

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 228**

51 Int. Cl.:
A61K 31/426 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05823154 .9**
96 Fecha de presentación: **16.11.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1824481**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2007**

54 Título: **Uso de ribosa-cesteína para tratar la hipoxia mejorando el aporte de glutatión y los niveles de ATP en células**

30 Prioridad:
17.11.2004 US 990933

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.11.2012

73 Titular/es:
MAX INTERNATIONAL, LLC (100.0%)
7090 S.Union Park Ave. Suite 500
Midvale UT 84047, US

72 Inventor/es:
NAGASAWA, HERBERT, T.

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 390 228 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de ribosa-cisteína para tratar la hipoxia mejorando el aporte de glutatión y los niveles de ATP en células.

Antecedentes de la invención

5 Los mecanismos protectores de las células de mamífero frente a factores estresantes exógenos y endógenos que generan radicales libres dañinos, emplean la coenzima antioxidante glutatión (GSH). El GSH es importante en el mantenimiento de la integridad estructural de las membranas celulares y de los orgánulos y en la síntesis de microtúbulos y macromoléculas. Véase, C.D. Klassen y col. Fundamental and Applied Toxicology, 5, 806 (1985). Se ha observado que la estimulación de la síntesis de GSH en las células epiteliales renales de rata y en las células estomacales, protege a las células de los efectos tóxicos de la ciclofosfamida y la serotonina, respectivamente. A la inversa, se ha observado que la inhibición de la síntesis de glutatión y el agotamiento del glutatión tienen los efectos siguientes: (a) disminución de la viabilidad celular, (b) aumento de la sensibilidad de las células frente a los efectos de la radiación, (c) aumento de la sensibilidad de las células tumorales frente a la citólisis con peróxido, (d) disminución de la síntesis de prostaglandina E y leucotrieno C y (e) destrucción selectiva de tripanosomas en ratones.

15 La biosíntesis de glutatión (GSH) implica dos reacciones secuenciales que utilizan ATP y que están catalizadas por las enzimas γ -glutamilcisteína sintetasa y glutatión sintetasa (GSH-sintetasa) que emplean los tres aminoácidos precursores, ácido L-glutámico, L- cisteína y glicina, tal y como se muestra en la Fig. 1.

20 Todos los reactivos a nivel de sustrato se encuentran en concentraciones próximas a la saturación enzimática *in vivo*, con la excepción de L-cisteína, cuya concentración celular es excesivamente baja. Por lo tanto, la primera reacción en la que es necesaria la L-cisteína, es decir, la síntesis de γ -L-glutamyl-L-cisteína, es la etapa limitante de la biosíntesis de glutatión. Por ello, la disponibilidad de L-cisteína intracelular es un factor decisivo en la biosíntesis total de GSH, con suficientes reservas de ATP.

25 En la síntesis de ATP a través de la vía de recuperación de nucleótidos, los precursores de nucleótidos que pueden estar presentes en el tejido se convierten en AMP y posteriormente se fosforilan a ATP. La adenosina se fosforila directamente a AMP, mientras que la xantina y la inosina primero se ribosilan con la 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) y después se convierten en AMP.

30 La ribosa se encuentra en la dieta normal solo en cantidades muy bajas, y se sintetiza en el cuerpo a través de la ruta de la pentosa fosfato. En la ruta sintética de novo, la ribosa se fosforila a PRPP, y se condensa con adenina para formar el compuesto intermedio monofosfato de adenosina (AMP). El AMP se fosforila adicionalmente a través de enlaces de alta energía para formar difosfato de adenosina (ADP) y ATP.

Durante el consumo de energía, el ATP pierde un enlace de alta energía para formar ADP, que se puede hidrolizar a AMP. El AMP y sus metabolitos adenina, inosina e hipoxantina pueden difundir libremente desde la célula muscular y pueden no estar disponibles para la síntesis de nuevo de ATP a través de la ruta de recuperación.

35 La disponibilidad de PRPP parece controlar la actividad tanto de la ruta de recuperación como de la ruta de novo, así como la conversión directa de adenina en ATP. La producción de PRPP a partir de la glucosa a través de la ruta de la pentosa fosfato, parece estar limitada por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). La glucosa a través de enzimas tales como G6PDH, se convierte en ribosa-5-fosfato y posteriormente se fosforila a PRPP, lo que aumenta las rutas de novo y de recuperación, así como la utilización de adenina.

40 Muchos estados producen hipoxia. Tales estados incluyen la isquemia aguda o crónica cuando el flujo de sangre al tejido se reduce debido a una enfermedad de las arterias coronarias o enfermedad vascular periférica en donde la arteria está parcialmente bloqueada por placas ateroscleróticas. En el documento de patente de EE.UU. 4.719.201, se describe que cuando el ATP se hidroliza a AMP en el músculo cardíaco durante la isquemia, el AMP se metaboliza adicionalmente a adenosina, inosina e hipoxantina, que se pierden de la célula después de la perfusión. En ausencia de AMP, la refosforilación a ADP y a ATP no puede tener lugar. Dado que los precursores se eliminaron de la célula por lavado, la vía de recuperación de los nucleótidos no está disponible para reponer los niveles de ATP. Se ha descrito que cuando la ribosa se administra mediante perfusión intravenosa en un corazón que se está recuperando de isquemia, se mejora la recuperación de los niveles de ATP.

50 Una incidencia temporal de la hipoxia tiene lugar en individuos sometidos a intervenciones de anestesia y/o quirúrgicas en las que se interrumpe temporalmente el flujo de sangre a un tejido. La enfermedad vascular periférica se puede mimetizar en claudicación intermitente, en donde un espasmo arterial temporal provoca síntomas similares. Por último, las personas que practican un ejercicio físico intenso o se encuentran en altitudes elevadas, pueden volverse hipóxicas. El documento de Patente de EE.UU. 6.218.366 describe que la tolerancia a la hipoxia se puede aumentar mediante la administración de ribosa antes del evento hipóxico.

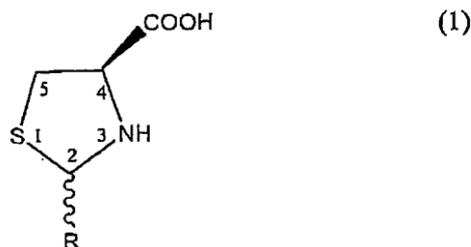
55 La hipoxia o la isquemia también pueden agotar el GSH. Por ejemplo, un ejercicio aeróbico vigoroso también pueden agotar los antioxidantes de los músculos esqueléticos, y a veces también de los otros órganos. El ejercicio aumenta la carga oxidativa del organismo al pedir a los tejidos que generen más energía. Producir más ATP requiere el uso

de más oxígeno, y esto a su vez produce una mayor producción de radicales libres de oxígeno. Estudios en humanos y en animales indican que el GSH se agota por el ejercicio, y que para el deportista habitual, el complemento con precursores de GSH puede ser eficaz para mantener los niveles de rendimiento. Véase L.L. Ji, *Free Rad. Biol. Med.*, **18**, 1079 (1995).

- 5 La lesión tisular, como por quemaduras, isquemia-reperfusión, cirugía, choque séptico o traumatismo también pueden agotar el GSH tisular. Véase, por ejemplo, K. Yagi, *Lipid Peroxides in Biology and Medicine*, Academic Press, Nueva York (1982), páginas 223-242; A. Blaustein y col., *Circulation*, **80**, 1449 (1989). H.B. Demopoulos, *Pathology of Oxygen*, A.P. Autor, compilador, Academic Press, Nueva York (1982) en las páginas 127-128; J. Vina y col., *Brit. J. Nutr.*, **68**, 421 (1992); C.D. Spies y col., *Crit. Care Med.*, **22**, 1738 (1994); B.M. Lomaestro y col., *Annals. Pharmacother.*, **29**, 1263 (1995) y P.M. Kidd, *Alt. Med. Res.*, **2**, 155 (1992).

Se ha planteado la hipótesis de que el aporte de L-cisteína a células de mamífero puede incrementar los niveles de GSH mediante el suministro de este precursor bioquímico de GSH a la célula. Sin embargo, la cisteína misma es neurotóxica cuando se administra a mamíferos, y se degrada rápidamente. En estudios previos, se ha mostrado que N-acetil-L-cisteína, L-2-oxotiazolidin-4-carboxilato, así como 2(R,S)-n-propil-, 2(R,S)-n-pentil- y 2(R,S)-metiltiazolidin-4R-carboxilato pueden proteger a los ratones de dosificaciones hepatotóxicas de paracetamol. Véase, H.T. Nagasawa y col., *J. Med. Chem.*, **27**, 591 (1984) y A. Meister y col., documento de Patente de EE.UU. 4.335.210. L-2-oxotiazolidin-4-carboxilato se convierte en L-cisteína a través de la enzima 5-oxo-L-prolinasa. Como se representa en la Fig. 2, los compuestos de fórmula 1, por ejemplo, en donde R=CH₃, actúan como formas de profármaco de L-cisteína (2), liberando este aminoácido sulfhidrilo mediante apertura del anillo e hidrólisis no enzimática. Sin embargo, la disociación para obtener L-cisteína, libera necesariamente una cantidad equimolar del aldehído (3), RCHO. En los profármacos en los que R es un residuo aromático o un residuo de alquilo, el potencial de efectos tóxicos está presente.

El documento de Patente de EE.UU. 4.868.114 describe un método que comprende la estimulación de la biosíntesis de glutatión en células de mamíferos, poniendo en contacto las células con una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (1):



en la que R es un (CHOH)_nCH₂OH y en donde n es 1-5. El compuesto en el que n es 3 es ácido 2(R,S)-D-ribo-(1',2',3',4'-tetrahidroxibutil)tiazolidin-4(R)-carboxílico (Ribosa-Cisteína, RibCys). Después de la administración *in vivo*, RibCys libera cisteína mediante hidrólisis no enzimática. RibCys ha mostrado ser eficaz para proteger contra la toxicidad hepática y renal inducida con paracetamol. A.M. Lucus, *Toxicol. Pathol.*, **28**, 697 (2000). RibCys también puede proteger el intestino grueso y delgado contra la lesión por radiación. Véase, M.P. Carroll y col., *Dis. Colon Rectum*, **38**, 716 (1995). Estos efectos protectores se cree que son debidos a la estimulación de la biosíntesis de GSH, que incrementa el GSH intracelular. Sin embargo, existe una necesidad de métodos para restaurar o mantener depósitos intracelulares de GSH en los tejidos de mamíferos sometidos a estados de hipoxia, en donde las reservas de ATP necesarias para impulsar la biosíntesis de GSH y sus precursores están agotadas.

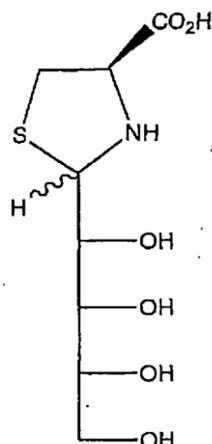
El documento de patente europea EP-A-0257992 describe agentes profilácticos y terapéuticos contra la isquemia cerebral.

J.C. Roberts y col., *J. Med. Chem.*, **30**, 1891 (1987) describen profármacos de L-cisteína como agentes protectores contra la hepatotoxicidad inducida por paracetamol, ácido 2-(polihidroalquil)tiazolidin-4(R)-carboxílico y ácido 2-(poliacetoxialquil)tiazolidin-4(R)-carboxílico.

Sumario de la invención

Los aspectos de la presente invención se establecen en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula I(a)



(RibCys) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para preparar un medicamento para tratar un mamífero, tal como un ser humano, amenazado o aquejado de un estado hipóxico (hipoxia).

5 La presente invención también proporciona un compuesto de fórmula I(a) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso como medicamento para tratar un mamífero, tal como un ser humano, amenazado o aquejado de un estado hipóxico (hipoxia).

Aunque unos niveles bajos de glutatión han sido implicados en una variedad de estados hipóxicos, tal y como se ha descrito anteriormente, el uso de RibCys o sus sales para prevenir, contrarrestar o tratar de otro modo esos estados no se ha descrito. Se cree que simplemente la administración de un precursor de GSH, tal como cisteína, no será tan eficaz en muchos casos de hipoxia, cuando el agotamiento de las reservas de ATP contribuye a la inhibición de la biosíntesis de GSH. La administración de cantidades eficaces de RibCys, además de funcionar como un profármaco para la cisteína, puede aportar cantidades de ribosa a tejidos con el ATP agotado, lo que estimula la síntesis *in vivo* de ATP y lo que también puede estimular la síntesis de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, reducida). Esta coenzima suministra los electrones a la reductasa de glutatión, que a su vez recicla el GSH oxidado a través de GSSG, formando GSH libre, que reanuda su función protectora como un cofactor para enzimas antioxidantes en la célula. Opcionalmente, el compuesto (Ia) se puede administrar con una cantidad adicional de ribosa libre. Opcionalmente, un medicamento que contiene el compuesto I(a) puede contener una cantidad adicional de ribosa libre. Preferiblemente, la administración será una administración oral, particularmente en situaciones profilácticas o de carga previa, pero la administración parenteral, tal como por inyección o infusión, puede ser necesaria en algunas situaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa la síntesis metabólica de glutatión (GSH) a partir de ácido L-glutámico.

La Figura 2 representa la disociación *in vivo* de un compuesto de fórmula I para producir cisteína y un aldehído.

Descripción detallada de la invención

25 Tal y como se usa en la presente memoria, el término RibCys se refiere a ácido 2(R,S)-D-ribo-(1',2',3',4'-tetrahidroxibutil)tiiazolidin-4(R)-carboxílico, así como a los enantiómeros 2R o 2S de (Ia), y a sus sales farmacéuticamente aceptables. Tales sales incluyen sales de metales alcalinos del resto de ácido carboxílico, así como sales de adición de ácido estables del resto NH, incluyendo sales de ácidos tanto inorgánicos como orgánicos, tales como citrato, malato, gluconato, glutamato, hidrocloreuro, hidrosulfato y similares.

30 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "hipoxia" o "estado hipóxico" significa un estado en el cual el oxígeno en uno o varios tejidos de un mamífero, disminuye por debajo de los niveles fisiológicos, por ejemplo, hasta un nivel inferior al óptimo. La hipoxia también incluye estados en los que los niveles de oxígeno disminuyen en los tejidos debido al estrés, tales como anestesia, cirugía, anemia, síndrome de dificultad respiratoria aguda, enfermedad crónica, síndrome de fatiga crónica, traumatismo, quemaduras, úlceras de la piel, caquexia debido al cáncer y otros estados catabólicos y similares. La hipoxia también incluye "isquemia" o "estados de isquemia" en los que los tejidos son privados de oxígeno debido a una reducción en el flujo sanguíneo, como a causa de una constricción o la obstrucción de un vaso sanguíneo. La isquemia y/o los estados isquémicos incluyen los causados por enfermedad de las arterias coronarias, cardiomiopatía, que incluye cardiomiopatía alcohólica, angioplastia, colocación de una endoprótesis vascular, cirugía cardíaca, tal como cirugía de derivación o cirugía de corrección de defectos cardíacos ("cirugía a corazón abierto"), trasplante de órganos, presión prolongada por peso sobre tejidos (úlceras por presión o úlceras por decúbito), lesión por isquemia-reperusión que puede causar daños en órganos o tejidos trasplantados y similares. La presente invención es eficaz para el tratamiento del agotamiento de GSH y de ATP debido a la hipoxia y, por lo tanto, para aumentar el nivel de energía, la fuerza y el bienestar de una persona, a

pesar de que la causa subyacente del estado hipóxico, tal como una infección vírica o bacteriana, la exposición a bacterias u otras toxinas, un bajo recuento de glóbulos rojos, el envejecimiento, el cáncer o el ejercicio continuado, no se vea afectado.

5 El término "tratar" o "tratamiento", tal y como se utiliza en esta memoria, incluye los efectos de la administración de RibCys a pacientes sanos y afectados por una enfermedad crónica o aguda, e incluye la inducción de efectos protectores, así como la disminución de al menos un síntoma de un estado hipóxico pasado o en curso.

10 Las dosis eficaces de RibCys variarán dependiendo del estado, la edad y el peso del paciente a tratar, el estado que se va a tratar y el modo de administración. Se ha encontrado que tanto la cisteína, liberada *in vivo* desde RibCys en modelos animales, como la ribosa, administrada directamente a seres humanos, son esencialmente no tóxicas en amplios intervalos de dosificación. Por ejemplo, se ha descrito que la ribosa incrementa la capacidad de ejercicio en seres humanos sanos cuando se toma por vía oral en dosificaciones de 8-10 g por día en un adulto. Véase, el documento de Patente de EE.UU. 6.534.480. RibCys administrada a ratones a 8 mmol/kg i.p., aumentaba los niveles de glutatión en numerosos órganos, incluyendo el corazón (1,5x) y el tejido muscular (2,5x). Véase, J.C. Roberts, Toxicol. Lett., **59**, 245 (1991). Asimismo, se ha observado que RibCys a 8 mmol/kg aporta cantidades protectoras eficaces de cisteína a ratones expuestos a ciclofosfamida. Esta dosis puede aportar aproximadamente 70-80 g de ribosa y aproximadamente 60-70 g de cisteína a un ser humano adulto. Véase, J.C. Roberts, Anticancer Res., **14**, 383 (1994). A.M. Lucas y col., Toxicol. Pathol., **20**, 697 (2000) han descrito que dosis de 2 g/kg de RibCys protegen a los ratones contra una toxicidad hepática y renal por paracetamol. Se ha descrito que las dosis de 1 g/kg de RibCys protegen a los ratones contra una lesión intestinal inducida por radiación (véase, J.K. Rowe y col., Dis. Colon Rectum, **36**, 681 (1993)). J.E. Fuher (documento de Patente de EE.UU. 4.719.201) informaba de que dosis de ribosa de aproximadamente 3 g/día durante al menos 5 días, restablecían y mantenían eficazmente los niveles de ATP en perros sometidos a isquemia (modelo de ataque cardíaco), las dosis aportaban aproximadamente 550-700 mg/kg de ribosa a un perro de 30 kg.

25 En la práctica clínica, estos compuestos, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se pueden administrar en la forma de una dosificación unitaria farmacéutica que comprende el ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, que puede ser un diluyente sólido, semisólido o líquido. Una dosificación unitaria del compuesto también se puede administrar sin un material de soporte. Ejemplos de preparaciones farmacéuticas incluyen, pero no están limitadas a las mismas, comprimidos, polvos, cápsulas, soluciones acuosas, suspensiones que incluyen concentrados, liposomas y otras formulaciones de liberación lenta, así como las formas de administración transdérmica. Típicamente, la forma de dosificación unitaria comprende aproximadamente 0,001-99% de la sustancia activa.

35 Los compuestos se pueden entregar por cualquier medio adecuado, por ejemplo, por vía tópica, oral, parenteral. Preferiblemente, la forma de entrega es un líquido o un sólido tal como un polvo que se puede agitar en un líquido ingerible. Se pueden utilizar vehículos farmacéuticos convencionales para composiciones tópicas, orales o parenterales, muchas de las cuales se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa.

40 Por ejemplo, para la administración oral, los vehículos o diluyentes farmacéuticos adecuados pueden incluir manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, talco, glucosa y carbonato de magnesio. Las composiciones orales pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones, formulaciones de liberación sostenida y similares. Un comprimido o una cápsula típica puede contener 40-99% de lactosa, 1-2% de estearato de magnesio y 10-20% de almidón de maíz, junto con la sustancia activa (preferiblemente aproximadamente 0,001-20%). Una solución acuosa puede contener hasta el nivel de saturación de RibCys o su sal, preferiblemente con una cantidad añadida de ribosa que es eficaz para prevenir o inhibir una disociación prematura *in vitro*.

45 Para la administración parenteral, los vehículos farmacéuticos adecuados pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, solución de Hank, solución de Ringer, glicerol y similares. Las composiciones parenterales pueden estar en forma de suspensiones, soluciones, emulsiones y similares. La administración parenteral es generalmente mediante inyección o infusión que puede ser subcutánea, intramuscular o intravenosa.

Ejemplo 1

Ácido 2(R,S)-D-ribo-1',2',3',4'-tetrahidroxibutiltiazolidin-4(R)-carboxílico (RibCys)

50 Este compuesto se sintetizó utilizando ribosa (Rib) como describen R. Bogner y col., Z. Liebigs Ann. Chem., **738**, 68 (1970). El producto se recogió para proporcionar 4,71 g (92,2% de rendimiento) de material de color amarillo pálido, p.f. 149°-151°C. dec $[\alpha]_D^{25}$ -103,1° (c = 0,52, H₂O); IR (KBr) ν 3220 (br, OH, COO⁻), 1610 cm⁻¹ (COO⁻).

Ejemplo 2

55 **Estimulación de la biosíntesis de glutatión en hepatocitos aislados de rata mediante profármacos de L-cisteína e inhibición mediante butionina sulfoximina (BSO)**

Se aislaron hepatocitos de rata siguiendo los métodos de P.O. Seglen, Exper. Cell Res., **74**, 450 (1972). Después de

la última extensión en placas, los hepatocitos se mantuvieron en cultivo durante 24 h antes de su uso. En todos los estudios solo se emplearon cultivos primarios. Los hepatocitos se incubaron con profármacos de cisteína NAC y (Ia) durante un período de 4 h, y después de eliminar el medio por aspiración, las células se lavaron con solución salina fría tamponada con fosfato y se desproteinizaron con 5% de ácido sulfosalicílico. El contenido total en GSH (GSH + GSSG) se determinó mediante una modificación del método de reciclado de DTNB [5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico)] glutatión reductasa de F. Tietze, *Anal. Biochem.*, **27**, 502 (1969). La concentración de GSH en la muestra se cuantificó mediante la determinación de la tasa de ciclación (Δ DO a 412 nm/min) de la muestra. Para los estudios de inhibición con BSO, las células se expusieron previamente a BSO (0,20 mM) antes del tratamiento con los profármacos de L-cisteína.

10 Los resultados se muestran en la Tabla 1, a continuación:

TABLA 1

Contenido incrementado en glutatión [GSH] de hepatocitos de rata después de incubar con profármacos de L-cisteína			
Profármaco de cisteína	Conc. (mM)	[GSH] \pm SE (nmol/10 ⁶ células)	Rel. de [GSH] frente a los testigos
Ninguno (Testigo)	-	35,4 \pm 0,75	1
RibCys (Ia)	1,0	61,2 \pm 1,52	1,7
N-acetil-L-cisteína (NAC)	2,5	45,8 \pm 1,27	1,3

15 Tal y como se puede observar en la Tabla 1, RibCys incrementaba los niveles de GSH aproximadamente 1,7 veces en relación a los testigos en estos hepatocitos. N-acetil-L-cisteína (NAC), el fármaco usado actualmente para el tratamiento clínico por sobredosis de paracetamol, también aumentó los niveles de GSH en un 30% en este sistema, pero requiere 2,5 veces más concentración de profármacos de tiazolidina para un aumento comparable. (Véase, L.F. Prescott y col., *Brit. Med. J.*, **2**, 1097 (1979); B.J. Lautenburg y col., *J. Clin. Invest.*, **71**, 980 (1983) y G.B. Corcoran y col., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **232**, 864 (1985)).

20 El que la biosíntesis de GSH estuviera estimulada por la liberación de su precursor bioquímico, L-cisteína, a partir de los profármacos, se indicaba mediante experimentos llevados a cabo en presencia de butionina sulfoxima 0,20 mM (BSO). O.W. Griffith y col., *J. Biol. Chem.*, **254**, 7558 (1979), han demostrado que BSO es un inhibidor específico de la sintetasa de gamma-glutamil cisteína, la enzima responsable de catalizar la primera etapa en la biosíntesis de GSH. Los datos resumidos en la Tabla 2, más adelante, demuestran que los niveles de GSH se redujeron con este inhibidor, incluso en presencia de RibCys, proporcionando así la evidencia de que los niveles elevados de GSH observados, eran debidos en efecto a la biosíntesis de nuevo de GSH a partir de la L-cisteína proporcionada por los profármacos de tiazolidina.

TABLA 2

Efecto inhibitor de la butionina sulfoxima (BSO) sobre el aumento de GSH producido por los profármacos de L-cisteína en hepatocitos de rata			
Profármaco (1,0 mM)	BSO (0,2 mM)	[GSH] \pm SE (nmol/10 ⁶ células)	Rel. de [GSH] frente a los testigos
Ninguno (Testigo)	-	35,4 \pm 0,78	1,0
Ninguno	+	18,4 \pm 2,08	0,5
RibCys (Ia)	+	16,2 \pm 3,60	0,5
N-acetil-L-cisteína	+	25,5 \pm 1,59	0,7

Ejemplo 3

30 RibCys incrementa el GSH en el corazón y en el tejido muscular

35 Tal y como informaron J.C. Roberts y col., *Toxicol. Lett.*, **59**, 245 (1991), RibCys incrementó con éxito los niveles de glutatión (GSH) en numerosos órganos portadores de tumores, en ratones CDF1. El contenido en GSH se sometió a ensayo 1, 2, 4, 8 y 16 h después de la administración de RibCys (8 mmol/kg, i.p.); diversos órganos alcanzaron un contenido máximo en GSH en diferentes intervalos de tiempo. El GSH en el hígado aumentó 1,5 veces en comparación con testigos no tratados, después de 16 h. El GSH renal también era máximo a las 16 h y obtuvo valores 1,6 veces superiores a los del testigo. El GSH muscular obtuvo niveles 2,5 veces superiores a los de los animales testigos, mientras que el de la vejiga aumentó 2,1 veces, y el del corazón 1,8 veces. Otros tejidos sometidos a ensayo (bazo, páncreas, pulmón) mostraban un incremento de 1,1 a 1,2 veces en contenido de GSH. El GSH en tumores L1210 implantados también aumentó solo 1,2 veces.

40

Ejemplo 4**Recuperación del corazón canino funcional después de una isquemia miocárdica global**

5 Tal y como se informó en los Ejemplos 1-2 de J.E. Foker (documento de Patente de EE.UU. 4.605.644), soluciones diluidas de ribosa en solución salina normal (0,9%) se han encontrado eficaces para disminuir el tiempo de recuperación del ATP, después de una isquemia de miocardio, en el modelo canino. Por ejemplo, la infusión de solución salina normal, que tiene 80 mM de ribosa con una tasa de aproximadamente 1 ml/min, durante aproximadamente 24,0 horas, proporcionó un tiempo de recuperación de ATP ocho veces menor. Durante este período de tratamiento, aproximadamente 17,0 g de ribosa se introdujeron en el sistema circulatorio; una dosis total de aproximadamente 550-700 mg de ribosa/kg de peso corporal. La dosis apropiada para la recuperación óptima de los niveles de ATP y la función cardíaca en un ser humano dado, se puede establecer fácilmente a través de estudios empíricos que incluyen ensayos conocidos para los niveles de ATP, la función cardíaca y similares.

15 Aunque los estudios de los ejemplos del documento de Patente de EE.UU. 4.605.644 se dirigen a mejorar la recuperación de energía después de una isquemia del corazón, con soluciones que contienen ribosa libre, el presente método que emplea el profármaco de cisteína/ribosa RibCys, también se espera que sea aplicable a cualquier órgano o tejido que haya sufrido hipoxia, tal como una lesión isquémica, en donde sería útil el aumento de antioxidante y la recuperación de ATP. Estas situaciones incluyen pero no se limitan a: infarto de miocardio, ictus, trasplante de órgano con conservación del órgano, apoyo neonatal, insuficiencias multiorgánicas, choque y traumatismo dando como resultado una circulación deteriorada, y similares. Frecuentemente, incluso una anestesia general sin complicaciones puede causar cierto grado de hipoxia y la intervención médica invasiva acompañante puede conducir a una acumulación de radicales libres en el tejido traumatizado. Del mismo modo, el ejercicio aeróbico en personas convalecientes o saludables puede conducir al agotamiento del ATP y a la acumulación de radicales libres a partir de oxidantes ambientales. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método por el cual se puede tratar un tejido hipóxico con el fin de recuperar rápidamente y mantener los niveles normales de ATP, tanto para mejorar la supervivencia del tejido como para acelerar la recuperación corporal general.

25 Aunque en la memoria descriptiva anterior se ha descrito esta invención en relación con ciertas realizaciones preferidas de la misma, y muchos detalles se han expuesto con fines ilustrativos, será evidente para los expertos en la técnica que la invención es susceptible de realizaciones adicionales y que algunos de los detalles descritos en este documento pueden variar considerablemente sin apartarse de los principios básicos de la invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de ácido 2(R,S)-D-ribo-(1',2',3',4'-tetrahidroxibutil)tiiazolidin-4(R)-carboxílico (RibCys) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para preparar un medicamento eficaz para el mantenimiento, restauración o aumento tanto de los niveles de ATP como de los niveles de glutatión para tratar la hipoxia en un mamífero amenazado o aquejado de un estado hipóxico.
2. Ácido 2(R,S)-D-ribo-(1',2',3',4'-tetrahidroxibutil)tiiazolidin-4(R)-carboxílico (RibCys) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso como un medicamento para el mantenimiento, restauración o aumento tanto de los niveles de ATP como de los niveles de glutatión para tratar la hipoxia en un mamífero amenazado o aquejado de un estado hipóxico.
- 10 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, o la RibCys para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la hipoxia es debida a una lesión isquémica.
4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, o la RibCys para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la lesión isquémica se produce durante una cirugía cardiaca, trasplante de órganos, angioplastia o colocación de una endoprótesis vascular.
- 15 5. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, o la RibCys para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la lesión isquémica es debida a una enfermedad vascular, cardiomiopatía, aturdimiento miocárdico, enfermedad vascular periférica, claudicación intermitente, taquicardia o isquemia-reperusión.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, o la RibCys para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la hipoxia es debida a anestesia, úlceras por presión, septicemia, ictus, intervención quirúrgica, quemadura, disfunción pulmonar o enfermedad crónica.
- 20 7. Uso de una cantidad de ácido 2(R,S)-D-ribo-(1',2',3',4'-tetrahidroxibutil)tiiazolidin-4(R)-carboxílico (RibCys) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para preparar un medicamento eficaz para el mantenimiento, restauración o aumento tanto de los niveles de ATP como de los niveles de glutatión (GSH) en un tejido de un mamífero aquejado de hipoxia.
- 25 8. Ácido 2(R,S)-D-ribo-(1',2',3',4'-tetrahidroxibutil)tiiazolidin-4(R)-carboxílico (RibCys) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso como un medicamento para el mantenimiento, restauración o aumento tanto de los niveles de ATP como de los niveles de glutatión (GSH) en un tejido de un mamífero aquejado de hipoxia.
- 30 9. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, o la RibCys para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el mamífero es un ser humano.
10. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 7 o 9, o la RibCys para uso de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, en donde la RibCys se administra oralmente.
11. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 7 o 9, o la RibCys para uso de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, en donde la RibCys se administra parenteralmente.
- 35 12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, o la RibCys para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la RibCys se administra por vía intravenosa o intraperitoneal.
13. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 7 o 9, o la RibCys para uso de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, en donde el mamífero estaba, está o estará sometido a una lesión isquémica.
- 40 14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, o la RibCys para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el tejido es tejido cardiovascular.
15. Uso de acuerdo con la reivindicación 14, o la RibCys para uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el tejido es tejido miocárdico.
16. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, o la RibCys para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicha lesión isquémica se produce durante una cirugía cardiaca, trasplante de órgano, angioplastia o colocación de una endoprótesis vascular.
- 45 17. Uso de acuerdo con la reivindicación 16, o la RibCys para uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la solución de RibCys se infunde directamente en una cámara del corazón o se infunde por vía intravenosa.
18. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, o la RibCys para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la isquemia es debida a enfermedad cardiovascular, cardiopatía, aturdimiento miocárdico, enfermedad vascular periférica, claudicación intermitente, taquicardia o isquemia-reperusión.
- 50

19. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 7 o 9, o la RibCys para uso de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, en donde la hipoxia es debida a anestesia, úlceras por presión, septicemia, ictus, intervención quirúrgica, quemadura, disfunción pulmonar o enfermedad crónica.
- 5 20. Uso de acuerdo con la reivindicación 19, o la RibCys para uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde las úlceras por presión son úlceras por decúbito.
21. Uso de acuerdo con la reivindicación 19, o la RibCys para uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la enfermedad crónica es debida a una infección vírica.
22. Uso de acuerdo con la reivindicación 21, o la RibCys para uso de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la infección vírica se debe a HCMV, VIH o VEB.
- 10 23. Uso de acuerdo con la reivindicación 19, o la RibCys para uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la enfermedad crónica es debida a una infección bacteriana.
24. Uso de acuerdo con la reivindicación 19, o la RibCys para uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la enfermedad crónica es cáncer.
- 15 25. Uso de ácido 2(R,S)-D-ribo-(1',2',3',4'-tetrahidroxibutil)tiazolidin-4(R)-carboxílico (RibCys) para preparar un medicamento en una cantidad eficaz para incrementar la tolerancia de un mamífero a la hipoxia de modo que la ribosa y la cisteína se incrementan en el tejido del mamífero durante el evento hipóxico.
26. Ácido 2(R,S)-D-ribo-(1',2',3',4'-tetrahidroxibutil)tiazolidin-4(R)-carboxílico (RibCys) para uso como un medicamento para incrementar la tolerancia de un mamífero a la hipoxia de modo que la ribosa y la cisteína se incrementan en un tejido de un mamífero durante el evento hipóxico.
- 20 27. Uso de acuerdo con la reivindicación 25, o la RibCys para uso de acuerdo con la reivindicación 26, en donde el mamífero es un ser humano.
28. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 7, 9, 25 o 27, o la RibCys para uso de acuerdo con las reivindicaciones 8, 9, 26 o 27, en donde la RibCys se administra en una dosificación de aproximadamente 10 a 150 gramos.
- 25 29. Uso de acuerdo con la reivindicación 25, o la RibCys para uso de acuerdo con la reivindicación 26, en donde la RibCys o una sal de la misma se administra al menos cinco minutos antes de que tenga lugar el evento hipóxico.
- 30 30. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 7, 9, 25 o 27, o la RibCys para uso de acuerdo con las reivindicaciones 8, 9, 26 o 27, en donde la RibCys o una sal de la misma se administra en un vehículo líquido que comprende una cantidad de ribosa libre eficaz para inhibir *in vitro* la disociación de RibCys antes de la administración.

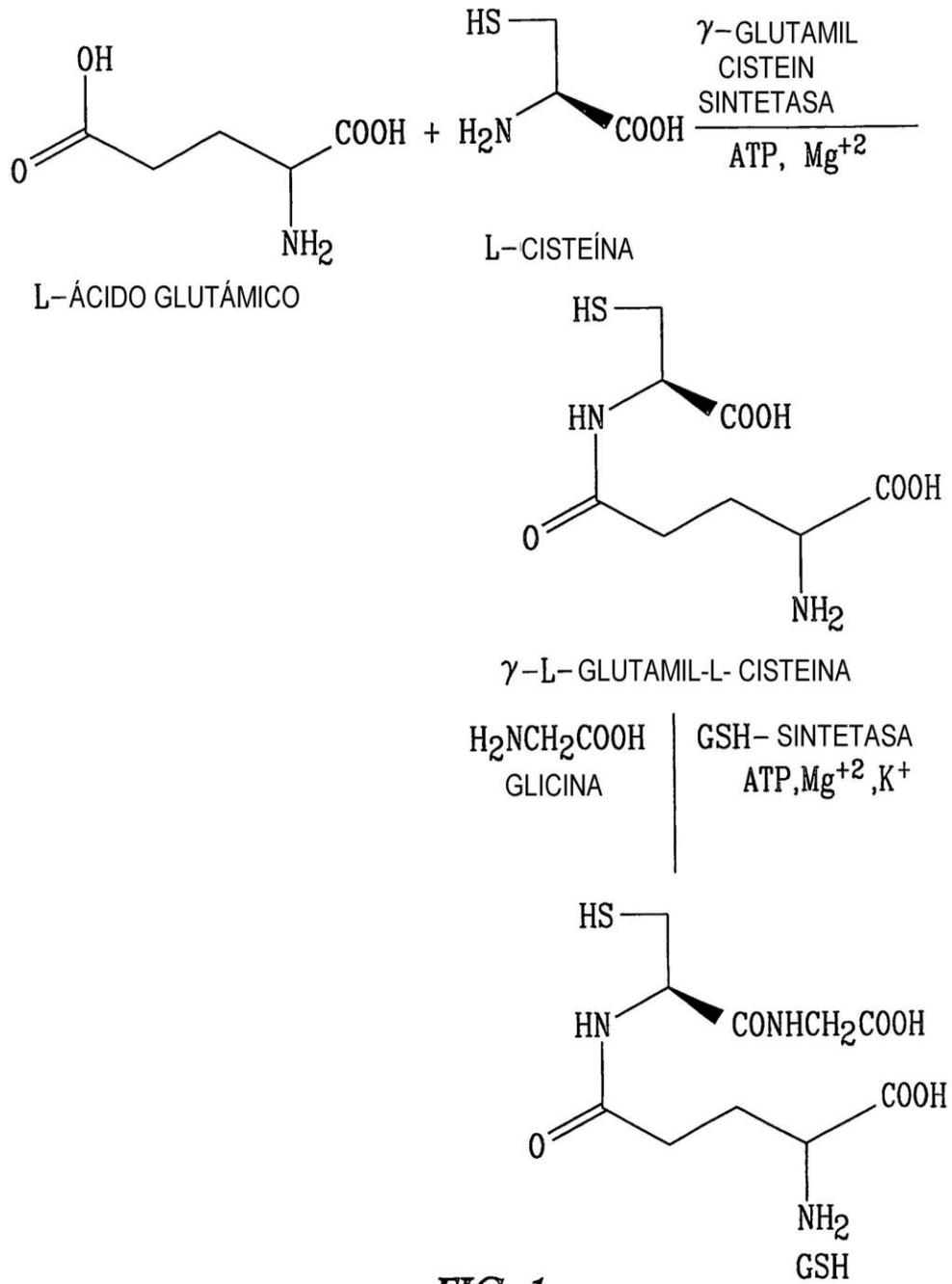


FIG. 1

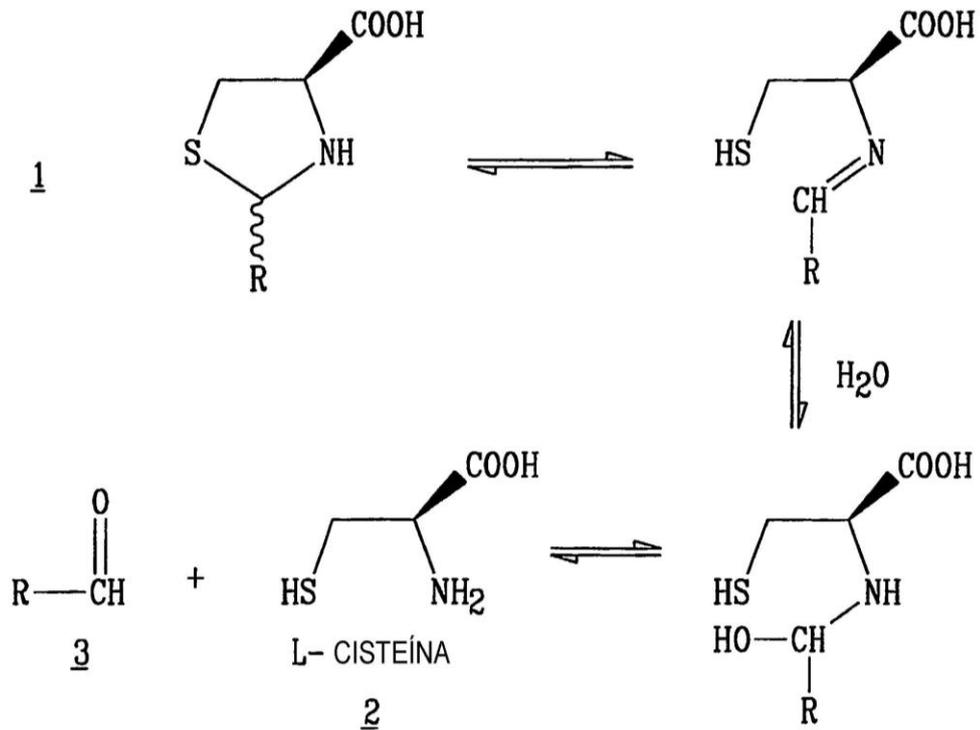


FIG. 2