

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 065**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7068 (2006.01)

A61K 31/7072 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99968207 .3**

96 Fecha de presentación: **31.08.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1109453**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2001**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para el tratamiento de enfermedades mitocondriales**

30 Prioridad:

31.08.1998 US 144096

45 Fecha de publicación de la mención BOP:

18.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

18.12.2012

73 Titular/es:

**WELLSTAT THERAPEUTICS CORPORATION
(100.0%)
930 CLOPPER ROAD
GAITHERSBURG, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

VON BORSTEL, REID W.

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 393 065 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

Composiciones y procedimientos para el tratamiento de enfermedades mitocondriales.

5 **Campo de la invención**

10 **[0001]** Esta invención se refiere en general a compuestos útiles para el tratamiento y la prevención de enfermedades, retardos de desarrollo y síntomas relacionados con la disfunción mitocondrial. Se administran precursores de nucleótidos pirimidínicos a un mamífero, incluyendo un ser humano, con el fin de compensar la disfunción mitocondrial y para mejorar las funciones mitocondriales.

Antecedentes de la invención

15 **[0002]** Las mitocondrias son orgánulos celulares presentes en la mayoría de células eucarióticas. Una de sus funciones primarias es la fosforilación oxidativa, un proceso mediante el cual se convierte la energía derivada del metabolismo de combustibles como glucosa o ácidos grasos en ATP, que se usa entonces para impulsar diversas reacciones biosintéticas que requieren energía y otras actividades metabólicas. Las mitocondrias tienen sus propios genomas, separados del ADN nuclear, que comprenden anillos de ADN con aproximadamente 16.000 pares de bases en células humanas. Cada mitocondria puede tener múltiples copias de su genoma, y las células individuales pueden tener cientos de mitocondrias.

25 **[0003]** La disfunción mitocondrial contribuye a diversos estados patológicos. Algunas enfermedades mitocondriales son debidas a mutaciones o deleciones en el genoma mitocondrial. Las mitocondrias se dividen y proliferan con una tasa de recambio más rápida que sus células hospedadoras, y su replicación está bajo el control del genoma nuclear. Si una proporción umbral de mitocondrias en una célula son defectivas, y si una proporción umbral de dichas células en un tejido tienen mitocondrias defectivas, pueden dar como resultado síntomas de disfunción del tejido u órgano. Prácticamente puede verse afectado cualquier tejido, y pueden estar presentes una gran variedad de síntomas, dependiendo de la extensión en que estén implicados diferentes tejidos.

30 **[0004]** Un óvulo fertilizado podría contener tanto mitocondrias normales como genéticamente defectivas. La segregación de mitocondrias defectivas en diferentes tejidos durante la división de este óvulo es un proceso estocástico, como lo será la relación de mitocondrias defectivas a normales en un tejido o célula dado (aunque puede haber una selección positiva o negativa de genomas mitocondriales defectivos durante el recambio mitocondrial en las células). Por tanto, pueden surgir una variedad de diferentes fenotipos patológicos a partir de una mutación puntual particular en el ADN mitocondrial. A la inversa, pueden surgir fenotipos similares de mutaciones o deleciones que afecten a diferentes genes en el ADN mitocondrial. Los síntomas clínicos en enfermedades mitocondriales congénitas se manifiestan a menudo en tejidos postmitóticos con alta demanda de energía como cerebro, músculo, nervio óptico y miocardio, pero están también implicados otros tejidos, incluyendo glándulas endocrinas, hígado, tracto gastrointestinal, riñón y tejido hematopoyético, dependiendo de nuevo en parte de la segregación de las mitocondrias durante el desarrollo, y de la dinámica del recambio mitocondrial a lo largo del tiempo.

45 **[0005]** Además de trastornos congénitos que implican mitocondrias defectivas heredadas, la disfunción mitocondrial adquirida contribuye a enfermedades, particularmente trastornos neurodegenerativos asociados al envejecimiento como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington. La incidencia de mutaciones somáticas en el ADN mitocondrial se eleva exponencialmente con la edad; la reducción de actividad de la cadena respiratoria se encuentra universalmente en la gente de edad. La disfunción mitocondrial está también implicada en la lesión neuronal excitotóxica, tal como la asociada a convulsiones o isquemia.

50 **[0006]** El tratamiento de enfermedades que implican disfunción mitocondrial ha implicado hasta ahora la administración de vitaminas y cofactores usados por elementos particulares de la cadena respiratoria mitocondrial. Se usan coenzima Q (ubiquinona), nicotinamida, riboflavina, carnitina, biotina y ácido lipoico en pacientes con enfermedad mitocondrial con beneficios ocasionales, especialmente en trastornos procedentes directamente de deficiencias primarias de uno de estos cofactores. Sin embargo, aunque útiles en casos aislados, ninguno de dichos cofactores metabólicos o vitaminas ha mostrado tener una utilidad general en la práctica clínica para el tratamiento de enfermedades mitocondriales. De forma similar, el ácido dicloroacético (ADC) se ha usado para tratar citopatías mitocondriales tales como MELAS; el ADC inhibe la formación de lactato y es útil principalmente en casos de enfermedades mitocondriales en que la misma excesiva acumulación de lactato contribuye a los síntomas. Sin embargo, el ADC no trata los síntomas relacionados con la insuficiencia mitocondrial en sí, y puede ser tóxico para algunos pacientes, dependiendo de los defectos moleculares subyacentes.

65 **[0007]** Las enfermedades mitocondriales comprenden trastornos causados por una enorme variedad de lesiones o defectos, con la expresión fenotípica de la enfermedad complicada adicionalmente por las distribuciones estocásticas de las mitocondrias defectivas en diferentes tejidos.

[0008] La patente de EE.UU. nº 5.583.117 de propiedad común con la presente da a conocer derivados

acetilados de citidina y uridina. La solicitud PCT/US 96/10067 de propiedad común con la presente da a conocer el uso de nucleósidos de pirimidina acilados para reducir la toxicidad de productos quimioterapéuticos y análogos de nucleósidos de pirimidina antivíricos.

5 Objetos de la invención

[0009] Es un objeto de la invención proporcionar composiciones útiles para tratar trastornos o consecuencias fisiopatológicas asociadas a la disfunción mitocondrial o a la disfunción mitocondrial de la cadena respiratoria mitocondrial en un mamífero, incluyendo un ser humano.

[0010] Es un objeto de la invención proporcionar compuestos y composiciones que mejoren la resistencia del tejido a disfunción mitocondrial *in vivo*.

[0011] Es un objeto de la invención proporcionar composiciones útiles para el tratamiento de enfermedades mitocondriales.

[0012] Es un objeto de la invención proporcionar agentes que compensen ampliamente los defectos mitocondriales implicados en una amplia variedad de patologías moleculares puesto que, en muchos casos, es difícil un diagnóstico preciso de las lesiones moleculares en trastornos mitocondriales.

[0013] Es un objeto de la invención proporcionar compuestos para uso en el tratamiento de enfermedades mitocondriales que sean beneficiosos en el caso de déficit de cadena de transporte electrónico mitocondrial independientemente de los defectos moleculares específicos.

25 Resumen de la invención

[0014] La invención en cuestión proporciona compuestos para uso en un procedimiento para tratar las consecuencias fisiopatológicas de una deficiencia en la cadena respiratoria mitocondrial en un mamífero, que comprende administrar a dicho mamífero necesitado de dicho tratamiento una cantidad de un precursor de nucleótido pirimidínico eficaz para reducir las consecuencias fisiopatológicas. Adicionalmente, la invención proporciona compuestos para uso en un procedimiento de prevención de las consecuencias fisiopatológicas de una deficiencia en la cadena respiratoria mitocondrial, que comprende administrar a un mamífero una cantidad de un precursor de nucleótido pirimidínico eficaz para prevenir las consecuencias fisiopatológicas.

[0015] En las enfermedades mitocondriales, los compuestos y composiciones de la invención son útiles para atenuar las secuelas clínicas procedentes de deficiencias en la cadena respiratoria. Las deficiencias en la cadena respiratoria subyacentes de la enfermedad mitocondrial están causadas por diversos factores, incluyendo mutaciones y deleciones congénitas o heredadas en ADN mitocondrial, déficit de proteínas codificadas nuclearmente que afecten a la actividad de la cadena respiratoria, así como mutaciones somáticas, calcio intracelular elevado, excitotoxicidad, óxido nítrico, hipoxia y defectos de transporte axónico.

[0016] La invención en cuestión proporciona compuestos y composiciones para uso en procedimientos para prevenir o reducir la muerte y disfunción de células postmitóticas portadoras de déficit de la cadena respiratoria mitocondrial.

[0017] La invención en cuestión proporciona además compuestos y composiciones para uso en procedimientos para el tratamiento de retardos del desarrollo del lenguaje, motor, de la función ejecutiva, cognitivo y de las habilidades sociales neuropsicológicas.

[0018] La invención en cuestión se refiere también al tratamiento de trastornos y afecciones que se dan a conocer en la presente memoria como afecciones en que contribuyen los defectos mitocondriales y que por lo tanto se someten a tratamiento con los compuestos y composiciones de la invención. Estos incluyen efectos secundarios de la quimioterapia del cáncer como neuropatías periféricas, neuropatías, fatiga y menopausia prematura, así como anomalías ovulatorias y la menopausia normal misma.

[0019] La invención, así como otros objetos, rasgos y ventajas de la misma, se entenderán más clara y completamente a partir de la siguiente descripción detallada, cuando se lea con referencia a los resultados adjuntos de los experimentos discutidos en los ejemplos siguientes.

60 Descripción detallada de la invención

[0020] La invención en cuestión está relacionada con compuestos y composiciones para uso en procedimientos para tratar o prevenir una variedad de trastornos clínicos derivados de la disfunción mitocondrial, especialmente déficit en la actividad de los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial. Dichos trastornos incluyen citopatías mitocondriales congénitas, retardos del desarrollo y disfunciones de la cadena respiratoria causadas por la administración de quimioterapia de cáncer citotóxica.

A. Definiciones

[0021] "Enfermedad mitocondrial" designa trastornos en que los déficit de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial contribuyen al desarrollo de la fisiopatología de dichos trastornos en un mamífero. Esta categoría incluye 1) deficiencias genéticas congénitas de la actividad de uno o más componentes de la cadena respiratoria mitocondrial; 2) deficiencias adquiridas de la actividad de uno o más componentes de la cadena respiratoria mitocondrial, en las que dichas deficiencias están causadas, entre otros, por a) daño oxidativo durante el envejecimiento; b) calcio intracelular elevado; c) exposición de las células afectadas a óxido nítrico; d) hipoxia o isquemia; e) déficit de transporte axónico de mitocondrias asociados a microtúbulos o f) expresión de proteínas desacoplantes mitocondriales.

[0022] La cadena respiratoria mitocondrial (también conocida como cadena de transporte electrónico) comprende 5 complejos principales:

Complejo I	NADH:ubiquinona reductasa
Complejo II	succinato:ubiquinona reductasa
Complejo III	ubiquinol:citocromo c reductasa
Complejo IV	citocromo c oxidasa
Complejo V	ATP sintasa

[0023] Los complejos I y II logran la transferencia de electrones desde los combustibles metabólicos, como productos de glucólisis y ácidos grasos, hasta ubiquinona (coenzima Q), convirtiéndola en ubiquinol. El ubiquinol se vuelve a convertir en ubiquinona mediante transferencia de electrones al citocromo c en el complejo III. El citocromo c se reoxida al complejo IV mediante la transferencia de electrones al oxígeno molecular, produciendo agua. El complejo V utiliza la energía potencial del gradiente protónico producido a través de la membrana mitocondrial por estas transferencias de electrones, convirtiendo el ADP en ATP, que proporciona entonces energía a las reacciones metabólicas de la célula.

[0024] La dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH) es una enzima implicada en la síntesis *de novo* de nucleótidos uridínicos. La actividad DHODH está acoplada a la cadena respiratoria mediante la transferencia de electrones de dihidroorotato a ubiquinona; estos electrones pasan entonces al citocromo c y al oxígeno a través de los complejos III y IV, respectivamente. Solo los complejos III y IV están directamente implicados en la biosíntesis de pirimidina. El orotato producido mediante la acción de la DHODH se convierte en monofosfato de uridina mediante fosforribosilación y descarboxilación.

[0025] Los "precursores de nucleótidos pirimidínicos", en el contexto de la invención, son intermedios de las rutas *de novo* o nativas de la síntesis de nucleótidos pirimidínicos que entran en la síntesis de pirimidina de forma distal a la DHODH (por ejemplo, orotato) o que no requieren la actividad DHODH para la conversión en nucleótidos pirimidínicos (por ejemplo, citidina, uridina o derivados de acilo de citidina o uridina). Se incluyen también dentro del alcance de la invención los fosfatos de nucleósido pirimidínico (por ejemplo, nucleótidos, difosfocolina de citidina, difosfoglucosa de uridina); estos compuestos se degradan al nivel de uridina o citidina antes de la entrada en las células y el anabolismo. Los derivados de acilo de citidina y uridina tienen mejor biodisponibilidad oral que los nucleósidos o nucleótidos originales. El ácido orótico y los ésteres del mismo se convierten en nucleótidos uridínicos y son también útiles para lograr los objetivos de la invención.

B. Compuestos de la invención

[0026] Es un rasgo primario de la presente invención el inesperado descubrimiento de que la administración de precursores de nucleótidos pirimidínicos es eficaz en el tratamiento de una gran variedad de síntomas y estados patológicos relacionados con la disfunción mitocondrial.

[0027] Los niveles de nucleótidos pirimidínicos en tejido aumentan mediante la administración de cualquiera de varios precursores. Se incorporan uridina y citidina a conjuntos de nucleótidos celulares mediante fosforilación en la posición 5'; los nucleótidos citidina y uridina son interconvertibles mediante reacciones de aminación y desaminación enzimática. El ácido orótico es un intermedio clave en la biosíntesis *de novo* de nucleótidos pirimidínicos. La incorporación de ácido orótico a conjuntos nucleotídicos requiere la fosforribosil pirofosfato (PRPP) celular. Como alternativa (o además de la provisión de precursores nucleotídicos exógenos), aumenta la biodisponibilidad de uridina en tejidos mediante la administración de compuestos que inhiben la uridina fosforilasa, la primera enzima en la ruta de degradación de la uridina. Los compuestos de la invención útiles en el tratamiento de enfermedades mitocondriales y trastornos relacionados incluyen uridina, citidina, orotato, derivados de acilo o ésteres biodisponibles oralmente de estos precursores de nucleótidos pirimidínicos e inhibidores de la enzima uridina fosforilasa.

[0028] Con referencia a los derivados de acilo de citidina y uridina, se aplican las siguientes definiciones:

El término "derivado de acilo", como se usa en la presente memoria, significa un derivado de un nucleósido pirimidínico en que se une un sustituyente acilo orgánico sustancialmente no tóxico derivado de un ácido carboxílico

a uno o más de los grupos hidroxilo libres del resto de ribosa del nucleóido oxipurínico con un ligamiento éster y/o en que se une dicho sustituyente al sustituyente amina en el anillo de purina de la citidina con un ligamiento amida. Dichos sustituyentes acilo derivan de ácidos carboxílicos que incluyen, pero sin limitación, compuestos seleccionados del grupo consistente en un ácido graso, un aminoácido, ácido nicotínico, ácidos dicarboxílicos, ácido láctico, ácido p-aminobenzoico y ácido orótico. Son sustituyentes de acilo ventajosos los compuestos normalmente presentes en el cuerpo, como constituyentes dietéticos o como metabolitos intermedios.

[0029] El término "sales farmacéuticamente aceptables", como se usa en la presente memoria, significa sales de adición de ácido o base farmacéuticamente aceptables de los derivados que incluyen, pero sin limitación, ácidos sulfúrico, clorhídrico o fosfórico o, en el caso del orotato, hidróxidos de sodio o calcio, y aminoácidos catiónicos, especialmente lisina.

[0030] El término "aminoácidos", como se usa en la presente memoria, incluye, pero sin limitación, glicina, las formas L de alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina, prolina, hidroxiprolina, serina, treonina, cisteína, cistina, metionina, triptófano, ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, lisina, histidina, ornitina, hidroxilisina, carnitina y otros aminoácidos de origen natural.

[0031] El término "ácidos grasos", como se usa en la presente memoria, significa ácidos carboxílicos que tienen 2-22 átomos de carbono. Dichos ácidos grasos pueden estar saturados, parcialmente saturados o poliinsaturados.

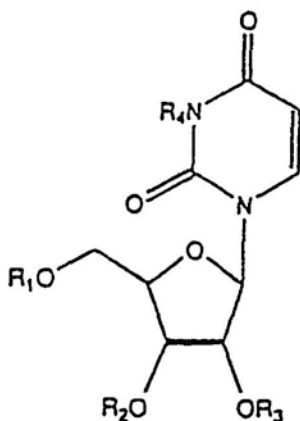
[0032] El término "ácidos dicarboxílicos", como se usa en la presente memoria, significa ácidos grasos con un segundo sustituyente ácido carboxílico.

[0033] Los compuestos de la invención tienen las siguientes estructuras:

[0034] En todos los casos, excepto cuando se indica, las letras y letras con subíndices que simbolizan los sustituyentes variables en las estructuras químicas de los compuestos de la invención son solo aplicables a la estructura inmediatamente precedente a la descripción del símbolo.

(1) Un derivado de acilo de uridina que tiene la fórmula:

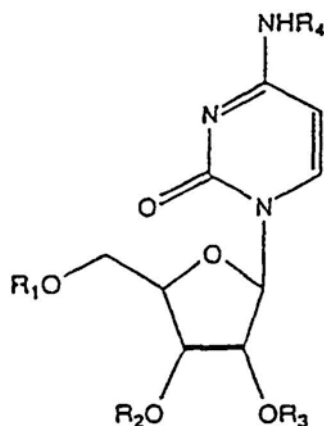
[0035]



en la que R₁, R₂, R₃ y R₄ son iguales o diferentes y cada uno es hidrógeno o un radical acilo de un metabolito, a condición de que al menos uno de dichos sustituyentes R no sea hidrógeno, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

(2) Un derivado de acilo de citidina que tiene la fórmula:

[0036]



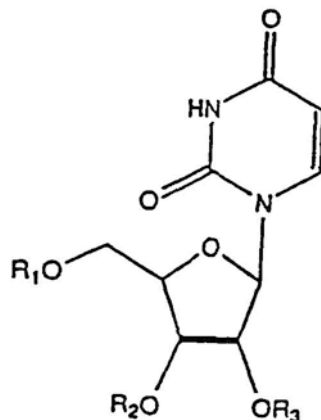
5 en la que R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son iguales o diferentes y cada uno es hidrógeno o un radical acilo de un metabolito, a condición de que al menos uno de dichos sustituyentes R no sea hidrógeno, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 [0037] Los compuestos de la invención útiles en el tratamiento de enfermedades mitocondriales incluyen:

(3) Un derivado de acilo de uridina que tiene la fórmula:

[0038]

15

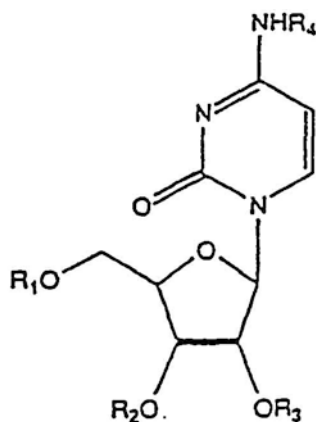


en la que R_1 , R_2 y R_3 son iguales o diferentes, y cada uno es hidrógeno o un radical acilo de

- 20 a. un ácido graso no ramificado de 2 a 22 átomos de carbono,
 b. un aminoácido seleccionado del grupo consistente en glicina, las formas L de alanina, valina, leucina, isoleucina, tirosina, prolina, hidroxiprolina, serina, treonina, cistina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, lisina, histidina, carnitina y ornitina,
 c. un ácido dicarboxílico que tiene 3-22 átomos de carbono,
 25 d. un ácido carboxílico seleccionado de uno o más del grupo consistente en ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido enolpirúvico, ácido lipoico, ácido pantoténico, ácido acetoacético, ácido p-aminobenzoico, ácido beta-hidroxibutírico, ácido orótico y creatina.

(4) Un derivado de acilo de citidina que tiene la fórmula:

[0039]

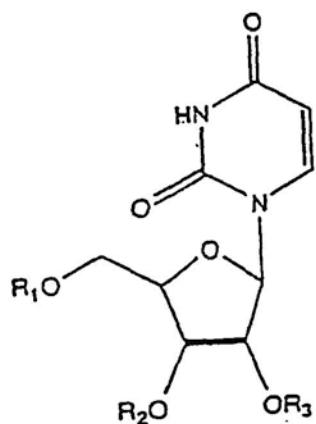


5 en la que R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son iguales o diferentes, y cada uno es hidrógeno o un radical acilo de

- a. un ácido graso no ramificado de 2 a 22 átomos de carbono,
- b. un aminoácido seleccionado del grupo consistente en glicina, las formas L de fenilalanina, alanina, valina, leucina, isoleucina, tirosina, prolina, hidroxiprolina, serina, treonina, cistina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, lisina, histidina, carnitina y ornitina,
- c. un ácido dicarboxílico que tiene 3-22 átomos de carbono,
- d. un ácido carboxílico seleccionado de uno o más del grupo consistente en ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido enolpirúvico, ácido lipoico, ácido pantoténico, ácido acetoacético, ácido p-aminobenzoico, ácido beta-hidroxibutírico, ácido orótico y creatina.

15 (5) Un derivado acilo de uridina que tiene la fórmula:

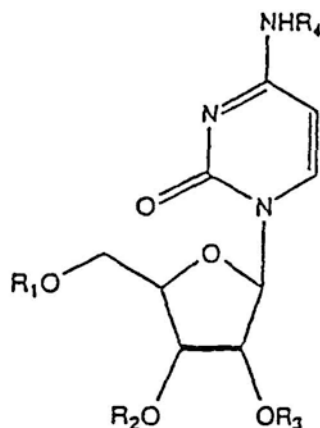
[0040]



25 en la que al menos uno de R_1 , R_2 o R_3 es un resto hidrocarbiloalcarbonilo que contiene 2-26 átomos de carbono y los sustituyentes R restantes son independientemente un resto hidrocarbiloalcarbonilo o hidrocarbiloalcarbonilo o H o fosfato.

(6) Un derivado de acilo de citidina que tiene la fórmula:

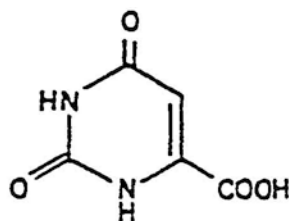
[0041]



5 en la que al menos uno de R_1 , R_2 , R_3 o R_4 es un resto hidrocarbiloalcoxilcarbonylo que contiene 2-26 átomos de carbono y los sustituyentes R restantes son independientemente un resto hidrocarbiloalcoxilcarbonylo o hidrocarbiloalcoxilcarbonylo o H o fosfato.

10 (7) Ácido orótico o sales del mismo:

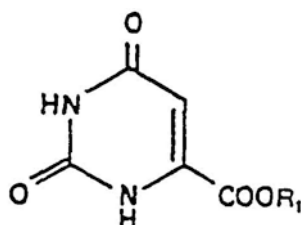
[0042]



15 [0043] Las sales farmacéuticamente aceptables del ácido orótico incluyen aquellas en que el componente catiónico de la sal es sodio, potasio, un aminoácido básico tal como arginina o lisina, metilglucamina, colina o cualquier otro catión hidrosoluble sustancialmente no tóxico con un peso molecular menor de aproximadamente 1000 Da.

20 8) Derivados de orotato sustituidos con alcohol:

[0044]



25 en la que R_1 es un radical de un alcohol que contiene 1 a 20 átomos de carbono unido al orotato a través de un ligamiento éster.

30 [0045] Están también incluidas en la invención las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos anteriormente observados.

35 [0046] Los compuestos ventajosos de la invención son ésteres de ácido graso de cadena corta (2 a 6 átomos de carbono) de uridina o citidina. Son compuestos particularmente ventajosos triacetiluridina o triacetilcitidina. Dichos compuestos tienen una mejor biodisponibilidad oral que los nucleósidos originales, y se desacetilan rápidamente después de la absorción tras administración oral.

[0047] El ácido pirúvico es útil para el tratamiento de células con función mitocondrial defectiva. Las células

con capacidad reducida de fosforilación oxidativa mitocondrial deben basarse en la glucólisis para la generación de ATP. La glucólisis está regulada por el estado redox de las células. Específicamente, se requiere NAD⁺ para un flujo óptimo de glucosa, produciendo NADH en el proceso. Para maximizar la producción de energía de la glucólisis, el NADH debe reoxidarse a NAD⁺. El pirovato exógeno puede reoxidar NADH en parte a través de la enzima de membrana plasmática NADH oxidasa.

[0048] El tripiruvato de uridina (2',3',5'-tri-O-piruviluridina) proporciona los beneficios tanto de pirimidinas como de piruvato, suministrando ambos con una sola entidad química, y evitando la carga de sodio, calcio u otros cationes en las correspondientes sales de ácido pirúvico.

C. Composiciones de la invención

[0049] En una realización de la invención, las composiciones farmacéuticas novedosas comprenden como agente activo uno o más precursores de nucleótidos pirimidínicos seleccionados del grupo consistente en uridina, citidina, ácido orótico o sus sales o ésteres y derivados de acilo de estos precursores de nucleótidos pirimidínicos junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

[0050] Las composiciones, dependiendo del uso y vía de administración pretendidos, se fabrican en forma de un líquido, suspensión, aspersión, microcápsula, comprimido, cápsula, gragea, disolución inyectable o supositorio (véase la discusión de la formulación a continuación).

D. Usos terapéuticos de los compuestos y composiciones de la invención

[0051] Las enfermedades relacionadas con la disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial pueden dividirse en varias categorías basándose en el origen de los defectos mitocondriales.

[0052] Las enfermedades mitocondriales congénitas son aquellas relacionadas con mutaciones, deleciones u otros defectos hereditarios en el ADN mitocondrial o en los genes nucleares que regulan la integridad del ADN mitocondrial, o en los genes nucleares que codifican proteínas que son críticas para la función de la cadena respiratoria mitocondrial.

[0053] Los defectos mitocondriales adquiridos comprenden principalmente: 1) daño para el ADN mitocondrial debido a procesos oxidativos o envejecimiento; 2) disfunción mitocondrial debido a una acumulación excesiva de calcio intracelular e intramitocondrial; 3) inhibición de los complejos de la cadena respiratoria con inhibidores de la cadena respiratoria endógenos o exógenos; 4) deficiencia de oxígeno aguda o crónica y 5) interacciones núcleo-mitocondrias alteradas, por ejemplo, alteración de acción de lanzadera de las mitocondrias en axones largos debido a defectos de microtúbulos y 6) expresión de proteínas desacoplantes mitocondriales en respuesta a lípidos, daño oxidativo o inflamación.

[0054] Los mecanismos más fundamentales implicados en los defectos mitocondriales adquiridos, y que subyacen en la patogénesis de una variedad de formas de disfunción de órgano y tejido, incluyen:

Acumulación de calcio: Un mecanismo fundamental de lesión celular, especialmente en tejidos excitables, que implica la entrada excesiva de calcio en las células como resultado de pérdidas a través de la membrana plasmática o defectos en los mecanismos de gestión del calcio intracelular. Las mitocondrias son los sitios principales de retención de calcio, y utilizan preferiblemente energía de la cadena respiratoria para captar calcio en lugar de para la síntesis de ATP, lo que da como resultado una espiral descendente de fallo mitocondrial, puesto que la captación de calcio en las mitocondrias da como resultado una capacidad reducida de transducción de energía.

Excitotoxicidad: La estimulación excesiva de neuronas con aminoácidos excitadores es un mecanismo común de muerte celular o lesión del sistema nervioso central. La activación de los receptores de glutamato, especialmente del subtipo designado receptores de NMDA, da como resultado la disfunción mitocondrial, en parte a través de la elevación del calcio intracelular durante la estimulación excitotóxica. A la inversa, los déficit de respiración mitocondrial y fosforilación oxidativa sensibilizan las células ante los estímulos excitotóxicos, dando como resultado muerte celular o lesión durante la exposición a niveles de neurotransmisores excitotóxicos o toxinas que serían inocuos para células normales.

Exposición a óxido nítrico: El óxido nítrico (~1 micromolar) inhibe la citocromo oxidasa (complejo IV) e inhibe así la respiración mitocondrial (Brown GC, *Mol. Cell. Biochem.* 174: 189-192, 1997); además, la exposición prolongada a NO reduce irreversiblemente la actividad del complejo I. Las concentraciones fisiológicas o fisiopatológicas de NO inhiben así la biosíntesis de pirimidina. El óxido nítrico está implicado en una variedad de trastornos neurodegenerativos incluyendo enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias del sistema nervioso central, y está implicado en la mediación del daño excitotóxico y posthipóxico de neuronas.

Hipoxia: El oxígeno es el aceptor de electrones terminal de la cadena respiratoria. La deficiencia de oxígeno altera la actividad de la cadena de transporte electrónico, dando como resultado una síntesis reducida de pirimidina así

como una síntesis reducida de ATP mediante fosforilación oxidativa. Las células humanas proliferan y retienen la viabilidad en condiciones virtualmente anaeróbicas si se les proporciona uridina y piruvato (o un agente similarmente eficaz para oxidar NADH para optimizar la producción glucolítica de ATP).

Interacciones núcleo-mitocondria: La transcripción de ADN mitocondrial que codifica componentes de la cadena respiratoria requiere factores nucleares. En los axones neuronales, las mitocondrias deben actuar como lanzaderas desde y hacia el núcleo para mantener la actividad de la cadena respiratoria. Si el transporte axónico está alterado por la hipoxia o por fármacos como taxol, que afectan a la estabilidad de los microtúbulos, las mitocondrias distantes del núcleo experimentan pérdida de actividad citocromo oxidasa.

Proteínas desacoplantes mitocondriales: Las mitocondrias son la fuente primaria de radicales libres y especies de oxígeno reactivas debido al desbordamiento de la cadena respiratoria mitocondrial, especialmente cuando los defectos en uno o más componentes de la cadena respiratoria alteran la transferencia ordenada de electrones desde los intermediarios metabólicos al oxígeno molecular. Para reducir el daño oxidativo, las células pueden compensarlo expresando proteínas desacoplantes mitocondriales (UCP), de las que se han identificado varias. La UCP-2 se transcribe en respuesta a daño oxidativo, citocinas inflamatorias o cargas lipídicas en exceso, por ejemplo, esteatosis hepática y esteatohepatitis. Las UCP reducen el desbordamiento de las especies de oxígeno reactivas de las mitocondrias al descargar gradientes de protones a través de la membrana interna mitocondrial, desperdiciando efectivamente la energía producida por el metabolismo y volviendo a las células vulnerables al estrés por energía como compensación por una lesión oxidativa reducida.

[0055] Especialmente en el sistema nervioso, los déficit de cadena respiratoria mitocondrial tienen dos consecuencias generalizables: 1) Desarrollo retardado o aberrante de circuitos neuronales en el sistema nervioso y 2) degeneración acelerada de neuronas y circuitos neuronales, de forma aguda o durante un periodo de años, dependiendo de la gravedad de los déficit mitocondriales y de otros factores precipitantes. Patrones análogos de desarrollo alterado y degeneración acelerada se refieren a tejidos y sistemas no neuronales también.

Disfunción mitocondrial y biosíntesis de pirimidina

[0056] Las células con mitocondrias gravemente dañadas (incluyendo la eliminación total de ADN mitocondrial, con la consiguiente interrupción de la actividad de la cadena respiratoria) pueden sobrevivir en cultivo si se les proporcionan dos agentes que compensen las funciones mitocondriales críticas: uridina y piruvato. La uridina es necesaria *in vitro* porque una enzima limitante para la síntesis *de novo* de nucleótidos uridínicos, la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH), está acoplada con la cadena respiratoria mitocondrial mediante la ubiquinona como aceptor de electrones proximal, el citocromo c como intermediario y el oxígeno como aceptor de electrones terminal (Loffler y col., *Mol. Cell. Biochem.* 174: 125-129, 1997). La DHODH es necesaria para la síntesis de orotato, que se fosforribosila y descarboxila entonces produciendo monofosfato de uridina (UMP). Todas las demás pirimidinas en las células derivan de UMP. Las células de pacientes con enfermedad mitocondrial debido a defectos en el ADN mitocondrial requieren uridina exógena para sobrevivir fuera del medio corporal, en las que las pirimidinas derivadas de otras células o de la dieta, y transportadas por la circulación, son a primera vista suficientes para apoyar su viabilidad (Bourgeron y col. *Neuromusc. Disord.* 3: 605-608, 1993). De forma significativa, la inhibición intencionada de DHODH por fármacos como brequinar o leflunomida da como resultado un daño citotóxico limitantes de la dosis en el sistema hematopoyético y mucosa gastrointestinal, en contraposición con la implicación predominante de tejidos postmitóticos, como el sistema nervioso central y músculo, en la enfermedad mitocondrial clínica.

Consecuencias fisiopatológicas de la disfunción de la cadena respiratoria

[0057] Las mitocondrias son críticas para la supervivencia y función apropiada de casi todos los tipos de células eucarióticas. Las mitocondrias de virtualmente cualquier tipo de célula pueden tener defectos congénitos o adquiridos que afecten a su función. Por tanto, los signos y síntomas clínicamente significativos de defectos mitocondriales que afecten a la función de la cadena respiratoria son heterogéneos y variables, dependiendo de la distribución de las mitocondrias defectivas entre las células, de la gravedad de sus déficit, y de las demandas fisiológicas sobre las células afectadas. Los tejidos sin división con altos requisitos de energía, por ejemplo, tejido nervioso, músculo esquelético y músculo cardíaco, son particularmente susceptibles de disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial, pero puede afectarse cualquier sistema de órganos.

[0058] Las enfermedades y síntomas enumerados a continuación comprenden consecuencias fisiopatológicas conocidas de disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial y, como tales, son trastornos en que los compuestos y composiciones de la invención tienen utilidad terapéutica.

[0059] Los síntomas patológicos consecuencia de la disfunción mitocondrial se atribuyen generalmente a: 1) el desbordamiento de los radicales libres de la cadena respiratoria; 2) los déficit de la síntesis de ATP que conducen a un fallo de la energía celular o 3) la apoptosis desencadenada por la liberación de señales mitocondriales como citocromo c, que inician o median las cascadas apoptóticas. Es un rasgo inesperado de la presente invención la observación de que los precursores de nucleótidos pirimidínicos de la invención tienen actividad terapéutica contra

una gran variedad de síntomas en pacientes con enfermedad mitocondrial, como se muestra en los Ejemplos. Esto constituye un importante cambio de paradigma en la comprensión de la patogénesis de enfermedades que implican disfunción mitocondrial, y en el entendimiento de cómo tratar dichos trastornos.

5 Tratamiento de citopatías mitocondriales congénitas

Defectos de ADN mitocondrial

10 **[0060]** Se han ligado una serie de síndromes clínicos con mutaciones o deleciones en el ADN mitocondrial. El ADN mitocondrial se hereda de la madre, con virtualmente todas las mitocondrias del cuerpo derivadas de las proporcionadas por el óvulo. Si hay una mezcla de mitocondrias defectivas y normales en un óvulo, la distribución y segregación de las mitocondrias es un proceso estocástico. Por tanto, las enfermedades mitocondriales son a menudo trastornos multisistémicos, y una mutación puntual particular del ADN mitocondrial puede dar como resultado, por ejemplo, conjuntos distintos de signos y síntomas en diferentes pacientes. A la inversa, mutaciones en dos genes diferentes del ADN mitocondrial pueden dar como resultado complejos sintomáticos similares.

15 **[0061]** No obstante, han surgido algunos patrones sintomáticos consistentes junto con defectos de ADN mitocondrial identificados, y estos comprenden las “enfermedades mitocondriales” clásicas, algunas de las cuales se enumeran inmediatamente a continuación. No obstante, es un aspecto importante de la invención en cuestión el reconocimiento de que el concepto de enfermedad mitocondrial y su tratamiento con compuestos y composiciones de la invención se extiende a muchas otras afecciones patológicas que también se dan a conocer en la presente memoria.

20 **[0062]** Algunos de los fenotipos clásicos de enfermedades mitocondriales importantes asociadas a mutaciones o deleciones del ADN mitocondrial incluyen:

25 MELAS: Encefalomiopatía mitocondrial, acidemia láctica y episodios de tipo apoplejía.
MERRF: Epilepsia mioclónica con fibras “rojas rasgadas” (musculares).
MNGIE: Encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial
NARP: Debilidad muscular neurogénica, ataxia y retinitis pigmentosa.
30 LHON: Neuropatía óptica hereditaria de Leber
Síndrome de Leigh (encefalomiopatía necrosante subaguda).
PEO: Oftalmoplegia externa progresiva.
Síndrome de Kearns-Sayres (PEO, retinopatía pigmentaria, ataxia y bloqueo cardíaco).

35 **[0063]** Otros síntomas comunes de enfermedades mitocondriales que pueden estar presentes solas o junto con estos síndromes incluyen cardiomiopatía, debilidad muscular y atrofia, retardos de desarrollo (que implican la función motora, del lenguaje, cognitiva o ejecutiva), ataxia, epilepsia, acidosis tubular renal, neuropatía periférica, neuropatía óptica, neuropatía autónoma, disfunción intestinal neurogénica, sordera neurosensitiva, disfunción de vejiga neurogénica, cardiomiopatía de dilatación, migraña, insuficiencia hepática, acidemia láctica y diabetes sacarina.

40 **[0064]** Además, los productos génicos y ARNt codificados por ADN mitocondrial, muchas proteínas implicadas en, o que afectan a, la respiración mitocondrial y la fosforilación oxidativa están codificados por ADN nuclear. De hecho, aproximadamente 3000 proteínas, o un 20% de todas las proteínas codificadas por el genoma nuclear, se incorporan físicamente a, o se asocian con, mitocondrias y funciones o biogénesis mitocondrial, aunque solo aproximadamente 100 están directamente implicadas como componentes estructurales en la cadena respiratoria. Por lo tanto, las enfermedades mitocondriales implican no solo productos génicos del ADN mitocondrial, sino también proteínas codificadas por el núcleo que afectan a la función de la cadena respiratoria y a la estructura mitocondrial.

50 **[0065]** Los estresantes metabólicos como las infecciones pueden desenmascarar los defectos mitocondriales que no proporcionan necesariamente síntomas en condiciones normales. Los retardos neuromusculares o neurológicos durante la infección son una señal de enfermedad mitocondrial. A la inversa, la disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial puede volver a las células vulnerables a estresantes que de otro modo serían inocuos.

55 **[0066]** El diagnóstico de enfermedad mitocondrial congénita es un desafío debido a la heterogeneidad de los síntomas, incluso entre pacientes afectados por el mismo defecto molecular. Los déficit de función celular y tisular debido a la disfunción mitocondrial pueden imitar la disfunción tisular causada por problemas que no implican directamente defectos mitocondriales. Son conocidos en la materia varios esquemas clínicamente útiles y prácticos para el diagnóstico de enfermedades mitocondriales; implican típicamente varios criterios principales (por ejemplo, fenotipos clínicos clásicos como MELAS, NARP o síndrome de Leigh, reducciones extremas (>80%) de la actividad del complejo de la cadena respiratoria en muestras de tejido recientes) con un buen grado de certidumbre en el establecimiento del papel de la disfunción de cadena respiratoria en la patogénesis de la enfermedad, y un mayor número de criterios menores (por ejemplo, anomalías bioquímicas moderadas características de defectos de la cadena respiratoria, síntomas característicos de enfermedades mitocondriales sin presentación total de uno de los fenotipos clásicos enumerados anteriormente) que son individualmente menos convincentes que los criterios

principales individuales, pero que acumuladamente proporcionan una fuerte evidencia de la contribución de los déficit de cadena respiratoria a una presentación clínica de un paciente particular, como se describe en Walker y col. (*Eur. Neurol.*, 36: 260-7, 1996), incorporado a la presente como referencia.

5 **[0067]** Como se demuestra en los Ejemplos, los compuestos y composiciones de la invención son útiles para el tratamiento de un espectro muy amplio de signos y síntomas de enfermedades mitocondriales con diferentes patologías moleculares subyacentes. Las mejoras observadas en estos pacientes y otros incluyen, pero sin limitación, reducción de la frecuencia y gravedad de convulsiones, migrañas y episodios de tipo apoplejía, mejora de la ganancia de peso en niños con "retardo del crecimiento", mejora de la acidosis tubular renal con reducción
10 simultánea de la necesidad de bicarbonato suplementario, mejora de la fuerza muscular, mejora de la adquisición del habla, mejora de la ataxia, reducción de la frecuencia y gravedad de infecciones de seno y oído, mejora de la memoria y mejora de síntomas de neuropatía autónoma y periférica. Las mejoras observadas en una amplia variedad de síntomas que eran básicamente insensibles a otras formas de apoyo metabólico, por ejemplo vitaminas y cofactores conocidos por ser necesarios para una función mitocondrial apropiada (lo que aboga contra la atribución de beneficios al efecto placebo, por la recurrencia de los síntomas cuando se retira el apoyo de pirimidina) demuestran la importante comprensión inesperada de la invención de que la deficiencia de pirimidina funcional o condicional es la base de una amplia variedad de síntomas dominantes en pacientes con enfermedades mitocondriales y que la suplementación con pirimidina es suficiente para mejorar una amplia variedad de síntomas en dichos pacientes. Hasta ahora, los síntomas de las enfermedades mitocondriales se habían atribuido a la
20 deficiencia de ATP, a especies de oxígeno reactivas generadas por la cadena respiratoria defectiva o a una muerte celular desencadenada por los componentes mitocondriales de la cascada apoptótica. La toxicidad limitante de la dosis de los inhibidores de la síntesis *de novo* de pirimidina es debida típicamente a la inhibición de la proliferación de tipos de células de división rápida como células de médula ósea y citoblastos de mucosa intestinal. Inesperadamente, los beneficios terapéuticos de los compuestos y procedimientos de la invención en pacientes y
25 animales experimentales se han demostrado en tejidos que comprenden células postmitóticas sin división, por ejemplo, neuronas centrales y periféricas y músculo esquelético y cardíaco.

[0068] Es un rasgo importante de la invención en cuestión el resultado inesperado de que el tratamiento de pacientes con enfermedades mitocondriales causadas por una variedad de defectos moleculares subyacentes da
30 como resultado la mejora clínica de una diversa colección de síntomas *in vivo* en pacientes (Ejemplos 1-4). Es significativo y adicionalmente inesperado que el beneficio clínico se haya observado incluso en pacientes con actividad normal de los dos complejos de la cadena respiratoria (III y IV) que están directamente implicados en las transferencias de electrones específicamente necesarias para la biosíntesis de pirimidina.

[0069] Además, es un aspecto inesperado e importante de la invención que se requieran típicamente dosis mayores de precursores de nucleótidos pirimidínicos de la invención para efectos de tratamiento óptimos en pacientes con citopatías mitocondriales que las necesarias para un tratamiento adecuado de pacientes con un bloqueo prácticamente completo de la síntesis *de novo* de pirimidina, por ejemplo, homocigosis de aciduria orótica de tipo I. Las dosis óptimas de un compuesto de la invención, por ejemplo triacetiluridina (que se absorbe eficazmente después de administración oral) para el tratamiento de enfermedades mitocondriales congénitas en niños están en el intervalo de 1 a 6 g/m² de área superficial corporal (de 50 a 300 mg/kg, ventajosamente de 100 a 300 mg/kg), mientras que la síntesis *de novo* diaria total de pirimidinas es de aproximadamente 1 g/día en adultos (aproximadamente 0,5 g/m²).

[0070] La amplia aplicabilidad de los procedimientos de la invención es inesperada y distingue a los compuestos y composiciones de la invención de las demás terapias de enfermedades mitocondriales que se han intentado, por ejemplo, coenzima Q, vitaminas B, carnitina y ácido lipoico, que se enfrentan generalmente a reacciones y cofactores muy específicos implicados en la función mitocondrial y que son por lo tanto útiles solo en casos aislados. Sin embargo, dichas intervenciones metabólicas con antioxidantes y cofactores de los complejos de la cadena respiratoria son compatibles con el tratamiento simultáneo con compuestos y composiciones de la invención, y de hecho se usan óptimamente en combinación con los compuestos y composiciones de la invención.

Mitocondrias y quimioterapia del cáncer

55 **[0071]** El ADN mitocondrial es típicamente más vulnerable al daño que el ADN mitocondrial por varias razones:

1. El ADN mitocondrial tiene un sistema de reparación menos sofisticado que el ADN nuclear.
2. Virtualmente todas las hebras de ADN mitocondrial codifican proteínas importantes, de modo que
60 cualquier defecto afectará potencialmente a la función mitocondrial. El ADN nuclear contiene largas regiones que no codifican proteínas, en las que las mutaciones o daños son esencialmente inocuos.
3. Las mitocondrias defectivas tienen a menudo una ventaja selectiva frente a las normales activas durante la proliferación y recambio.
4. El ADN mitocondrial no está protegido por histonas.

65 **[0072]** Empíricamente, el daño de ADN mitocondrial es más extenso y persiste más tiempo que el daño de

ADN nuclear en células sometidas a estrés oxidativo o agentes quimioterapéuticos del cáncer como cisplatino debido tanto a la mayor vulnerabilidad como a la reparación menos eficaz del ADN mitocondrial. Aunque el ADN mitocondrial puede ser más sensible al daño que el ADN nuclear, es relativamente resistente en algunas situaciones a la mutagénesis por carcinógenos químicos. Esto es debido a que las mitocondrias responden a algunos tipos de daño de ADN mitocondrial destruyendo sus genomas defectivos en lugar de intentando repararlos. Esto da como resultado una disfunción mitocondrial global durante un periodo después de la quimioterapia citotóxica. El uso clínico de agentes quimioterapéuticos como cisplatino, mitomicina y citoxano está a menudo acompañado por "fatiga quimioterapéutica" debilitante y periodos prolongados de debilidad e intolerancia al ejercicio, que pueden persistir después de la recuperación por las toxicidades hematológica y gastrointestinal de dichos agentes.

[0073] Los compuestos y composiciones de la invención son útiles para el tratamiento y la prevención de disfunciones mitocondriales causadas por la administración de quimioterapia de cáncer citotóxica. Este uso de precursores de nucleótidos pirimidínicos es mecánica y bioquímicamente distinto de la reducción de toxicidad de los análogos de pirimidina anticancerosos citotóxicos por los precursores de nucleótidos pirimidínicos, que está mediada por la competición bioquímica al nivel de antimetabolitos nucleotídicos.

[0074] El Ejemplo 5 ilustra el efecto protector de la triacetiluridina oral en la protección contra neuropatía inducida por taxol.

[0075] Además, el estado redox mitocondrial hepático es un contribuyente a la regulación del apetito. Los pacientes de cáncer exhiben a menudo "saciedad temprana", que contribuye a la anorexia, pérdida de peso y caquexia. El metabolismo de la energía está a menudo gravemente perturbado en paciente de cáncer, con ciclos inútiles de desperdicio de energía de glucólisis tumoral hiperactiva que producen lactato en circulación, que se convierte en el hígado de nuevo en glucosa. La lesión mitocondrial inducida por la quimioterapia contribuye adicionalmente a la perturbación metabólica.

[0076] Como se indica en el Ejemplo 2, el tratamiento con un compuesto de la invención da como resultado un apetito mejorado en un paciente con enfermedad mitocondrial.

Mitocondrias y función ovárica

[0077] Es una función crucial del ovario mantener la integridad del genoma mitocondrial en los óvulos, puesto que las mitocondrias que pasan al feto derivan todas de las presentes en los óvulos en el momento de la concepción. Las deleciones en el ADN mitocondrial se vuelven detectables aproximadamente a la edad de la menopausia, y están asociadas también a ciclos menstruales anormales. Puesto que las células no pueden detectar directamente y responder a los defectos del ADN mitocondrial, sino que solo pueden detectar los efectos secundarios que afectan al citoplasma, como una respiración o estado redox alterado o déficit en la síntesis de pirimidina, dichos productos de la función mitocondrial participan como señal de la selección de óvulo y atresia folicular, desencadenando en última instancia la menopausia cuando no puede garantizarse ya el mantenimiento de la fidelidad genómica y la actividad funcional mitocondrial. Esto es análogo a la apoptosis en células con daño del ADN, que experimentan un proceso activo de suicidio celular cuando no puede conseguirse ya la fidelidad genómica por procesos de reparación. Las mujeres con citopatías mitocondriales que afectan a las gónadas experimentan a menudo menopausia precoz o exhiben anormalidades cíclicas primarias. La quimioterapia por cáncer citotóxica induce a menudo la menopausia precoz, con el consiguiente riesgo aumentado de osteoporosis. La amenorrea inducida por la quimioterapia es generalmente debida a insuficiencia ovárica primaria. La incidencia de amenorrea inducida por quimioterapia aumenta en función de la edad en mujeres premenopáusicas que reciben quimioterapia, apuntando a una implicación mitocondrial. Los inhibidores de la respiración mitocondrial o la síntesis de proteína inhiben la ovulación inducida por hormonas, e inhiben además la producción de hormonas esteroideas ováricas en respuesta a gonadotropinas de pituitaria. Las mujeres con síndrome de Down experimentan típicamente una menopausia precoz y también están sujetas a un inicio temprano de demencia de tipo Alzheimer. Se encuentra consistentemente una baja actividad de citocromo oxidasa en tejidos de pacientes de Down y en enfermedad de Alzheimer de inicio tardío.

[0078] Es por lo tanto útil un apoyo apropiado de la función mitocondrial o compensación de la disfunción mitocondrial para proteger frente a la menopausia relacionada con la edad o inducida por quimioterapia o a irregularidades del ciclo menstrual u ovulación. Los compuestos y composiciones de la invención, incluyendo también antioxidantes y cofactores mitocondriales, son útiles para tratar y prevenir amenorrea, ovulación irregular, menopausia o consecuencias derivadas de la menopausia.

[0079] En el Ejemplo 1, el tratamiento con un compuesto de la invención dio como resultado el acortamiento del ciclo menstrual. Puesto que el paciente estaba en una fase lútea persistente, su respuesta indica que el precursor de nucleótido pirimidínico administrado invirtió la hiposensibilidad a gonadotropinas de pituitaria, presuntamente elevadas para compensar la hiposensibilidad ovárica de origen mitocondrial.

Diagnóstico de enfermedad mitocondrial

[0080] La notable respuesta de pacientes con enfermedad mitocondrial ante la administración de los compuestos de la invención indica que la respuesta clínica al precursor de nucleótido pirimidínico administrado según los procedimientos de la invención en cuestión tiene utilidad de diagnóstico para detectar una posible enfermedad mitocondrial. El diagnóstico molecular de lesiones moleculares subyacentes de disfunción mitocondrial es difícil y costoso, especialmente cuando el defecto no es una de las mutaciones o delecciones más comunes del ADN mitocondrial. El diagnóstico definitivo de enfermedad mitocondrial requiere a menudo biopsias musculares, pero incluso esta medida invasiva funciona solo si los defectos mitocondriales están presentes en músculo. Puesto que los compuestos y composiciones de la invención son seguros cuando se administran según los procedimientos de la invención en cuestión, la exposición terapéutica a un precursor de nucleótido pirimidínico es una sonda de diagnóstico importante para la sospecha de enfermedad mitocondrial, especialmente cuando se usa junto con pruebas de diversos otros aspectos de la disfunción mitocondrial.

[0081] Para el diagnóstico de citopatía mitocondrial congénita, se administran dosis diarias de 50 a 300 mg/kg de precursor de nucleótido pirimidínico de la invención a un paciente durante un periodo de 1 a 12 semanas y se controlan los cambios de signos y síntomas clínicos. Las mejoras observadas en los pacientes descritos en los Ejemplos y pacientes adicionales incluyen, pero sin limitación, reducción de la frecuencia y gravedad de convulsiones, migrañas y episodios de tipo apoplejía, mejora de la ganancia de peso en niños con "retardo del crecimiento", mejora de la acidosis tubular renal con reducción simultánea de la necesidad de bicarbonato suplementario, mejora de la fuerza muscular, mejora de la adquisición del habla, mejora de la ataxia, mejora de la hipotonía, reducción de la frecuencia y gravedad de infecciones de seno y oído, mejora de la memoria y mejora de síntomas de neuropatía autónoma y periférica. En una realización de la invención, se usan también otras pruebas de la función mitocondrial para proporcionar evidencias del diagnóstico de enfermedad mitocondrial. El diagnóstico requiere típicamente la consideración acumulada de una serie de pruebas corroborativas con diferentes grados de fiabilidad, como se describe en Walker y col. (*Eur. Neurol.*, 36: 260-7, 1996). La sensibilidad terapéutica a un precursor de nucleótido pirimidínico de la invención es principalmente útil como criterio menor adicional en este esquema de diagnóstico, puesto que es posible que aparezcan beneficios terapéuticos después de la administración de precursores de nucleótidos pirimidínicos que no estén mediados únicamente por la compensación de los déficit de la cadena respiratoria. Puesto que la naturaleza y gravedad de los síntomas de enfermedades mitocondriales son heterogéneos y variables entre pacientes, se valora típicamente la eficacia de los precursores de nucleótidos pirimidínicos exógenos seleccionando los síntomas dominantes en un paciente y controlando su gravedad con una escala lo más cuantitativa posible durante el transcurso de la terapia. Si se sospecha un posible efecto placebo, se usa opcionalmente en un paciente individual el cambio con anonimato del paciente de fármaco a un placebo apropiado. La valoración del beneficio clínico puede requerir unas considerables habilidades y experiencia, pero dicha habilidad está en el terreno de los practicantes de la técnica de tratar pacientes con enfermedades metabólicas multisistémicas, y como tal no constituye una experimentación indebida en vista de la gravedad de esta clase de enfermedades. Los ejemplos citados a continuación de tratamiento clínico de pacientes de enfermedades mitocondriales con triacetiluridina, un compuesto de la invención, ejemplifican la viabilidad de determinar el beneficio clínico en pacientes individuales.

E. Administración y formulación de los compuestos y composiciones de la invención

[0082] En el caso de todas las dianas terapéuticas específicas para terapia con precursor de nucleótido pirimidínico de enfermedades mitocondriales, los compuestos de la invención se administran típicamente de una a tres veces al día. Los derivados de acilo de uridina y citidina se administran por vía oral en dosis de 10 a 500 mg/kg de peso corporal al día, con variaciones dentro de este intervalo que dependen de la cantidad necesaria para un beneficio clínico óptimo. Generalmente, las dosis óptimas están entre 50 y 300 mg/kg/día (ventajosamente, de 100 a 300 mg/kg/día), divididas en dos o tres dosis separadas en un intervalo de 6 a 12 horas. La uridina y citidina se absorben menos eficazmente que los derivados de acilo de estos dos nucleósidos, de modo que se requieren mayores dosis para el beneficio terapéutico en comparación con la conseguida con derivados de acilo. La diarrea osmótica limita la cantidad de uridina o citidina (u otros derivados como difosfocolina de citidina) que puede administrarse a un paciente, de modo que en la mayoría de casos los derivados de acilo de citidina y uridina son más eficaces que los compuestos originales, con menos efectos secundarios. Las dosis de citidina y uridina usadas para lograr los fines de la invención están en el intervalo de 50 a 1000 mg/kg/día, ventajosamente de 100 a 1000 mg/kg/día, dependiendo del equilibrio entre eficacia terapéutica y tolerabilidad. El orotato o ésteres de alcohol de orotato se administran por vía oral en dosis en el intervalo de 20 a 200 mg/kg/día, dependiendo de nuevo de la cantidad necesaria para conseguir un efecto terapéutico óptimo en un estado patológico particular que implica disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial. La dosis de precursor de nucleótido pirimidínico de la invención necesaria para una enfermedad o paciente particular dependerá también en parte de la gravedad de la enfermedad.

[0083] En cualquier paciente individual con una enfermedad caracterizada o causada por una disfunción mitocondrial, típicamente se determina empíricamente la dosis eficaz de precursor de nucleótido pirimidínico de la invención. En enfermedades mitocondriales congénitas, también conocidas como citopatías mitocondriales o encefalomiopatías mitocondriales, la presentación clínica de signos y señales es generalmente heterogénea y variable entre pacientes. El beneficio clínico después de la administración de un compuesto de la invención se

determina controlando un conjunto de síntomas y valorando su gravedad con el tiempo, por ejemplo, a intervalos de un mes. Se seleccionan con este fin de 3 a 5 síntomas dominantes, y el grado de mejora que se considera que constituye un beneficio clínico es a menudo materia de consideración clínica. En el tratamiento de pacientes con trastornos metabólicos complejos, dicha valoración no constituye una carga indebida de experimentación, especialmente dada la gravedad (a menudo potencialmente mortal) de las citopatías mitocondriales y la naturaleza costosa de su cuidado. La compensación de los defectos mitocondriales u otros metabólicos lo antes posible en la vida del paciente puede constituir una gran diferencia frente a la intervención después del desarrollo del cerebro y de que el cuerpo alcance la estasis después de la pubertad. Por lo tanto, merece la pena el considerable esfuerzo empleado en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades metabólicas complejas, especialmente en niños en desarrollo. Los ejemplos citados a continuación de mejora clínica después de la administración de un compuesto de la invención a pacientes con enfermedades mitocondriales demuestran la viabilidad y valor de dicho tratamiento y valoración.

[0084] En el caso de la mayoría de enfermedades con menos heterogeneidad en la presentación clínica que las enfermedades mitocondriales, existen en la materia escalas de valoración apropiadas validadas para determinar la eficacia de tratamientos farmacológicos. Antes de realizar estudios clínicos para determinar las dosis de precursores de nucleótidos pirimidínicos de la invención para el tratamiento de las afecciones patológicas dadas a conocer en la presente memoria descriptiva, se determinan las dosis apropiadas para pacientes individuales evaluando la respuesta clínica (incluyendo imágenes de RMN cerebral y otros índices, por ejemplo medidas bioquímicas, que pueden no resultar clínicamente evidentes simplemente mediante la observación de los síntomas del paciente) según escalas de valoración patológica cuantitativa. En todos los casos, se controlan los síntomas dominantes de un estado patológico particular con el tiempo para determinar si ocurre una mejora de los signos y síntomas o una atenuación del declive clínico, como es común en las técnicas médicas. Antes de la determinación de la dosis en estudios clínicos con anonimato, se diferencia la respuesta de un paciente dado ante un precursor de nucleótido pirimidínico de la invención de un posible efecto placebo simplemente mediante una permutación con anonimato de fármaco a placebo durante un periodo de varias semanas.

[0085] En el caso de pacientes incapaces de recibir medicaciones orales, los compuestos de la invención, especialmente uridina, citidina y ésteres de orotato, pueden administrarse, si se requiere, mediante infusión intravenosa prolongada, suministrando dosis diarias de 10 a 500 mg/kg/día.

[0086] Los compuestos farmacológicamente activos se combinan opcionalmente con portadores farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos. Estos se administran en forma de comprimidos, suspensiones, disoluciones, grageas, cápsulas o supositorios. Las composiciones se administran, por ejemplo, por vía oral, rectal, vaginal o se liberan a través de la cavidad bucal de la boca, y pueden aplicarse en forma de disolución mediante inyección, por vía oral o mediante administración tópica. Las composiciones pueden contener de aproximadamente 0,1 a 99%, preferiblemente de aproximadamente 50 a 90%, del compuesto o compuestos activos, junto con el excipiente o excipientes.

[0087] Para administración parenteral mediante inyección o infusión intravenosa, se suspenden o disuelven los compuestos activos en medio acuoso tal como agua estéril o disolución salina. Las disoluciones o suspensiones inyectables contienen opcionalmente un agente tensioactivo tal como ésteres de polioxietilensorbitán, ésteres de sorbitán, polioxietiléteres o agentes solubilizantes como propilenglicol o etanol. La disolución contiene típicamente de 0,01 a 5% de compuestos activos.

[0088] Los excipientes adecuados incluyen cargas tales como azúcares, por ejemplo, lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol, preparaciones de celulosa y/o fosfatos de calcio, por ejemplo, fosfato tricálcico o hidrogenofosfato de calcio, así como aglutinantes tales como pasta de almidón que usa, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz o almidón de patata, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona.

[0089] Los auxiliares incluyen agentes reguladores del flujo y lubricantes, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico o sales del mismo, tales como estearato de magnesio o estearato de calcio y/o polietilenglicol. Los núcleos de gragea se proporcionan con recubrimientos adecuados que, si se desea, son resistentes a los jugos gástricos. Con este fin, se usan disoluciones concentradas de azúcar que contienen opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, disoluciones de lacado y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Para producir recubrimientos resistentes a los jugos gástricos, se usan disoluciones de preparaciones de celulosa adecuadas tales como acetilcelulosa ftalato o hidroxipropilmetilcelulosa ftalato. Se añaden opcionalmente tintes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de gragea, por ejemplo, para identificación o para caracterizar diferentes dosis de compuesto.

[0090] Las preparaciones farmacéuticas de la presente invención se fabrican de una manera que es conocida por sí misma, por ejemplo, mediante procesos de mezclado, granulación, preparación de grageas, disolución o liofilización convencionales. Por tanto, las preparaciones farmacéuticas para uso oral se obtienen combinando el compuesto o compuestos activos con excipientes sólidos, moliendo opcionalmente la mezcla resultante y

procesando la mezcla de gránulos después de añadir auxiliares adecuados, si se desea o es necesario, para obtener comprimidos o núcleos de grageas.

[0091] Otras preparaciones farmacéuticas que son útiles para suministro oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras contienen el compuesto o compuestos activos en forma de gránulos que opcionalmente se mezclan con cargas tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio, y opcionalmente estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos preferiblemente se disuelven o suspenden en líquidos adecuados tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles. Además, se añaden opcionalmente estabilizantes.

[0092] Las preparaciones farmacéuticas que se usan por vía rectal incluyen, por ejemplo, supositorios que consisten en una combinación de compuestos activos con una base de supositorio. Son bases de supositorio adecuadas, por ejemplo, triglicéridos naturales o sintéticos, hidrocarburos de parafina, polietilenglicoles o alcoholes superiores. Además, son útiles cápsulas rectales de gelatina que consisten en una combinación de los compuestos activos con una base. Los materiales de base incluyen, por ejemplo, triglicéridos líquidos, polietilenglicoles o hidrocarburos de parafina. En otra realización de la invención, se usa una formulación de enema que contiene opcionalmente excipientes aumentadores de la viscosidad como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, carbopol, poliácridatos de glicerina u otros hidrogeles.

[0093] Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de los compuestos activos en forma hidrosoluble, por ejemplo, sales hidrosolubles.

[0094] Además, se administran suspensiones de los compuestos activos según sea apropiado en suspensiones de inyección oleosas. Los disolventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos, por ejemplo, aceite de sésamo o ésteres de ácido graso sintético, por ejemplo, oleato de etilo o triglicéridos. Las suspensiones de inyección acuosas incluyen opcionalmente sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión contiene opcionalmente estabilizantes.

F. Síntesis de los compuestos de la invención

[0095] Los derivados de acilo y uridina se sintetizan típicamente mediante procedimientos de acilación que implican la reacción de cloruros de ácido o anhídridos de ácido con citidina o uridina.

[0096] Se muestra en el Ejemplo 6 la síntesis de 2',3',5'-tri-O-piruviluridina.

[0097] Los siguientes ejemplos son ilustrativos de los procedimientos y composiciones de la presente invención. Están dentro del espíritu y alcance de esta invención otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de una variedad de condiciones y parámetros encontrados normalmente en terapia clínica, que son obvias para los especialistas en la materia.

Ejemplos

Ejemplo 1: Tratamiento de un trastorno mitocondrial multisistémico con triacetiluridina

[0098] Una mujer de 29 años con deficiencia parcial del complejo I, y cuyo hijo estaba diagnosticado con enfermedad mitocondrial que conducía a episodios de tipo apoplejía, ataxia y encefalopatía, presentaba un trastorno mitocondrial multisistémico. Los signos y síntomas incluían migrañas hemipléjicas/afásicas, convulsiones tonicoclónicas generalizadas, disfunción intestinal y de vejiga neurogénica que requería cateterización aproximadamente 4 veces al día, disfagia, polineuropatía autónoma y periférica que producía parestesias dolorosas, síndrome de taquicardia/bradicardia y mala capacidad funcional, con incapacidad para subir un tramo de escaleras sin parar a descansar, y rendimiento cognitivo disminuido, con episodios de obnubilación y mala memoria que duraban de horas a días.

[0099] Después del inicio del tratamiento con triacetiluridina oral 0,05 mg/kg/día, y durante un periodo de al menos 6 meses, esta paciente no tuvo convulsiones ni migrañas; sus parestesias relacionadas con la neuropatía periférica desaparecieron. Es capaz de evacuación espontánea la mayoría de días, requiriendo cateterización solo una o dos veces por semana. Después de 6 semanas de tratamiento con triacetiluridina, esta paciente era capaz de caminar toda una milla, lo que había sido incapaz de hacer durante los últimos dos años debido a una capacidad funcional inadecuada. Sus episodios de bradicardia durante el sueño y taquicardia durante el ejercicio se redujeron en frecuencia; antes del tratamiento, aparecía taquicardia con un ritmo cardíaco mayor de 140 bpm simplemente al levantarse, y después de 6 semanas de triacetiluridina, aparecía taquicardia solo en colinas y escaleras. Sus sentidos se han despejado y los déficit de memoria han mejorado notablemente.

[0100] Durante el tratamiento, los ciclos menstruales de esta paciente se acortaron de 4 semanas a 2 semanas, y exhibió una fase lútea persistente evaluada por medidas de estradiol, progesterona, FSH y LH. Después

de varios meses, su ciclo se normalizó a 4 semanas.

[0101] Esta paciente demuestra rasgos importantes de la invención en cuestión porque 1) el compuesto de la invención causó mejoras de virtualmente todos los rasgos de una enfermedad multisistémica compleja relacionada con la disfunción mitocondrial en una variedad de tejidos y 2) los compuestos de la invención son inesperadamente útiles para tratar afecciones patológicas relacionadas con una deficiencia parcial del complejo I, que afectan a una parte de la cadena respiratoria mitocondrial que está fuera de la secuencia de transferencias electrónicas implicadas directamente en la biosíntesis *de novo* de pirimidina.

[0102] El acortamiento transitorio del ciclo menstrual de esta paciente se interpreta como una mejora de la función ovárica causada por la triacetiluridina vista la estimulación hormonal excesiva mediante la que el sistema neuroendocrino estaba intentando compensar la disfunción ovárica. La realimentación entre los ovarios y el hipotálamo condujo a una progresiva normalización del tiempo de ciclo.

Ejemplo 2: Tratamiento de epilepsia resistente

[0103] Un niño de 11 años tenía epilepsia resistente desde los 4,5 años, aparentemente debido a un síndrome de delección de ADN mitocondrial múltiple. En diciembre de 1997, su estado se deterioró, incluyendo dos ingresos en la unidad de cuidados intensivos por epilepsia progresiva. Incluso con regímenes agresivos de terapia anticonvulsiva estándar, este paciente tenía de 8 a 10 convulsiones tonicoclónicas generalizadas por noche, dejándole incapaz de asistir regularmente a la escuela o de participar en actividades deportivas. Desarrolló también automatismo del labio superior.

[0104] En los primeros 3 días después del inicio del tratamiento con triacetiluridina oral (inicialmente a una dosis de 0,05 g/kg/día, y aumentando gradualmente a 0,1 y entonces a 0,24 g/kg/día durante el transcurso de varias semanas), no hubo convulsiones y cesó el movimiento involuntario del labio. Ha habido posteriormente algunas recurrencias de convulsiones, especialmente durante episodios de infección, aunque a una frecuencia mucho menor que antes del tratamiento con triacetiluridina. Este paciente ha podido volver a la escuela y retomar la participación activa en deportes. Su apetito, función cognitiva y coordinación motora fina han mejorado durante la terapia, dando como resultado un rendimiento académico mejorado y un rendimiento sobresaliente en actividades deportivas como el béisbol.

Ejemplo 3: Tratamiento de acidosis tubular renal

[0105] Una niña de 2 años con síndrome de Leigh (encefalopatía necrosante subaguda) asociado con deficiencia grave del complejo I exhibía acidosis tubular renal que requería la administración intravenosa de 25 mEq al día de bicarbonato de sodio. Al cabo de varias horas después de iniciar el tratamiento intragástrico con triacetiluridina 0,1 g/mg/día, desapareció su acidosis tubular renal y no requirió ya bicarbonato suplementario para normalizar el pH de la sangre. La triacetiluridina dio también como resultado la rápida normalización de las concentraciones elevadas de aminoácidos en circulación y mantuvo el ácido láctico a niveles bajos después de la retirada del tratamiento con dicloroacetato, que era anteriormente necesario para evitar la acidosis láctica.

Ejemplo 4: Tratamiento de retardo del desarrollo

[0106] Se trató una niña de 4,5 años con epilepsia, ataxia, retardo del lenguaje, intolerancia a las grasas y aciduria dicarboxílica con triacetiluridina a una dosis diaria de 0,1 a 0,3 g/kg/día. Dicho tratamiento dio como resultado una disminución del 50% de la frecuencia de las convulsiones, la mejora de la ataxia y coordinación motora, la recuperación de la tolerancia a grasas de la dieta y un desarrollo rápidamente acelerado de las capacidades lingüísticas expresivas.

Ejemplo 5: Prevención de neuropatía inducida por taxol

[0107] La neuropatía periférica es un efecto secundario frecuente, y a menudo limitante de la dosis, de agentes anticancerosos importantes como cisplatino y taxol. En el caso del taxol, aparece neuropatía sensorial grave varios días después de la administración. El mecanismo de acción del taxol implica la estabilización de microtúbulos, lo que es útil para tratar cánceres pero nocivo para las neuronas periféricas. La estabilización de microtúbulos altera el transporte axónico de componentes celulares. Las mitocondrias actúan como lanzaderas entre el cuerpo celular y las terminales de neuronas, de modo que la expresión de componentes de la cadena respiratoria mitocondrial puede regularse mediante factores de transcripción nuclear. Durante la inhibición de la acción de lanzadera mitocondrial, la mitocondrias distantes del núcleo experimentan una disminución de la expresión de las subunidades de la cadena respiratoria codificadas por el genoma mitocondrial debido a una inadecuada exposición a factores de transcripción de ADNmt, dando como resultado una falta de energía neuronal regional y otras consecuencias de la disfunción mitocondrial.

[0108] Se trataron dos grupos de 10 ratones cada uno con taxol 21,6 mg/kg/día durante 6 días consecutivos mediante inyección intraperitoneal. Un grupo adicional de 10 ratones recibió inyecciones de solo vehículo. Uno de

los grupos de ratones tratados con taxol recibió triacetiluridina oral 4000 mg/kg dos veces al día. 9 días después del inicio de los tratamientos con taxol, se ensayaron los déficit sensoriales nociceptivos determinando la latencia de retirada de cola después de la exposición de la punta de la cola a una radiación térmica enfocada con un lámpara térmica de infrarrojo. En este sistema, los retrasos en la respuesta de retirada de cola ante el calor radiante se correlacionan con déficit nerviosos sensoriales.

Grupo:	Latencia de retirada de cola
Control (sin taxol)	10,8 ± 0,5 s
Taxol	16,0 ± 3,1 s
Taxol + triacetiluridina	11,9 ± 0,7 s

[0109] El tratamiento con taxol alteró las respuestas ante estímulos dolorosos como índice de neuropatía sensorial tóxica. El tratamiento con acetiluridina oral atenuó significativamente las alteraciones inducidas por taxol de la latencia de retirada de cola.

Ejemplo 6: Síntesis de piruvato de uridina

[0110] A. Se logró la preparación de cloruro de piruvilo mediante la reacción de α, α -diclorometilmetiléter y ácido pirúvico usando el procedimiento de Ottenheim y Man (*Synthesis*, 1975, pág. 163).

[0111] B. Se secó uridina (3,0 g, 12 mmol) mediante el azeótropo con tolueno a vacío (3x) y se disolvió entonces en DMF (20 ml) y piridina (20 ml). Se enfrió la disolución resultante a -10°C y se añadieron gota a gota 6,0 ml de cloruro de piruvilo (producido en la etapa A anterior). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 24 horas. El análisis por TLC (5% de MeOH/CH₂Cl₂) mostró el consumo de uridina. Se evaporó la mezcla de reacción hasta sequedad y se repartió entre CH₂Cl₂ y bicarbonato de sodio acuoso. Se lavó la fase orgánica con agua, HCl acuoso (pH 3,0) y agua, se secó sobre sulfato de sodio, se concentró y se purificó usando cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 5% de MeOH/CH₂Cl₂), proporcionando 1,4 g de piruvato de uridina o 2',3',5'-tri-O-piruviluridina.

Ejemplo 7: Efecto terapéutico de la triacetiluridina oral en el modelo de MPTP de enfermedad de Parkinson (EP) y disfunción mitocondrial

[0112] La neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) es un inhibidor del complejo I (NADH deshidrogenasa) de la cadena respiratoria mitocondrial que se usa para inducir la pérdida de células dopaminérgicas (Varastet y col., *Neuroscience*, 63: 47-56, 1994). Esta toxina se usa ampliamente actualmente como modelo animal de EP (Bezard y col., *Exp. Neurol.*, 148: 288-92, 1997).

[0113] Se usaron ratones C57/BL6 macho de 6-9 meses de 30-40 g de peso de Taconic Farms en los estudios de MPTP (n= 7/grupo). Se administró MPTP (30 mg/kg i.p.) 2 veces al día durante 1,5 días. Se administró TAU dos veces al día a 4 g/kg por vía oral en vehículo hidroxipropilmetilcelulosa al 0,75% en disolución de 200 mg de TAU/ml 2 horas antes de la administración de toxina y hasta el día antes del sacrificio.

[0114] Ocho días después de detener la inyección de MPTP, se sacrificaron los ratones con CO₂ y se extirpó el cuerpo estriado de ambos lados en una superficie fría. Se congeló el cuerpo estriado en hielo seco. Se valoró la supervivencia neuronal dopaminérgica mediante el contenido de dopamina del cuerpo estriado (DA). Se ensayó el contenido de dopamina mediante un procedimiento radioenzimático en condiciones de GLP, pero la DA puede medirse también usando cromatografía líquida de alta presión con detección electroquímica como se describe anteriormente (Friedemann y Gerhardt, *Neurobiol. Aging*, 13: 325-32, 1992). Hubo una mortalidad reducida en los ratones tratados con MPTP debido al tratamiento con TAU. La mortalidad de los ratones de control + MPTP era de un 71,4% en comparación con un 28,6% en el grupo de tratamiento con TAU + MPTP. Hubo también un efecto neuroprotector del tratamiento con PN401 sobre el contenido reducido de DA debido a MPTP.

Efecto de TAU sobre la reducción inducida por MPTP del contenido de DA del cuerpo estriado

[0115]

Tratamiento	DA del cuerpo estriado*
Control + control	147 ± 13,0
TAU + control	93,8 ± 10,7
Control + MPTP	9,2 ± 2,2
TAU + MPTP	37,9 ± 7,4

*Los datos se representan como ng de DA/mg de proteína (media ± DE)

[0116] Se efectuó un segundo estudio que usaba MPTP (25 mg/kg i.p. dos veces al día durante 2 días). Se usaron ratones C57/BL6 macho de 6-9 meses de 30-40 g de peso de Taconic Farms en los estudios de MPTP (n= 6/grupo). Se administró MPTP (30 mg/kg i.p.) dos veces al día durante 2 días. Se administró TAU dos veces al día a 4 g/kg de peso corporal por vía oral en vehículo hidroxipropilmetilcelulosa al 0,75% en disolución de 200 mg de

TAU/ml 2 horas antes de la administración de toxina y hasta el día antes del sacrificio. Se administraron por vía oral TAU o vehículo (dosis de TAU 4 g/kg de peso corporal dos veces al día), empezando el día antes de la administración de MPTP y terminando el día 8. Se sacrificaron los ratones el día 9. Este estudio demostró también que la TAU mostraba efectos protectores sobre las neuronas dopaminérgicas, como se indica por una reducción atenuada de la pérdida de DA del cuerpo estriado debida al MPTP.

Efecto de la TAU sobre la reducción inducida por MPTP del contenido de DA del cuerpo estriado

[0117]

Tratamiento	DA del cuerpo estriado*
Control + control	71,0 ± 10,6
TAU + control	52,0 ± 3,0
Control + MPTP	15,9 ± 2,2
TAU + MPTP	26,7 ± 0,9
*Los datos se representan como ng de DA/mg de proteína (media ± EM)	

Ejemplo ilustrativo 8: Efecto terapéutico de la TAU en el modelo de ácido 3-nitropropiónico (3NP) de enfermedad de Huntington (EH)

[0118] La EH se caracteriza por una progresiva pérdida neuronal especialmente en el cuerpo estriado. Los pacientes con EH tienen una actividad reducida de la actividad succinato deshidrogenasa (complejo II)-ubiquinol oxidoreductasa (complejo III). Browne, "Mitochondria & Free Radicals in Neurodegenerative Diseases", 361-380 (1997). Un modelo ampliamente usado de EH emplea un inhibidor de succinato deshidrogenasa, el ácido 3-nitropropiónico (3NP). (Ferrante y col., "Mitochondria & Free Radicals in Neurodegenerative Diseases", 229-244, 1997). El 3NP induce daño en el cuerpo estriado en particular (Brouillet y col., *J. Neurochem.*, 60: 356-9, 1993).

[0119] Se trataron ratones macho Swiss de 6-8 meses (National Cancer Institute; NCI, Frederick, MD) con 3NP (65 mg/kg i.p.) diariamente durante 4 días para inducir la mortalidad, la pérdida de células neuronales y la alteración del comportamiento, con n= 8/grupo. Se administró TAU dos veces al día a 4g/kg de peso corporal por vía oral en vehículo hidroxipropilmetilcelulosa al 0,75% en 200 mg de TAU/ml a los ratones un día antes y cada día hasta el día 8. El día 9, se perfundieron los ratones fijados con formalina tamponada al 10% y se procesaron para tinción con plata para detectar el daño neuronal. Hubo una mortalidad reducida debida al 3NP en los ratones tratados con TAU en comparación con los controles como se muestra a continuación. No hubo mortalidad en el grupo de 3NP + TAU, pero murieron 3 de 8 ratones en el grupo de vehículo + 3NP.

[0120] La puntuación del comportamiento de los ratones tratados con 3NP era para determinar si había una alteración motora en algún punto durante el estudio. Hubo un 88% de ratones tratados con control + 3 NP con alteración del comportamiento indicada por una observación macroscópica. Se encontró una incidencia reducida de alteración de solo un 50% en los ratones tratados con TAU + 3NP.

[0121] Se analizó la tinción con plata por un patólogo con anonimato de la identidad de las muestras de tejido. No hubo signos claros de daño neuronal detectado en los ratones tratados con TAU + 3NP. Sin embargo, en los ratones tratados con control + 3NP, la tinción con plata de las terminales sinápticas en la zona del cuerpo estriado (área de núcleo caudado/putamen) y la sustancia negra era pronunciada. Se encontró también impregnación con plata de axones y/o terminaciones sinápticas en el tálamo, mesencéfalo profundo y/o formación reticular (médula) en un 80% de los ratones tratados con control + 3NP. LA sustancia negra se proyecta en el cuerpo estriado y estas áreas son especialmente vulnerables al daño por 3NP. El daño a la sustancia negra y cuerpo estriado se evitaba mediante TAU.

Ejemplo ilustrativo 9: Efecto terapéutico de la TAU en el modelo de ácido 3-nitropropiónico (3NP) de epilepsia

[0122] El ácido 3-nitropropiónico (3NP) es una toxina mitocondrial que actúa inhibiendo el complejo II de la cadena respiratoria; se usa para inducir lesiones cerebrales similares a las características de la enfermedad de Huntington. También pueden inducirse convulsiones por el uso de 3NP como modelo de epilepsia y disfunción mitocondrial. Urbanska y col., *Eur. J. Pharmacol.*, 359: 55-8 (1998). Se usaron ratones CD-1 macho (National Cancer Institute, NCI, Frederick, MD) de entre 26-40 g de peso. Se dividieron los ratones en grupos de 5 y se eligieron aleatoriamente los animales para cada grupo de diferentes jaulas para evitar una posible influencia de la edad. Se mantuvieron los ratones en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h con acceso libre al agua y alimento. Se efectuaron todos los experimentos durante el periodo de luz entre las 9:00 y las 16:00. Se administró a los ratones (n= 17-20) 3NP 160 mg/kg y se hizo seguimiento de las convulsiones. Se diluyó el 3NP a 16 mg o 18 mg/ml en agua estéril (pH: 7,4). Se administró 3NP i.p. en un volumen de 0,1 ml/10 g de peso corporal. Se administró TAU a 4 g/kg por vía oral en vehículo hidroxipropilmetilcelulosa al 0,75% 2 horas antes de la administración de 3NP. Se valoraron las convulsiones de forma similar a los procedimientos descritos anteriormente (Roberts & Keith, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 270: 505-11, 1994; Urbanska y col., *Eur. J. Pharmacol.*, 359: 55-8, 1998).

[0123] Se efectuaron las observaciones del comportamiento al cabo de 120 min después de la aplicación de 3NP. Se consideraron y registraron tres categorías principales de respuesta convulsiva:

1. Movimientos clónicos: movimientos de los miembros anteriores acompañados de fasciculación facial;
2. Movimientos clónicos explosivos: movimiento de los cuatro miembros implicando correr, saltar y botar;
3. Respuesta tónica: incluyendo flexión tónica y extensión tónica de los cuatro miembros.

La tasa de mortalidad se evaluó a los 120 min después de la inyección de 3NP.

[0124] El 3NP indujo principalmente convulsiones clónicas, prosiguiendo varios ratones con el desarrollo de un comportamiento de carrera y saltos que generalmente dio como resultado la muerte. La TAU redujo la incidencia porcentual de convulsión clónica, convulsión con carrera y mortalidad debida al 3NP. El criterio de valoración principal era la latencia de convulsión clónica. La TAU aumentó la latencia de convulsión clónica de 25,0 a 40,8 minutos. Los datos se representan como media $\pm$ EM.

<u>Criterio de valoración</u>	<u>Control + 3NP</u>	<u>TAU + 3NP</u>
% de convulsiones clónicas	90,0	70,6
% de convulsiones con carreras	42,9	5,9
% de mortalidad	35	11,8
Latencia de la convulsión clónica	23,8 $\pm$ 0,7	40,8 $\pm$ 4,9

Ejemplo ilustrativo 10: Efecto terapéutico de la TAU en el modelo de ácido quinolónico (AQ) de excitotoxicidad

[0125] El ácido quinolínico es un agonista de receptor de NMDA que se ha usado en modelos de enfermedad de Huntington y daño excitotóxico (Beal y col., *J. Neurosci.*, 11: 1649-59, 1991; Beal y col., *J. Neurosci.*, 11: 147-58, 1991; Ferrante y col., *Exp. Neurol.*, 119: 46-71, 1993). Puede inducir un daño grave en el SNC cuando se administra directamente en el cuerpo estriado. El daño y/o mortalidad debido al AQ intracuerpo estriado es probablemente debido a una etiología del SNC.

[0126] Se trataron ratones Swiss macho de 6-8 meses (National Cancer Institute; NCI, Frederick, MD) con AQ (50 o 100 nmoles administrados bilateralmente en ambos cuerpos estriados a $n = 8$ /grupo. Se administró TAU dos veces al día a 4 g/kg de peso corporal por vía oral en vehículo hidroxipropilmetilcelulosa al 0,75% en 200 mg de TAU/ml a los ratones un día antes y cada día hasta el día 6. El día 7 se sacrificaron los ratones. Se administró el AQ en un volumen de 2 μ l como se describe anteriormente (Tatter y col., *Neuroreport.*, 6: 1125-9, 1995).

[0127] Hubo una mortalidad reducida debida al AQ en los ratones tratados con TAU. El porcentaje de ratones supervivientes a los 7 días tratados con 50 nmoles de AQ fue de un 64% en control + AQ y de 73% en TAU + AQ, y para ratones tratados con 100 nmoles de AQ, solo un 4% sobrevivieron en el grupo de control + AQ, mientras que sobrevivió un 19% en el grupo de TAU + AQ. La TAU demostró un efecto neuroprotector sobre la excitotoxicidad debida al AQ.

[0128] Aunque la presente invención se ha descrito en términos de realizaciones preferidas, se entiende que se les ocurrirán variaciones y modificaciones a los especialistas en la materia. Por lo tanto, se pretende que las reivindicaciones adjuntas cubran todas dichas variaciones y modificaciones equivalentes que entran dentro del alcance de la invención según se reivindica.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un precursor de nucleótido pirimidínico para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir las consecuencias fisiopatológicas de una disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial en un mamífero, en el que dicha disfunción en la cadena respiratoria está causada por la administración de agentes quimioterapéuticos del cáncer citotóxicos a dicho mamífero; en el que dicho precursor de nucleótido de pirimidina se selecciona del grupo consistente en uridina, citidina, un derivado acilo de uridina, un derivado acilo de citidina, ácido orótico, un éster de alcohol de ácido orótico o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho medicamento se formula para proporcionar de 0,05 a 0,3 gramos de dicho precursor por kilogramo de peso corporal al día.
3. Uso como en la reivindicación 1, en el que dicho precursor de nucleótido pirimidínico es un derivado de acilo de citidina.
4. Uso como en la reivindicación 1, en el que dicho precursor de nucleótido de pirimidina es un derivado de acilo de uridina.
5. Uso como en la reivindicación 1, en el que dicho derivado de acilo de uridina es 2',3',5'-tri-O-acetiluridina.
6. Uso como en la reivindicación 1, en el que dicho derivado de acilo de uridina es 2',3',5'-tri-O-piruviluridina.
7. Uso como en la reivindicación 1, en el que el sustituyente alcohol de dicho éster de alcohol de ácido orótico es etanol.
8. Uso como en la reivindicación 1, en el que dicho precursor de nucleótido pirimidínico es difosfocolina de citidina.
9. Uso como en la reivindicación 1, en el que dicho medicamento se formula para administración oral.
10. Uso como en la reivindicación 1, en el que dicho medicamento se formula para proporcionar una dosis de 100 a 300 miligramos de dicho precursor por kilogramo de peso corporal al día.
11. Un compuesto seleccionado del grupo consistente en 2',3',5'-tri-O-piruviluridina, 2',3'-di-O-piruviluridina, 2',5'-di-O-piruviluridina, 3',5'-di-O-piruviluridina, 2'-O-piruviluridina, 3'-O-piruviluridina y 5'-O-piruviluridina.
12. Uso de un precursor de nucleótido de pirimidina para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad mitocondrial congénita seleccionada del grupo consistente en MELAS, LHON, MERRF, MNGIE, NARP, PEO, enfermedad de Leigh y síndrome de Keams-Sayres en un mamífero, en el que dicho precursor de nucleótido pirimidínico se selecciona del grupo consistente en uridina, citidina, un derivado acilo de uridina, un derivado acilo de citidina, ácido orótico, un éster de alcohol de ácido orótico o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
13. Uso como en la reivindicación 12, en el que dicho precursor de nucleótido pirimidínico es 2',3',5'-tri-O-acetiluridina.