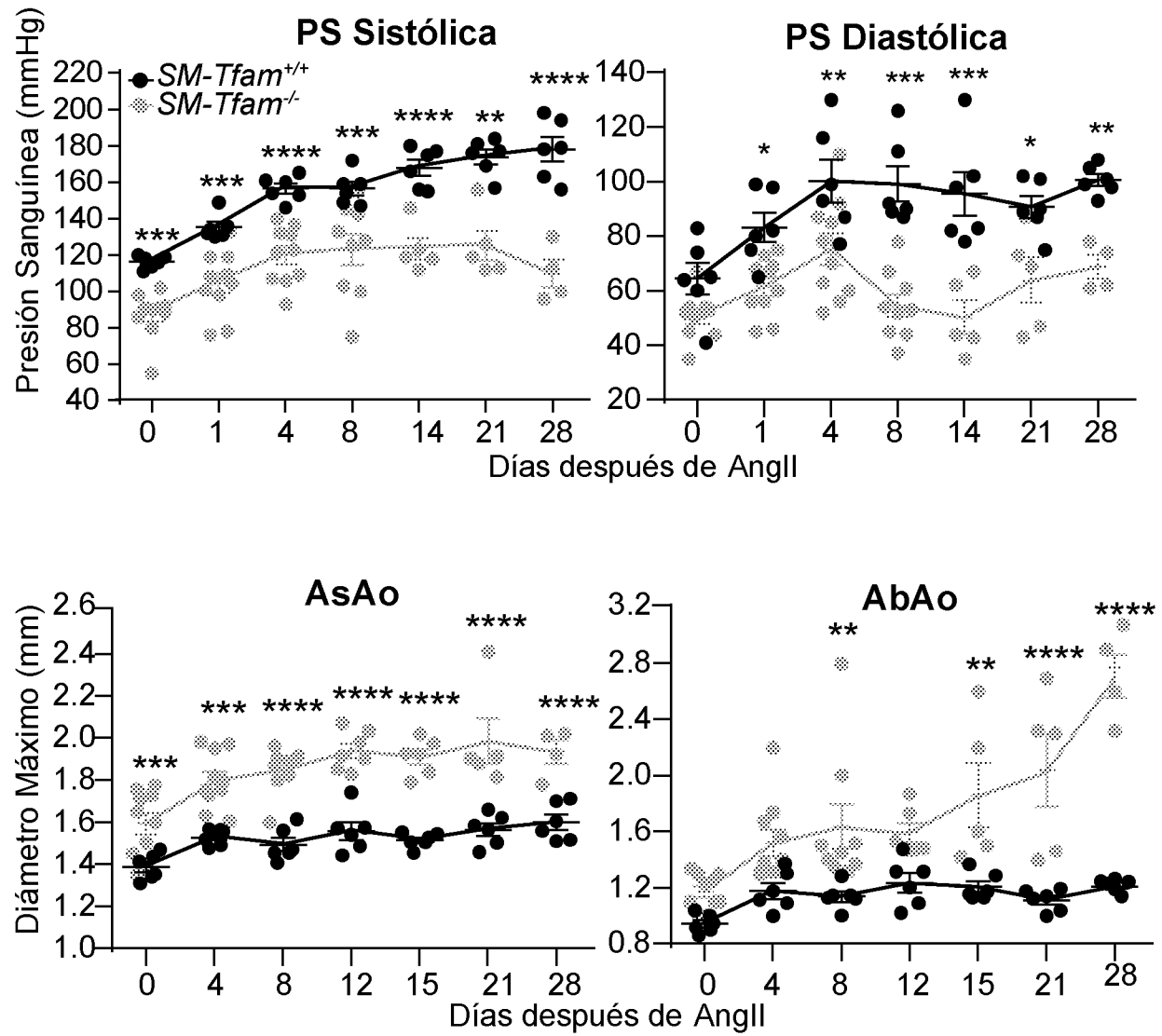
E



9/25

FIGURA 3 (cont.)

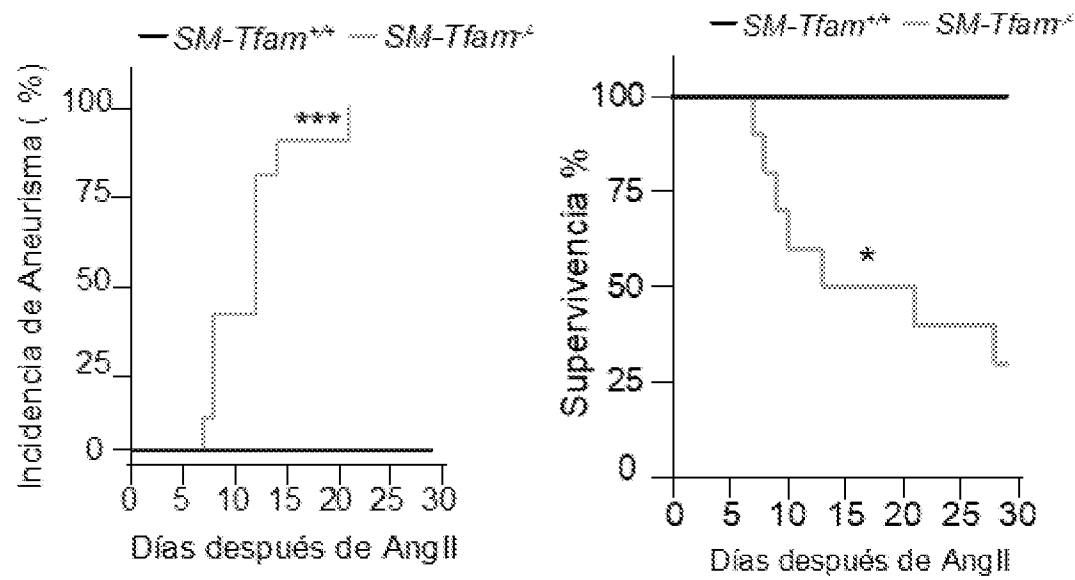
F



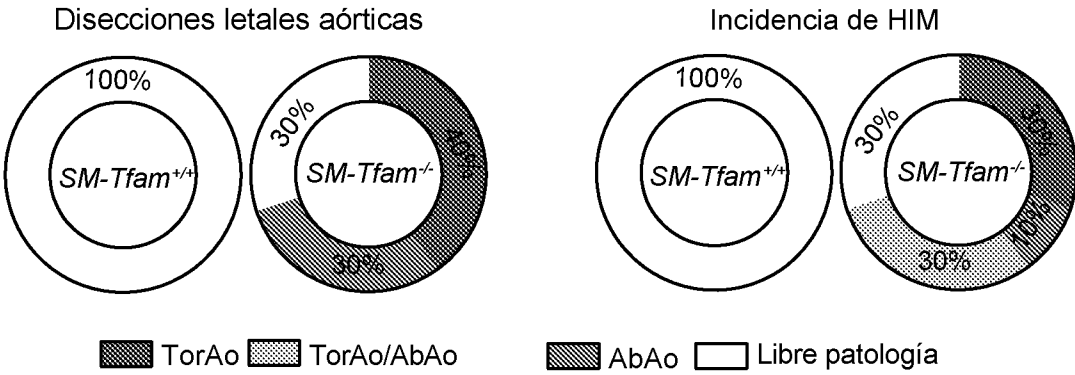
10/25

FIGURE 3 (cont.)

G



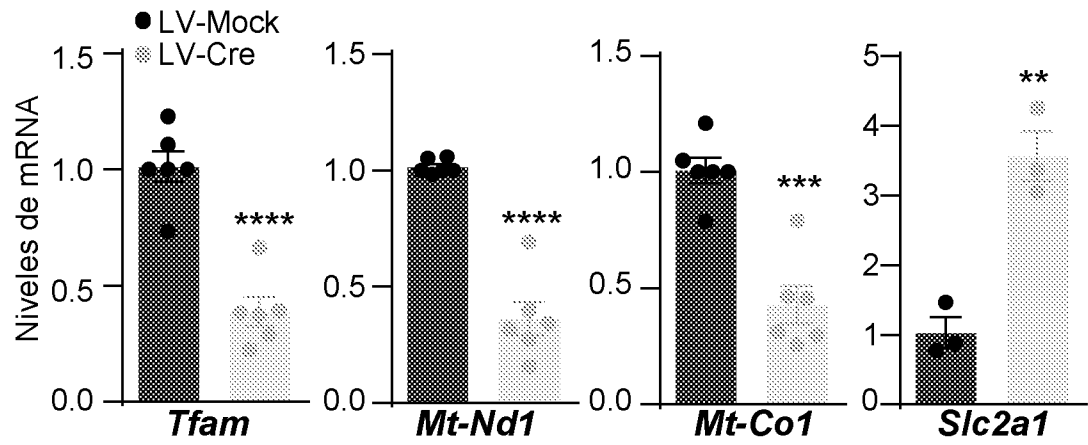
H



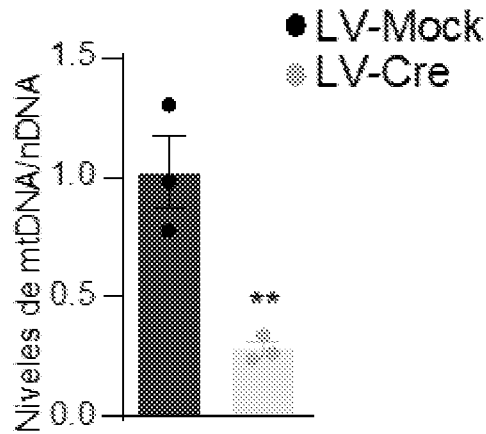
11/25

FIGURA 4

A



B



12/25

FIGURA 4 (cont.)

C

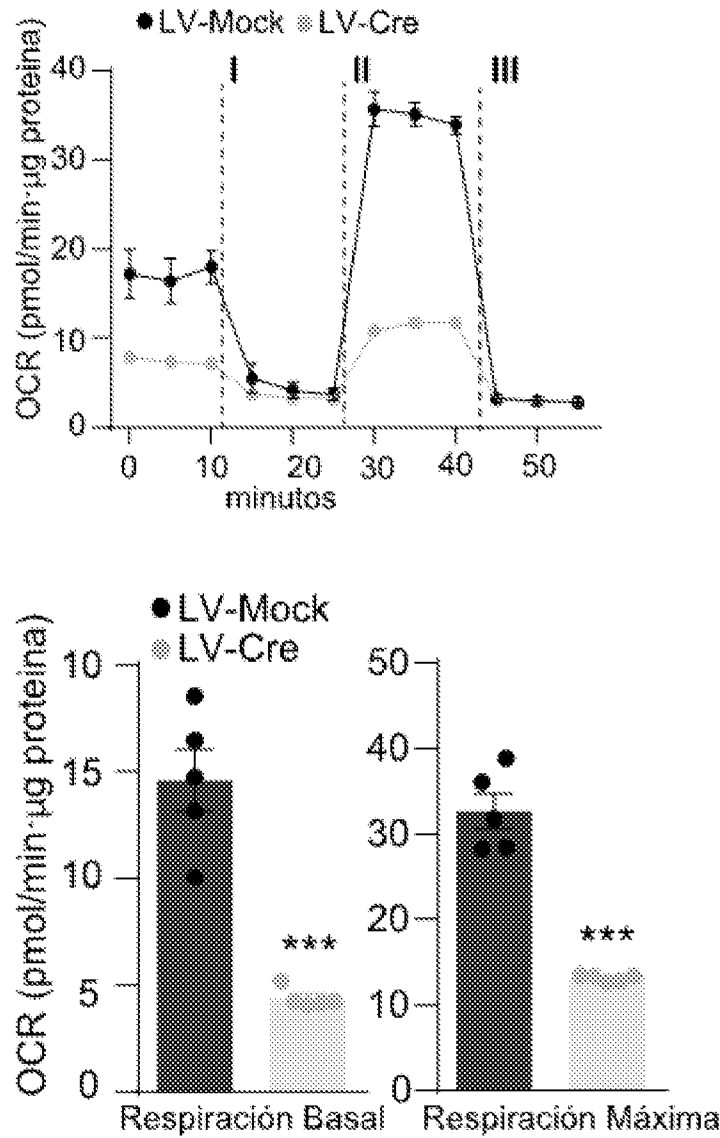
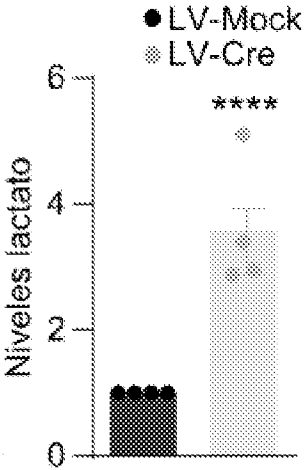
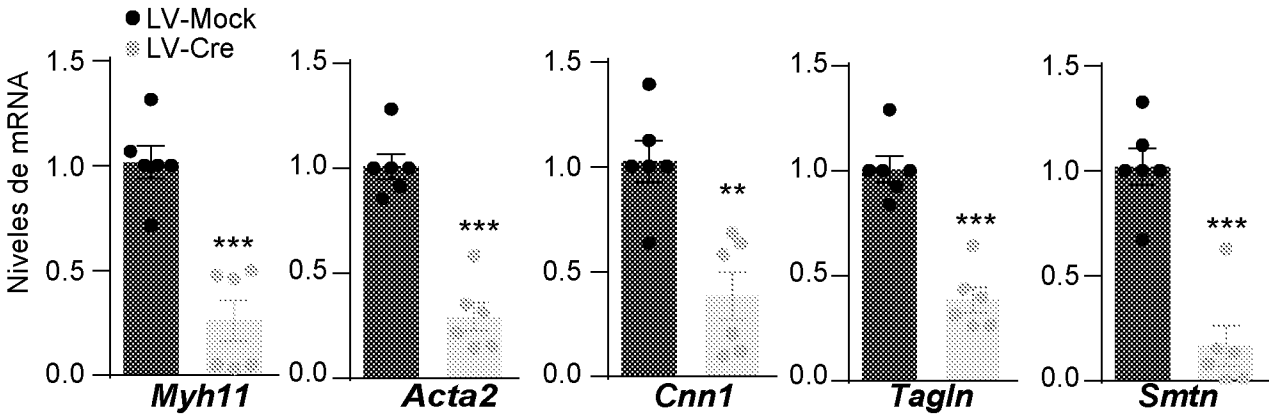


FIGURA 4 (cont.)

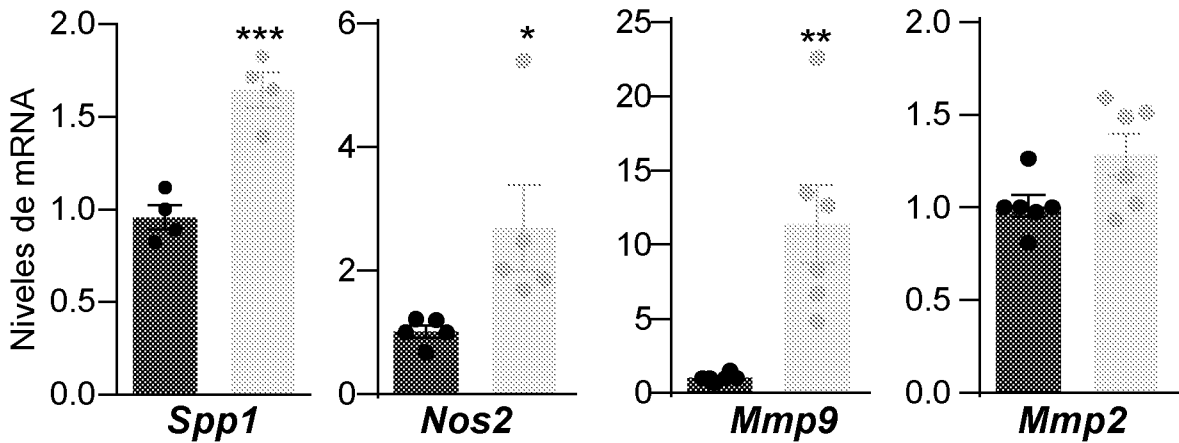
D



E



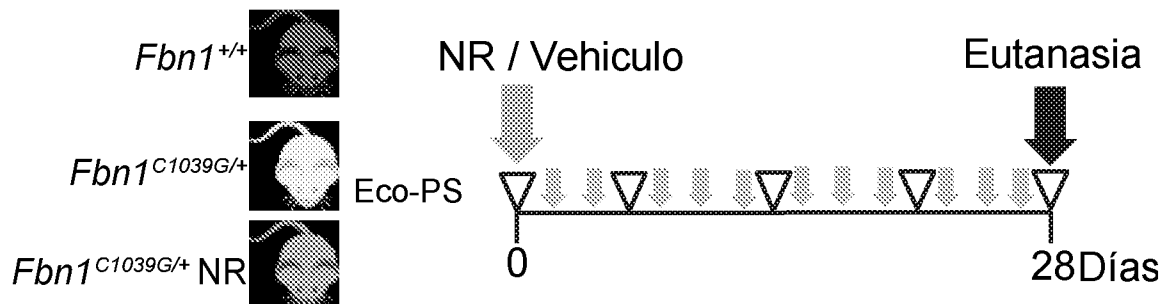
F



14/25

FIGURA 5

A



B

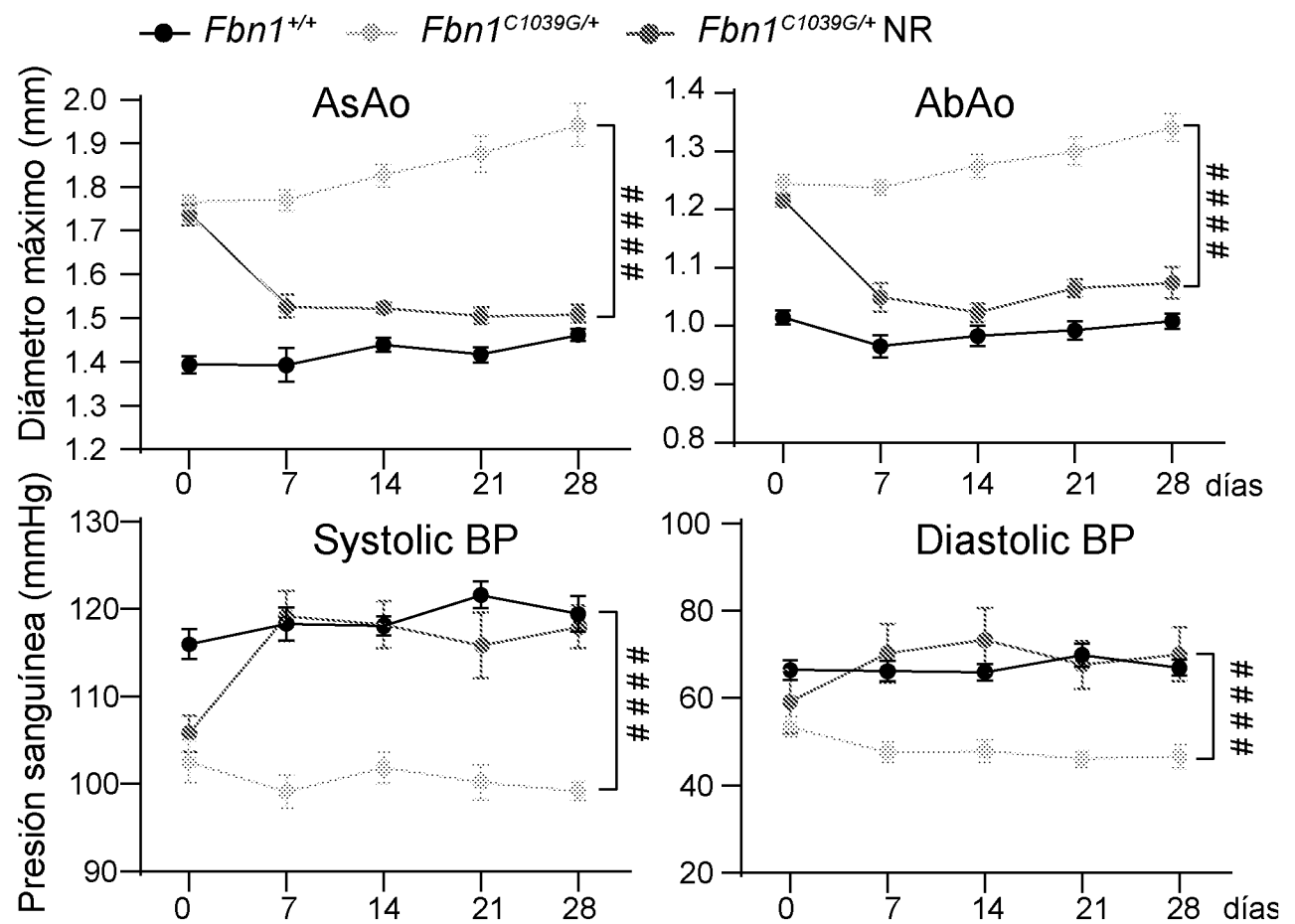
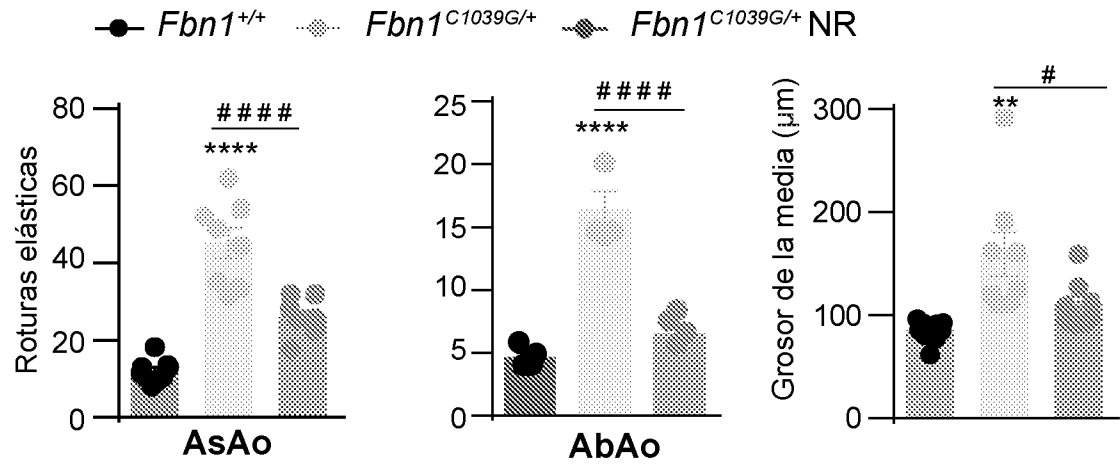
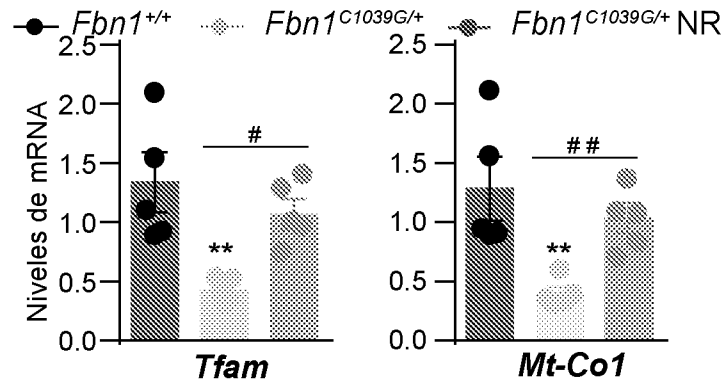


FIGURA 5 (cont.)

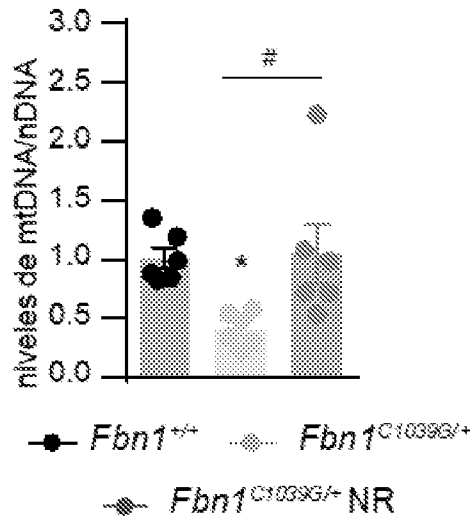
C



D



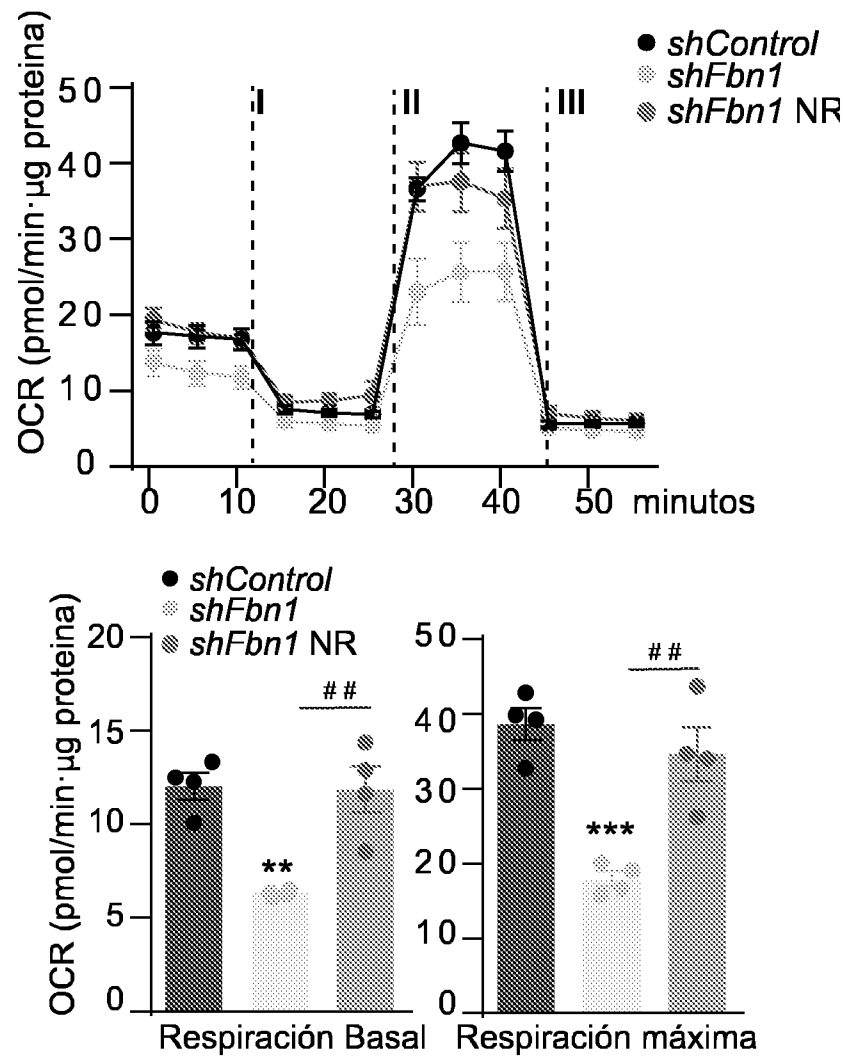
E



16/25

FIGURA 6

A



B

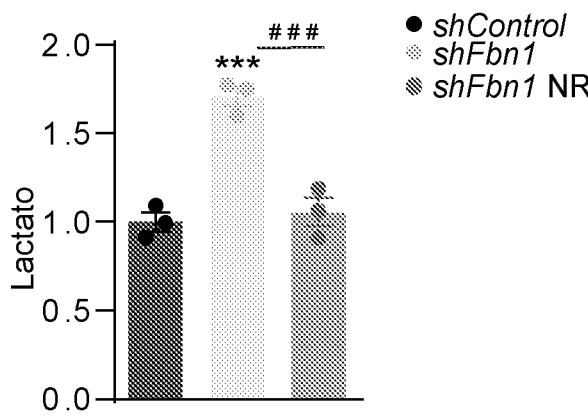
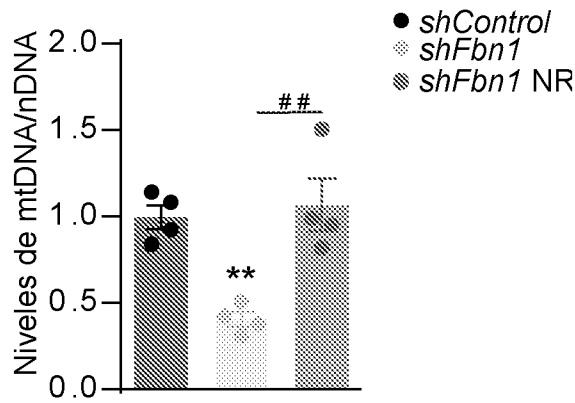
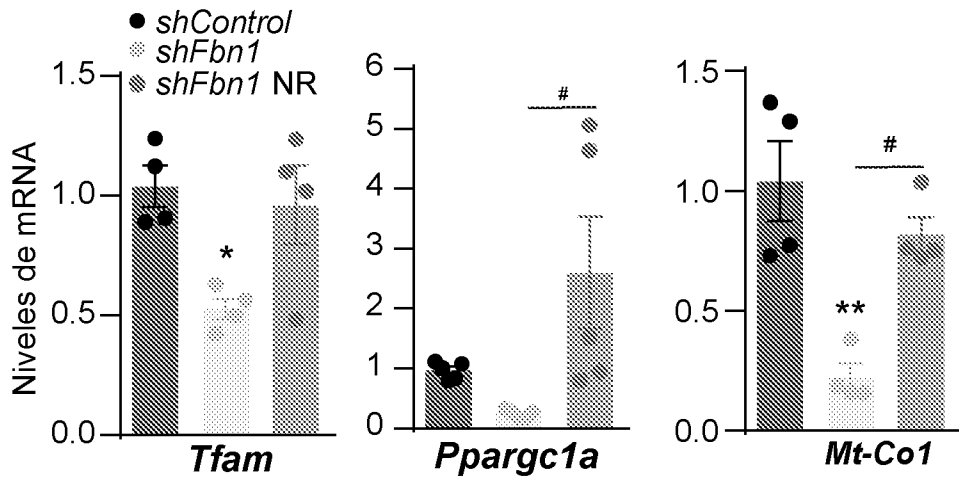


FIGURA 6 (cont.)

C



D



E

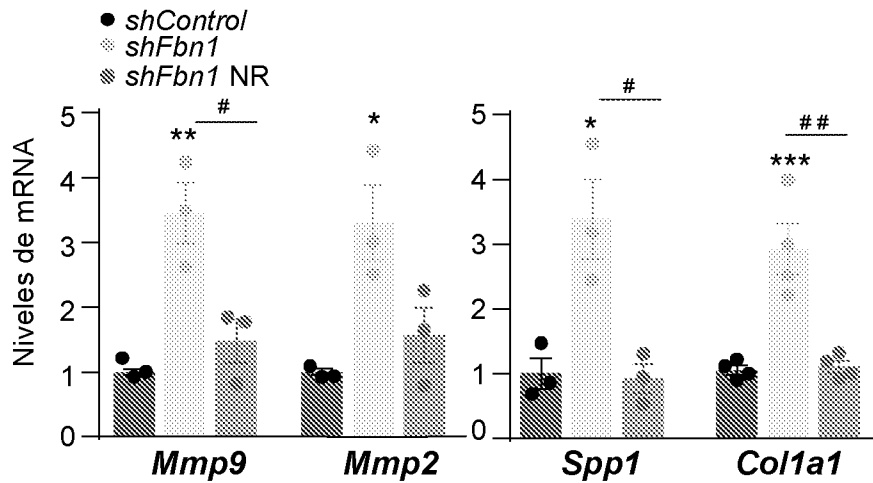
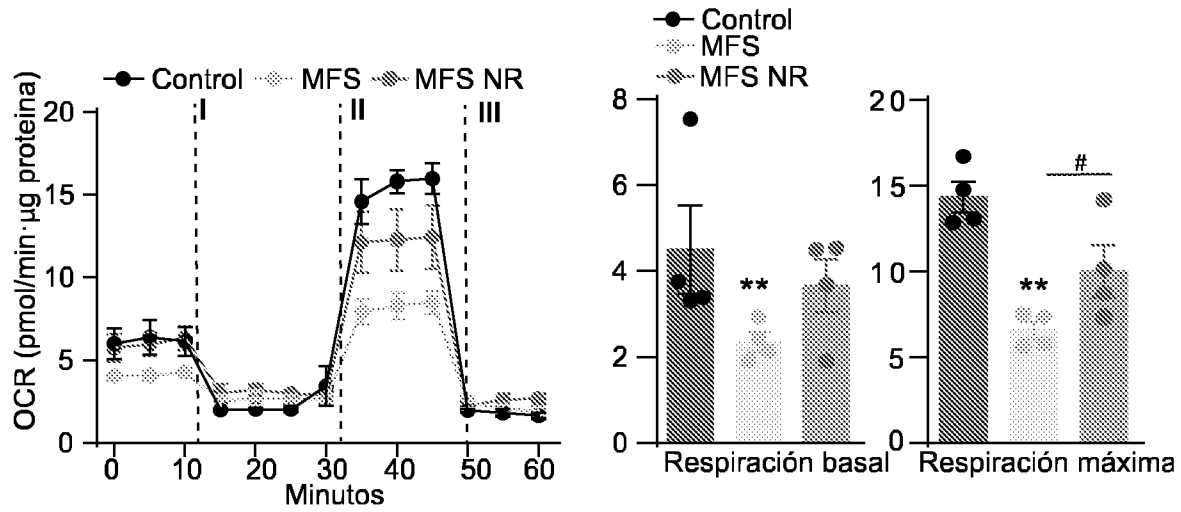
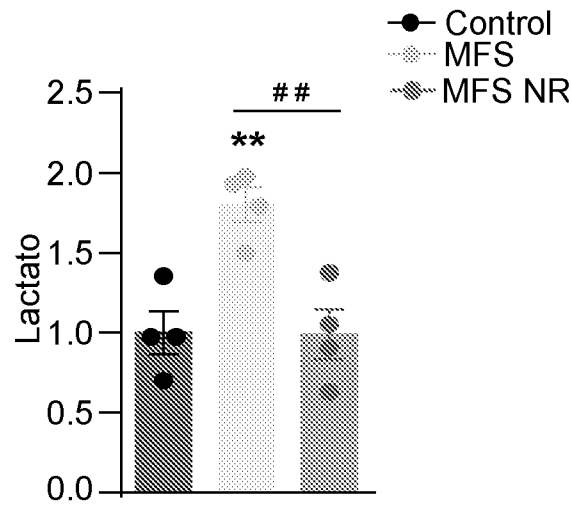


FIGURA 6 (cont.)

F



G



H

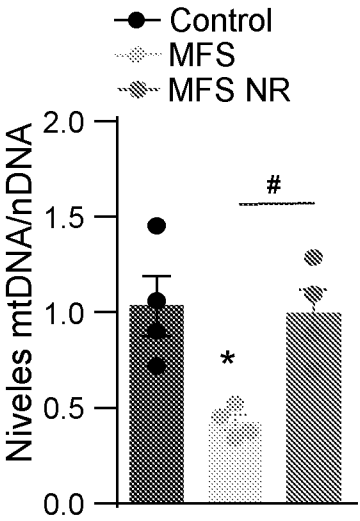
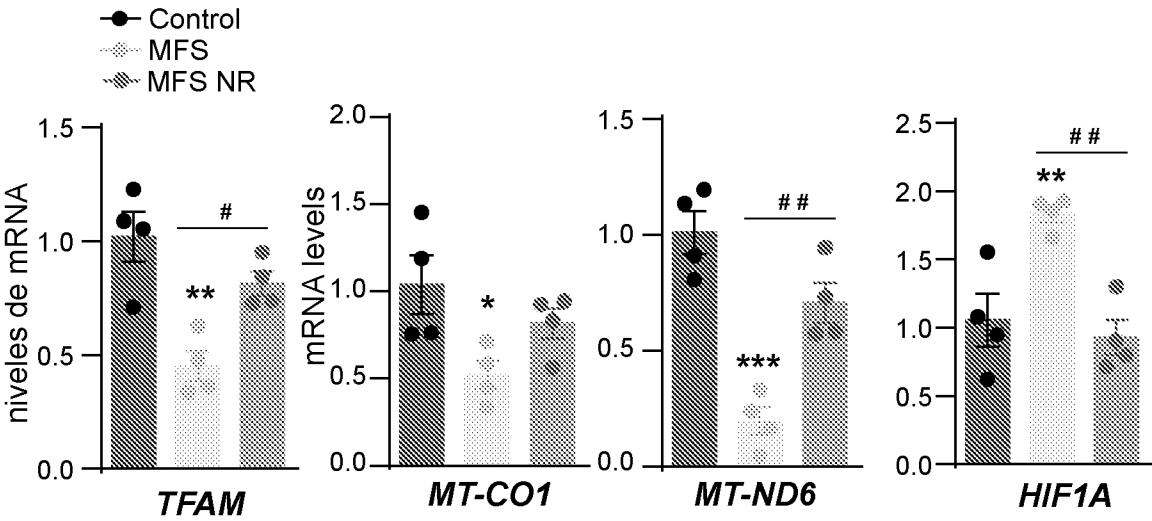
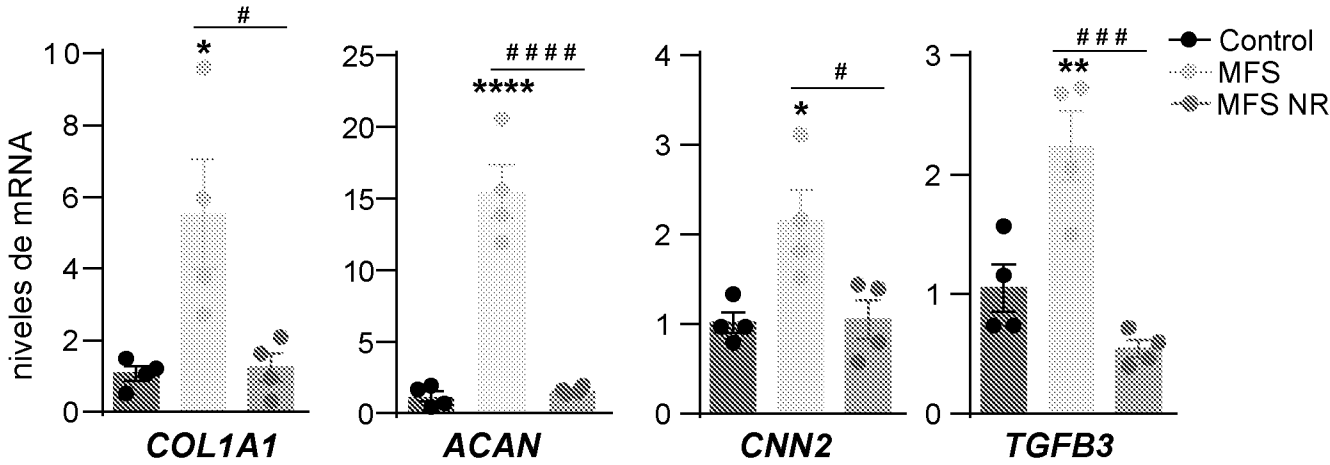


FIGURA 6 (cont.)

I



J



20/25

FIGURA 7

A1

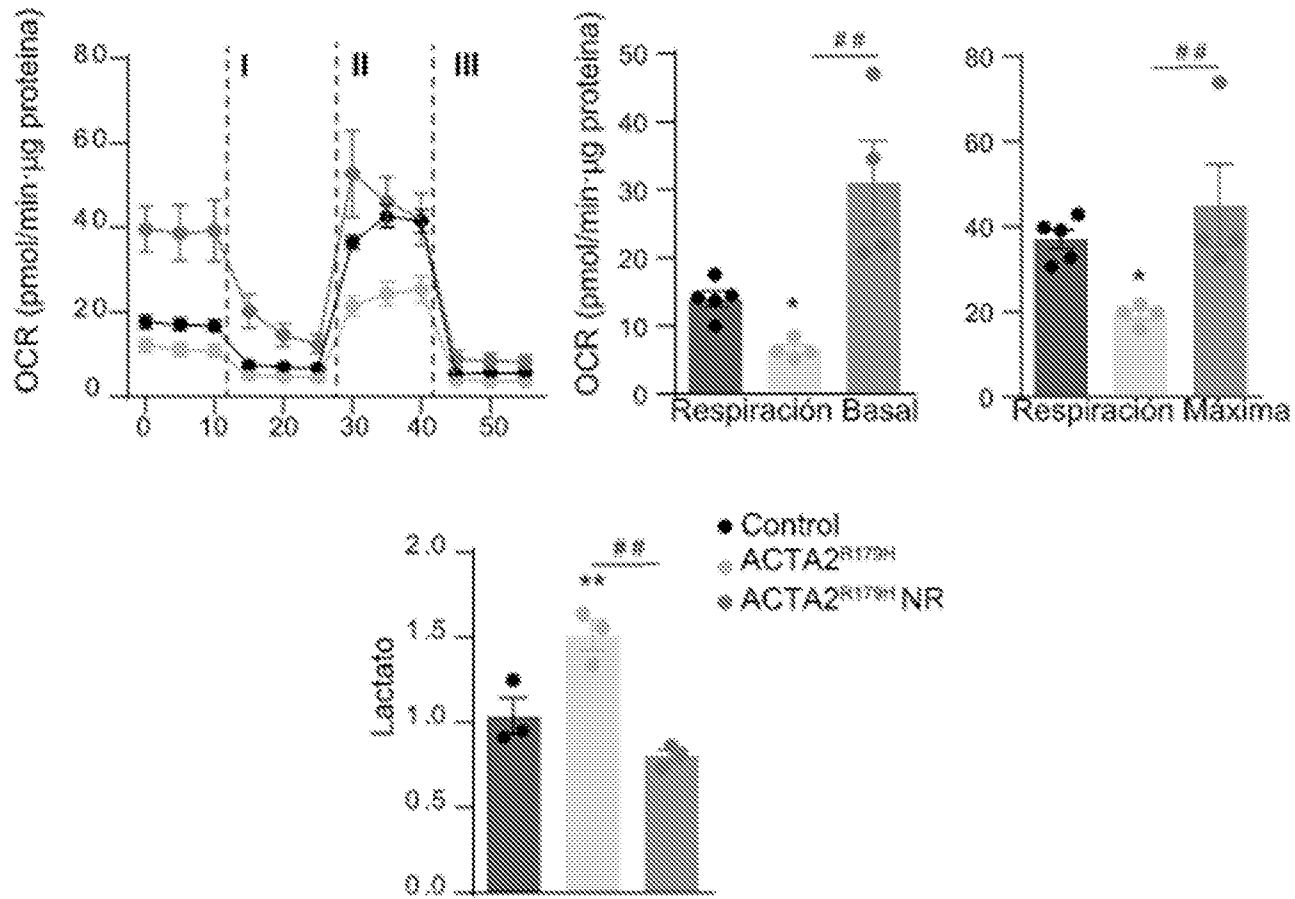


FIGURA 7 (cont.)

A2

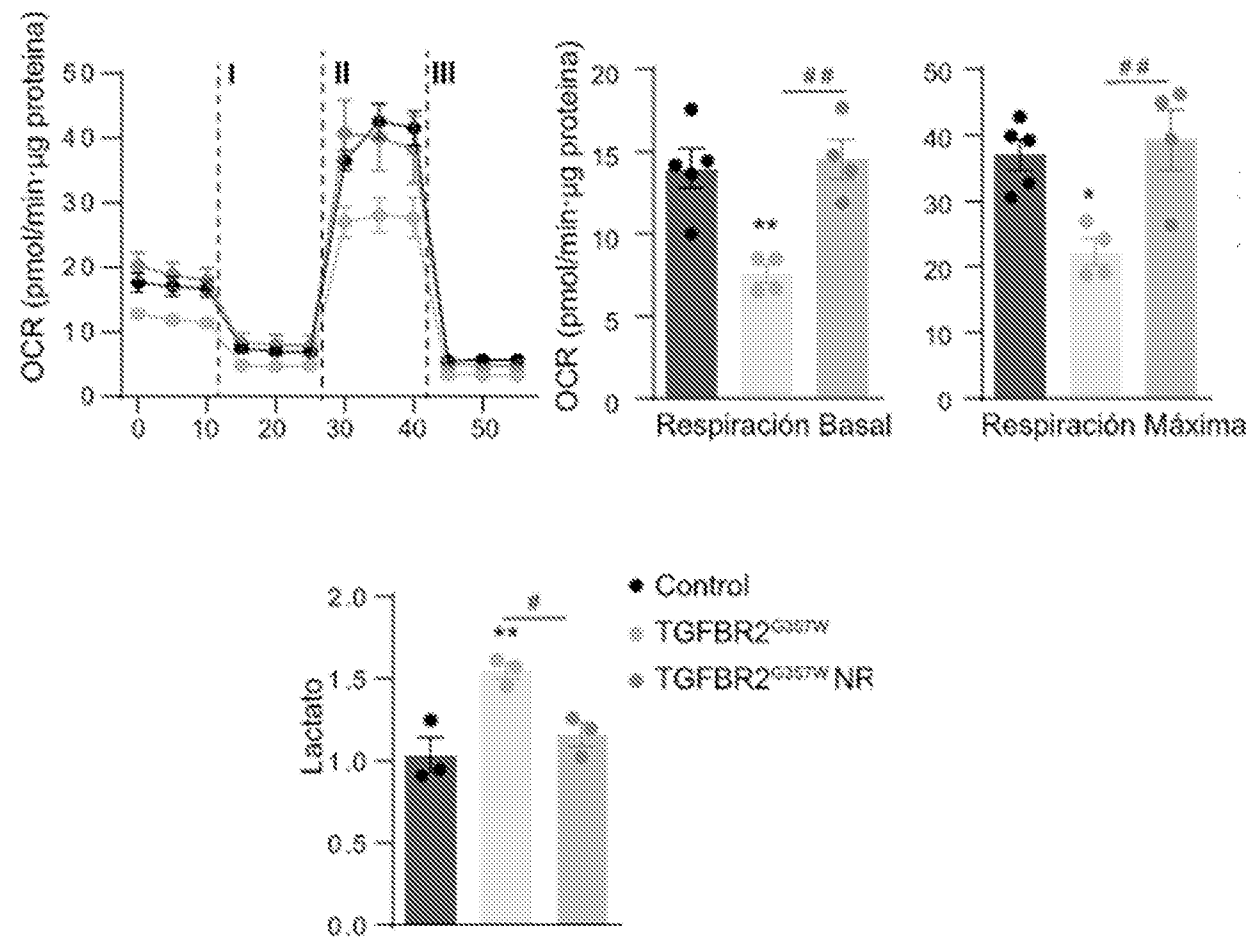
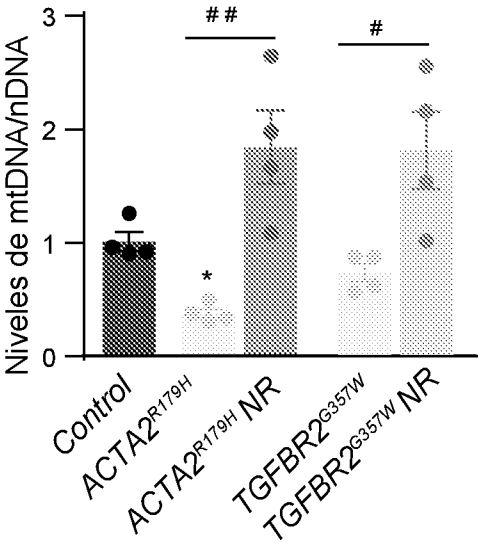


FIGURA 7 (cont.)

B



C

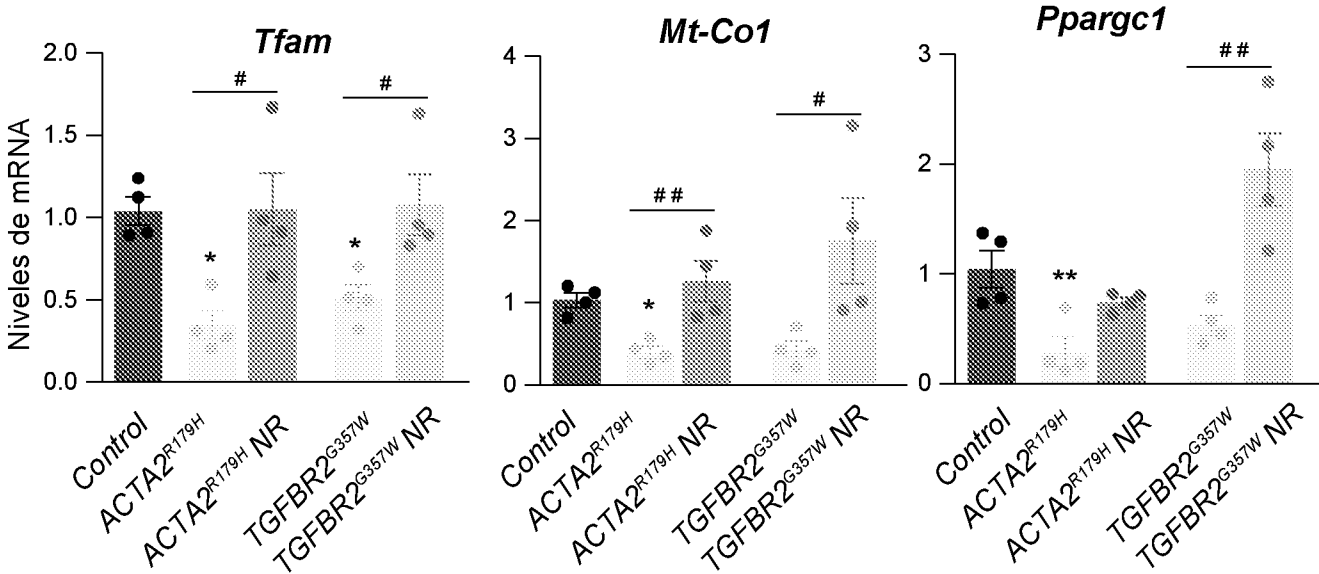
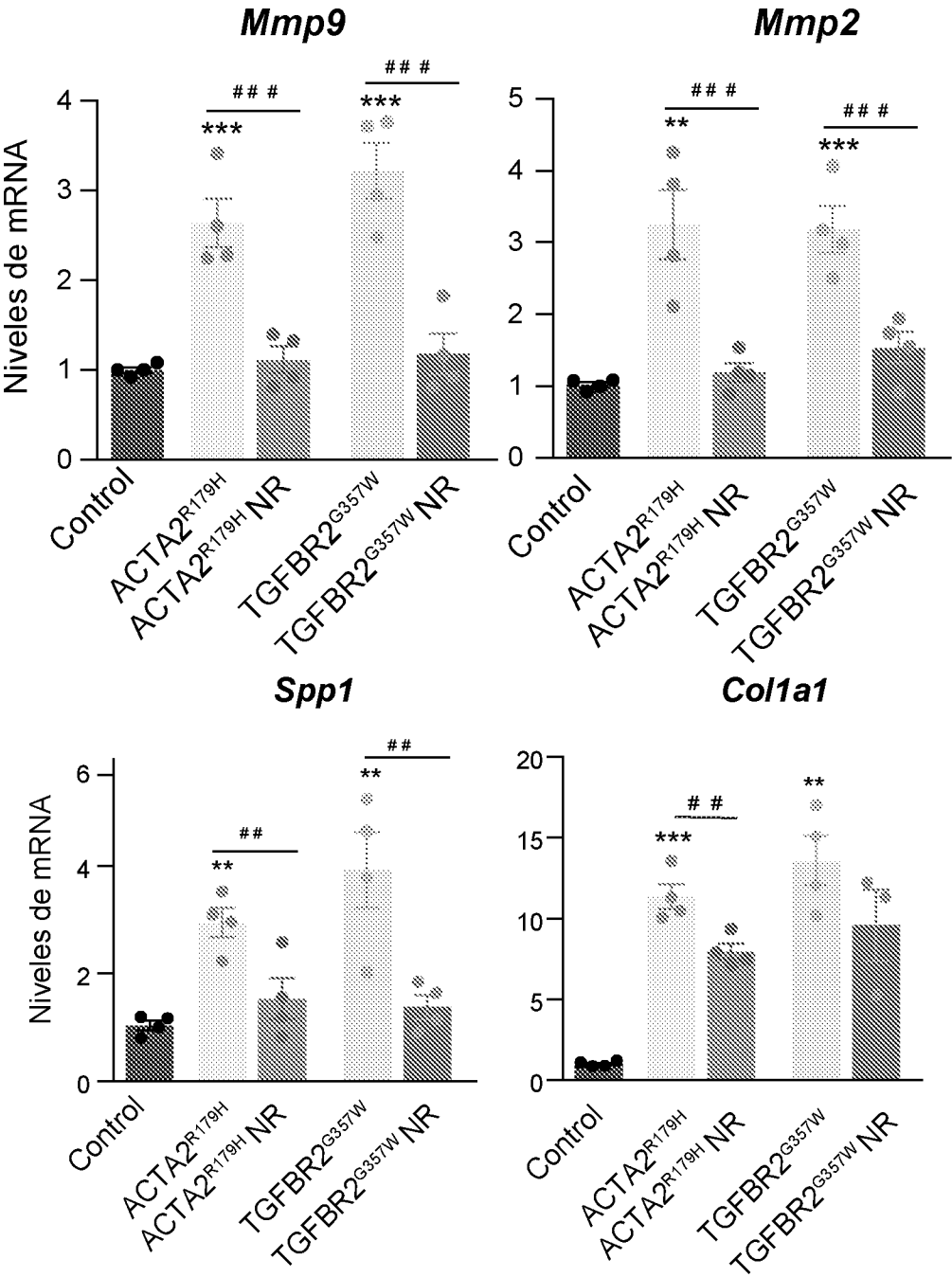


FIGURA 7 (cont.)

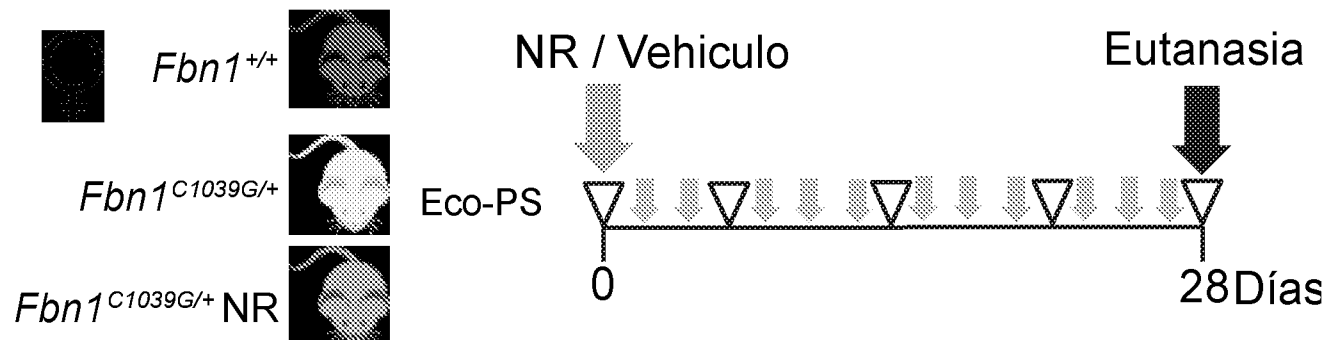
D



24/25

FIGURA 8

A



B

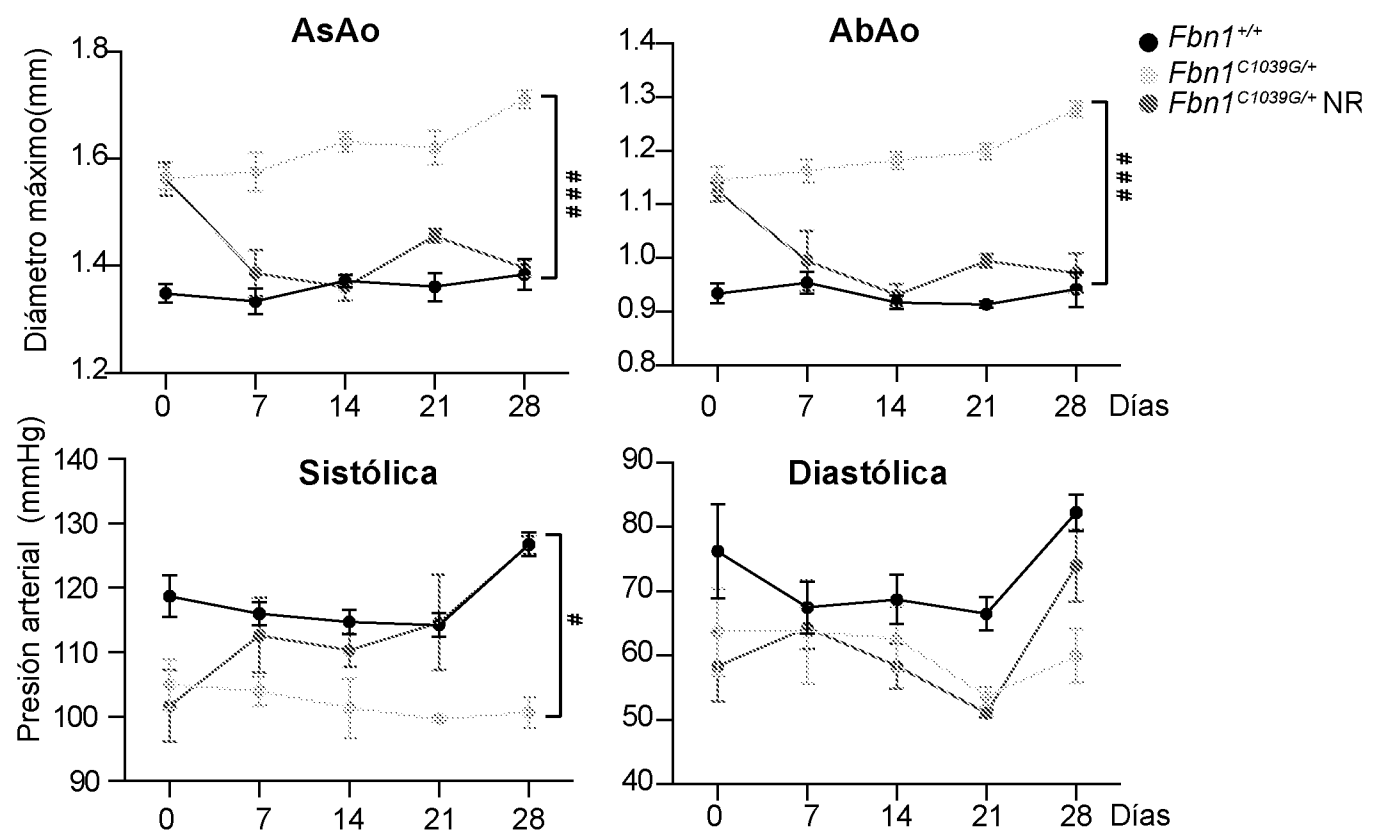
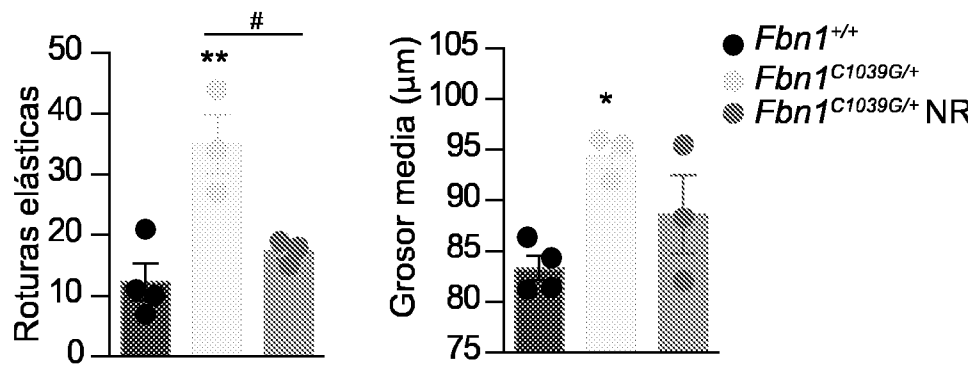


FIGURA 8 (cont.)

C



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2021/070638

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/7076 (2006.01)

A61P9/14 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INSPEC, NPL, INTERNET

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HORIMATSU TETSUO et al.. Niacin protects against abdominal aortic aneurysm formation via GPR109A independent mechanisms: role of NAD()/nicotinamide. Cardiovascular Research Dec 1 2020., 01/12/2020, Vol. 116, N° 14, pages 2226-2238, ISSN 0008-6363(print) ISSN 1755-3245(electronic), <DOI: 10.1093/cvr/cvz303> Results, Discussion, Conclusions.	1-27
Y	CERUTTI RAFFAELE et al.. NAD()-Dependent Activation of Sirt1 Corrects the Phenotype in a Mouse Model of Mitochondrial Disease. Cell Metabolism Jun 3 2014., 03/06/2014, Vol. 19, N° 6, pages 1042-1049, ISSN 1550-4131(print) ISSN 1932-7420(electronic), <DOI: 10.1016/j.cmet.2014.04.001> Results, figure 2	1-27

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13/12/2021

Date of mailing of the international search report
(16/12/2021)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
J. Vizán Arroyo

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498573

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2021/070638

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VAN DER PLUIJM INGRID et al.. Decreased mitochondrial respiration in aneurysmal aortas of Fibulin-4 mutant mice is linked to PGC1A regulation. Cardiovascular Research Nov 1 2018., 01/11/2018, Vol. 114, N° 13, pages 1776-1793, ISSN 0008-6363(print) ISSN 1755-3245(electronic), <DOI: 10.1093/cvr/cvy150> Results, figure 2.	1-27
A	WATSON ALANNA et al.. Nicotinamide Phosphoribosyltransferase in Smooth Muscle Cells Maintains Genome Integrity, Resists Aortic Medial Degeneration, and is Suppressed in Human Thoracic Aortic Aneurysm Disease. Circulation Research Jun 9 2017., 09/06/2017, Vol. 120, N° 12, pages 1889-1902, ISSN 0009-7330(print) ISSN 1524-4571(electronic), <DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310022> the whole document.	1-27
A	SARTOR L FORTEZA A. Strategies to prevent aortic complications in Marfan syndrome. Journal of Thoracic Disease 20170501 Ame Publishing Company Hkg., 01/05/2017, Vol. 9, N° Supplement 6, pages S434 - S438, ISSN 2072-1439 (print) ISSN 2077-6624 (electronic), <DOI: 10.21037/jtd.2017.04.69> the whole document.	1-27
A	SRIVASTAVA SARIKA. Emerging therapeutic roles for NAD() metabolism in mitochondrial and age-related disorders.. Clinical and Translational Medicine United States Dec 2016., 30/11/2016, Vol. 5, N° 1, pages 25, ISSN 2001-1326 (Print), <DOI: 10.1186/s40169-016-0104-7 pubmed:27465020> the whole document.	1-27

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2021/070638

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/7076 (2006.01)

A61P9/14 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INSPEC, NPL, INTERNET

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	HORIMATSU TETSUO et al.. Niacin protects against abdominal aortic aneurysm formation via GPR109A independent mechanisms: role of NAD()/nicotinamide. Cardiovascular Research Dec 1 2020., 01/12/2020, Vol. 116, Nº 14, páginas 2226-2238, ISSN 0008-6363(print) ISSN 1755-3245(electronic), <DOI: 10.1093/cvr/cvz303> Resultados, Discusión, Conclusiones.	1-27
Y	CERUTTI RAFFAELE et al.. NAD()-Dependent Activation of Sirt1 Corrects the Phenotype in a Mouse Model of Mitochondrial Disease. Cell Metabolism Jun 3 2014., 03/06/2014, Vol. 19, Nº 6, páginas 1042-1049, ISSN 1550-4131(print) ISSN 1932-7420(electronic), <DOI: 10.1016/j.cmet.2014.04.001> Resultados, figura 2	1-27

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
13/12/2021

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
16 de diciembre de 2021 (16/12/2021)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
J. Vizán Arroyo
Nº de teléfono 91 3498573

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2021/070638

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	VAN DER PLUIJM INGRID et al.. Decreased mitochondrial respiration in aneurysmal aortas of Fibulin-4 mutant mice is linked to PGC1A regulation. Cardiovascular Research Nov 1 2018., 01/11/2018, Vol. 114, Nº 13, páginas 1776-1793, ISSN 0008-6363(print) ISSN 1755-3245(electronic), <DOI: 10.1093/cvr/cvy150> Resultados, figura 2.	1-27
A	WATSON ALANNA et al.. Nicotinamide Phosphoribosyltransferase in Smooth Muscle Cells Maintains Genome Integrity, Resists Aortic Medial Degeneration, and is Suppressed in Human Thoracic Aortic Aneurysm Disease. Circulation Research Jun 9 2017., 09/06/2017, Vol. 120, Nº 12, páginas 1889-1902, ISSN 0009-7330(print) ISSN 1524-4571(electronic), <DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310022> todo el documento.	1-27
A	SARTOR L FORTEZA A. Strategies to prevent aortic complications in Marfan syndrome. Journal of Thoracic Disease 20170501 Ame Publishing Company Hkg., 01/05/2017, Vol. 9, Nº Suplemento 6, páginas S434 - S438, ISSN 2072-1439 (print) ISSN 2077-6624 (electronic), <DOI: 10.21037/jtd.2017.04.69> todo el documento.	1-27
A	SRIVASTAVA SARIKA. Emerging therapeutic roles for NAD() metabolism in mitochondrial and age-related disorders.. Clinical and Translational Medicine United States Dec 2016., 30/11/2016, Vol. 5, Nº 1, páginas 25, ISSN 2001-1326 (Print), <DOI: 10.1186/s40169-016-0104-7 pubmed:27465020> todo el documento.	1-27