(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 541 769**

(51) Int. CI.:

C07F 9/54 (2006.01)
A61K 33/42 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2004 E 04775122 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 1664069**

(54) Título: **Derivados de mitoquinona usados como antioxidantes dirigidos a las mitocondrias**

(30) Prioridad:

22.08.2003 NZ 52780003
23.10.2003 NZ 52915303
14.06.2004 NZ 53355604

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.07.2015

(73) Titular/es:

ANTIPODEAN PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
Level 2, 16 Viaduct Harbour Ave. P.O. Box 1671
Auckland 1140, NZ

(72) Inventor/es:

TAYLOR, KENNETH MARTIN y
SMITH, ROBIN

(74) Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

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

Derivados de mitoquinona usados como antioxidantes dirigidos a las mitocondrias

Campo de la invención

[0001] La invención se refiere a compuestos antioxidantes anfifílicos que tienen un grupo catiónico lipófilo y a la síntesis, la formulación y las propiedades fisicoquímicas de dichos compuestos que favorecen su uso como, por ejemplo, productos farmacéuticos.

Antecedentes

[0002] El estrés oxidativo contribuye a diversas enfermedades degenerativas humanas asociadas con el envejecimiento, tales como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer, así como la corea de Huntington y la ataxia de Friedreich y a daños inespecíficos que se acumulan con el envejecimiento. También contribuye a la inflamación y a lesiones tisulares por reperfusión isquémica en la apoplejía y en el infarto de miocardio y también durante el trasplante de órganos y las cirugías. Para prevenir los daños causados por el estrés oxidativo se han desarrollado varias terapias. Sin embargo, la mayoría de éstas no están dirigidas a las células y por lo tanto son menos que óptimamente eficaces. Además, muchos de dichos antioxidantes tienen unas propiedades fisicoquímicas desfavorables que limitan, por ejemplo, su biodisponibilidad y su capacidad para penetrar en el órgano objetivo para ejercer un efecto terapéutico.

[0003] Las mitocondrias son orgánulos intracelulares responsables del metabolismo energético. Consecuentemente, los defectos mitocondriales son perjudiciales, particularmente para los tejidos neuronales y musculares, que tienen una elevada demanda de energía. También son la principal fuente de radicales libres y de especies de oxígeno reactivas que pueden provocar un estrés oxidativo dentro de la mayoría de las células. Por lo tanto, los solicitantes creen que la administración selectiva de antioxidantes en la mitocondria será más eficaz que el uso de antioxidantes no dirigidos. Consecuentemente, la presente invención está dirigida a la provisión de antioxidantes que pueden ser dirigidos a las mitocondrias.

[0004] Los cationes lipófilos pueden acumularse en la matriz mitocondrial debido a su carga positiva (Rottenberg, 1979 Methods Enzymol 55, 547. Chen, 1988 Ann Rev Cell Biol 4, 155). Dichos iones se acumulan porque son lo suficientemente lipófilos como para ocultar la carga positiva o deslocalizarla en una gran área superficial, también con la condición de que no haya una ruta de salida activa y que el catión no sea metabolizado o inmediatamente tóxico para una célula.

[0005] El foco de la invención está por lo tanto en una metodología mediante la cual es posible el uso de la capacidad de la mitocondria para concentrar cationes lipófilos específicos para captar los antioxidantes unidos, de forma que el antioxidante se dirija hacia la principal fuente de radicales libres y de especies de oxígeno reactivas que provocan el estrés oxidativo.

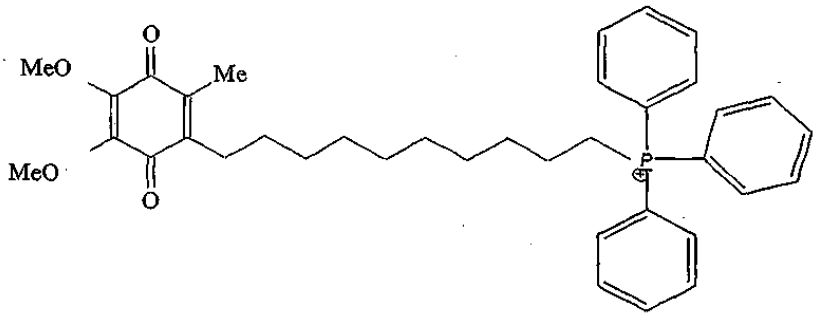
[0006] Algunos ejemplos de compuestos antioxidantes que muestran una buena actividad antioxidante *in vivo* y que también muestran una baja funcionalidad antioxidante con respecto al compartimento objetivo *in vivo* incluyen la Coenzima Q (CoQ) y la Idebenona. Estos dos compuestos tienen una baja biodisponibilidad y deben ser administrados a unas tasas de dosis muy altas para ser eficaces, y por lo tanto tienen una baja eficacia terapéutica cuando se relaciona con la tasa de dosis administrada.

[0007] Sin desear ceñirnos a ninguna teoría, creemos que para un compuesto antioxidante, la actividad *in vitro* o *ex vivo* (tal como, por ejemplo, la actividad antioxidante o la acumulación mitocondrial) no es en modo alguno el único determinante de la funcionalidad antioxidante ni/o de la eficacia *in vivo* (tal como, por ejemplo, la eficacia terapéutica). Aunque es cierto que para ser útil como compuesto antioxidante dirigido a las mitocondrias de la presente invención, un compuesto antioxidante debe mostrar una actividad antioxidante adecuada *in vitro* o *ex vivo*, para ser eficaz *in vivo*, el compuesto antioxidante dirigido a las mitocondrias debe mostrar otras propiedades fisicoquímicas deseables, tales como, por ejemplo, una biodisponibilidad adecuada, una localización o una distribución adecuadas en la mitocondria objetivo y/o una estabilidad adecuada.

[0008] Sin desear ceñirnos a ninguna teoría, creemos que los compuestos antioxidantes dirigidos a las mitocondrias de la presente invención muestran una funcionalidad antioxidante ventajosa, incluyendo una biodisponibilidad y/o un direccionamiento mitocondrial y una acumulación *in vivo* al menos en parte en virtud de sus

propiedades fisicoquímicas, tales como, por ejemplo, su anfifilia, su estructura física y/o su tamaño y/o su entre baja y moderada hidrofobicidad y/o su coeficiente de partición. Dichos compuestos son por lo tanto terapéuticamente eficaces a unas bajas tasas de dosificación en comparación con otros compuestos antioxidantes.

[0009] En la Patente de EE.UU. Nº 6331532, con referencia a ejemplos de los compuestos de mitoquinol y de mitoquinona (denominados conjuntamente en el presente documento mitoquinona / mitoquinol) se divulga la posibilidad de un direccionamiento mitocondrial de una fracción antioxidante dependiente de un catión lipófilo acoplado covalentemente a la fracción antioxidante. El compuesto ejemplificado en ese documento (a pesar de la generalización de la longitud del puente), es el compuesto de mitoquinona de la fórmula



con una longitud del puente de carbono de 10 (es decir, con un puente C10). Su forma reducida, el mitoquinol, también tiene un puente C10.

[0010] Hemos averiguado que la mitoquinona / mitoquinol, a pesar de su excelente actividad antioxidante y direccionamiento y de su acumulación en la mitocondria *in vitro* e *in vivo*, son algo inestables en forma de la sal de bromuro. También hemos averiguado que las propiedades fisicoquímicas de la mitoquinona / mitoquinol, según se divulga en la Patente de EE.UU. Nº 6.331.532, son menos apropiadas para una formulación farmacéutica, por ejemplo, cuando la administración va a ser por vía oral o parenteral y/o cuando existe un direccionamiento del compuesto a las mitocondrias de tejidos de órganos internos (por ejemplo, cerebro, corazón, hígado u otros órganos).

[0011] Algunos ejemplos de los compuestos de la presente invención son adecuados para su formulación farmacéutica. Pueden estar en una forma distinta a una forma cristalina y/o sólida, pero son susceptibles de formar una forma sólida mediante su mezcla con otros agentes, tales como, por ejemplo, portadores, excipientes, agentes de complejación u otros aditivos y similares, tales como, por ejemplo, las ciclodextrinas. Ventajosamente, dichos agentes son farmacéuticamente aceptables.

[0012] Hemos estimado la conveniencia de ofrecer ejemplos de los compuestos anfifílicos antioxidantes dirigidos a las mitocondrias de la presente invención con su carga positiva asociada con un anión adecuado, para proporcionar así el compuesto en forma de una sal neutralizada general, que incluye productos sólidos o cristalinos. En dichas formas salinas hemos averiguado, sin embargo, que es mejor evitar ciertos aniones formadores de sales ya que muestran reactividad frente al compuesto antioxidante, por ejemplo, frente a la fracción antioxidante, frente a la fracción de conexión o frente a la fracción catiónica lipófila y/o pueden dar lugar a la escisión en o de la fracción antioxidante. Otros aniones formadores de sales se consideran farmacéuticamente indeseables. Por ejemplo, las fracciones de nitrato generalmente se consideran inapropiadas por las compañías farmacéuticas por ser farmacéuticamente o medioambientalmente inaceptables, mientras que hemos averiguado que el bromuro de hidrógeno usado frecuentemente en la formación de las sales de dichos compuestos tienen unas propiedades nucleófilas que pueden dar lugar a una reactividad frente a la fracción antioxidante, por ejemplo, a una escisión de un grupo metilo de la fracción antioxidante del compuesto de fórmula general (II) del presente documento y/o a una cierta disminución global en la estabilidad del compuesto global. Por ejemplo, hemos determinado que la sal de bromuro de la mitoquinona es algo inestable.

[0013] Por lo tanto creemos que las formas salinas, incluyendo las formas salinas tales como una forma líquida, sólida o cristalina, de los antioxidantes dirigidos a las mitocondrias, se asocian mejor con un anión o con una fracción similar que no sea nucleófila y/o con una que no muestre reactividad frente a cualquiera de las fracciones que comprende el compuesto o el complejo antioxidante. También es preferible que el anión sea farmacéuticamente aceptable.

Objeto de la invención

[0014] Consecuentemente, es un objeto de la presente invención proporcionar compuestos y composiciones antioxidantes anfifílicos farmacéuticamente aceptables, formas de dosificación y métodos dependientes de dichos compuestos que, por ejemplo, son útiles en el tratamiento de enfermedades o de afecciones asociadas al estrés oxidativo, o proporcionar al público una elección útil.

Resumen de la invención

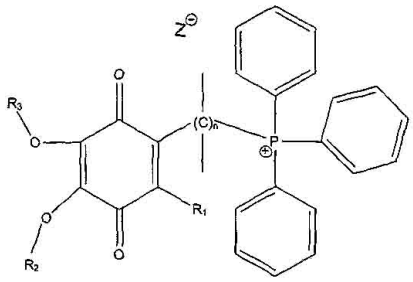
[0015] La invención se refiere a compuestos antioxidantes según se definen en las reivindicaciones.

[0016] En un primer aspecto, la presente invención consiste en un compuesto que comprende una fracción catiónica lipófila unida por una fracción de conexión a una fracción antioxidante, y un complemento aniónico para dicha fracción catiónica, en el que la especie catiónica es capaz de dirigir hacia la mitocondria a la especie antioxidante, y la forma salina es químicamente estable y/o el complemento aniónico no muestra reactividad frente a la fracción antioxidante, la fracción catiónica o la fracción de conexión.

[0017] En una forma de realización la fracción antioxidante es una quinona o un quinol.

[0018] En una forma de realización, la fracción catiónica lipófila es un catión trifenilfosfonio sustituido o no sustituido.

[0019] En una forma de realización el compuesto tiene la fórmula general I



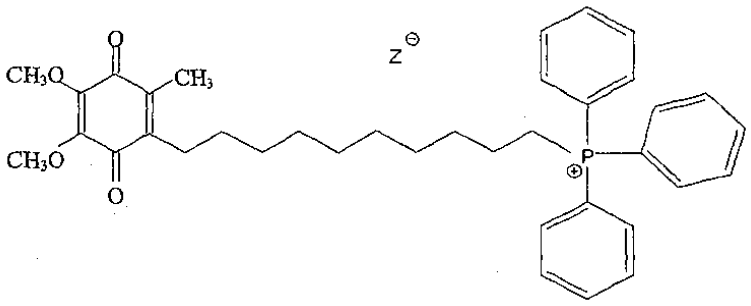
I

y/o su forma de quinol, en la que R_1, R_2 y R_3, que pueden ser iguales o diferentes, se eligen de entre fracciones alquilo C_1 hasta C_5 (opcionalmente sustituidas) o H, y en la que n es un número entero desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 20, y en la que Z es un anión no reactivo.

[0020] Preferiblemente Z se elige de entre el grupo que consiste en sulfonatos de alquilo o de arilo.

[0021] Preferiblemente cada uno de los C del puente de (C)n está saturado.

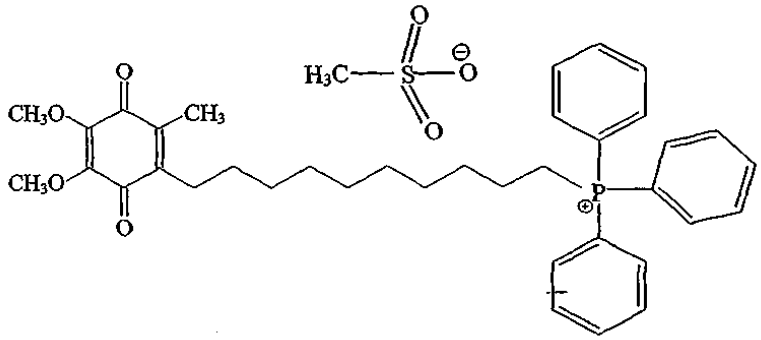
[0022] En una forma de realización preferida, el compuesto tiene la fórmula



II

y/o su forma de quinol, en la que Z es un anión no nucleófilo.

[0023] Más preferiblemente, el compuesto tiene la fórmula



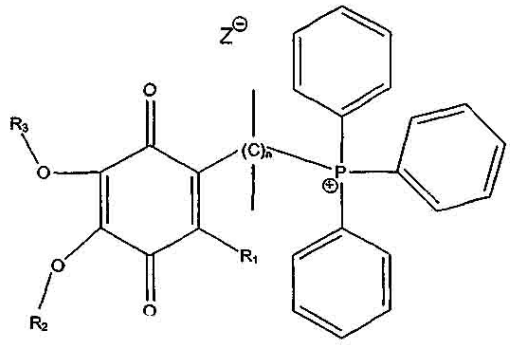
(III)

[0024] En otro aspecto la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende o que incluye un compuesto que comprende una fracción catiónica lipófila unida por una fracción de conexión a una fracción antioxidante, y un complemento aniónico para dicha fracción catiónica, en la que la especie catiónica es capaz de dirigir hacia la mitocondria a la especie antioxidante, y la forma salina es químicamente estable y/o el complemento aniónico no muestra reactividad frente a la fracción antioxidante, la fracción catiónica o la fracción de conexión.

[0025] En una forma de realización la fracción antioxidante es una quinona o un quinol.

[0026] En una forma de realización, la fracción catiónica lipófila es un catión trifenilfosfonio sustituido o no sustituido.

[0027] En una forma de realización el compuesto tiene la fórmula general I



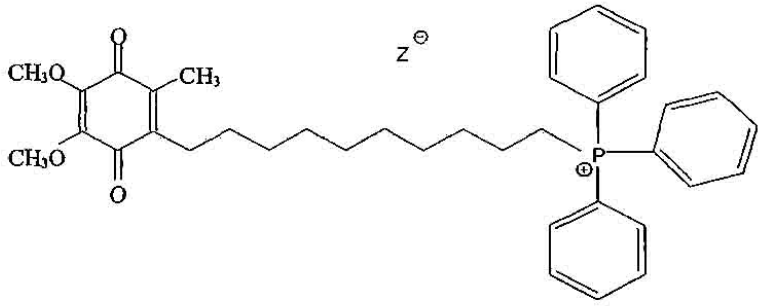
I

y/o su forma de quinol, en la que R_1, R_2 y R_3, que pueden ser iguales o diferentes, se eligen de entre fracciones alquilo C_1 hasta C_5 (opcionalmente sustituidas) o H, y en la que n es un número entero desde aproximadamente 2 hasta 20, y en la que Z es un anión no reactivo.

[0028] Preferiblemente Z se elige de entre el grupo que consiste en sulfonatos de alquilo o de arilo.

[0029] Preferiblemente cada uno de los C del puente de (C)n está saturado.

[0030] En una forma de realización adicional, el compuesto tiene la fórmula



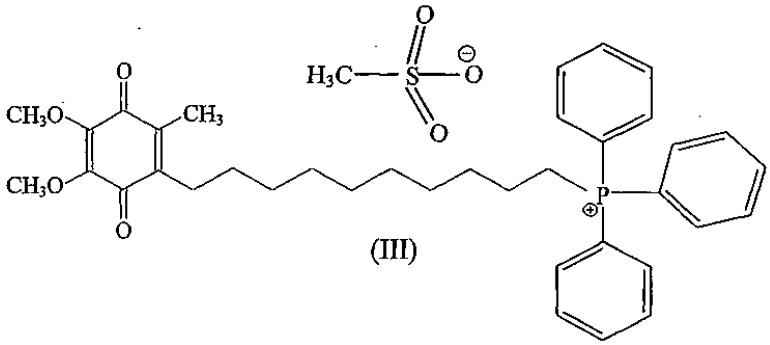
II

y/o su forma de quinol, en la que Z es un anión no nucleófilo.

[0031] En una forma de realización adicional la composición comprende un compuesto que tiene la fórmula II y/o su forma de quinol, en la que Z es un anión no nucleófilo, y en la que la composición comprende ciclodextrina.

[0032] En varios ejemplos, la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es desde aproximadamente 10:1 hasta aproximadamente 1:10, desde aproximadamente 5:1 hasta aproximadamente 1:5, desde aproximadamente 4:1 hasta aproximadamente 1:4, desde aproximadamente 2:1 hasta aproximadamente 1:2 o de aproximadamente 1:1, por ejemplo, la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es de aproximadamente 1:2.

[0033] Más preferiblemente, la composición comprende un compuesto que tiene la fórmula



(III)

en la que la ciclodextrina es la β-ciclodextrina, más preferiblemente la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es de aproximadamente 1:2.

[0034] En una forma de realización la composición farmacéutica está formulada para su administración oral.

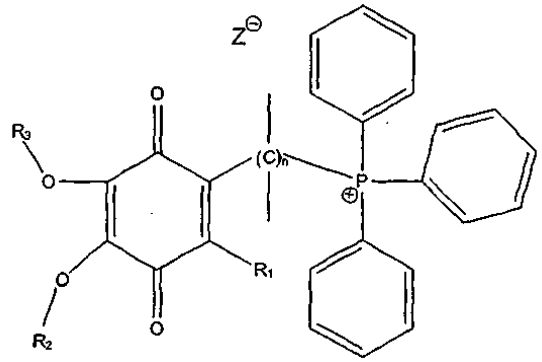
[0035] En una forma de realización adicional la composición farmacéutica está formulada para su administración parenteral.

[0036] En un aspecto más la presente invención proporciona una unidad de dosificación que comprende o que incluye un compuesto que comprende una fracción catiónica lipófila unida por una fracción de conexión a una fracción antioxidante, y un complemento aniónico para dicha fracción catiónica, en la que la especie catiónica es capaz de dirigir hacia la mitocondria a la especie antioxidante, y la forma salina es químicamente estable y/o el complemento aniónico no muestra reactividad frente a la fracción antioxidante, la fracción catiónica o la fracción de conexión, junto con cualquier diluyente y/o portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0037] En una forma de realización la fracción antioxidante es una quinona o un quinol.

[0038] En una forma de realización, la fracción catiónica lipófila es un catión trifenilfosfonio sustituido o no sustituido.

[0039] En una forma de realización el compuesto tiene la fórmula general I



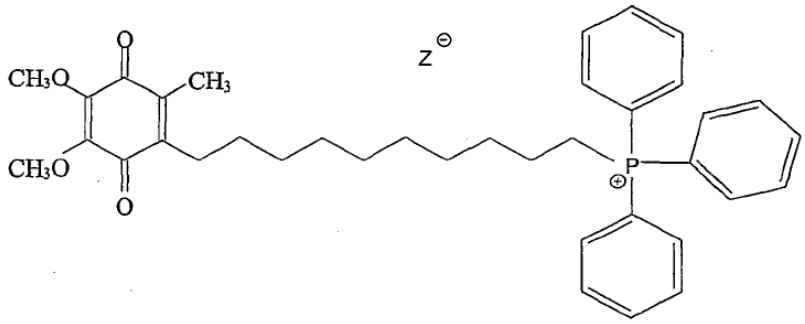
I

y/o su forma de quinol, en la que R_1, R_2 y R_3, que pueden ser iguales o diferentes, se eligen de entre fracciones alquilo C_1 hasta C_5 (opcionalmente sustituidas) o H, y en la que n es un número entero desde aproximadamente 2 hasta 20, y en la que Z es un anión no reactivo.

[0040] Preferiblemente Z se elige de entre el grupo que consiste en sulfonatos de alquilo o de arilo.

[0041] Preferiblemente cada uno de los C del puente de (C)n está saturado.

[0042] En una forma de realización adicional, el compuesto tiene la fórmula y/o su forma de quinol, en la que Z es un anión no nucleófilo.

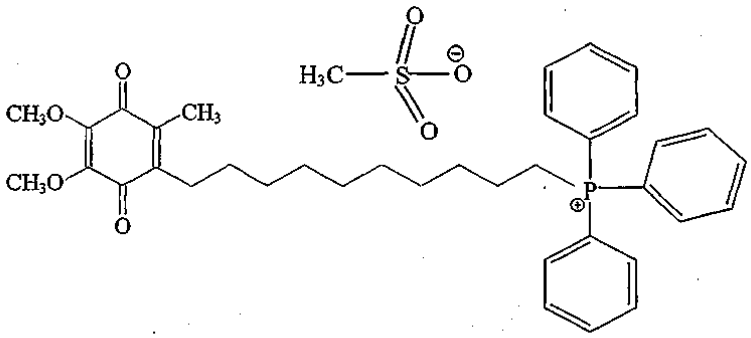


II

[0043] En una forma de realización adicional la unidad de dosificación comprende un compuesto que tiene la fórmula II y/o su forma de quinol, en la que Z es un anión no nucleófilo, y en la que la composición comprende ciclodextrina.

[0044] En varios ejemplos la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es desde aproximadamente 10:1 hasta aproximadamente 1:10, desde aproximadamente 5:1 hasta aproximadamente 1:5, desde aproximadamente 4:1 hasta aproximadamente 1:4, desde aproximadamente 2:1 hasta aproximadamente 1:2 o de aproximadamente 1:1, por ejemplo, la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es de aproximadamente 1:2.

[0045] Más preferiblemente, la unidad de dosificación comprende un compuesto que tiene la fórmula



(III)

en la que la ciclodextrina es la β-ciclodextrina, más preferiblemente la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es de aproximadamente 1:2.

[0046] En una forma de realización la unidad de dosificación es adecuada para su administración oral.

[0047] En una forma de realización adicional la unidad de dosificación es adecuada para su administración parenteral.

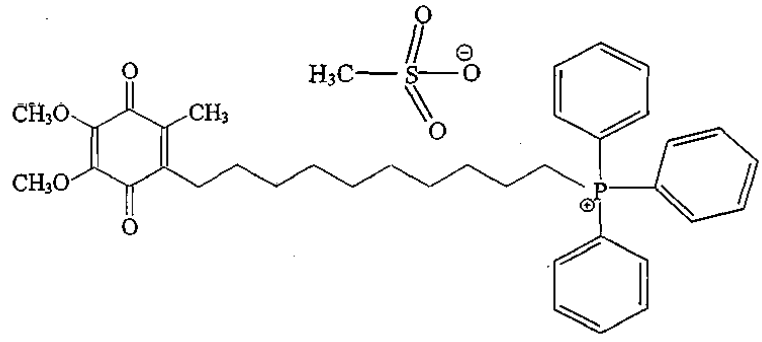
[0048] En un aspecto más la presente invención proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, una composición o una forma de dosificación de la presente invención para su uso en la profilaxis o el tratamiento del estrés oxidativo en un mamífero mediante la administración del compuesto o de la sal del mismo a dicho mamífero.

[0049] En una forma de realización, el compuesto es un compuesto de fórmula II o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0050] En otra forma de realización, dicha administración es en el primer día a una dosis de desde aproximadamente 1,02 hasta aproximadamente 2,0 veces la dosis diaria de mantenimiento, seguida de la administración del compuesto o de la sal del mismo a la dosis diaria de mantenimiento durante los días posteriores.

[0051] Preferiblemente la sal es la de metansulfonato y el compuesto se combina con ciclodextrina.

[0052] Más preferiblemente el compuesto tiene la fórmula



(III).

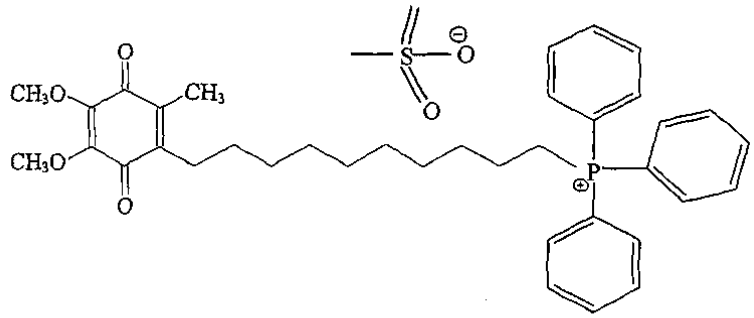
[0053] Preferiblemente, la ciclodextrina es la β-ciclodextrina, más preferiblemente la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es de aproximadamente 1:2.

[0054] En un aspecto más la presente invención proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, una composición o una forma de dosificación de la presente invención para su uso en la

profilaxis o el tratamiento de los síntomas del envejecimiento en un mamífero mediante la administración del compuesto o de la sal del mismo a dicho mamífero.

[0055] En una forma de realización, el compuesto es un compuesto de fórmula II o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

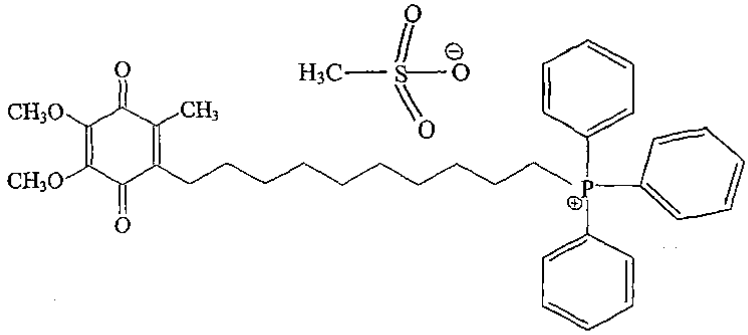
[0056] En otra forma de realización, dicha administración es en el primer día a una dosis de desde aproximadamente 1,02 hasta aproximadamente 2,0 veces la dosis diaria de mantenimiento, seguida de la administración del compuesto o de la sal del mismo a la dosis diaria de mantenimiento durante los días posteriores.



(III).

[0057] Preferiblemente la sal es la de metansulfonato y el compuesto se combina con ciclodextrina.

[0058] Más preferiblemente el compuesto tiene la fórmula



(III).

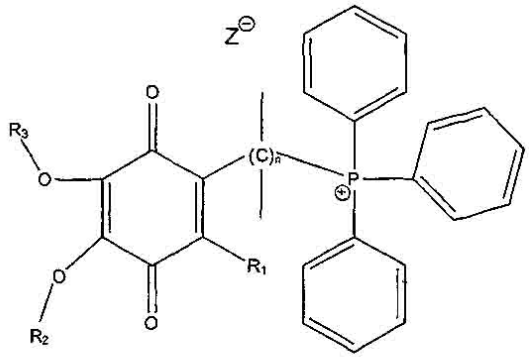
[0059] Preferiblemente, la ciclodextrina es la β-ciclodextrina, más preferiblemente la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es de aproximadamente 1:2.

[0060] En un aspecto adicional, la presente invención consiste en un compuesto estable que comprende una fracción catiónica lipófila unida por una fracción de conexión a una fracción antioxidante, y un complemento aniónico para dicha fracción catiónica, en el que
la especie catiónica es capaz de dirigir hacia la mitocondria a la especie antioxidante, y
el complemento aniónico no es un ión halógeno, y
el complemento aniónico no es nucleófilo y/o
el complemento aniónico no muestra reactividad frente a la fracción catiónica, la fracción de conexión o la fracción antioxidante.

[0061] En una forma de realización la fracción antioxidante es una quinona o un quinol.

[0062] En una forma de realización, la fracción catiónica lipófila es un catión trifenilfosfonio sustituido o no sustituido.

[0063] En una forma de realización el compuesto tiene la fórmula general I



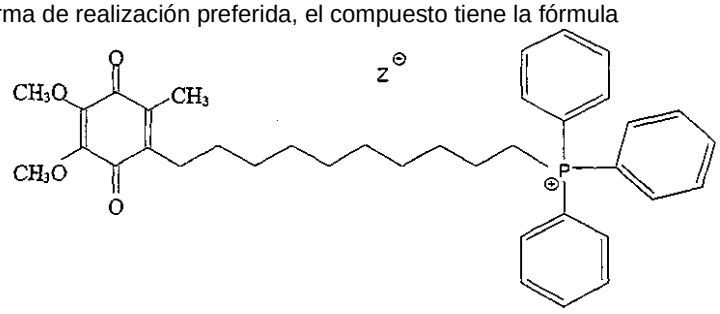
I

y/o su forma de quinol, en la que R_1, R_2 y R_3, que pueden ser iguales o diferentes, se eligen de entre fracciones alquilo C_1 hasta C_5 (opcionalmente sustituidas) o H, y en la que n es un número entero de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 20, y en la que Z es un anión no reactivo.

[0064] Preferiblemente Z se elige de entre el grupo que consiste en sulfonatos de alquilo o de arilo.

[0065] Preferiblemente cada uno de los C del puente de (C)n está saturado.

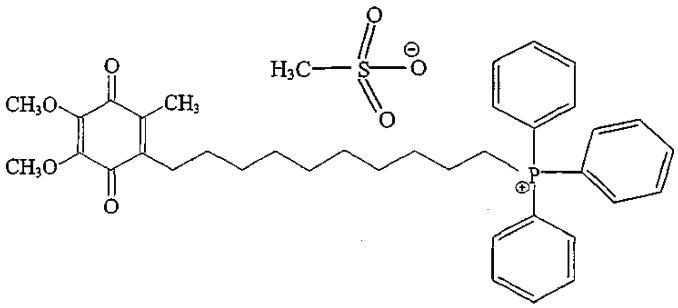
[0066] En una forma de realización preferida, el compuesto tiene la fórmula



II

y/o su forma de quinol, en la que Z es un anión no nucleófilo.

[0067] Más preferiblemente, el compuesto tiene la fórmula



(III).

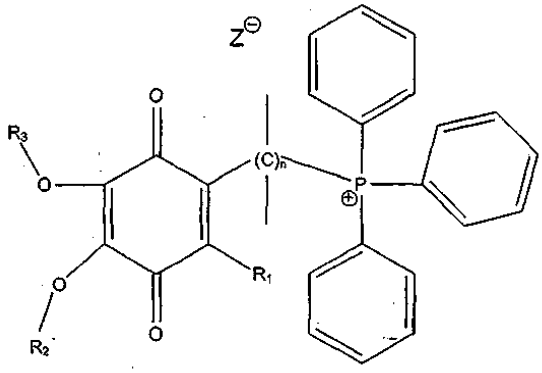
[0068] En otro aspecto la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende o que incluye un compuesto estable que comprende una especie catiónica que es una fracción catiónica lipófila unida por una fracción de conexión a una fracción antioxidante, y un complemento aniónico para dicha fracción catiónica, en el que

la especie catiónica es capaz de dirigir hacia la mitocondria a la especie antioxidante, y
el complemento aniónico no es un ión halógeno, y el complemento aniónico no es nucleófilo y/o
el complemento aniónico no muestra reactividad frente a la fracción catiónica, la fracción de conexión o la fracción antioxidante.

[0069] En una forma de realización la fracción antioxidante es una quinona o un quinol.

[0070] En una forma de realización, la fracción catiónica lipófila es un catión trifenilfosfonio sustituido o no sustituido.

[0071] En una forma de realización el compuesto tiene la fórmula general I



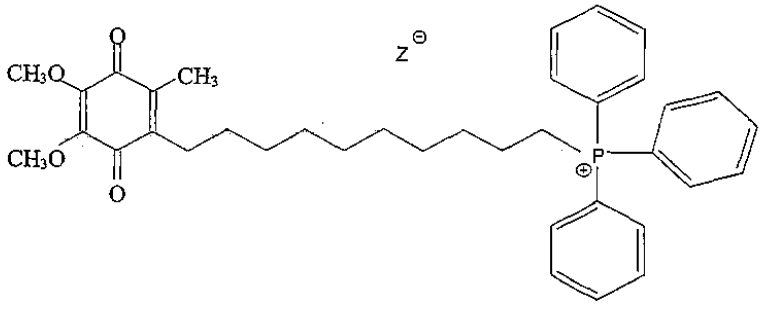
I

y/o su forma de quinol, en la que R_1, R_2 y R_3, que pueden ser iguales o diferentes, se eligen de entre fracciones alquilo C_1 hasta C_5 (opcionalmente sustituidas) o H, y en la que n es un número entero desde aproximadamente 2 hasta 20, y en la que Z es un anión no reactivo.

[0072] Preferiblemente Z se elige de entre el grupo que consiste en sulfonatos de alquilo o de arilo.

[0073] Preferiblemente cada uno de los C del puente de (C)n está saturado.

[0074] En una forma de realización adicional, el compuesto tiene la fórmula



II

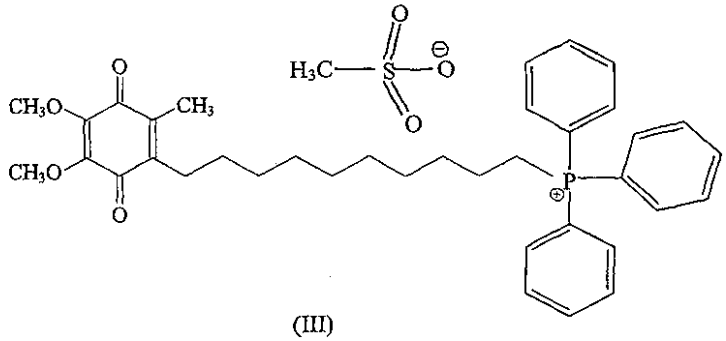
y/o su forma de quinol, en la que Z es un anión no nucleófilo.

[0075] En una forma de realización adicional la composición comprende un compuesto que tiene la fórmula II y/o su forma de quinol, en la que Z es un anión no nucleófilo, y en la que la composición comprende ciclodextrina.

[0076] En varios ejemplos la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es desde aproximadamente 10:1 hasta aproximadamente 1:10, desde aproximadamente 5:1 hasta aproximadamente 1:5, desde aproximadamente 4:1 hasta aproximadamente 1:4, desde aproximadamente 2:1 hasta aproximadamente 1:2 o de aproximadamente 1:1, por ejemplo, la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es de

aproximadamente 1:2.

[0077] Más preferiblemente, la composición comprende un compuesto que tiene la fórmula



(III)

en la que la ciclodextrina es la β-ciclodextrina, más preferiblemente la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es de aproximadamente 1:2.

[0078] En una forma de realización la composición farmacéutica está formulada para su administración oral.

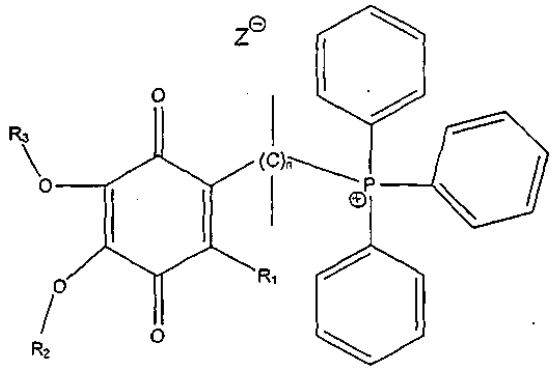
[0079] En una forma de realización adicional la composición farmacéutica está formulada para su administración parenteral.

[0080] En un aspecto más la presente invención consiste en una unidad de dosificación que comprende o que incluye un compuesto estable que comprende una fracción catiónica lipófila unida por una fracción de conexión a una fracción antioxidante, y un complemento aniónico para dicha fracción catiónica, junto con cualquier diluyente y/o portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que
la especie catiónica es capaz de dirigir hacia la mitocondria a la especie antioxidante, y
el complemento aniónico no es un ión halógeno, y el complemento aniónico no es nucleófilo y/o
el complemento aniónico no muestra reactividad frente a la fracción catiónica, la fracción de conexión o la fracción antioxidante.

[0081] En una forma de realización la fracción antioxidante es una quinona o un quinol.

[0082] En una forma de realización, la fracción catiónica lipófila es un catión trifenilfosfonio sustituido o no sustituido.

[0083] En una forma de realización el compuesto tiene la fórmula general I



I

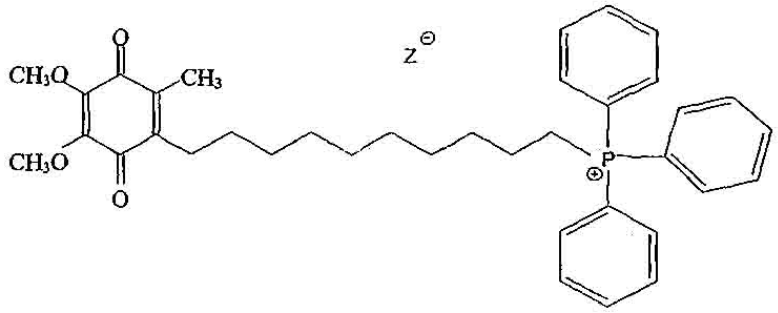
y/o su forma de quinol, en la que R_1, R_2 y R_3, que pueden ser iguales o diferentes, se eligen de entre fracciones alquilo C_1 hasta C_5 (opcionalmente sustituidas) o H, y en la que n es un número entero desde aproximadamente 2

hasta 20, y en la que Z es un anión no reactivo.

[0084] Preferiblemente Z se elige de entre el grupo que consiste en sulfonatos de alquilo o de arilo.

[0085] Preferiblemente cada uno de los C del puente de (C)n está saturado.

[0086] En una forma de realización adicional, el compuesto tiene la fórmula



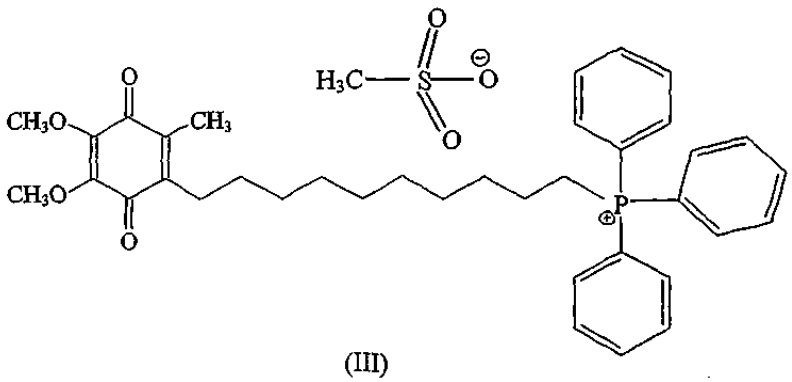
II

y/o su forma de quinol, en la que Z es un anión no nucleófilo.

[0087] En una forma de realización adicional la unidad de dosificación comprende un compuesto que tiene la fórmula II y/o su forma de quinol, en la que Z es un anión no nucleófilo, y en la que la composición comprende ciclodextrina.

[0088] En varios ejemplos la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es desde aproximadamente 10:1 hasta aproximadamente 1:10, desde aproximadamente 5:1 hasta aproximadamente 1:5, desde aproximadamente 4:1 hasta aproximadamente 1:4, desde aproximadamente 2:1 hasta aproximadamente 1:2 o de aproximadamente 1:1, por ejemplo, la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es de aproximadamente 1:2.

[0089] Más preferiblemente, la unidad de dosificación comprende un compuesto que tiene la fórmula



(III)

en la que la ciclodextrina es la β-ciclodextrina, más preferiblemente la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es de aproximadamente 1:2.

[0090] En una forma de realización la unidad de dosificación es adecuada para su administración oral.

[0091] En una forma de realización adicional la unidad de dosificación es adecuada para su administración parenteral.

[0092] En un aspecto adicional, la presente invención consiste en una unidad de dosificación adecuada para su administración oral que comprende como principio activo un compuesto de acuerdo con la presente invención, siendo el compuesto o estando formulado como una forma cristalina y/o una forma no líquida.

[0093] En un aspecto adicional, la presente invención consiste en una unidad de dosificación adecuada para su administración parenteral que comprende como principio activo un compuesto de acuerdo con la presente invención.

[0094] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica adecuada para el tratamiento de un paciente que se beneficiaría de una reducción en el estrés oxidativo o de una reducción en los síntomas del envejecimiento que comprende o que incluye una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención junto con uno o más portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

[0095] En una forma de realización el compuesto es un compuesto de fórmula I.

[0096] En un ejemplo, el compuesto está complejado con ciclodextrina.

[0097] En varios ejemplos la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es desde aproximadamente 10:1 hasta aproximadamente 1:10, desde aproximadamente 5:1 hasta aproximadamente 1:5, desde aproximadamente 4:1 hasta aproximadamente 1:4, desde aproximadamente 2:1 hasta aproximadamente 1:2 o de aproximadamente 1:1, por ejemplo, la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es de aproximadamente 1:2.

[0098] Más preferiblemente, el compuesto es un compuesto de fórmula (III) y la ciclodextrina es la β-ciclodextrina, más preferiblemente y la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es de aproximadamente 1:2.

[0099] En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para reducir el estrés oxidativo en una célula que comprende la etapa de poner en contacto dicha célula con un compuesto de la presente invención.

[0100] En una forma de realización el compuesto es un compuesto de fórmula I.

[0101] En un ejemplo, el compuesto está complejado con ciclodextrina.

[0102] En varios ejemplos la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es desde aproximadamente 10:1 hasta aproximadamente 1:10, desde aproximadamente 5:1 hasta aproximadamente 1:5, desde aproximadamente 4:1 hasta aproximadamente 1:4, desde aproximadamente 2:1 hasta aproximadamente 1:2 o de aproximadamente 1:1, por ejemplo, la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es de aproximadamente 1:2.

[0103] Más preferiblemente, el compuesto es un compuesto de fórmula (III) y la ciclodextrina es la β-ciclodextrina, más preferiblemente y la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es de aproximadamente 1:2.

[0104] En una forma de realización la composición farmacéutica está formulada para su administración oral.

[0105] En una forma de realización adicional la composición farmacéutica está formulada para su administración parenteral.

[0106] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica adecuada para el tratamiento de un paciente que padece o que está predispuesto a padecer enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, corea de Huntington o ataxia de Friedreich, que comprende o que incluye una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención junto con uno o más portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

[0107] Preferiblemente dicho tratamiento es el de un paciente que padece o que está predispuesto a padecer ataxia de Friedreich.

[0108] En un aspecto adicional más, la invención proporciona compuestos para su uso en un método de terapia o de profilaxis de un paciente que se beneficiaría de una reducción en el estrés oxidativo que comprende o que incluye la etapa de la administración a dicho paciente de un compuesto de la presente invención.

[0109] En una forma de realización el compuesto es un compuesto de fórmula I.

[0110] En un ejemplo, el compuesto está complejado con ciclodextrina.

[0111] En varios ejemplos la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es desde aproximadamente 10:1 hasta aproximadamente 1:10, desde aproximadamente 5:1 hasta aproximadamente 1:5, desde aproximadamente 4:1 hasta aproximadamente 1:4, desde aproximadamente 2:1 hasta aproximadamente 1:2 o de aproximadamente 1:1, por ejemplo, la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es de aproximadamente 1:2.

[0112] Más preferiblemente, el compuesto es un compuesto de fórmula (III) y la ciclodextrina es la β-ciclodextrina, más preferiblemente y la proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina es de aproximadamente 1:2.

[0113] En una forma de realización dicha administración es una administración oral.

[0114] En otra forma de realización dicha administración es una administración parenteral.

[0115] En otro aspecto la invención proporciona compuestos para su uso en un método de terapia o de profilaxis de un paciente que se beneficiaría de una reducción en el estrés oxidativo o de una reducción en los síntomas del envejecimiento, que comprende la etapa de la administración al paciente de un compuesto de la presente invención.

[0116] En otro aspecto más, la invención proporciona compuestos para su uso en un método de terapia o de profilaxis de un paciente que padece o que está predispuesto a padecer enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, corea de Huntington o ataxia de Friedreich que comprende o que incluye la etapa de la administración a dicho paciente de un compuesto de la presente invención.

[0117] Preferiblemente el método de terapia o de profilaxis es de un paciente que padece o que está predispuesto a padecer ataxia de Friedreich.

[0118] En otro aspecto la invención proporciona compuestos para su uso en un método para reducir el estrés oxidativo en una célula, que comprende la etapa de la administración a la célula de un compuesto de la presente invención.

[0119] En otro aspecto la invención proporciona el uso de un compuesto según se ha descrito previamente en la preparación o en la elaboración de un medicamento, de una unidad de dosificación o de una composición farmacéutica eficaz para su uso en la reducción del estrés oxidativo en un paciente.

[0120] En otro aspecto la invención proporciona el uso de un compuesto según se ha descrito previamente en la preparación o en la elaboración de un medicamento, de una unidad de dosificación o de una composición farmacéutica eficaz para su uso en la reducción de los síntomas del envejecimiento en un paciente.

[0121] En un aspecto más la invención proporciona el uso de un compuesto de la presente invención en la preparación o en la elaboración de un medicamento, de una unidad de dosificación o de una composición farmacéutica eficaz para su uso en el tratamiento o en la profilaxis de un paciente que padece o que está predispuesto a padecer enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, corea de Huntington o ataxia de Friedreich que comprende o que incluye la etapa de la administración a dicho paciente de un compuesto de la presente invención.

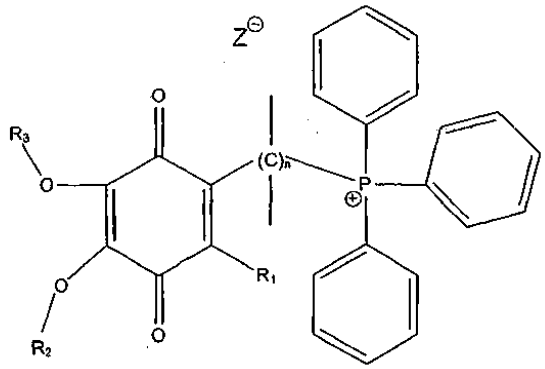
[0122] Preferiblemente el medicamento, la unidad de dosificación o la composición farmacéutica es eficaz para su uso en el tratamiento o la profilaxis de un paciente que padece o que está predispuesto a padecer ataxia de Friedreich.

[0123] En otro aspecto la invención proporciona el uso de un compuesto según se ha descrito previamente en la preparación o en la elaboración de un medicamento, de una unidad de dosificación o de una composición farmacéutica eficaz para su uso en la reducción del estrés oxidativo en una célula.

[0124] Preferiblemente, dicha preparación o elaboración es junto con otro material o materiales, más

preferiblemente diluyentes, excipientes y/o portadores farmacéuticamente aceptables.

[0125] En un aspecto más la presente invención consiste en un método de síntesis de un compuesto con una fracción o con la fracción de la fórmula I

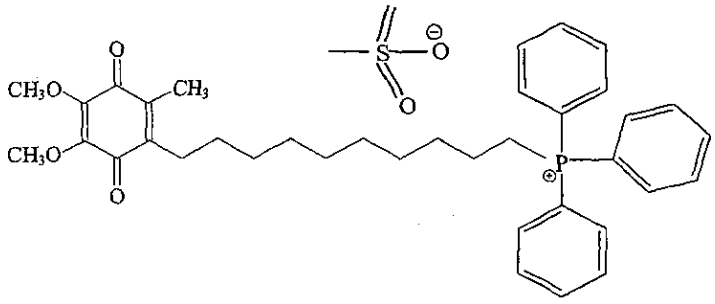


I

(y/o su forma de quinona) en la que R_1, R_2 y R_3, que pueden ser iguales o diferentes, se eligen de entre fracciones alquilo C_1 hasta C_5 (opcionalmente sustituidas) o H, y en la que n es un número entero desde 2 hasta 20, incluyendo o comprendiendo dicho método la mezcla de ciclodextrina.

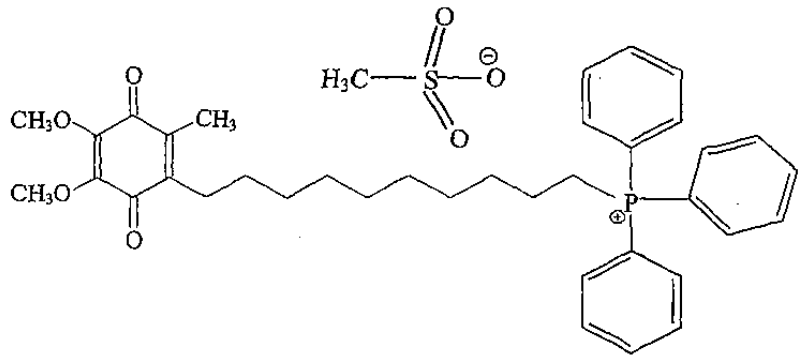
[0126] Preferiblemente cada uno de los C del puente de (C)n está saturado.

[0127] En un aspecto más la presente invención consiste en un método de síntesis de un compuesto que tiene la fórmula



incluyendo o comprendiendo dicho método la mezcla de ciclodextrina.

[0128] En un aspecto más la presente invención consiste en un método de síntesis de un compuesto que tiene la fórmula



(III)

esencialmente según se describe en el presente documento.

[0129] Cualquier análisis sobre documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos o similares que se haya incluido en la presente memoria descriptiva es únicamente con el fin de proporcionar un contexto para la presente invención. No debe interpretarse como una admisión de que cualquiera o todos de estos asuntos forman parte de la base de la técnica anterior o de que eran un conocimiento general habitual en el campo pertinente de la presente invención por existir antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

[0130] A lo largo de esta memoria descriptiva, se entenderá que la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implica la inclusión del elemento, del número entero o de la etapa, o del grupo de elementos, de números enteros o de etapas establecidos, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa de un grupo de elementos, de números enteros o de etapas.

[0131] A lo largo de esta memoria descriptiva se entenderá que el término "quinona", tanto si se usa individualmente como en forma de prefijo con otro término para describir la forma oxidada de un compuesto, incluye en su ámbito la forma reducida de ese compuesto, es decir, la forma de quinol. De forma análoga, la referencia a una quinona, mediante su representación estructural, por ejemplo, también incluye en su ámbito la forma de quinol.

[0132] A lo largo de esta memoria descriptiva se entenderá que el término "quinol", tanto si se usa individualmente como en forma de prefijo con otro término para describir la forma reducida de un compuesto, incluye en su ámbito la forma oxidada de ese compuesto, es decir, la forma de quinona. De forma análoga, la referencia a un quinol, mediante su representación estructural, por ejemplo, también incluye en su ámbito la forma de quinona.

[0133] Según se usa en el presente documento el término "y/o" incluye ambos de "y" y de "o" como opciones.

[0134] Según se usa en el presente documento, el término "coeficiente de partición" y "coeficiente de partición (octanol:agua)" se refiere al coeficiente de partición de octan-1-ol / solución salina tamponada con fosfato determinado a 25 ºC o a 37 ºC (véase Kelso, G. F., Porteous, C. M., Coulter, C. V., Hughes, G. Porteous, W. K., Ledgerwood, E. C., Smith, R. A. J. y Murphy, M. P. 2001 J Biol Chem 276 4588. Smith, R. A. J., Porteous, C. M., Coulter, C. V. y Murphy, M. P. 1999 Eu. J Biochem 263, 709. Smith, R. A. J., Porteous, C. M., Gane, A. M. y Murphy, M. P. 2003 Proc Na Acad Sci 100, 5407.) o al coeficiente de partición de octanol / agua calculado mediante el uso del programa informático Advanced Chemistry Development (ACD) Solaris V4.67 según se describe en Jauslin, M. L., Wirth, T., Meier, T. y Schoumacher, F., 2002, Hum Mol Genet 11, 3055.

[0135] Según se usa en el presente documento, la frase "aceptable para una preparación farmacéutica" incluye en su significado no solamente una aceptabilidad con respecto a la administración farmacéutica, sino también con respecto a la formulación, por ejemplo, para una estabilidad, vida de almacenamiento, higroscopicidad, preparación aceptable, y similares.

[0136] Según se usa en el presente documento un "anión no reactivo" es un anión que no muestra reactividad frente a la fracción antioxidante, al catión lipófilo o la fracción de conexión. Por ejemplo, si una de dichas fracciones del compuesto comprende un objetivo de ataque nucleófilo, el anión no es nucleófilo.

[0137] Aunque ampliamente, como se ha definido anteriormente, la invención también consiste en formas de realización de las cuales la siguiente descripción proporciona algunos ejemplos.

[0138] En particular, se conseguirá una mejor comprensión de la invención con referencia a los dibujos anexos.

Breve descripción de los dibujos

[0139]

La **Figura 1** representa la captación de compuestos antioxidantes anfifílicos por parte de la mitocondria, en la que se muestra esquemáticamente la captación de Mitoquinona-C10 en una mitocondria activada.

La **Figura 2** representa las rutas sintéticas de A: Mitoquinona-C3; B: Mitoquinona-C5; C: Mitoquinona-C15.

La **Figura 3** representa la estructura de compuestos antioxidantes de Mitoquinona y del compuesto relacionado TPMP. Un fosfolípido dibujado a la misma escala está alineado con los compuestos antioxidantes de Mitoquinona para indicar las potenciales de profundidades máximas de penetración de la cadena lateral de ubiquinol en una hoja de una bicapa fosfolipídica. A: TPMP. B: Mitoquinona-C3. C: Mitoquinona-C5. D: Mitoquininona-C10. E: Mitoquinona-C15. F: fosfolípido.

La **Figura 4** presenta gráficas que muestran la captación y la unión de los compuestos antioxidantes por parte de la mitocondria medidas mediante el uso de un electrodo selectivo de iones. A: Mitoquinona-C3. B: Mitoquinona-C5. C: Mitoquinona-C10. D: Mitoquinona-C15. En los paneles de la izquierda estaban presentes las mitocondrias (1 mg de proteína/ml) en presencia de rotenona, y después se añadieron los compuestos antioxidantes en forma de cinco adiciones secuenciales de 1 µM (cabezas de flecha negras) para calibrar la respuesta del electrodo. Para los paneles de la derecha se calibraron en primer lugar los electrodos mediante cinco adiciones secuenciales de 1 µM (cabezas de flecha negras) y después se añadieron las mitocondrias (1 mg de proteína/ml). En todos los casos se añadió succinato para generar un potencial de membrana, y se añadió FCCP para disiparlo. Los datos son los trazos típicos de los experimentos repetidos al menos 2 - 3 veces.

La **Figura 5** presenta gráficas que muestran la eficacia antioxidante de los compuestos antioxidantes. A: se activaron mitocondrias con succinato (barras negras) o mediante su incubación con un sistema regenerador del ATP que consiste en ATP, fosfoenol piruvato y cinasa de piruvato (barras blancas). Después de una preincubación de 30 s con los diversos análogos de Mitoquinona, TPMP o portador, se indujo un estrés oxidativo mediante la adición de $FeCl_2$ 50 µM y de H_2O_2 300 µM. Después de 15 min de incubación a 37 ºC, se estimó la peroxidación lipídica mediante la medición de las TBARs. Los datos son las medias ± el intervalo de los experimentos independientes. El ligero efecto protector de la Mitoquinona-C5 sobre la peroxidación lipídica en presencia de ATP es debido a parte de la Mitoquinona-C5 añadida desde la solución madre, que está en forma de ubiquinol. B: se midió el potencial de la membrana mitocondrial inducido con succinato o con el sistema regenerador de ATP a partir de la acumulación de [^{3}H]TPMP. Los datos son las medias ± el intervalo de las determinaciones por duplicado de una incubación de 25 minutos. Los potenciales de membrana después de una incubación de 5 minutos eran los mismos (datos no mostrados). C: se midió la dependencia de la concentración de la prevención de la acumulación de las TBARs por parte de los compuestos antioxidantes. Todas las incubaciones se llevaron a cabo en presencia de succinato como se describió en A. Los resultados se expresan como el % de inhibición de la formación de las TBARS, tomando el valor de la muestra expuesta a $FeCl_2$ / H_2O_2 en ausencia de análogos de Mitoquinona como un 0 % de inhibición, y una muestra de control (sin la adición de $FeCl_2$ / H_2O_2) como el 100 %. Los datos mostrados son una valoración típica, con cada concentración determinada por triplicado ± DT. D: concentraciones de la CI_{50} para la prevención de la peroxidación lipídica. Los datos son las medias ± eem, estimados a partir de tres valoraciones independientes según se muestra en C. Se determinó la significación estadística con respecto a la CI_{50} para la Mitoquinona-C3 mediante el uso de de la prueba de la *t* de Student bilateral: *p < 0,05; **p < 0,005.

La **Figura 6** presenta una gráfica que muestra el efecto de la Mitoquinona-C 10 y de la Mitoquinona-C3 sobre el flujo en el seno coronario.

La **Figura 7** presenta una gráfica que muestra el efecto de la Mitoquinona-C10 y de la Mitoquinona-C3 sobre la presión diastólica en el ventrículo izquierdo.

La **Figura 8** presenta una gráfica que muestra el efecto de la Mitoquinona-C10 y de la Mitoquinona-C3 sobre la frecuencia cardiaca.

La **Figura 9** presenta gráficas que muestran la frecuencia de cambio del ventrículo izquierdo.

La **Figura 10** representa gráficas que muestran el efecto de la Mitoquinona-C10 y de la Mitoquinona-C3 sobre la función respiratoria mitocondrial tras una isquemia.

La **Figura 11** es una gráfica que representa la estabilidad de la Mitoquinona-C10 pura (lote nº 3) en frascos de vidrio transparentes a 40 ºC, 75 % de RH; a 25 ºC, 50 % de RH y a 5 ºC en gel de sílice.

La **Figura 12** es una gráfica que representa la estabilidad de la Mitoquinona-C10 (lote nº 4) a 25 ºC, 50 % de RH.

La **Figura 13** es una gráfica que representa la estabilidad del complejo de Mitoquinona-C10 β-ciclodextrina (1:1) a 4 ºC en sílice, a 25 ºC, 50 % de RH y a 40 ºC, 75 % de RH.

La **Figura 14** es una gráfica que representa la estabilidad del complejo de Mitoquinona-C10 β-ciclodextrina (1:2) a 4 ºC en sílice, a 25 ºC, 50 % de RH y a 40 ºC, 75 % de RH.

La **Figura 15** es una gráfica que representa la estabilidad del complejo de Mitoquinona-C10 β-ciclodextrina (1:4) a 4 ºC en sílice, a 25 ºC, 50 % de RH y a 40 ºC, 75 % de RH.

La **Figura 16** presenta una gráfica que muestra la estabilidad del mesilato de Mitoquinona-C10 en agua.

La **Figura 17** presenta una gráfica que muestra estabilidad del mesilato de Mitoquinona-C10 en HCl 0,01 M.

La **Figura 18** presenta una gráfica que muestra la estabilidad del mesilato de Mitoquinona-C10 en IPB, pH 7,4.

La **Figura 19** presenta una gráfica que muestra la estabilidad del mesilato de Mitoquinona-C10 en MeOH al 50 %.

La **Figura 20** presenta una gráfica que muestra la estabilidad en estado sólido del mesilato de Mitoquinona-C10 a 40 ºC, 75 % de RH; y a 25 ºC, 50 % de RH y a 4 ºC en gel de sílice azul.

La **Figura 21** presenta una gráfica que muestra la estabilidad del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:2) en agua.

La **Figura 22** presenta una gráfica que muestra la estabilidad del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:2) en HCl 0,01 M.

La **Figura 23** presenta una gráfica que muestra la estabilidad del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:2) en IPB, pH 7,4.

La **Figura 24** presenta una gráfica que muestra la estabilidad del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:2) en MeOH al 50 %.

La **Figura 25** presenta una gráfica que muestra la estabilidad en estado sólido del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:2) a 40 ºC, 75 % de RH; a 25 ºC, 50 % de RH y a 4 ºC en gel de sílice azul.

La **Figura 26** presenta una gráfica que muestra la estabilidad del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:1) en agua.

La **Figura 27** presenta una gráfica que muestra la estabilidad del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:1) en HCl 0,01 M.

La **Figura 28** presenta una gráfica que muestra la estabilidad del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:1) en IPB pH 7,4.

La **Figura 29** presenta una gráfica que muestra la estabilidad del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:1) en metanol al 50 %.

La **Figura 30** presenta una gráfica que muestra la estabilidad en estado sólido del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:1) a 40 ºC, 75 % de RH; a 25 ºC, 50 % de RH y a 4 ºC en gel de sílice azul.

La **Figura 31** presenta gráficas de los perfiles de concentración plasmática-tiempo en rata de la Mitoquinona-C10 después de una única administración IV (A) (10 mg/kg) y oral (B) (50 mg/kg) a ratas de mesilato de Mitoquinona-C10 en un complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:2) (n = 5). Los parámetros farmacocinéticos derivados de estos datos se proporcionan en la Tabla 11.

Descripción detallada de la invención

[0140] Como se ha establecido anteriormente, el foco de esta invención está en el direccionamiento mitocondrial de compuestos, principalmente con el fin de una terapia y/o de una profilaxis para reducir el estrés oxidativo.

[0141] Las mitocondrias tienen un potencial de membrana sustancial de hasta 180 mV a través de su membrana interna (interior negativo). Debido a este potencial, que hace permeable la membrana, los cationes lipófilos se acumulan en varios cientos de veces en la matriz mitocondrial.

[0142] Los solicitantes han averiguado que mediante el acoplamiento de cationes lipófilos (por ejemplo, el catión lipófilo trifenilfosfonio) a una fracción antioxidante, los compuestos anfifílicos resultantes pueden ser administrados en la matriz de células intactas. Después el antioxidante es dirigido a un sitio de producción primaria de radicales libres y de especies de oxígeno reactivas en la célula, en lugar de ser dispersado aleatoriamente.

[0143] Los solicitantes han determinado adicionalmente que las propiedades del compuesto antioxidante, tales como, por ejemplo, la naturaleza de la fracción antioxidante, las características físicas y químicas de la fracción de conexión, tales como, por ejemplo, la longitud o la lipofilia de la fracción de conexión y/o la naturaleza lipófila del catión, contribuyen a la eficacia del compuesto antioxidante *in vivo* y contribuyen a la funcionalidad antioxidante del compuesto. Para los compuestos antioxidantes de la presente invención, la eficacia *in vivo* puede comprender en parte una biodisponibilidad adecuada, una estabilidad adecuada, una farmacocinética adecuada, una actividad antioxidante adecuada y/o un direccionamiento y/o una acumulación mitocondriales adecuados.

[0144] Los compuestos antioxidantes de la invención se definen en las reivindicaciones.

[0145] En principio, en la formación de los compuestos antioxidantes puede emplearse cualquier catión lipófilo y cualquier antioxidante susceptible de ser transportado a, y/o a través de, la membrana mitocondrial, y de acumularse en las mitocondrias de células intactas.

[0146] El catión lipófilo de la invención es el catión trifenilfosfonio, según se ejemplifica en el presente documento. Otros cationes lipófilos que pueden ser acoplados covalentemente a los antioxidantes divulgados en el presente documento incluyen los cationes tribencil amonio y fosfonio. En algunos ejemplos de los compuestos antioxidantes divulgados en el presente documento, el catión lipófilo se acopla a la fracción antioxidante mediante una cadena carbonada lineal saturada con desde 1 hasta aproximadamente 30 átomos de carbono, por ejemplo, desde 2 hasta aproximadamente 20, desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 15, desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 10 o desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 10 átomos de carbono. En un ejemplo particularmente preferido, la cadena carbonada lineal comprende 10 átomos de carbono.

[0147] Preferiblemente la cadena carbonada es un grupo alquileno (por ejemplo, C_1-C_{20} o C_1-C_{15}), otras cadenas carbonadas que incluyen opcionalmente uno o más enlaces dobles o triples enlaces también son divulgadas en el presente documento. También están incluidas las cadenas carbonadas que incluyen uno o más sustituyentes (tales como grupos hidroxilo, ácido carboxílico o amida) y/o que incluyen una o más cadenas laterales o ramificaciones, tales como las seleccionadas de entre los grupos alquilo, alquenilo o alquinilo no sustituidos o sustituidos. También están incluidas las cadenas carbonadas que comprenden más de aproximadamente 30 átomos de carbono pero cuya longitud es equivalente a la de una cadena carbonada saturada lineal con desde 1 hasta aproximadamente 30 átomos de carbono.

[0148] Los expertos en la materia apreciarán que pueden usarse fracciones distintas a un alquileno lineal para el acoplamiento covalente de una fracción antioxidante con el catión lipófilo, por ejemplo, grupos alquilo sustituidos o ramificados, enlaces peptídicos y similares.

[0149] En algunas formas de realización de la invención, el catión lipófilo está unido a la fracción antioxidante mediante un grupo alquileno de cadena lineal con entre 1 y 10 átomos de carbono; tal como, por ejemplo, un grupo etileno, propileno, butileno, pentileno o decileno.

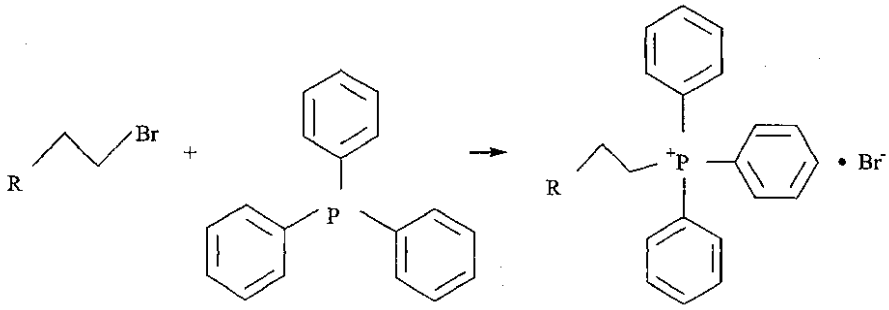
[0150] Las fracciones antioxidantes útiles en la presente invención incluyen aquellas que requieren una interacción con agentes reductores para su actividad antioxidante, tanto para una actividad antioxidante inicial como para el reciclado de la actividad antioxidante, o ambas. Por ejemplo, los compuestos antioxidantes de la presente invención que comprenden como fracción antioxidante activa una fracción de quinol, pueden ser administrados en la forma de quinona. Para que funcionen como un antioxidante, es decir, para que tengan actividad antioxidante, la quinona debe ser reducida a la forma de quinol mediante la interacción con un agente reductor, tal como, por ejemplo, un agente reductor mitocondrial tal como el Complejo II, para la actividad antioxidante inicial. Una interacción posterior de la quinona en forma oxidada con agentes reductores puede dar lugar al reciclado de la actividad antioxidante.

[0151] Otros ejemplos de las fracciones antioxidantes divulgadas en el presente documento incluyen aquellas que ya existen en la forma reducida y que no requieren la interacción con agentes reductores para su actividad antioxidante inicial. A pesar de esto, la posterior interacción de la forma oxidada de dichas fracciones antioxidantes con agentes reductores mitocondriales puede dar lugar al reciclado de la actividad antioxidante. Por ejemplo, la fracción antioxidante Vitamina E puede ser administrada en la forma reducida, y por lo tanto no requiere la interacción con agentes reductores para su actividad antioxidante inicial, pero puede interactuar posteriormente con agentes reductores, tales como, por ejemplo, el grupo endógeno de quinonas, reciclando así la actividad antioxidante.

[0152] Algunos ejemplos adicionales de fracciones antioxidantes útiles en la presente invención incluyen aquellas que no son recicladas por la interacción con agentes reductores mitocondriales.

[0153] Algunos ejemplos de las fracciones antioxidantes divulgadas en el presente documento incluyen la vitamina E y los derivados de la vitamina E, antioxidantes que rompen la cadena, tales como butilhidroxianisol, butilhidroxitolueno, quinoles y capturadores de radicales en general, tales como fulerenos derivatizados. Además, también pueden usarse capturadores de espín, que reaccionan con los radicales libres para generar radicales libres estables. Estos incluirían derivados de 5,5-dimetilpirrolina-N-óxido, *terc*-butilnitrosobenceno, *terc*-nitrosobenceno, α-fenil-*terc*-butilnitrona y compuestos relacionados.

[0154] Algunos compuestos antioxidantes preferidos, que incluyen aquellos con las fórmulas generales I y II del presente documento, pueden ser preparados fácilmente, por ejemplo, mediante la siguiente reacción:



[0155] La estrategia de síntesis general es el calentamiento de un precursor que contiene un grupo saliente adecuado, preferiblemente un precursor de alquilsulfonilo, bromo o yodo con más de 1 equivalente de trifenilfosfina bajo argón durante varios días. Después el compuesto de fosfonio se aísla en forma de su sal. Para hacer esto, el producto se tritura repetidamente con éter dietílico hasta que queda un sólido de color blanquecino. Este se disuelve después en cloroformo o en diclorometano y se precipita con éter dietílico para eliminar el exceso de trifenilfosfina. Esto se repite hasta que el sólido ya no se disuelve en cloroformo. En este punto el producto se recristaliza varias veces en un disolvente adecuado tal como cloroformo, acetona, acetato de etilo o alcoholes superiores.

[0156] Puede usarse un método sintético preferido para la preparación de una forma estable de un compuesto antioxidante preferido dirigido a la mitocondria de fórmula III (también denominado en el presente documento mesilato de Mitoquinona-C10 o metansulfonato de Mitoquinona-C10), según se establece a en el Ejemplo 1 del

presente documento.

[0157] También se apreciará que el anión del compuesto antioxidante así preparado puede intercambiarse fácilmente con otro anión farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable, según se define en las reivindicaciones, si esto fuera deseable o necesario, mediante el uso de un intercambio de iones o de otras técnicas conocidas en la materia.

[0158] Los solicitantes han determinado que la estabilidad de la forma salina del compuesto antioxidante mejora cuando el anión no muestra reactividad frente a la fracción antioxidante, la fracción de conexión o la fracción catiónica lipófila. Por ejemplo, en el caso de los ejemplos preferidos de los compuestos antioxidantes de la invención, el anión no es nucleófilo. También es deseable que el anión sea un anión farmacéuticamente aceptable. También se prefiere que para la formulación farmacéutica, el anión no muestre reactividad frente a cualquiera de los demás agentes que comprende la formulación.

[0159] Algunos ejemplos de aniones no nucleófilos incluyen hexafluoroantimoniato, -arsenato o -fosfato o tetrafenilborato, tetra(perfluorofenil) borato u otros tetrafluoroboratos, trifluorometansulfonato, sulfonatos de arilo y de alquilo tales como metansulfonato y p-toluensulfonato, y fosfatos.

[0160] Algunos ejemplos de los aniones farmacéuticamente aceptables divulgados en el presente documento incluyen iones de halógenos tales como un ión fluoruro, un ión cloruro, un ión bromuro y un ión yoduro; aniones de sales de ácidos inorgánicos tales como nitrato, perclorato, sulfato, fosfato y carbonato; aniones farmacéuticamente aceptable de sales de ácidos alquilsulfónicos inferiores tales como sales del ácido metansulfónico y del ácido etansulfónico; aniones farmacéuticamente aceptables de sales de ácidos arilsulfónicos, tales como sales del ácido bencensulfónico, del ácido 2-naftalensulfónico y del ácido p-toluensulfónico; aniones farmacéuticamente aceptables de sales de ácidos orgánicos tales como sales del ácido tricloroacético, del ácido trifluoroacético, del ácido hidroxiacético, del ácido benzoico, del ácido mandélico, del ácido butírico, del ácido propiónico, del ácido fórmico, del ácido fumárico, del ácido succínico, del ácido cítrico, del ácido tartárico, del ácido oxálico, del ácido maleico, del ácido acético, del ácido málico, del ácido láctico y del ácido ascórbico; y aniones farmacéuticamente aceptables de sales de aminoácidos tales como sales del ácido glutámico y sales del ácido aspártico.

[0161] En el caso de los ejemplos preferidos de los compuestos antioxidantes de la invención, el precursor del anión halógeno es intercambiado por aniones de sulfonato de arilo o de alquilo. Algunos ejemplos incluyen bencensulfonato, p-toluensulfonato, 2-naftilensulfonato, metansulfonato, etansulfonato, propansulfonato. Un anión particularmente preferido es el anión metansulfonato. Como se ha descrito anteriormente, un ejemplo de un compuesto antioxidante de la invención en el que el anión es metansulfonato es el compuesto antioxidante particularmente preferido de fórmula III, denominado en el presente documento metansulfonato de Mitoquinona-C10 o mesilato de Mitoquinona-C10.

[0162] Puede usarse el mismo procedimiento general para crear una amplia variedad de compuestos dirigidos a las mitocondrias con diferentes fracciones antioxidantes R unidas a la fracción o fracciones de trifenilfosfonio (o de otro catión lipófilo). Estos incluirían una serie de derivados de la vitamina E, en los que la longitud del acoplamiento en puente de la función de la Vitamina E con la fracción de trifenilfosfonio (o de otro catión lipófilo) es variable. Otros antioxidantes que pueden usarse como R incluyen antioxidantes de ruptura de la cadena, tales como butilhidroxianisol, butilhidroxitolueno, quinoles y capturadores de radicales en general tales como fulerenos derivatizados. Además, también pueden sintetizarse capturadores de espín, que reaccionan con los radicales libres para generar radicales libres estables. Estos incluirían derivados de 5,5-dimetilpirrolina-*N*-óxido, *terc*-butilnitrosobenceno, *terc*-nitrosobenceno, α-fenil-*terc*-butilnitrona y compuestos relacionados.

[0163] Se apreciará que para un compuesto antioxidante de la presente invención, como para cualquier fármaco, la actividad *in vitro* no es en modo alguno el único determinante de la funcionalidad o de la eficacia *in vivo*. La actividad antioxidante de los compuestos antioxidantes de la presente invención puede ser determinada mediante métodos tales como los descritos en el presente documento mediante el uso de, por ejemplo, mitocondrias aisladas y/o de células aisladas. Aunque es cierto que, para que sea útil como un compuesto antioxidante dirigido a la mitocondria de la presente invención, un compuesto antioxidante debe mostrar una actividad antioxidante adecuadamente alta en dichos ensayos, para ser eficaz *in vivo* el compuesto antioxidante dirigido a la mitocondria debe mostrar otras propiedades fisicoquímicas deseables, por ejemplo, una biodisponibilidad, una estabilidad o una funcionalidad antioxidante adecuadas.

[0164] Algunos ejemplos de los compuestos antioxidantes que muestran una buena actividad antioxidante

pero que muestran una baja biodisponibilidad con respecto al compartimento objetivo *in vivo* incluyen la Coenzima Q (CoQ) y la Idebenona. Ambos de estos compuestos deben ser administrados a unas tasas de dosis muy altas (por ejemplo, de 0,5 - 1,2 g) para obtener unos efectos clínicos mínimos en pacientes humanos.

[0165] Algunos ejemplos del compuesto antioxidante dirigido a la mitocondrias de la presente invención muestran una buena actividad antioxidante y biodisponibilidad, y por lo tanto son eficaces *in vivo* a unas tasas de dosis bajas. Una determinación de la biodisponibilidad de los compuestos antioxidantes anfifílicos preferidos dirigidos a la mitocondria de la presente invención, el mesilato de Mitoquinona-C10 y un complejo de ciclodextrina del mismo, se presenta en el presente documento en el Ejemplo 11. Creemos que los compuestos antioxidantes de la presente invención son eficaces en el direccionamiento mitocondrial de la actividad antioxidante, mostrando a la vez uno o más de los beneficios adicionales de estar disponibles en una forma cristalina o sólida, o de ser susceptibles de ser formulados en una forma sólida, una estabilidad aumentada, una biodisponibilidad mejorada y/o una funcionalidad antioxidante mejorada. Creemos que las características físicas y químicas de los compuestos antioxidantes de la presente invención, de nuevo sin desear ceñirnos a ninguna teoría, confieren a los compuestos antioxidantes de la presente invención unas características preferidas, permitiendo así su uso en las composiciones, formulaciones y métodos, entre otras aplicaciones, en los que los compuestos antioxidantes de la técnica anterior eran menos adecuados dadas sus propiedades químicas y físicas.

[0166] En algunas formas de realización de la invención, el compuesto antioxidante es un derivado de quinol de la fórmula II definido anteriormente. Por ejemplo, un derivado de quinol de la invención es el compuesto Mitoquinona-C10 (del cual el compuesto de fórmula III es una forma salina específica) como se ha definido anteriormente. Un ejemplo adicional de un compuesto de la invención es un compuesto de fórmula I en el que $(C)_n$ es $(CH_2)_5$, y la fracción de quinol es la misma que la de la Mitoquinona-C10, que se denomina en el presente documento Mitoquinona-C5 (véase la Figura 3C). Un ejemplo adicional más de un compuesto de la invención es un compuesto de fórmula I en el que $(C)_n$ es $(CH_2)_3$, y la fracción de quinol es la misma que la de la Mitoquinona-C10 que se denomina en el presente documento Mitoquinona-C3 (véase la Figura 3B). Todavía otro ejemplo adicional de un compuesto de la invención es un compuesto de fórmula I en el que $(C)_n$ es $(CH_2)_{15}$, y la fracción de quinol es la misma que la de la Mitoquinona-C10, que se denomina en el presente documento Mitoquinona-C15 (véase la Figura 3E).

[0167] Una vez preparado el compuesto antioxidante de la invención en cualquier forma farmacéuticamente apropiada y que incluye opcionalmente portadores, excipientes, diluyentes, agentes de complejación o aditivos farmacéuticamente aceptables, será administrado al paciente que requiere una terapia y/o una profilaxis. Una vez administrado, el compuesto dirigirá la actividad antioxidante a las mitocondrias de las células del paciente.

[0168] Los compuestos antioxidantes de la presente invención pueden ser administrados a los pacientes mediante las vías de administración oral y/o parenteral.

[0169] El compuesto antioxidante debe estar formulado en una composición farmacéutica estable y segura para su administración a un paciente. La composición puede prepararse de acuerdo con los métodos convencionales, disolviendo o suspendiendo una cantidad del ingrediente compuesto antioxidante en un diluyente. La cantidad es de entre 0,1 mg y 1.000 mg por ml de diluyente del compuesto antioxidante. Puede añadirse un tampón de acetato, de fosfato, de citrato o de glutamato, permitiendo que el pH de la composición final esté entre 5,0 y 9,5; opcionalmente también puede añadirse un agente de tonificación de carbohidrato o de un alcohol polihídrico, y un conservante elegido de entre el grupo que consiste en m-cresol, alcohol bencílico, metil, etil, propil y butil parabenos y fenol. Se usa una cantidad suficiente de agua para inyección para la obtención de una concentración deseada de la solución. También puede haber presentes algunos agentes de tonificación adicionales tales como cloruro de sodio, así como otros excipientes, si se desea. Dichos excipientes, deben mantener, sin embargo, la tonicidad global del compuesto antioxidante.

[0170] Los términos tampón, solución tampón y solución tamponada, cuando se usan con referencia a la concentración de iones hidrógeno o pH, se refieren a la capacidad de un sistema, particularmente en solución acuosa, para resistir un cambio del pH tras la adición de un ácido o de un álcali, o tras la dilución con un disolvente. Una característica de las soluciones tamponadas, que experimentan pequeños cambios en el pH tras la adición de un ácido o de una base, es la presencia de un ácido débil y de una sal del ácido débil, o de una base débil y de una sal de la base débil. Un ejemplo del sistema anterior es ácido acético y acetato de sodio. El cambio en el pH es ligero siempre que la cantidad de iones hidroxilo añadida no supere la capacidad del sistema tamponante para neutralizarla.

[0171] La estabilidad de la formulación parenteral de la presente invención se mejora mediante el mantenimiento del pH de la formulación en el intervalo de aproximadamente desde 5,0 hasta 9,5. Otros intervalos de pH incluyen, por ejemplo, desde 5,5 hasta 9,0 o desde 6,0 hasta 8,5 o desde 6,5 hasta 8,0 o desde 7,0 hasta 7,5.

[0172] El tampón usado en la práctica de la presente invención se elige de entre cualquiera de los siguientes, por ejemplo, un tampón de acetato, un tampón de fosfato o un tampón de glutamato, siendo el tampón más preferido el tampón de fosfato.

[0173] También pueden usarse portadores o excipientes para facilitar la administración del compuesto. Algunos ejemplos de portadores y de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares tales como lactosa, glucosa o sacarosa, o diversos tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, polietilenglicoles y disolventes fisiológicamente compatibles.

[0174] Puede incluirse un estabilizante en la presente formulación, pero, y muy importante, no es necesario. Sin embargo, si se incluye, un estabilizante útil en la práctica de la presente invención es un carbohidrato o un alcohol polihídrico. Los alcoholes polihídricos incluyen compuestos tales como sorbitol, manitol, glicerol y polietilenglicoles (PEGs). Los carbohidratos incluyen, por ejemplo, manosa, ribosa, trehalosa, maltosa, inositol, lactosa, galactosa, arabinosa o lactosa.

[0175] Algunos estabilizantes adecuados incluyen, por ejemplo, alcoholes polihídricos tales como sorbitol, manitol, inositol, glicerol, xilitol y un copolímero de polipropileno / etilenglicol, así como diversos polietilenglicoles (PEG) con un peso molecular de 200, 400, 1.450, 3.350, 4.000, 6.000 y 8.000).

[0176] La Farmacopea de los Estados Unidos (USP) establece que deben añadirse agentes antimicrobianos a concentraciones bacteriostáticas o fungicidas a las preparaciones contenidas en recipientes de dosis múltiples. Deben estar presentes en una concentración adecuada en el momento de su uso para prevenir la multiplicación de los microorganismos introducidos involuntariamente en la preparación mientras se extrae una porción del contenido con una aguja hipodérmica y una jeringa o mediante el uso de cualquier otro medio invasivo de administración, tal como inyectores de pluma. Los agentes antimicrobianos deben ser evaluados para asegurar la compatibilidad con todos los demás componentes de la fórmula, y debería evaluarse su actividad en la fórmula total para asegurar que un agente en particular que es eficaz en una formulación no es ineficaz en otra. No es inusual encontrarse con que un agente en particular sea eficaz en una formulación pero no sea eficaz en otra formulación.

[0177] Un conservante es, en el sentido farmacéutico habitual, una sustancia que impide o inhibe el crecimiento microbiano y que puede ser añadida a una formulación farmacéutica con este fin para evitar el consiguiente desperdicio de la formulación por los microorganismos. Aunque la cantidad de conservante no es grande, puede afectar no obstante a la estabilidad global del compuesto antioxidante. Por lo tanto, incluso la elección de un conservante puede ser difícil.

[0178] Aunque el conservante para su uso en la práctica de la presente invención puede variar entre el 0,005 y el 1,0 % (p/v), el intervalo preferido para cada conservante, solo o junto con otros, es: alcohol bencílico (0,1 - 1,0 %) o m-cresol (0,1 - 0,6 %) o fenol (0,1 - 0,8 %) o una combinación de metil (0,05 - 0,25 %) y etil o propil o butil (0,005 % - 0,03 %) parabenos. Los parabenos son ésteres de un alquilo inferior del ácido para-hidroxibenzoico.

[0179] Una descripción detallada de cada conservante se establece en "Remington's Pharmaceutical Sciences" así como en Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Vol. 1, 1992, Avis et al. Con estos fines, puede administrarse la sal cristalina del diclorhidrato de trientina por vía parenteral (incluyendo inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, inyección intradérmica o técnicas de infusión) o mediante nebulización para inhalación en formulaciones unitarias de dosificación que contienen portadores, coadyuvantes y vehículos convencionales no tóxicos farmacéuticamente aceptables.

[0180] También puede ser deseable la adición de cloruro de sodio o de otra sal para ajustar la tonicidad de la formulación farmacéutica, dependiendo del agente de tonificación elegido. Sin embargo, esto es opcional y depende de la formulación en particular elegida. Las formulaciones parenterales deben ser isotónicas o sustancialmente isotónicas, de otro modo podría producirse una irritación y dolor significativos en el sitio administración.

[0181] La isotonicidad deseada puede conseguirse mediante el uso de cloruro de sodio o de otros agentes farmacéuticamente aceptables tales como dextrosa, ácido bórico, tartrato de sodio, propilenglicol, polioles (tales como manitol y sorbitol) o de otros solutos inorgánicos u orgánicos. Generalmente, la composición es isotónica con

respecto a la sangre del sujeto.

[0182] Si se desea, la formulación parenteral puede espesarse con un agente espesante tal como metil celulosa. La formulación puede prepararse en una forma emulsionada, tanto de agua en aceite como de aceite en agua. Puede emplearse cualquiera de una gran diversidad de agentes emulsionantes farmacéuticamente aceptables que incluyen, por ejemplo, polvo de acacia, un tensioactivo no iónico o un tensioactivo iónico.

[0183] También puede ser deseable la adición de agentes dispersantes o suspensores adecuados a la formulación farmacéutica, estos pueden incluir, por ejemplo, suspensiones acuosas tales como gomas sintéticas y naturales, es decir, tragacanto, goma arábiga, alginato, dextrano, carboximetil celulosa de sodio, metil celulosa, polivinilpirrolidona o gelatina.

[0184] El vehículo de mayor importancia para los productos parenterales es el agua. El agua con una calidad adecuada para su administración parenteral debe prepararse bien mediante destilación o bien mediante ósmosis inversa. Únicamente mediante estos medios es posible separar adecuadamente las diversas sustancias contaminantes líquidas, gaseosas y sólidas del agua. El agua para inyección es el vehículo acuoso preferido para su uso en la formulación farmacéutica de la presente invención. El agua puede ser purgada con nitrógeno gaseoso para eliminar cualquier oxígeno o radicales libres del oxígeno del agua.

[0185] Es posible que haya presentes otros ingredientes en la formulación farmacéutica parenteral de la presente invención. Dichos ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, aceites (por ejemplo, un aceite vegetal tal como de sésamo, de cacahuete o de oliva), agentes analgésicos, emulsionantes, antioxidantes, agentes de volumen, modificadores de la tonicidad, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, albúmina sérica humana, gelatina o proteínas) y un ión bipolar (por ejemplo, un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Por supuesto, dichos ingredientes adicionales no deberían afectar negativamente a la estabilidad global de la formulación farmacéutica de la presente invención.

[0186] Los recipientes también son una parte integrante de la formulación de una inyección, y pueden ser considerados un componente, ya que no hay un recipiente que sea totalmente insoluble o que no afecte de alguna forma al líquido que contiene, particularmente si el líquido es acuoso. Por lo tanto, la elección de un recipiente para una inyección en particular debe basarse en una consideración de la composición del recipiente, así como de la solución y del tratamiento al que se va a someter.

[0187] Con objeto de permitir la introducción de una aguja desde una jeringa hipodérmica en un vial de dosis múltiples, y proporcionar un resellado tan pronto como se retire la aguja, cada vial se cierra herméticamente con un cierre de caucho que se mantiene en su sitio mediante una banda de aluminio.

[0188] Los tapones para los viales de vidrio, tales como, West 4416/50, 4416/50 (revestido de Teflon) y 4406/40, Abbott 5139 o cualquier tapón equivalente, pueden usarse como cierre para el vial de dosis. Estos tapones superan el ensayo de integridad de tapones cuando son ensayados mediante el uso de patrones de uso del paciente, por ejemplo, el tapón puede soportar al menos aproximadamente 100 inyecciones.

[0189] Cada uno de los componentes de la formulación farmacéutica descritos anteriormente es conocido en la materia y se describe en Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Vol. 1,2º ed., Avis et al. Ed., Mercel Dekker, Nueva York, N.Y. 1992.

[0190] El proceso de elaboración de la formulación anterior implica la formación del compuesto, una filtración estéril y las etapas de llenado. El procedimiento de formación del compuesto puede implicar, por ejemplo, la disolución de los ingredientes en un orden específico, tal como en primer lugar del conservante, seguido de los agentes estabilizantes / de tonicidad, de los tampones y después del compuesto antioxidante, o la disolución de todos los ingredientes que forman la formulación parenteral al mismo tiempo. Un ejemplo de un método para la preparación de una formulación parenteral para su administración es la disolución del compuesto en la forma antioxidante, por ejemplo, mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:2), en agua y diluir la mezcla resultante en una solución salina tamponada con fosfato.

[0191] Alternativamente, las formulaciones parenterales de la presente invención se preparan mediante la mezcla de los ingredientes siguiendo unos procedimientos aceptados de forma general. Por ejemplo, pueden mezclarse los componentes elegidos en una mezcladora o en otro dispositivo habitual para producir una mezcla concentrada, que después puede ajustarse hasta la concentración y la viscosidad finales mediante la adición de

agua, de un agente espesante, de un tampón, de albúmina sérica humana al 5 % o de un soluto adicional para controlar la tonicidad.

[0192] Alternativamente, el compuesto antioxidante puede ser envasado en forma de un sólido seco y/o de un polvo para ser reconstituido con un disolvente para producir una formulación parenteral de acuerdo con la presente invención para su uso en el momento de la reconstitución.

[0193] Además, el proceso de elaboración puede incluir cualquier proceso de esterilización adecuado cuando se desarrolla la formulación parenteral de la presente invención. Algunos procesos de esterilización típicos incluyen filtración, vapor (calor húmedo), calor seco, gases (por ejemplo, óxido de etileno, formaldehído, dióxido de cloro, óxido de propileno, beta-propiolacetona, ozono, cloropicrin, metil bromuro del ácido peracético, y similares), exposición a radiación y manipulación aséptica.

[0194] Algunas vías adecuadas de administración parenteral incluyen intravenosa, intramuscular, subcutánea, intravenosa, subdérmica, intraarticular, intratecal, intraperitoneal y similares. Se prefiere la vía de administración intravenosa. También es permisible la administración en las mucosas. La dosis y el régimen de dosificación dependerán del peso y de la salud del sujeto.

[0195] Los portadores, excipientes, diluyentes, agentes de complejación o aditivos farmacéuticamente aceptables pueden elegirse de forma que, por ejemplo, mejoren la estabilidad del compuesto antioxidante, faciliten la síntesis o la formulación de una formulación farmacéutica y/o mejoren la biodisponibilidad del compuesto antioxidante.

[0196] Por ejemplo, las moléculas portadoras tales como la ciclodextrina y los derivados de la misma son bien conocidas en la materia por su potencial como agentes de complejación capaces de alterar los atributos fisicoquímicos de las moléculas farmacológicas. Por ejemplo, las ciclodextrinas pueden estabilizar (tanto térmicamente como oxidativamente), reducir la volatilidad de, y alterar la solubilidad de, los agentes activos con los que están complejadas. La ciclodextrinas son moléculas cíclicas formadas por unidades anulares de glucopiranosa que forman estructuras toroidales. El interior de la molécula de ciclodextrina es hidrófobo, y el exterior es hidrófilo, lo que hace que la molécula de ciclodextrina sea soluble en agua. El grado de solubilidad puede alterarse mediante la sustitución de los grupos hidroxilo del exterior de la ciclodextrina. De forma análoga, la hidrofobicidad del interior puede alterarse mediante una sustitución, a pesar de que generalmente la naturaleza hidrófoba del interior permite la acomodación de invitados relativamente hidrófobos en la cavidad. La acomodación de una molécula en otra se conoce como complejación, y el producto resultante se denomina complejo de inclusión. Algunos ejemplos de derivados de ciclodextrina incluyen sulfobutilciclodextrina, maltosilciclodextrina, hidroxipropilciclodextrina y las sales de los mismos.

[0197] En el presente documento se divulgan métodos para la formación de una composición farmacéuticamente aceptable que comprenden un complejo de inclusión de un compuesto antioxidante dirigido a la mitocondria, en este caso de Mitoquinona-C10 en un complejo con β-ciclodextrina, en el Ejemplo 1 y en el Ejemplo 7. Los métodos para la formación de composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden un complejo de inclusión de un compuesto antioxidante preferido dirigido a la mitocondria de mesilato de Mitoquinona-C10 en un complejo con β-ciclodextrina se divulgan en el presente documento en el Ejemplo 9 y en el Ejemplo 10.

[0198] Las propiedades fisicoquímicas, que incluyen, por ejemplo, las propiedades farmacéuticas, del complejo de compuesto antioxidante-ciclodextrina, pueden modificarse mediante, por ejemplo, una variación en la proporción molar entre el compuesto antioxidante y la ciclodextrina, o una variación en la propia ciclodextrina. Por ejemplo, para los compuestos antioxidantes preferidos de fórmula general I, la proporción molar entre el compuesto antioxidante y la ciclodextrina (compuesto antioxidante: ciclodextrina) puede ser de desde aproximadamente 10:1 hasta aproximadamente 1:10, desde aproximadamente 5:1 hasta aproximadamente 1:5, desde aproximadamente 4:1 hasta aproximadamente 1:4, desde aproximadamente 2:1 hasta aproximadamente 1:2 o de aproximadamente 1:1. En un ejemplo adicional, la proporción molar preferida entre el compuesto antioxidante ejemplar de Mitoquinona-C10 y la ciclodextrina es 1:2, y la ciclodextrina es la β-ciclodextrina.

[0199] Alternativamente, la forma farmacéuticamente apropiada del compuesto antioxidante puede ser formulada de forma que se mejore la estabilidad y la biodisponibilidad del compuesto antioxidante. Por ejemplo, pueden aplicarse recubrimientos entéricos en los comprimidos para impedir la liberación del compuesto antioxidante en el estómago, y para reducir el riesgo de efectos secundarios desagradables, o bien para mantener la estabilidad del compuesto antioxidante, que de otro modo podría verse sometido a una degradación por la exposición al entorno

gástrico. La mayoría de los polímeros que se usan con este fin son poliácidos que funcionan en virtud del hecho de que su solubilidad en el medio acuoso depende del pH, y que requieren unas condiciones con un pH superior al que se encuentra habitualmente en el estómago.

[0200] Un tipo preferible de estructura de liberación controlada oral es un recubrimiento entérico de una forma de dosificación sólida. Los recubrimientos entéricos favorecen que los compuestos permanezcan físicamente incorporados en la forma de dosificación durante un periodo específico cuando se exponen a los jugos gástricos, ya que los recubrimientos entéricos están diseñados para desintegrarse en el líquido intestinal para una absorción rápida. El retardo en la absorción es dependiente de la velocidad de paso a través del tracto gastrointestinal, y por lo tanto, la velocidad de vaciado gástrico es un factor importante. Para algunas administraciones, una forma de dosificación de tipo unidad múltiple, tal como los gránulos, puede ser superior a una de tipo unidad individual. Por lo tanto, en una forma de realización, los compuestos antioxidantes de la invención pueden estar contenidos en una forma de dosificación de unidad múltiple recubierta entéricamente. En una forma de realización más preferible, la forma de dosificación del compuesto antioxidante se prepara mediante la producción de partículas que tienen un sólido de compuesto antioxidante-agente de recubrimiento entérico en un material de núcleo inerte. Estos gránulos pueden dar como resultado una absorción prolongada del compuesto antioxidante con una buena biodisponibilidad.

[0201] Algunos agentes de recubrimiento entérico típicos incluyen, pero no se limitan a, ftalato de hidroxipropilmetil celulosa, copolímero del ácido metacrílico-éster del ácido metacrílico, acetato ftalato de polivinilo y acetato ftalato de celulosa.

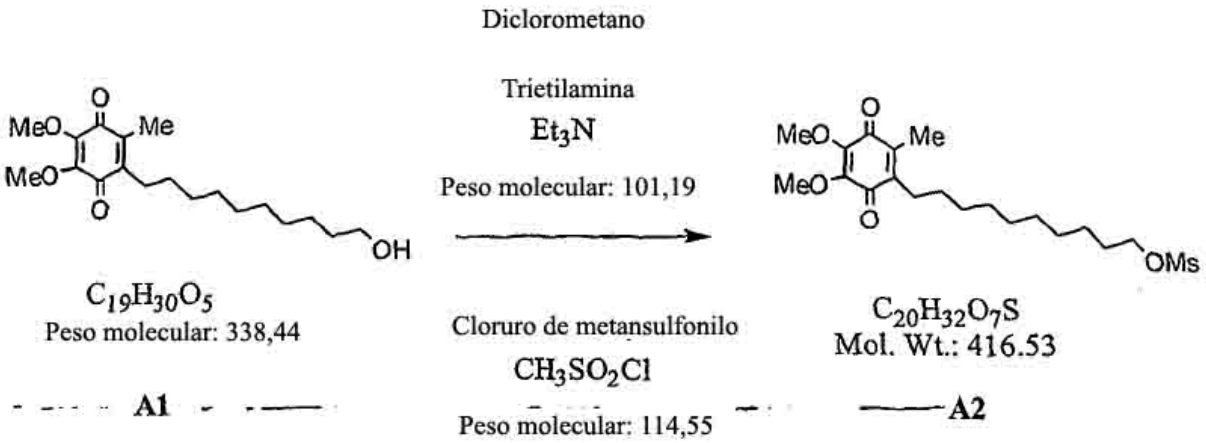
[0202] Algunos ejemplos de los compuestos antioxidantes preferidos de la presente invención y/o de formulaciones y/o de complejos de los mismos muestran unas propiedades farmacéuticas ventajosas. Por ejemplo, se formulan con facilidad, son químicamente y físicamente estables y fácilmente solubles en agua, tienen una baja higroscopicidad y muestran una buena vida de almacenamiento.

[0203] La invención se describirá ahora con más detalle con referencia a la siguiente sección experimental no limitante.

EJEMPLO 1. Síntesis de Mitoquinona-C10

[0204] A continuación se describe un método de síntesis preferido de una forma salina estable preferida del compuesto antioxidante ejemplar dirigido a la mitocondria Mitoquinona-C10, mesilato de Mitoquinona-C10, y de un complejo con ciclodextrina del mismo.

Fase I
Esquema:

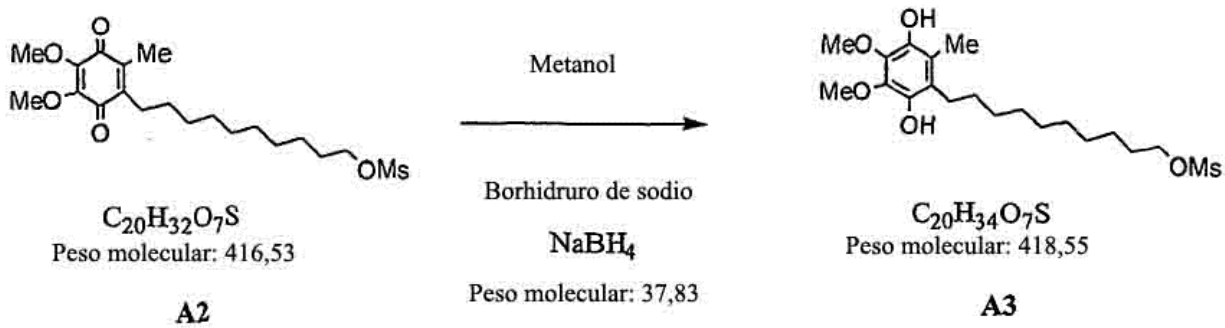


Etapa:

[0205]

1. Se disuelve idebenona (A1, 0,25 kg, 0,74 mol) en 2,5 l de DCM de calidad reactiva y después la mezcla se enfría hasta 10 ± 3 ºC en una atmósfera inerte.
2. Se añade trietilamina (0,152 kg, 1,5 mol) en una porción a la temperatura ambiente y la mezcla se deja reequilibrar a 10 ± 3 ºC.
3. Entonces se añade gradualmente una solución de cloruro de metansulfonilo (0,094 kg, 0,82 mol) en 0,5 l de DCM a una velocidad tal que se mantenga una temperatura interna de aproximadamente 10 - 15 ºC. (A esta escala, la adición se completó después de 75 minutos).
4. La mezcla de reacción se agita durante 15 - 30 minutos adicionales.
5. Se comprueba la finalización de la IPC mediante una TLC (R_f 0,65, 5 % de etanol / diclorometano).
6. La mezcla se lava después con agua (0,85 l) y con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (0,85 l).
7. La capa orgánica se evapora hasta un líquido de color rojo a presión reducida a 40 - 45 ºC. Después de secar durante 2 - 4 horas adicionales a alto vacío y a la temperatura ambiente, el bruto A2 así obtenido se usa directamente en la siguiente etapa. El rendimiento es desconocido ya que quedó atrapado disolvente en el líquido.

Fase 2
Esquema:



$C_{20}H_{32}O_7S$
Peso molecular: 416,53
A2

$C_{20}H_{34}O_7S$
Peso molecular: 418,55
A3

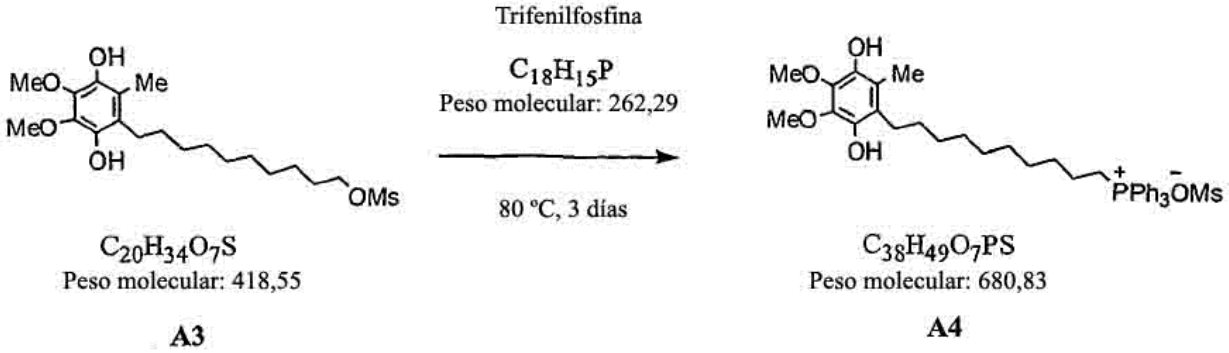
Peso molecular: 37,83

Etapa:

[0206]

1. Se disuelve mesilato de idebenona (**A2**, se asume un 100 % de rendimiento en la última etapa, 0,31 kg, 0,74 mol) en 2 l de metanol y después la mezcla se enfría hasta 0 - 5 ºC en una atmósfera inerte.
2. Se añade en porciones borhidruro de sodio (0,03 kg, 0,79 mol) a una velocidad tal que la temperatura interna no supere los 15 ºC. La finalización de la reacción estará acompañada por un cambio de color: rojo → amarillo *(A esta escala, la adición se completó después de 20 minutos)*.
3. La mezcla de reacción se agita durante 10 - 30 minutos adicionales.
4. Se comprueba la finalización de la IPC mediante una TLC **(A3** R_f 0,60, 5 % de etanol / diclorometano, **A2** R_f 0,65).
5. La mezcla se inactiva entonces con 2 l de una solución de ácido clorhídrico 2 M y se extrae tres veces con 1,2 l de diclorometano.
6. Las fases orgánicas combinadas se lavan después una vez con 1,2 l de agua y se secan sobre sulfato de magnesio anhidro (0,24 kg).
7. La fase orgánica se evapora después hasta un jarabe de color amarillo / pardo a presión reducida a 40 - 45 ºC. Después de secar durante 2 - 8 horas adicionales a alto vacío a la temperatura ambiente, el producto en bruto **A3**, 0,304 kg, 98 % de rendimiento, así obtenido se usa directamente en la siguiente etapa.

Fase 3
Esquema:

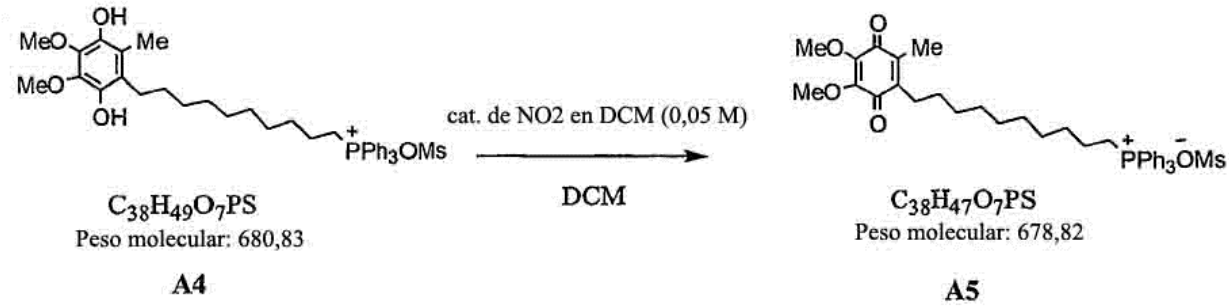


Etapa:

[0207]

1. Se añaden fragmentos de trifenilfosfina (0,383 kg 1,46 mol) a mesilato de idebenol (**A3**, 0,304 kg, 0,73 mol) en un matraz de fondo redondo del tamaño adecuado.
2. El matraz se une entonces a un evaporador rotatorio y el contenido se calienta a vacío a una temperatura del baño de 80 - 85 ºC.
3. La mezcla debería formar un fundido homogéneo a esta temperatura. Una vez que se ha formado el fundido y ya no hay evidencias de desgasificación, el vacío se desplaza con una atmósfera inerte y la mezcla se rota suavemente en un baño establecido a 80 - 85 ºC durante aproximadamente 3 días.
4. Se comprueba la finalización de la IPC mediante una RMN ^{1}H y una RMN ^{31}P. Se requiere un mínimo de conversión del 95 % antes de que pueda tener lugar el proceso de elaboración.
5. Después, la mezcla se enfría hasta cerca de la temperatura ambiente y se disuelve en 0,8 l de diclorometano.
6. Después se añaden en porciones 3,2 l de acetato de etilo con un calentamiento suave para precipitar el producto deseado en un exceso de trifenilfosfina.
7. Se elimina un pequeño volumen de disolvente mediante una evaporación a presión reducida (para eliminar el DCM) y la mezcla remanente se enfría después hasta cerca de la temperatura ambiente y se decanta.
8. El residuo siruposo remanente se somete entonces al mismo procedimiento de lavado dos veces más, y finalmente se seca después a alto vacío hasta un peso constante, para proporcionar una espuma de color pardo, 0.441 kg, 89 % de rendimiento (NOTA: el producto aún contenía algo de disolvente, véase la RMN). El **A4** así obtenido se usa directamente en la siguiente etapa.

Fase 4
Esquema:



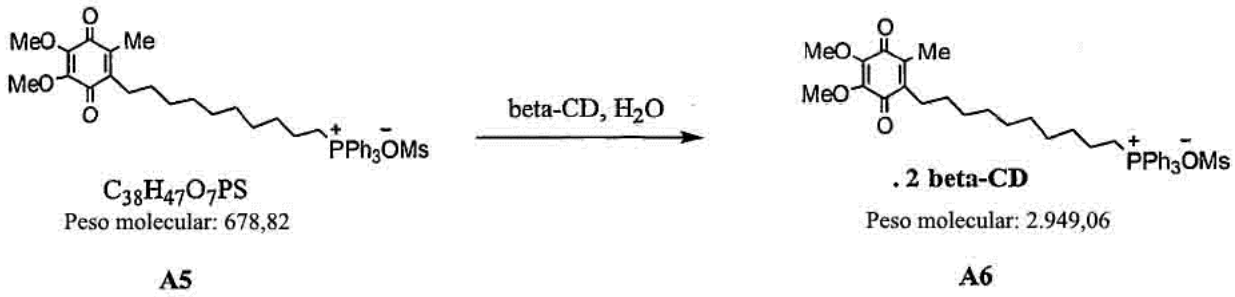
Etapa:

[0208]

1. Se disuelve la sal de mesilato de mitoQuinol en bruto (0,44 kg, se asumen 0,65 mol) en 6 l de DCM anhidro y el

matraz se purga con oxígeno.
2. El contenido del matraz se agita vigorosamente bajo una atmósfera de oxígeno durante 30 minutos para asegurar la saturación del disolvente con el gas.
3. Se añaden rápidamente 0,1 l de una solución de NO_2 0,65 M en DCM seco (2 mol % de NO_2) en una porción y la mezcla se agita vigorosamente bajo una atmósfera de oxígeno durante 4 - 8 horas a la temperatura ambiente.
4. Después se lleva a cabo una comprobación de la finalización de la IPC (mediante una RMN ^1H y opcionalmente una RMN ^{31}P).
5. Si la oxidación es incompleta se añaden adicionalmente 2 mol % de NO_2 en forma de una solución en DCM. Esto debería dirigir la reacción a su finalización. Se comprueba la IPC como antes. A esta escala se necesitaron 8 mol % de NO_2 en forma de una solución en DCM para que la reacción llegara a su finalización.
6. Entonces el disolvente se elimina mediante una evaporación a presión reducida para proporcionar un residuo siruposo de color rojo. Este residuo se disuelve en 2 l de diclorometano a 40 - 45 ºC.
7. Después se añaden 3,2 l de acetato de etilo en porciones con un calentamiento suave para precipitar el producto deseado. Se elimina un pequeño volumen de disolvente mediante una evaporación a presión reducida (para eliminar el DCM) y la mezcla remanente se enfría después hasta cerca de la temperatura ambiente y se decanta.
8. El residuo oleoso se secó a finalmente a alto vacío hasta un peso constante para proporcionar un vidrio de color rojo (419 g, 94 % de rendimiento). El **A5** así obtenido se usa directamente en la siguiente etapa.

Fase 5
Esquema:



[0209]

1. Se disuelve la sal de mesilato de mitoQuinol en bruto (A5 0,419 kg) en 6 l de agua con un calentamiento suave a 40 - 43 ºC.
2. La beta-ciclodextrina, 1,24 kg, se disuelve por separado en 20 l de agua, con un calentamiento a 60 ºC.
3. Estas dos soluciones se enfrían hasta aproximadamente la temperatura ambiente y se combinan para formar una mezcla homogénea. Esta solución debe ser almacenada a < 5 ºC.
4. Después se congela esta solución de color naranja a -20 ºC y se liofiliza por lotes hasta un peso constante (al menos 48 horas).
5. El sólido resultante se muele después suavemente para formar un polvo uniforme que fluye libremente de color amarillo / naranja (1,433 kg).

[0210] Se ha llevado a cabo un método sintético alternativo en el que la etapa de oxidación 3 de la fase 4 del método sintético descrito anteriormente se consiguió burbujeando oxígeno a través de la solución, lo que indica que la reacción de oxidación puede estar guiada sustancialmente hasta su finalización mediante un medio oxidativo distinto a la oxidación con NO_2.

EJEMPLO 2. Síntesis de compuestos antioxidantes dirigidos a la mitocondria

[0211] La síntesis químicas de la Mitoquinona-C3, de la Mitoquinona-C5 y de la Mitoquinona-C15 se resumen en la Fig. 2 y están descritas a continuación. Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron adquiridos mediante el uso de un instrumento Varian 300 MHz. Para la RMN-^1H el patrón interno era tetrametilsilano en $CDCl_3$. Para la RMN ^{31}P, el patrón externo era ácido fosfórico al 85 %. Los desplazamientos químicos (δ) están en ppm con respecto al patrón. Los análisis elementales fueron realizados por el Campbell Microanalytical Laboratory, University of Otago. La espectrometría de masas por electronebulización fue realizada mediante el uso de un espectrómetro de masas con cromatografía líquida Shimadzu LCMS-QP800X. Las soluciones madre se prepararon en etanol absoluto y se almacenaron a -20 ºC en la oscuridad.

[0212] *Mitoquinona-C3* **(6)**. La ruta sintética hacia la Mitoquinona-C3 se muestra en la Fig. 2A. El material de partida, 2,3,4,5-tetrametoxitolueno **(1)** (Lipshutz, B. H., Kim, S. -k., Mollard, P. y Stevens, K. L. (1998) Tetrahedron 54, 1241 - 1253) se preparó mediante la reducción de la g 2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona (CoQ_0) al hidroquinol (Carpino, L. A., Triolo, S.A. y Berglund, R. A. (1989) J. Org. Chem. 54, 3303 - 3310) seguido de una metilación para dar **1** (Lipshutz, B. H., Kim, S. -k., Mollard, P. y Stevens, K. L. (1998) Tetrahedron 54, 1241 - 1253). Una solución de **1** (6,35 g, 29,9 mmol) en hexano seco (80 ml) y de N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (8,6 ml) se puso con una barra de agitación secada a la llama en un tubo de Schlenk secado a la llama en una atmósfera de nitrógeno. Se añadió lentamente una solución en hexano de n-butil-litio (1,6 M, 26,2 ml) a la temperatura ambiente y la mezcla se enfrió y se agitó a 0 ºC durante 1 h. Después de haberse enfriado hasta -78 ºC, se añadió tetrahidrofurano seco (THF; 250 ml), y se retiró una pequeña alícuota de la mezcla de reacción, se inactivó con D_2O y se examinó mediante una RMN ^1H para asegurar una metalación completa. La suspensión de color amarillo se transfirió después a un segundo tubo de Schlenk secado a la llama que contiene CuCN (0,54 g, 6,03 mmol) bajo nitrógeno a -78 ºC. La mezcla se calentó a 0 ºC durante 10 min, después se enfrió hasta -78 ºC y se añadió bromuro de alilo (3,62 ml) y la reacción se agitó durante una noche (19 h) y se dejó calentar hasta la temperatura ambiente. La reacción se inactivó con NH_4Cl acuoso al 10 % (75 ml) y se extrajo con éter (2 x 200 ml). Los extractos etéreos combinados se lavaron con H_2O (2 x 150 ml), NH_4OH acuoso al 10 % (200 ml) y NaCl acuoso saturado (200 ml). Los disolventes orgánicos se secaron sobre $MgSO_4$, se filtraron y el disolvente se eliminó mediante una evaporación rotatoria a vacío para dar un producto en bruto (7,25 g). La cromatografía en columna en gel de sílice y una elución con éter / hexano al 20 % dieron el 1,2,3,4-tetrametoxi-5-metil-6-(2-propenil) benceno puro **(2)** (Yoshioka, T., Nishi, T., Kanai, T., Aizawa y., Wada, K., Fujita, T. y Horikoshi, H. (1993), Eur. Pat. Appl. EP 549366 A1) (6,05 g, 83,5 %). RMN ^1H δ 5,84 - 5,98 (1H, m, -C**H**=C), 4,88 - 5,03 (2H, m, =C**H**$_2$), 3,78, 3,80, 3,90, 3,92 (12H, s, O**Me**), 3,38 (2H, d, J = 7,0 Hz, Ar-C**H**$_2$), 2,14 (3H, s, Ar-**Me**) ppm.

[0213] Una solución de 2 (8,0 g, 33,05 mmol) en THF seco (45 ml) se añadió gota a gota durante 20 min bajo argón a una suspensión agitada de 9-borabiciclo[3,3,1]nonano en THF (79 ml, 39,67 mmol, 0,5 M) a 25 ºC. La solución resultante se agitó durante una noche a la temperatura ambiente y durante 2 h adicionales a 65 ºC en una atmósfera de argón. Después, la mezcla se enfrió hasta 0 ºC y después se añadió gota a gota NaOH 3 M (53 ml), seguido de H_2O_2 acuoso al 30 % (53 ml). Después de 30 min de agitación a la temperatura ambiente, la fase acuosa se saturó con NaCl y se extrajo 3 veces con THF. Las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con NaCl acuoso saturado, se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se evaporaron para dar un residuo oleoso (11,5 g) que se purificó mediante una cromatografía en columna en gel de sílice (200 g, empaquetada con éter / hexano 1:9). La elución con éter / hexano 1:4 dio el 3-(2,3,4,5-tetrametoxi-6-metil-fenil)-propan-1-ol puro **(3)** en forma de un aceite viscoso incoloro (6,85 g, 80 %). RMN ^1H δ 3,91, 3,90, 3,84, 3,79 (12H, s, O**Me**), 3,56 (2H, t, J = 7,0 Hz, -CH$_2$-O**H**), 2,72 (2H, t, J = 7,0 Hz, Ar- C**H**$_2$), 2,17 (3H, s, Ar-**Me**), 1,74 (2H, quintuplete, J = 7,0 Hz, -C**H**$_2$-) ppm, Anál. Calc. para $C_{14}H_{22}O_5$: C, 62,2; H, 8,2. Encontrado: C, 62,2; H, 8,4 %.

[0214] Una solución de 3 (3,88 g, 15 mmol) y trietilamina (3,0 g, 30 mmol, 4,2 ml) en CH_2Cl_2 (50 ml) se agitó a la temperatura ambiente durante 10 min. Se añadió gota a gota cloruro de metansulfonilo (1,8 g, 1,20 ml, 15,75 mmol) en CH_2Cl_2 (50 ml) durante 20 min y la mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 1 h. Después, la mezcla se diluyó con CH_2Cl_2 (50 ml) y la capa orgánica se lavó con H_2O (5 x 100 ml), $NaHCO_3$ acuoso al 10 % (100 ml), se secó ($MgSO_4$), se filtró y el disolvente se eliminó a vacío mediante una evaporación rotatoria para proporcionar el 1-(3-metanosulfoniloxipropil)-2-metil-3,4,5,6-tetrametoxibenceno **(4)** en forma de un líquido (4,8 g, 95 %). RMN ^1H δ 4,27 (2H, t, J = 7,0 Hz, -C**H**$_2$-O-SO$_2$-Me), 3,91, 3,89, 3,82, 3,78 (12H, s, **OMe**), 3,03 (3H, s, -O-SO$_2$-**Me**), 2,70 (2H, t, J = 7,0 Hz, Ar-C**H**$_2$-), 2,17 (3H, s, Ar-**Me**), 1,9 (2H, m, -C**H**$_2$-) ppm.

[0215] El metansulfonato en bruto **4** (3,30 g, 9,8 mmol) se usó directamente en la siguiente reacción mediante una mezcla con una mezcla de trifenilfosfina recién molida (4,08 g, 15,6 mmol) y NaI (7,78 g, 51,9 mmol) en un tubo de Kimax y se precintó en una atmósfera de argón. La mezcla se mantuvo después a 70 - 74 ºC con agitación magnética durante 3 h, tiempo durante el cual la mezcla cambio desde un líquido espeso fundido hacia un sólido vítreo. El tubo se enfrió hasta la temperatura ambiente y el residuo se agitó con CH_2Cl_2 (30 ml). Después la suspensión se filtró, y el filtrado se evaporó a vacío. El residuo se disolvió en una cantidad mínima de CH_2Cl_2 y se trituró con un exceso de éter (250 ml) para precipitar el sólido de color blanco. El sólido se filtró y se lavó con éter, se secó a vacío para dar yoduro de [3-(2,3,4,5-tetrametoxi-6-metil-fenil)-propil]trifenil-fosfonio puro **(5)** (5,69 g, 90 %). RMN ^1H δ 7,82 - 7,65 (15H, m, Ar-**H**), 3,88, 3,86, 3,74, 3,73 (12H, s, O**Me**), 3,76 - 3,88 (2H, m, C**H**$_2$-P+), 2,98 (2H, t, J = 7,0 Hz, C**H**$_2$-Ar), 2,13 (3H, s, Ar-**Me**), 1,92 - 1,78 (2H, m, -C**H**$_2$-) ppm. RMN ^{31}P (121,4 MHz) δ 25,32 ppm, Anál. calc. para $C_{32}H_{36}IO_5P$: C, 59,8; H, 5,7; P, 4,8; Encontrado: C, 59,8; H, 5,8; P, 4,5 %.

[0216] Una solución de la forma de yoduro de **5** (4,963 g, 7,8 mmol) en CH_2Cl_2 (80 ml) se agitó con $NaNO_3$ acuoso al 10 % (50 ml) en un embudo de decantación durante 5 min. La capa orgánica se separó, se secó (Na_2SO_4),

se filtró y se evaporó a vacío para dar la sal de nitrato de **5** (4,5 g, 7,8 mmol, 100 %), que se disolvió en una mezcla de CH_3CN y H_2O (7:3, 38 ml) y se agitó a 0 ºC en un baño de hielo. Después se añadió ácido piridin-2,6-dicarboxílico (6,4 g, 39 mmol), seguido de la adición gota a gota de una solución de nitrato amónico de cerio (21,0 g, 39 mmol) en CH_3CN / H_2O (1:1, 77 ml) durante 5 min. La mezcla de reacción se agitó a 0 ºC durante 20 min y después a la temperatura ambiente durante unos 10 min adicionales. Después la mezcla de reacción se vertió en H_2O (200 ml) y se extrajo con CH_2Cl_2 (200 ml), se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó a vacío para dar un nitrato en bruto de [3-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-d ioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)propil] trifenilfosfonio **(6)**. El producto total se disolvió en CH_2Cl_2 (100 ml) y se agitó durante 10 min con KBr acuoso al 20 % (50 ml). La capa orgánica se separó, se secó y se evaporó a vacío para dar la sal de bromuro de **6** (4,1 g, 93,6 %). RMN ^{1}H δ 7,90 - 7,65 (15H, m, Ar-**H**), 4,15 - 4,05 (2H, m, C**H**$_2$-P+), 3,96, 3,95, (6H, s, O**Me**), 2,93 (2H, t, J = 7,0 Hz, C**H**$_2$-Ar), 2,15 (3H, s, Ar-Me), 1,85 - 1,70 (2H, m, -C**H**$_2$-) ppm. RMN ^{31}P δ 25,29 ppm.

[0217] Una solución del bromuro **6** (3,65 g, 6,5 mmol) en CH_2Cl_2 (75 ml) se agitó con una solución acuosa al 10 % p/v de metansulfonato de sodio (100 ml) en un embudo de decantación durante 5 min. La capa de CH_2Cl_2 se separó, se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó a vacío para dar la sal de metansulfonato de [3-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)propil]trifenil-fosfonio (**6**) (3,7 g, 98 %). RMN ^{1}H δ 7,88 - 7,60 (15H, m, Ar-**H**), 3,93, 3,92, (6H, s, O**Me**), 3,90 - 3,78 (2H, m, C**H**$_2$-P+), 2,85 (2H, t, J = 7,0 Hz, C**H**$_2$-Ar), 2,70 (3H, s, OSO_2CH_3), 2,09 (3H, s, Ar-**Me**), 1,82 - 1,68 (2H, m, - C**H**$_2$-) ppm. RMN ^{31}P (121,4 MHz) δ 25,26 ppm. Anál. calc. para $C_{31}H_{33}O_7PS$: C, 64,1; H, 5,7; P, 5,3; S, 5,5. Encontrado: C, 63,8; H, 5,9; S, 5,3; P, 5,2 %.

[0218] *Mitoquinona-C5* **(14)**. La ruta sintética hacia la Mitoquinona-C5 se muestra en la Fig. 2B. Se añadió dihidropirano (46,83 g, 0,55 mol) a 2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzohidroquinona (CoQ_0) (50 g, 0.275 mol) disuelta en ácido acético (500 ml) y se agitó a la temperatura ambiente durante 10 minutos. A esta solución se añadió $BF_3 \cdot Et_2O$ (38,57 g, 0,271 mol). La solución resultante se agitó durante 18 horas a la temperatura ambiente. Después de este tiempo, la mezcla de reacción en bruto se vertió en agua helada (500 ml) y se extrajo con cloroformo (1.000 ml). El extracto orgánico se lavó con salmuera (500 ml) y se secó ($MgSO_4$). El disolvente se eliminó a vacío para dar el 2,3-dimetoxi-5-metil-6-(tetrahidro-piran-2-il)-4-(tetrahidro-piran-2-iloxi)-fenol **(7)** en bruto en forma de un aceite de color rojo (115 g) que se usó sin purificación adicional. Una solución de **7** en bruto (110 g) en una mezcla de ácido acético / ácido perclórico (97,5:2,5, 500 ml) se hidrogenó sobre un 5 % de paladio / carbón vegetal (5,42 g) a la presión atmosférica y la temperatura ambiente hasta que cesó la captación de hidrógeno (tres días). La mezcla de reacción se filtró después a través de una capa de Celita, y el residuo sólido se lavó con etanol (500 ml). El filtrado combinado se dividió en tres porciones iguales y a cada porción se le añadió agua destilada (1.000 ml) y se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 200 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (500 ml), bicarbonato de sodio saturado (500 ml) y salmuera (300 ml) y después se secaron ($MgSO_4$). Después, la mezcla se filtró y los disolventes se eliminaron a vacío para dar el acetato de 4-acetoxi-3-(5-acetoxi-pentil)-5,6-dimetoxi-2-metil-fenilo **(8)** en bruto en forma de un aceite de color rojo (110 g) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. RMN ^{1}H δ 4,0 - 4,15 (2H, m, -C**H**$_2$-O), 3,86 (6H, s, 2x O**Me**)**,** 2,58 (2H, t, J = 7,0 Hz, -C**H**$_2$-Ar), 2,12 (3H, s, Ar-**Me**), 2,06 (6H, s, 2x C**H**$_3$-C=O), 2,02 (3H, s, C**H**$_3$-C=O), 1,35 - 1,70 (6H, m, **-**C**H**$_2$C**H**$_2$C**H**$_2$-) ppm.

[0219] Se añadió bromuro de litio y aluminio (8,0 g, 0,21 mol) a THF seco (500 ml) en un matraz de fondo redondo de 1 l equipado con un agitador magnético, un condensador de reflujo y rodeado por un baño de agua a la temperatura ambiente. Se añadió gota a gota una solución de **8** en bruto (74 g) en THF seco recién destilado (100 ml) a la mezcla de THF / $LiALH_4$ durante un periodo de 25 - 30 minutos. Se añadió THF seco adicional (200 ml) para facilitar la agitación, y la reacción se dejó en agitación durante 3 horas a la temperatura ambiente. La reacción se inactivó después mediante la adición gota a gota de HCl 3 M (20 ml) seguido de una lenta adición de agua destilada (70 ml). La mezcla de reacción se filtró después y el filtrado se lavó con salmuera (2 x 300 ml), se secó ($MgSO_4$), se filtró y el disolvente se eliminó a vacío. El residuo de color verde remanente en el embudo del filtro se disolvió en HCl al 15 % (500 ml) y se extrajo con CH_2Cl_2 (1 x 300 ml, 2 x 200 ml). Las fracciones orgánicas se combinaron y se lavaron con salmuera (400 ml), se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y evaporaron a vacío. Este extracto se combinó con el material procedente del proceso de elaboración del filtrado para dar el 2-(5-hidroxipentil)-5,6-dimetoxi-3-metil-benceno-1,4-diol **(9)** en bruto (68,3 g) en forma de un aceite de color rojo. Este producto **9** se purificó mediante el uso de una cromatografía en columna en gel de sílice, (600 g, empaquetada con un 10 % de éter / CH_2Cl_2). La elución con un 10 % de éter / CH_2Cl_2 dio algo de **8** sin reaccionar y el material de partida de 2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzohidroquinona. La elución con un 20 % de éter / CH_2Cl_2 dio una mezcla de **9** y la quinona **10** (14,14 g, 19 % a partir del 2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinol). El compuesto **9** se convirtió lentamente en la quinona **10** después de un periodo de reposo al aire, y no pudo obtenerse un análisis elemental satisfactorio. RMN ^{1}H δ 5,41 (1H, s, Ar-O**H**), 5,38 (1H, s, Ar-O**H**), 4,88 (6H, s, 2 x Ar-O**Me**), 3,65 (2H, t, J = 6,3 Hz, C**H**$_2$-OH), 2,61 (2H, t, J = 6,4 Hz, Ar-C**H**$_2$), 2,14 (3H, s, Ar-**Me**), 1,42-1,68 (6H, m, 3x- C**H**$_2$-) ppm.

[0220] Una solución del quinol **9** (7,5 g, 27,7 mmol) en CH_2Cl_2 (150 ml) se saturó con oxígeno gaseoso a la presión atmosférica y se añadió una solución de NO_2 en CH_2Cl_2 (1 ml, 1,32 M). La reacción se agitó a la temperatura ambiente bajo un atmósfera de oxígeno durante 18 horas, momento en el cual la TLC (40 % de éter / CH_2Cl_2) mostró que se había completado la formación de la quinona 2-(5-hidroxipentil)-5,6-dimetoxi-3-metil-[1,4]benzoquinona **(10)**. Después, el disolvente se eliminó a vacío para proporcionar el producto **10** (Yu, C.A. y Yu, L. (1982) Biochemistry 21, 4096 - 4101) (7,40 g) en forma de un aceite de color rojo. RMN ^{1}H δ 3,99 (6H, s, 2 x Ar-O**Me**), 3,65 (2H, t, J = 6,3 Hz, C**H**$_2$-OH), 2,47 (2H, t, J = 6,3 Hz, Ar-C**H**$_2$), 2,01 (3H, s, Ar-**Me**), 1,52 - 1,60 (2H, m, -C**H**$_2$-), 1,37 - 1,43 (4H, m, -C**H**$_2$C**H**$_2$-) ppm.

[0221] Se preparó una solución de **10** (7,40 g, 27,3 mmol) en CH_2Cl_2 (150 ml) y trietilamina (5,46 g, 5,46 mmol) y se añadió una solución de cloruro de metansulfonilo (2,48 g, 30 mmol) en CH_2Cl_2 (50 ml) durante 30 minutos con agitación. Después de agitar durante 1,5 horas adicionales a la temperatura ambiente, la mezcla de reacción se lavó con agua destilada (5 x 100 ml), bicarbonato de sodio saturado (150 ml) y se secó ($MgSO_4$). La mezcla se filtró y el disolvente se eliminó a vacío para dar el metansulfonato en bruto (9,03 g) en forma de un aceite de color rojo. RMN ^{1}H δ 4,19 (2H, t, J = 7,5 Hz, -C**H**$_2$-OMs), 3,95 (6H, s, 2xAr-O**Me**), 2,98 (3H, s, OSO_2C**H**$_3$), 2,44 (2H, t, J = 7,5 Hz, Ar-C**H**$_2$-), 1,98 (3H, s, Ar-**Me**), 1,75 (2H, quintuplete, J = 7,5 Hz, -C**H**$_2$-), 1,38 - 1,48 (4H, m, -C**H**$_2$-C**H**$_2$-) ppm. El metansulfonato se disolvió en NaI al 10 % (p/v) en acetona (100 ml) y se agitó durante 44 horas a la temperatura ambiente. Después, la mezcla se concentró a vacío y se añadió H_2O (100 ml) al residuo. La mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 70 ml) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y el disolvente se eliminó a vacío para dar la 2-(5-yodopentil)-5,6-dimetoxi-3- metil-[1,4]benzoquinona en bruto **(11)**. Este producto se purificó mediante una cromatografía en columna en gel de sílice (150 g). La elución con CH_2Cl_2 y un 10 % de éter / CH_2Cl_2 dio **11** puro (7,05 g, 69 %) en forma de un aceite de color rojo. RMN ^{1}H δ 3,99 (6H, s, 2 x Ar-O**Me**), 3,18 (2H, t, J = 6,9 Hz, C**H**$_2$-I), 2,47 (2H, t, J = 7,2 Hz, Ar-C**H**$_2$), 2,02 (3H, s, Ar-**Me**), 1,85 (2H, quintuplete, J = 7,5 Hz, -C**H**$_2$-), 1,38 - 1,48 (4H, m, -C**H**$_2$-C**H**$_2$-) ppm. Anal. calc. para $C_{14}H_{19}IO_4$: C, 44,5; H, 5,1; I, 33,6. Encontrado: C, 44,6; H, 5,1; I, 33,4 %.

[0222] Una solución de **11** (1,14 g, 2,87 mmol) en metanol (20 ml) se trató con $NaBH_4$ (0,16 g, 4,3 mmol) y la mezcla se volvió incolora en 1 minuto. Después de 5 minutos a la temperatura ambiente se añadió HCl acuoso al 5 % (100 ml) y la solución se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 50 ml). Las fracciones orgánicas se combinaron, se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y el disolvente se eliminó a vacío para dar **12** (1,15 g, 100 %) en forma de un aceite de color amarillo sensible al oxígeno que se usó sin demora. RMN ^{1}H δ 5,36, 5,31 (2H, s, Ar-OH), 3,89 (6H, s, 2x Ar-OMe), 3,20 (2H, t, J = 7,5 Hz, -CH_2-I), 2,62 (2H, t, J = 7,5 Hz, -CH_2-Ar), 2,15 (3H, s, Me), 1,82 - 1,92 (2H, m, -CH_2-), 1,45 - 1,55 (4H, m, -CH_2-CH_2-) ppm. Una mezcla de **12** (1,15 g, 2,87 mmol) y trifenilfosfina (1,2 g, 4,31 mmol) se puso en un tubo de Kimax con una barra de agitación. El tubo se lavó abundantemente con argón, se precintó firmemente y se calentó y se agitó durante 14 h a 70 ºC. Se formó un sólido de color oscuro que se disolvió en CH_2Cl_2 (10 ml) y se trituró en éter (200 ml) y el precipitado de color blanco formado se filtró rápidamente. El precipitado, que se volvió pegajoso tras la exposición al aire, se redisolvió en CH_2Cl_2 y se evaporó a vacío para dar el producto en bruto de yoduro de [5-(2,5-dihidroxi-3,4-dimetoxi-6-metilfenil)-pentil]trifenilfosfonio **(13)** (2,07 g, 115 %) en forma de un aceite de color pardo. El material no era estable durante su almacenamiento en períodos prolongados y se usó lo más pronto posible en las reacciones posteriores RMN. ^{1}H δ 7,84 - 7,68 (15H, m, Ar-**H**), 5,45 (1H, s, Ar-O**H**), 5,35 (1H, s, Ar-O**H**), 3,89 (3H, s, Ar-O**Me**), 3,87 (3H, s, ArO**Me**), 3,65 (2H, m, -C**H**$_2$-+PPh_3), 2,54 (2H, t, J = 7,0 Hz, Ar-C**H**$_2$), 2,08 (3H, s, Ar-**Me**), 1,65 - 1,75 (2H, m, -C**H**$_2$-), 1,45 - 1,55 (4H, m, -C**H**$_2$C**H**$_2$-) ppm. RMN ^{31}P δ 25,43 ppm.

[0223] Una solución de **13** (2,07 g) en CH_2Cl_2 (50 ml) se saturó con oxígeno gaseoso y se añadió una solución de NO_2 en CH_2Cl_2 (0,5 ml, 1,32 M). Después, la reacción se agitó a la temperatura ambiente bajo un atmósfera de oxígeno durante 18 h. El disolvente se eliminó a vacío para proporcionar el producto en bruto de yoduro de [5-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)pentil]trifenilfosfonio **(14)** en forma de un aceite de color rojo. Este residuo se disolvió de nuevo en CH_2Cl_2 (10 ml) y se trituró en éter (200 ml) para dar un precipitado inicial de color amarillo que solidificó en forma de un aceite de color rojo en unos pocos minutos. Los disolventes se decantaron y el precipitado se disolvió en CH_2Cl_2 y el disolvente se eliminó a vacío para dar el producto **(14)** (1,866 g) en forma de un aceite de color rojo. Se purificó una alícuota (0,880 g) de **14** mediante una cromatografía en columna en gel de sílice (20 g). La elución con CH_2Cl_2 dio un material no identificado de color púrpura. La elución con un 5 % de etanol / CH_2Cl_2 dio el producto de yoduro puro **14** (0,606 g) en forma de un aceite de color rojo. RMN ^{1}H δ 7,84 - 7,68 (15 H, m, Ar-**H**) 3,98 (6H, s, 2 x Ar-O**Me**), 3,65 (2H, m, C**H**$_2$-P+), 2,40 (2H, t, J = 7,5 Hz, Ar-C**H**$_2$), 2,00 (3H, s, Ar-**Me**), 1,71 (4H, m, -C**H**$_2$-), 1,43 (2H, m, -C**H**$_2$-) ppm. RMN ^{31}P (121,4 MHz) δ 25,47 ppm. Anál. calc. para $C_{32}H_{36}IO_4P$: C, 59,8; H, 5,7; I, 19,8; P, 4,8; Encontrado: C, 60,0; H, 5,3; I, 19,7; P, 4,7 %.

[0224] *Mitoquinona-CI5* **(16)**. La ruta sintética hacia la Mitoquinona-C15 se muestra en la Fig. 2C. Una solución de $K_2S_2O_8$ (0,450 g, 1,66 mmol) en H_2O (25 ml) se añadió gota a gota durante 2,5 horas a una suspensión

agitada de $AgNO_3$ (0,262 g, 1,54 mmol), ácido 16-hidroxihexadecanoico (0,408 g, 1,50 mmol) y 2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona (0,271 g, 1,49 mmol) en H_2O:CH_3CN (1:1, 36 ml) mantenida a 75 ºC. Después de agitar durante 30 minutos, la mezcla se enfrió y se extrajo con éter (4 x 30 ml). La fase orgánica combinada se lavó con H_2O (2 x 100 ml), $NaHCO_3$ (1 M, 2 x 50 ml) y NaCl saturado (2 x 50 ml). La fase orgánica se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró a vacío para dar un aceite de color rojo (0,444 g). La cromatografía en columna del aceite en bruto (gel de sílice, 15 g) y la elución con mezclas de CH_2Cl_2 y éter (0 %, 5 % 20 %) dio la 2-(15-hidroxipentadecil)-5,6-dimetoxi-3-metil-[1,4]benzoquinona **(15)** (0,192 g, 33 %) en forma de un aceite de color rojo. RMN ^{1}H δ 3,99, 3,98 (6H, s, O**Me**), 3,64 (2H, t, J = 6,5 Hz, -C**H**$_2$OH), 2,45 (2H, t, J = 7,5 Hz, -C**H**$_2$-anillo), 1,4 - 1,2 (26H, m, -(C**H**$_2$)$_{13}$-). Anál. calc. para $C_{24}H_{40}O_5$: C, 70,6; H, 9,9. Encontrado: C, 70,5; H, 9,8 %.

[0225] Una mezcla de trifenilfosfina (0,066 g, 0,25 mmol), Ph_3PHBr (0,086 g, 0,25 mmol) y 15 (0,101 g, 0,25 mmol) se agitó bajo argón en un tubo de Kimax precintado a 70 ºC durante 24 horas, momento en el cual se había transformado en un aceite viscoso de color rojo. El residuo se disolvió en un mínimo de CH_2Cl_2 (0,5 ml) y se vertió en éter (10 ml) para producir un precipitado oleoso de color rojo. Después los disolventes se decantaron, el residuo se disolvió en CH_3OH (0,5 ml) y se diluyó con H_2O (10 ml) que contenía un 48 % de HBr (1 gota). Se formó un precipitado de color rojo, y después de que el precipitado hubiera sedimentado, se eliminó el sobrenadante y el residuo se lavó con H_2O (5 ml). El residuo se disolvió después en etanol (5 ml) y el disolvente se eliminó a vacío. El residuo se disolvió de nuevo en CH_2Cl_2 (0,5 ml), se diluyó con éter (5 ml) y el disolvente se decantó y el residuo se colocó en un sistema de vacío (0,1 mbar) durante 24 horas para dar el bromuro de [15-(4,5-dimetoxi-2-metil- 3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)pentadecil]trifenilfosfonio **(16)** (0,111 g, 61 %) en forma de una espuma de color amarillo que se transformó en un aceite de color rojo al contacto con el aire. RMN ^{1}H (299 MHz) δ 7,6 - 8,0 (15H, m, Ar-**H**), 3,89 (6H, s, O**Me**), 3,9 (2H, m, -C**H**$_2$-P), 2,6 (2H, m,-C**H**$_2$- anillo), 1,7 - 1,1 (26H, m, -(C**H**$_2$)$_{13}$-) ppm. RMN ^{31}P (121,4 MHz) δ 25,71 ppm. La espectrometría de masas por electronebulización encontró (M^+) 653, calculado para $C_{42}H_{54}O_4P^+$ 653. Los resultados analíticos de la combustión no fueron satisfactorios debido a unos niveles incoherentes de inclusión de disolvente.

EJEMPLO 3. Propiedades de los compuestos antioxidantes ejemplares dirigidos a las mitocondrias

[0226] La presente invención reconoce que, con objeto de ser adecuada para una gran diversidad de aplicaciones, por ejemplo, la formulación de formas de dosificación tales como comprimidos, existe una ventaja en ser capaces de formular una forma cristalina o sólida del compuesto antioxidante dirigida a las mitocondrias. De forma análoga, sin desear ceñirnos a ninguna teoría, se cree que la funcionalidad antioxidante de los compuestos de la presente invención está determinada, al menos en parte, por sus propiedades fisicoquímicas.

[0227] Los coeficientes de partición de una diversidad de los compuestos antioxidantes se muestran en la Tabla 1. Los coeficientes de partición en octan-1-ol / PBS se determinaron mediante la adición de 400 nmol del compuesto a 2 ml de octan-1-ol saturado con PBS y la mezcla durante 30 min a 37 ºC con 2 ml de PBS saturado con octan-1-ol. Las concentraciones del compuesto en las dos fases se midieron mediante la absorción UV a 268 nm y se cuantificaron a partir de curvas estándar del compuesto en PBS saturado con octan-1-ol o de octan-1-ol saturado con PBS (Kelso, G. F., Porteous, C. M., Coulter, C. V., Hughes, G., Porteus, W. K., Ledgerwood, E. C., Smith, R. A. J. y Murphy, M. P., 2001, J Biol Chem 276, 4588; Smith, R. A. J., Porteous, C. M., Coulter, C. V. y Murphy, M. P. 1999 Eur J Biochem 263, 709). Las disoluciones madre de los compuestos se prepararon en etanol absoluto y se almacenaron a -20 ºC en la oscuridad. El [^{3}H]TPMP era de American Radiolabelled Chemicals Inc, (MO, EE.UU.).

[0228] Una mención particular merece el bajo coeficiente de partición de los compuestos con unos números pequeños de átomos de carbono formando un puente con la fracción antioxidante y el fosfonio. Por ejemplo, un compuesto de la presente invención, denominado en el presente documento Mitoquinona-C3, que tiene un puente de 3 carbonos, tiene un coeficiente de partición de aproximadamente 50 veces menor que el compuesto relacionado, la Mitoquinona-C10 (Tabla 1).

TABLA I. Coeficientes de partición de los compuestos antioxidantes y de compuestos relacionados

Compuesto	Coeficiente de partición
Metiltrifenilfosfonio (TPMP)	[a] 0,35 ± 0,02
Mito Vit E	[b] 7,4 ± 1,6
4-Bromobutiltrifenilfosfonio	[b] 3,83 ± 0,22
4-Yodobutiltrifenilfosfonio	[c] 4,0 ± 0,4

Mitoquinona-C15	
Mitoquinona-C10	[a] 160 ± 9
Mitoquinona-C5	13,9 ± 1,9
Mitoquinona-C3	[c] 2,8 ± 0,3
α-Tocoferol	[b] 27,4 ± 1,9
Bromodecilubiquinona	[d] 310 v 60
Idebenona	[d] $3,1 \times 10^3$
Decilubiquinona	[d] $3,1 \times 10^5$
Coenzima Q_0	[d] 1,33
Coenzima Q_1	[d] 409
Coenzima Q_2	$< 44 \times 10^4$
Ubiquinona (Coenzima Q_{10})	$< 82 \times 10^{20}$
Ubiquinol	$< 53 \times 10^{20}$
Decilubiquinol	$< 91 \times 10^5$
Idebenol	$<82 \times 10^3$

Los datos [a-c] son los coeficientes de partición en octan-1-ol / solución salina tamponada con fosfato determinados a 25 ºC o a 37 ºC como se ha descrito anteriormente, o los coeficientes de partición [d] en octanol / agua calculados mediante el uso del programa informático Advanced Chemistry Development (ACD) Solaris V4.67 según se describe en Jauslin, M. L., Wirth, T., Meier, T. y Schoumacher, F., 2002, Hum Mol Genet 11, 3055:

[a] Kelso, G. F., Porteous, C.M., Coulter, C. V., Hughes, G., Porteus, W. K., Ledgerwood, E. C., Smith, R. A. J. y Murphy, M. P., 2001, J Biol Chem 276, 4588.

[b] Smith, R. A. J., Porteous, C. M., Coulter, C. V. y Murphy, M. P. 1999 Eur J Biochem 263, 709.

[c] Smith, R. A. J., Porteous, C. M., Gane, A. M. y Murphy, M. P. 2003 Proc Nat Acad Sci 100, 9, 5407.

[0229] A partir de sus coeficientes de partición en octan-1-ol / PBS, está claro que la Mitoquinona-C3, la Mitoquinona-C5, la Mitoquinona-C10 y la Mitoquinona-C15 abarcan una amplia variedad de hidrofobicidades. La de la Mitoquinona-C3 es similar a la del simple y relativamente soluble en agua catión TPMP, mientras que la de la Mitoquinona-C15 indica que tiene una solubilidad en agua muy baja. Se ha informado de que los cationes de alquiltrifenilfosfonio tales como la Mitoquinona se adsorben sobre las bicapas de fosfolípidos con el catión a nivel de los grupos de ácido carboxílico, mientras que el grupo alquilo hidrófobo penetra en el núcleo hidrófobo de la membrana. Se cree que cuanto más largo sea el puente de metileno, más profundamente penetrará el ubiquinol antioxidante en el núcleo hidrófobo de la membrana. Creemos que el grado máximo de penetración en una hoja de la membrana se producirá para estos compuestos según se ilustra en la Figura 3, que muestra las variantes de Mitoquinona alineadas con un fosfolípido típico. Este modelo indica que la fracción de ubiquinol de la Mitoquinona-C3 únicamente penetra cerca de la superficie de la membrana, mientras que las de la Mitoquinona-C10 y de la Mitoquinona-C15 penetran cerca del núcleo de la bicapa de fosfolípidos.

[0230] Hemos sintetizado una serie de compuestos antioxidantes con un abanico de hidrofobicidades y profundidades de penetración en la bicapas de fosfolípidos.

EJEMPLO 4. Captación mitocondrial de los compuestos dirigidos a las mitocondrias

[0231] Para demostrar que el direccionamiento mitocondrial es eficaz, se determinó la captación por parte de las mitocondrias en respuesta al potencial de membrana de los compuestos antioxidantes ejemplares Mitoquinona-C3, Mitoquinona-C5, Mitoquinona-C10 y Mitoquinona-C 15.

Para medir la captación de los compuestos antioxidantes por parte de las mitocondrias activadas, se construyó un electrodo selectivo de iones (Smith, R. A., Kelso, G. F., James, A. M. y Murphy, M. P. (2004) Meth. Enzymol. 382, 45 - 67; Davey, G. P., Tipton, K. F. y Murphy, M. P. (1992) Biochem. J. 288, 439 - 443; Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R. y Kobatake y. (1979) J. Membr. Biol. 49, 105 - 121). Se insertaron el electrodo y un electrodo de referencia de Ag / AgCl a través de la capa hermética de Perspex de una cámara de incubación agitada y termostatizada de 3 ml a 30 ºC, provista con un puerto de inyección para la adición de sustratos. Para medir la captación del compuesto antioxidante, se incubaron mitocondrias de hígado de rata (1 mg de proteína/ml) a 30 ºC en medio de KCl (KCl 120 mM, HEPES 10 mM, pH 7,2, EGTA 1 mM) y nigericina (1 µg/ml) y rotenona (8 µg/ml). Se

añadieron succinato (10 mM) y FCCP (500 nM) cuando se indicó. La producción del electrodo selectivo de iones se hizo pasar a un sistema de adquisición de datos PowerLab a través del amplificador de pH frontal y se analizó mediante el uso del programa informático Chart, todos de ADInstruments.

[0232] Las mitocondrias de hígado de rata se prepararon mediante una homogenización seguida de una centrifugación diferencial en tampón enfriado en hielo que contiene sacarosa 250 mM, Tris-HCl 5 mM, EGTA 1 mM, pH 7,4 (Chappell, J. B. y Hansford, R. G. (1972) en: Subcellular components: preparation and fractionation, páginas 77 - 91 (Birnie, G. D., Ed.) Butterworths, Londres). La concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo de biuret mediante el uso de BSA como patrón (Gornall, A. G., Bardawill, C. J. y David, M. M. (1949) J. Biol. Chem. 177, 751 - 766). El potencial de la membrana mitocondrial se midió mediante la adición de TPMP 500 nM complementado con 50 nCi de [^{3}H]TPMP a las mitocondrias suspendidas en medio de KCl (KCl 120 mM, HEPES 10 mM, pH 7,2, EGTA 1 mM) a 25 ºC (Brand, M. D. (1995) en: Bioenergetics - a practical approach, páginas 39 - 62 (Brown, G. C. y Cooper, C. E., Eds.) IRL, Oxford). Después de la incubación, las mitocondrias se sedimentaron mediante centrifugación y se cuantificaron las cantidades de [^{3}H]TPMP en el sobrenadante y en los sedimentos mediante un recuento de centelleo, y se calculó el potencial de membrana asumiendo un volumen mitocondrial de 0,5 µl/mg de proteínas mitocondriales y una corrección de la unión del TPMP de 0,4 (Brown, G. C. y Brand, M. D. (1985) Biochem. J. 225, 399 - 405).

[0233] Construimos electrodos selectivos de iones para medir sus concentraciones en el estado estacionario (Smith, R. A., Kelso, G. F., James, A. M. y Murphy, M. P. (2004) Meth. Enzymol. 382, 45 - 67; Davey, G. P., Tipton, K. F. y Murphy, M. P. (1992) Biochem. J. 288, 439 - 443; Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R. y Kobatake y. (1979) J. Membr. Biol. 49, 105 - 121). La respuesta de estos electrodos a cationes simples de trifenilfosfonio tales como TPMP es Nernstiana, con una respuesta lineal del voltaje del electrodo a log10[concentración del catión] y una pendiente de ~ 60 mV a 30 ºC (Davey, G. P., Tipton, K. F. y Murphy, M. P. (1992) Biochem. J. 288, 439 - 443; Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R. y Kobatake y. (1979) J. Membr. Biol. 49, 105 - 121). El compuesto más hidrófilo, la Mitoquinona-C3, también dio una respuesta del electrodo Nernstiana con una pendiente cercana a 60 mV a unas concentraciones superiores a 10 µM. Esto está ilustrado en el lado derecho de la Figura 4A, mediante la respuesta logarítmica del electrodo a las adiciones secuenciales de Mitoquinona-C3 1 pM en ausencia de mitocondrias. Para la Mitoquinona-C5, la Mitoquinona-C10 y la Mitoquinona-C15, el electrodo también respondió rápidamente y de forma estable a las adiciones secuenciales en ausencia de mitocondrias (Figuras 4B, 4C y 4D, respectivamente, paneles del lado derecho). Sin embargo, en estos casos las respuestas de los electrodos no eran Nernstianas, creemos que debido a la mayor hidrofobicidad de estos compuestos. Aun así, para los cuatro compuestos antioxidantes, el electrodo selectivo de iones permitió la medición de las concentraciones de los compuestos libres, y por lo tanto su captación por parte de las mitocondrias en tiempo real.

[0234] Para medir la captación del compuesto antioxidante, se añadieron mitocondrias a la cámara del electrodo en presencia de rotenona para evitar la formación de un potencial de membrana (lado izquierdo de la Figura 4). A continuación realizamos cinco adiciones secuenciales de compuesto antioxidante 1 µM para calibrar la respuesta del electrodo, seguido del sustrato respiratorio succinato para generar un potencial de membrana. La activación mitocondrial dio lugar a la rápida captación de todas las variantes del compuesto antioxidante por parte de la mitocondria, y la posterior adición del desacoplante FCCP anuló el potencial de membrana y permitió su rápida liberación desde la mitocondria (Figura 4 A-D, lado izquierdo). Estos experimentos demuestran claramente la captación dependiente del potencial de membrana de la Mitoquinona-C3, de la Mitoquinona-C5 y de la Mitoquinona-C10. Mientras que la Mitoquinona-C15 también fue captada por la mitocondria tras la inducción de un potencial de membrana, la respuesta del electrodo a la Mitoquinona-C15 en presencia de la mitocondria era más débil, más ruidosa y con mayor tendencia a la deriva. Esto contrasta con la respuesta del electrodo a la Mitoquinona-C15 en ausencia de mitocondria (cotéjense los paneles del lado derecho), y es debido a sus bajas concentraciones libres en presencia de la mitocondria.

[0235] Después se determinó el grado de unión del compuesto antioxidante a la mitocondria desactivada (Figura 4, lado derecho). Para estos experimentos se añadieron en primer lugar variantes del compuesto antioxidante a la cámara del electrodo, y después se añadieron las mitocondrias en presencia de rotenona para evitar la formación de un potencial de membrana. La disminución en la concentración del compuesto antioxidante tras la adición de las mitocondrias es debida a la unión del compuesto antioxidante a las mitocondrias desactivadas. La posterior adición de succinato para generar un potencial de membrana indica la captación dependiente del potencial de membrana de los compuestos, que es revertida después mediante la adición de FCCP para anular el potencial de membrana.

[0236] La concentración libre de Mitoquinona-C3 no se vio afectada por la adición de las mitocondrias, lo que

indica la cantidad despreciable de Mitoquinona-C3 unida a la mitocondria desactivada (Figura 4A, lado derecho). La captación sensible al FCCP de la mitoquinona-C3 tras la activación con succinato fue de aproximadamente 3,7 nmol de mitoquinona-C3 / mg de proteína, lo que se corresponde con un índice de acumulación de ~ 2 x 10^3. Esto es coherente con lo esperado a partir de la ecuación de Nernst, y un potencial de la membrana mitocondrial de aproximadamente 180 mV, teniendo en cuenta las correcciones por la unión intramitocondrial.

[0237] Para la Mitoquinona-C5 se produjo una cierta unión del compuesto a la mitocondria desactivada (~ 0,6 nmol/mg de proteína), sin embargo ésta era despreciable en comparación con su posterior captación tras la activación con succinato, de aproximadamente 2,8 nmol de Mitoquinona-C5 / mg de proteína, lo que se corresponde con un índice de acumulación de aproximadamente 1,4 x 10^3 (Figura 4B, lado derecho).

[0238] Para la Mitoquinona-C10 se produjo una unión significativa a la mitocondria desactivada de aproximadamente 2,6 nmol de Mitoquinona-C10, y esto fue seguido por una captación adicional de aproximadamente 1 nmol/mg de proteína tras la adición de succinato (Figura 4C, lado derecho).

[0239] Prácticamente toda la Mitoquinona-C15 libre estaba unida a la mitocondria desactivada, pero había una cierta captación adicional tras la activación con succinato. La captación dependiente del potencial de membrana de la Mitoquinona-C15 era evidente en el panel del lado izquierdo de la Figura 4D, donde la respuesta del electrodo era altamente sensible para permitir la medición de la pequeña cantidad de Mitoquinona-C15 libre cuando el electrodo era calibrado en presencia de la mitocondria. Por el contrario, la captación de Mitoquinona-C15 es difícil de ver en el lado derecho de la Figura 4D, donde la respuesta del electrodo era bastante menos sensible para permitir la medición de la Mitoquinona-C15 en ausencia de la mitocondria.

[0240] Estos experimentos demuestran que la longitud de los puentes de metileno de los compuestos antioxidantes determina al menos en parte su grado de adsorción a las membranas mitocondriales (lado derecho de la Figura 4). La adsorción varía desde despreciable para la Mitoquinona-C3, hasta una unión prácticamente completa para la Mitoquinona-C15. Tras la adición de la Mitoquinona-C15 a la mitocondria desactivada, se une esencialmente todo el compuesto, distribuido a través de ambas superficies de las membranas interna y externa. Cuando se induzca un potencial de membrana, creemos que habrá una redistribución significativa del compuesto hacia la superficie dirigida la matriz de la membrana interna desde la superficie exterior de la membrana interna, y desde la membrana externa. En resumen, todas las variantes del compuesto antioxidante son captadas en la mitocondria dirigidas por el potencial de membrana, y cuanto más largo sea el puente de metileno, mayor será su adsorción a las bicapas de fosfolípidos.

EJEMPLO 5. Eficacia antioxidante de los compuestos ejemplares dirigidos a las mitocondrias

[0241] Los compuestos de la invención también son muy eficaces frente al estrés oxidativo. Para medir la eficacia antioxidante, la capacidad de los compuestos antioxidantes de prevenir la peroxidación lipídica en las mitocondrias, medida a partir de la acumulación de TBARS en mitocondrias expuestas a hierro ferroso y a peróxido de hidrógeno (Figura 5).

[0242] Para la cuantificación de la peroxidación lipídica se usó el ensayo de las TBARS. Se incubaron mitocondrias de hígado de rata (2 mg de proteína/ml) en 0,8 ml de medio que contiene KCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,6 a 37 ºC, complementado bien con succinato 10 mM y 8 mg/ml de rotenona, o bien con un sistema regenerador del ATP de ATP 2,5 mM, fosfoenolpiruvato 1 mM y 4 U/ml de cinasa de piruvato. Después se expusieron las mitocondrias a un estrés oxidativo mediante la adición de $FeCl_2$ 50 mM / H_2O_2 300 mM durante 15 min a 37 ºC. Después de la incubación se añadieron 64 ml de butilhidroxitolueno en etanol al 2 % (p/v), seguido de 200 ml de $HClO_4$ al 35 % (v/v) y de 200 ml de ácido tiobarbitúrico al 1 % (p/v). Después, las muestras se incubaron durante 15 min a 100 ºC, se centrifugaron (5 min a 12.000 x g) y el sobrenadante se transfirió a un tubo de vidrio. Después de la adición de 3 ml de agua y de 3 ml de butan-1-ol, las muestras se agitaron vorticialmente y se dejaron separar las dos fases. Después se analizaron alícuotas de 200 ml de la capa orgánica en un lector fluorimétrico de placas (λ_{Ex} = 515 nm; λ_{Em} = 553 nm) para las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) y se comparó con una curva patrón de malondialdehído (MDA) preparada a partir de 1,1,3,3-tetraetoxipropano 0,01 - 5 mM (Kelso, G. F., Porteous, C. M., Coulter, C. V., Hughes, G., Porteous, W. K., Ledgerwood, E. C., Smith, R. A. J. y Murphy, M. P. (2001) J. Biol. Chem. 276, 4588 - 4596).

[0243] Para las mitocondrias activadas con succinato, el nivel de fondo de las TBARS era despreciable, pero aumentó hasta aproximadamente 3,75 nmol de MDA / mg de proteína tras la exposición al estrés oxidativo (Figura 5A; barras oscuras). Unas concentraciones altas (5 µM) de cualquiera de los compuestos antioxidantes impidieron

ampliamente la acumulación de las TBARS, mientras que la simple acción del catión TPMP no lo hizo. Esto confirma que era la cadena lateral de ubiquinol de los compuestos antioxidantes de Mitoquinona era la responsable de la acción antioxidante, y no ninguna interacción no específica del catión con la mitocondria.

[0244] En estos experimentos el succinato servirá tanto para mantener un potencial de membrana para guiar la captación de los cationes en las mitocondrias, como para reciclar la forma de ubiquinona de los compuestos antioxidantes de Mitoquinona a la forma antioxidante activa de ubiquinol (Kelso, G. F., Porteous, C. M., Coulter, C. V., Hughes, G., Porteous, W. K., Ledgerwood, E. C., Smith, R. A. J. y Murphy, M.P. (2001) J. Biol. Chem. 276, 4588 - 4596). Para comprobar si se requiere la reducción por parte de la cadena respiratoria para la eficacia antioxidante de los compuestos antioxidantes de Mitoquinona, incubamos mitocondrias en presencia de ATP y de un sistema regenerador de ATP. La hidrólisis del ATP y la reversión de la sintasa de ATP mitocondrial dio lugar a un importante bombeo de protones que creó un potencial de membrana similar al generado por el succinato (Figura 5B). Esto producirá la misma captación de compuesto oxidante de Mitoquinona que para la mitocondria activada por el succinato, pero ahora los compuestos antioxidantes de Mitoquinona ya no serán reciclados en sus formas activas de ubiquinol por parte de la cadena respiratoria. Los compuestos antioxidantes de Mitoquinona eran ineficaces en la prevención de la peroxidación lipídica en las mitocondrias activadas por una hidrólisis del ATP (Figura 5a, barras blancas), en comparación con la contundente protección observada en las mitocondrias activadas por el succinato (Figura 5b, barras negras). Por lo tanto, son necesarios tanto la reducción de los compuestos antioxidantes de Mitoquinona por parte de la cadena respiratoria, como la acumulación por el potencial de membrana mitocondrial, para la eficacia antioxidante de los compuestos antioxidantes de Mitoquinona.

[0245] Se observaron unos niveles menores de peroxidación lipídica en las muestras de control de las mitocondrias activadas con succinato, en comparación con las activadas con ATP (Figura 5A). Esto es debido al efecto antioxidante protector del grupo endógeno mitocondrial de Coenzima Q que es mantenido en estado reducido por la presencia de succinato, pero se oxida en presencia de ATP (James, A. M., Smith, R. A. y Murphy, M. P. (2004) Arch. Biochem. Biophys. 423, 47 - 56; Ernster, L., Forsmark, P. y Nordenbrand, K. (1992) Biofactors 3, 241 - 8). En resumen, todos los compuestos antioxidantes de Mitoquinona requieren la activación por parte de la cadena respiratoria para que sean unos antioxidantes eficaces.

[0246] Para la Figura 5A se usó una única concentración de 5 pM para todos los compuestos antioxidantes de Mitoquinona. Para comparar sus eficacias antioxidantes relativas, valoramos los compuestos en presencia de succinato: una valoración típica se muestra en la Figura 5C. Este experimento sugiere que la eficacia antioxidante de estos compuestos se correlaciona con la longitud del puente de metileno. Para cuantificar esto, calculamos los valores de la CI_{50} para la prevención de la peroxidación lipídica por parte de los cuatro compuestos antioxidantes de Mitoquinona ejemplares (Figura 4D). Estas mediciones confirmaron que el orden de eficacia antioxidante era: Mitoquinona-C15 > Mitoquinona-C10 > Mitoquinona-C5 > Mitoquinona-C3.

[0247] Todos los compuestos antioxidantes de Mitoquinona se acumulaban en la mitocondrias guiados por el potencial de membrana mitocondrial. Para el compuesto más hidrófobo, la Mitoquinona-C15, este efecto estaba muy enmascarado por una extensa unión a las bicapas de fosfolípidos. Todos los compuestos eran unos antioxidantes eficaces y para una actividad antioxidante persistente durante 15 minutos, todos requerían la acción de la cadena respiratoria para reciclar el compuesto antioxidante de Mitoquinona en su forma antioxidante activa después de haber eliminado los intermedios de la peroxidación lipídica.

EJEMPLO 6. Efecto del compuesto antioxidante dirigido a las mitocondrias sobre la hemodinámica cardiaca y la función mitocondrial.

[0248] Se evaluó el efecto de la administración del compuesto antioxidante dirigido a la mitocondria, en particular de la Mitoquinona-C10 y de la Mitoquinona-C3, sobre la función cardíaca mediante el uso del modelo de perfusión de corazón aislado de Langendorf. Se asignaron ratas a los siguientes cuatro grupos de administración: Control (placebo), TPMP (metiltrifenilfosfonio), Mitoquinona-C10 y Mitoquinona-C3. Después del periodo de tratamiento, las ratas se sacrificaron humanamente y los corazones aislados se conectaron al sistema de perfusión aislado de Langendorf. Este sistema usa una retroperfusión a través de la aorta para mantener el corazón mientras se mide la función cardíaca. Se midió la presión en el ventrículo izquierdo con un globo ventricular izquierdo. También se midió el flujo coronario.

[0249] La Figura 6 representa al flujo coronario a 10 mm de Hg de presión ventricular izquierda para cada uno de los grupos de tratamiento. El flujo coronario se midió antes de la isquemia y de nuevo a los cero minutos, a los 20 minutos, a los 40 minutos y a los 60 minutos después de la inducción de la isquemia. Se realizó un ANOVA

monofactorial con una prueba *post hoc* de bonferroni. Significación con respecto al control pre-isquémico: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001. Significación con respecto al respectivo tiempo de control: † P < 0,05; †† P < 0,01; ††† P < 0,001.

[0250] Los resultados demuestran que el tratamiento con la Mitoquinona-C10 reduce significativamente la reducción en el flujo coronario inducida por la isquemia. La Mitoquinona-C3 tiene un efecto menor pero aún significativo en puntos temporales posteriores. La ausencia de cualquier efecto con la administración de TPMP indica que es la fracción antioxidante de la Mitoquinona-C10 y de la Mitoquinona-C3, y no el catión trifenilfosfonio, la responsable de los efectos observados con el compuesto antioxidante dirigido a la mitocondria.

[0251] La Figura 7 representa los efectos del tratamiento sobre la presión diastólica ventricular izquierda a 10 mm de Hg. La presión diastólica ventricular izquierda se midió antes de la inducción de la isquemia, y de nuevo a los cero minutos, a los 20 minutos, a los 40 minutos y a los 60 minutos después de la inducción de la isquemia. El análisis estadístico fue un ANOVA de los rangos con una prueba *post hoc* de Dunns. Significación con respecto al control pre-isquémico: * P < 0,05. † representa P < 0,05 frente a 60 min después del control isquémico. Los resultados demuestran que el tratamiento con Mitoquinona-C10 da como resultado un aumento estadísticamente significativo en la presión diastólica ventricular izquierda con respecto a las ratas no tratadas, reduciendo la reducción inducida por la isquemia en la presión diastólica ventricular izquierda. La ausencia de cualquier efecto con la administración del TPMP indica que es la fracción antioxidante de la Mitoquinona-C10, y no el catión trifenilfosfonio, la responsable de los efectos observados con el compuesto antioxidante dirigido a la mitocondria.

[0252] Después se determinó el efecto de la administración de Mitoquinona-C10 y de Mitoquinona-C3 sobre la frecuencia cardíaca. La Figura 8 representa la frecuencia cardíaca de cada uno de los grupos de tratamiento antes de la isquemia, y a los cero minutos, a los 20 minutos, a los 40 minutos y a los 60 minutos después de la inducción de la isquemia. Los resultados mostrados son un ANOVA monofactorial seguido de una prueba *post hoc* de bonferroni. *** representa P < 0,001 con respecto al control pre-isquémico. †† representa P < 0,05 con respecto al respectivo control post-isquémico. Los resultados demuestran que el tratamiento con la Mitoquinona-C10 reduce significativamente la reducción inducida por la isquemia en la frecuencia cardiaca en comparación con las ratas de control. La ausencia de cualquier efecto con la administración de TPMP indica que es la fracción antioxidante de la Mitoquinona-C10, y no el catión trifenilfosfonio, la responsable de los efectos observados con el compuesto antioxidante dirigido a la mitocondria.

[0253] Se evaluó adicionalmente la función cardíaca mediante la determinación del efecto de la administración del compuesto antioxidante dirigido a la mitocondria sobre la frecuencia de contracción y relajación del corazón. La Figura 9A representa la frecuencia de contracción en cada uno de los cuatro grupos de tratamiento antes de la isquemia, y a los cero minutos, a los 20 minutos, a los 40 minutos y a los 60 minutos después de la inducción de la isquemia. La Figura 9B representa la frecuencia de relajación en cada uno de los cuatro grupos de tratamiento antes de la isquemia, y a los cero minutos, a los 20 minutos, a los 40 minutos y a los 60 minutos después de la inducción de la isquemia. En cada caso se realizó un ANOVA de los rangos con una prueba *post hoc* de Dunns. * representa la significación con P < 0,05 con respecto al control pre-isquémico. † representa la significación con P < 0,05 con respecto a los respectivos controles temporales post-isquémicos. †† representa la significación con P < 0,01 con respecto al respectivo control temporal post-isquémico.

[0254] Los resultados demuestran que la administración de la Mitoquinona-C10 tiene un efecto estadísticamente significativo, reduciendo la reducción inducida por la isquemia en la frecuencia de contracción y relajación del ventrículo izquierdo cuando se compara con las ratas de control.

[0255] Los datos anteriores muestran claramente el efecto beneficioso de la administración del compuesto antioxidante dirigido a las mitocondrias sobre la función cardíaca. Con objeto de determinar si los efectos observados sobre la función cardíaca eran debidos al efecto del compuesto antioxidante dirigido a las mitocondrias sobre la función mitocondrial, se evaluó la actividad mitocondrial pre-isquémica y post-isquémica para cada uno de los grupos de tratamiento. La Figura 10A representa la función respiratoria relacionada con el NAD^+ de la mitocondria antes y después de la isquemia para cada uno de los cuatro grupos de tratamiento. La Figura 10B presenta la función respiratoria relacionada con el FAD antes y después de la isquemia para cada uno de los cuatro grupos de tratamiento. *** representa la significación con P < 0,001 con respecto al control pre-isquémico. ††† representa la significación con P < 0,001 con respecto al control post-isquémico.

[0256] Estos datos muestran que la Mitoquinona-C10 tiene un efecto beneficioso estadísticamente significativo sobre la función respiratoria mitocondrial después de una isquemia en comparación con las ratas de

control. Estos resultados apoyan la conclusión de que los efectos de la administración del compuesto antioxidante dirigido a las mitocondrias sobre la función cardíaca son debidos al efecto protector de la función mitocondrial.

EJEMPLO 7. Estabilidad de los complejos de Mitoquinona-C10 con β-ciclodextrina

[0257] En los estudios de preformulación, se averiguó que la Mitoquinona-C10 en forma de la sal de bromuro (ejemplo de referencia) se degrada con el tiempo en estado sólido cuando se almacenaba a 25 ºC, 50 % de RH y a 40 ºC, 75 % de RH. El objetivo del presente estudio era establecer si podía mejorarse la estabilidad en estado sólido de la Mitoquinona-C10 mediante su complejación con β-ciclodextrina.

[0258] El lote nº 6 de Mitoquinona-C10 y la idebenona fueron suministrados por Industrial Research Limited (Nueva Zelanda). La β-ciclodextrina (lote nº 70P225) fue adquirida en ISP technologies Inc. El NaCl, el NaH PU y el metanol (HPLC) fueron adquiridos en BDH.

Estudios de estabilidad en estado sólido de la Mitoquinona-C10 pura

[0259] Se pesaron de forma precisa muestras de Mitoquinona-C10 (aproximadamente 5 mg) en frascos transparentes y se expusieron a 25 ºC, 50 % de RH, a 40 ºC, 75 % de RH y a 4 ºC en sílice. Los frascos se retiraron después de 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 días y se analizó la Mitoquinona-C10 mediante un método validado de HPLC mediante el uso de Mitoquinona-C10 almacenada a -20 ºC en sílice como control.

Preparación de complejos de Mitoquinona-C10:β-ciclodextrina

[0260] Se prepararon tres complejos con diferentes proporciones molares (bromuro de Mitoquinona-C10:β-ciclodextrina 1:1, 1:2 y 1:4) mediante el uso del lote nº 6 de Mitoquinona-C10.

Preparación de una solución de β-ciclodextrina en agua

[0261] Se pesó de forma precisa β-ciclodextrina (1,1397 g, igual a 1,0361 g después de la corrección por el contenido en humedad) y se disolvió en agua bidestilada mediante la aplicación de ultrasonidos durante 10 min. El volumen se completó hasta 100 ml con agua.

Preparación del complejo de Mitoquinona-C10:β-ciclodextrina (proporción molar de 1:1)

[0262] Se evaporó una solución etanólica de bromuro de Mitoquinona-C10 (90 mg igual a 159,95 mg de Mitoquinona-C10) bajo nitrógeno sobre una placa caliente mantenida a 40 - 50 ºC durante 8 min. Se añadieron la solución de β-ciclodextrina (10 ml) y agua bidestilada (30 ml) al vaso de precipitados, al que después se le aplicaron ultrasonidos durante 40 min.

Preparación del complejo de Mitoquinona-C10:β-ciclodextrina (proporción molar de 1:2)

[0263] Se evaporó una solución etanólica de bromuro de Mitoquinona-C10 (89,8 mg igual a 159,82 mg de Mitoquinona-C10) bajo nitrógeno sobre una placa caliente mantenida a 37 - 45 ºC durante 10 min, seguido de 3 min a 50 ºC. Se añadieron la solución de β-ciclodextrina (20 ml) y agua bidestilada (20 ml) al vaso de precipitados, al que después se le aplicaron ultrasonidos durante 30 min.

Preparación del complejo de Mitoquinona-C10:β-ciclodextrina (proporción molar de 1:4)

[0264] Se evaporó una solución etanólica de bromuro de Mitoquinona-C10 (90 mg igual a 159,95 mg de Mitoquinona-C10) bajo nitrógeno sobre una placa caliente mantenida a 37 - 50 ºC durante 12 min. Se añadió la solución de β-ciclodextrina (40 ml) al vaso de precipitados, al que después se le aplicaron ultrasonidos durante 20 min.

[0265] Todas las soluciones anteriores se congelaron mediante un almacenamiento a -18 ºC durante una noche. Las soluciones congeladas se liofilizaron durante 2 días mediante el uso del liofilizador LABCONO. Los compuestos liofilizados se almacenaron a -20 ºC.

Calorimetría diferencial de barrido de los complejos liofilizados de Mitoquinona-C10:β-ciclodextrina

[0266] Se realizó una calorimetría diferencial de barrido (DSC) de los tres complejos liofilizados mediante el uso de un calorímetro diferencial de barrido Perkin Elmer PYRIS-1. Se preparó una muestra de Mitoquinona-C10 mediante la evaporación de una solución etanólica bajo nitrógeno gaseoso a 35 - 50 ºC durante 10 min.

[0267] Se usaron bandejas de aluminio (Nº 0219-0041, suministradas por Perkin-Elmer). El análisis se llevó a cabo bajo una purga con nitrógeno. Las bandejas vacías se usaron para establecer la línea de base.

[0268] El intervalo de temperatura del barrido era de 50 - 160 ºC, con un mantenimiento inicial a 50 ºC durante 1 min seguido de un aumento de 10 ºC / min hasta 160 ºC.

Ensayo de HPLC

[0269] Se desarrolló un método de HPLC para la Mitoquinona-C10 mediante el uso de metanol y de dihidrogenofosfato de sodio 0,01 M (85:15) como fase móvil a un caudal de 1 ml/min y mediante el uso de una detección de UV-VIS a 265 nm. El patrón interno era idebenona. La columna era una Prodigy ODS3100A (Phenomenex) con un tamaño de partícula de 5 µ. Posteriormente este método se modificó tras la llegada de una nueva columna. La fase móvil usada con el método modificado era metanol y dihidrogenofosfato de sodio 0,01 M (80:20). Este método fue validado. Se comprobó la interferencia de la β-ciclodextrina en el método de HPLC antes del análisis de los complejos de Mitoquinona-C10:β-ciclodextrina. Se demostró que la β-ciclodextrina no interfiere en el ensayo de HPLC de la Mitoquinona-C10.

Estudios de estabilidad de los complejos de Mitoquinona-C10:β-ciclodextrina

[0270] Como había tres complejos de Mitoquinona-C10 con β-ciclodextrina, la cantidad de Mitoquinona-C10 en las muestras de 5 mg de los diferentes complejos era diferente. Con objeto de exponer unas cantidades iguales de Mitoquinona-C10 en los tres complejos, se tomaron diferentes pesos de los complejos: se tomaron 4 mg del complejo 1:1 que contenía 1,473 mg de Mitoquinona- C10; 6,5 mg del complejo 1:2 que contenía 1,469 mg de Mitoquinona-C10; y 11,5 mg del complejo 1:4 que contenía 1,467 mg de Mitoquinona-C10 y se usaron en el estudio de estabilidad según el procedimiento operativo habitual.

[0271] Se añadieron alícuotas de agua para HPLC (1,5 ml) a cada frasco de muestra para disolver completamente los complejos de Mitoquinona-C10:β-ciclodextrina. Se diluyeron alícuotas (50 µl) de estas soluciones hasta 1 ml con agua. Las alícuotas (100 µl) de estas soluciones diluidas de los complejos de Mitoquinona-C10:β-ciclodextrina se agitaron vorticialmente con 200 µl de la solución de 10 µg/ml del patrón interno en metanol. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 10.000 rpm y se inyectaron 50 µl de los sobrenadantes en el sistema de HPLC. Se preparó una curva patrón mediante el uso de soluciones de Mitoquinona-C10 en el intervalo de concentración de entre 2,5 y 120 µg/ml que contenían 5 mg/ml de las soluciones de β-ciclodextrina

[0272] Todos los compuestos tenían un color ligeramente naranja-amarillo y un aspecto muy esponjoso. El color no era uniforme y estaba más concentrado hacia el fondo de los matraces de liofilización.

[0273] Los resultados de la DSC se proporcionan como sigue:

[0274] **Mitoquinona-C10**: cuando se analizó una muestra pura de Mitoquinona-C10, se observaron picos por encima de 120 ºC. Con una muestra de Mitoquinona-C10, se observaron dos picos prominentes entre 130 ºC y 140 ºC. Cuando se analizó otra muestra, no se observaron dichos picos prominentes, pero se observaron picos pequeños por encima de 120 ºC. Después del análisis, se cortaron las bandejas y se examinaron las muestras. Las muestras tenía un color entre verde oscuro y negro en ambos casos.

[0275] **β-ciclodextrina**: había un pico amplio entre 70 ºC y 85 ºC.

[0276] **Complejo de Mitoquinona-C10:β-ciclodextrina (1:1)**: no se observaron picos significativos. Después del análisis la bandeja se cortó y se examinó. El color de la muestra había experimentado un ligero cambio hacia marrón claro (no es un cambio significativo).

[0277] **Complejo de Mitoquinona-C10:β-ciclodextrina (1:2)**: no se observaron picos significativos. Después del análisis, no se observó ningún cambio de color en la muestra.

[0278] **Complejo de Mitoquinona-C10:β-ciclodextrina (1:4)**: no se observaron picos significativos, pero se

observó un pequeño pico exotérmico a 120 ºC. Después del análisis, no se observó ningún cambio de color en la muestra.

[0279] El aspecto de los picos en la muestra pura de Mitoquinona-C10 indica que los cambios en el compuesto están teniendo lugar con la temperatura. Sin embargo, como había muchos picos y también se produjeron cambios en la muestra, éstos podrían ser el resultado de una degradación. Cuando se analizó una segunda muestra de Mitoquinona-C10, dio un termograma diferente al de la primera muestra. En el caso de los complejos, no había picos significativos ni cambios de color.

[0280] Los resultados del estudio de estabilidad en estado sólido de la Mitoquinona-C10 pura (lote nº 3) se proporcionan en la Tabla 2 y en la Figura 11.

Tabla 2. Estabilidad en estado sólido de la Mitoquinona-C10 (lote nº 3).

Frascos de vidrio transparente	**Día 1**	**Día 2**	**Día 4**	**Día 8**	**Día 16**	**Día 32**	**Día 64**
40 ºC, 75 % de RH	98,90	101,9	102,8	94,07	83,22	76,70	67,25
25 ºC, 50 % de RH	95,11	97,46	95,06	97,52	102,8	40,76	18,37
5 ºC, gel de sílice	97,04	102,8	92,97	95,67	98,37	67,36	63,70
Estabilidad en estado sólido de la Mitoquinona-C10 (lote nº 3) en ausencia de luz a 40 ºC, 75 % de RH; a 25 ºC, 50 % de RH y a 5 ºC en gel de sílice azul. Los datos son las medias de dos valores expresados como el porcentaje del contenido original.							

[0281] Debido a la significativa inestabilidad a 25 ºC, 50 % de RH en comparación con 40 ºC, 75 % de RH, se repitió el estudio de estabilidad a 25 ºC, 50 % de RH con el lote nº 4 de Mitoquinona-C10. El segundo estudio de estabilidad se llevó a cabo en frascos tanto transparentes como ámbar, y los resultados se proporcionan en la Tabla 3 y la Figura 12.

Tabla 3. Estabilidad en estado sólido de la Mitoquinona-C10 (lote nº 4)

Tiempo (días)	**1**	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**
Frascos de vidrio transparente	88,21	93,19	92,65	93,10	94,47	62,05	57,94
Frascos de vidrio ámbar oscuro	94,84	94,52	100,28	97,65	98,03	61,48	58,66
La estabilidad en estado sólido de la Mitoquinona-C10 (lote nº 4) se midió en ausencia de luz a 25 ºC, 50 % de RH. Los datos son las medias de tres valores expresados como el porcentaje del contenido original.							

[0282] Ambos lotes (los lotes nº 3 y 4) de Mitoquinona-C10 suministrados por el departamento de química mostraron una caída repentina en su contenido después de 16 días. Sin embargo, para el lote nº 4 la degradación no era tan grande después de entre 32 y 64 días en comparación con el lote nº 3. También se observó que el que los frascos fueran transparentes o ámbar no tenía ningún efecto sobre la estabilidad de la Mitoquinona-C10.

[0283] La Mitoquinona-C10 suministrada por IRL se usó para la preparación de los complejos de Mitoquinona-C10:β-ciclodextrina. La Mitoquinona-C10 suministrada por IRL era un jarabe de color rojizo amarillento en alcohol etílico. La estabilidad de los complejos de Mitoquinona-C10:β-ciclodextrina se proporciona en la Tabla 4 y en las Figuras 13, 14 y 15. Debido a las pequeñas cantidades disponibles para el estudio de los complejos de Mitoquinona-C10:β-ciclodextrina, no hay resultados para el día 1 ni para el día 4.

Tabla 4. Estabilidad en estado sólido de los complejos de Mitoquinona-C10:β-ciclodextrina

complejo 1:1					
Tiempo (días)	**2**	**8**	**16**	**32**	**64**
4 ºC, sílice	106,38	110,97	101,71	101,71	102,68
25 ºC, 50 % de RH	95,65	93,00	101,15	101,15	108,89
40 ºC, 75 % de RH	129,22	108,77	113,48	113,49	89,25

complejo 1:2					
Tiempo (días)	**2**	**8**	**16**	**32**	**64**
4 ºC, sílice	105,48	101,23	105,08	111,21	101,16
25 ºC, 50 % de RH	108,16	95,46	105,41	-108,55	99,78
40 ºC, 75 % de RH	115,99	110,22	114,03	101,50	99,44
complejo 1:4					
Tiempo (días)	**2**	**8**	**16**	**32**	**64**
4 ºC, sílice	105,10	115,86	100,25	107,63	107,63
25 ºC, 50 % de RH	111,46	116,03	96,61	92,40	92,40
40 ºC, 75 % de RH	108,85	100,01	87,34	71,13	71,13
Estabilidad en estado sólido de los complejos de Mitoquinona-C10: β-ciclodextrina en ausencia de luz a 40 ºC, 75 % de RH; a 25 ºC, 50 % de RH y a 5 ºC en gel de sílice azul. Los datos son las medias de dos valores expresados como un porcentaje.					

[0284] Los resultados demuestran que la Mitoquinona-C10 puede formar eficazmente complejos con la β-ciclodextrina, y que puede ser estabilizada mediante su complejación con β-ciclodextrina. Los resultados demuestran que la Mitoquinona-C10 en los complejos de β-ciclodextrina 1:1 y 1:2 era estable en diversas condiciones. Los resultados también demuestran que la estabilidad de la Mitoquinona-C10 en el complejo 1:4 había disminuido con respecto a la estabilidad de la Mitoquinona-C10 en los complejos de β-ciclodextrina 1:1 y 1:2.

EJEMPLO 8. Estudios de estabilidad del mesilato de Mitoquinona-C10

Estabilidad de la solución de mesilato de Mitoquinona-C10

[0285] Se determinó la estabilidad de la solución de mesilato de Mitoquinona-C10 en cinco disolventes; agua, HCl 0,01 M, NaOH 0,01 M, IPB (pH 7,4) y MeOH al 50 % a dos temperaturas, 25 ºC y 40 ºC, en dos condiciones atmosféricas, al aire y con nitrógeno, durante 125 días según el procedimiento operativo habitual del Solicitante.

[0286] Las soluciones de mesilato de Mitoquinona-C10 (100 µg/ml) en los cincos disolventes se prepararon mediante la dilución de una solución madre de 1 mg/ml de mesilato de Mitoquinona-C10 en agua. Las soluciones (5 ml) se colocaron en viales de vidrio, se purgaron con aire o con nitrógeno, se precintaron y se colocaron para su almacenamiento. Se recogieron alícuotas (0,25 ml) a los 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 125 días y se determinó la concentración de Mitoquinona-C10 mediante una HPLC.

[0287] Los resultados se proporcionan en la Tabla 5. La estabilidad del mesilato de Mitoquinona-C10 en NaOH 0,01 M no está incluida debido a que el mesilato de Mitoquinona-C10 se descompuso en este disolvente en 15 minutos. Los resultados demuestran que (a) la estabilidad de la solución es independiente de la atmósfera que haya por encima de la solución, y (b) la temperatura tiene un efecto significativo sobre la estabilidad de la Mitoquinona-C10 en todos los disolventes, excepto en HCl.

Tabla 5. Estabilidad de la solución de mesilato de Mitoquinona-C10 en 4 disolventes diferentes en diferentes condiciones.

Condiciones	Tiempo (Días)							
	1	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**125**
Agua, Aire, 25 ºC	99,6	98,3	98,1	91,2	93,8	98,0	94,7	91,7
Agua, Aire, 40 ºC	98,1	95,0	94,6	92,1	92,1	91,5	58,3	21,8
HCl 0,01 M, Aire, 25 ºC	103,7	107,6	102,8	98,3	98,8	98,6	98,6	92,5
HCl 0,01 M, Aire, 40 ºC	98,4	98,8	99,2	96,5	100,6	104,9	94,0	82,6
IPB, Aire, 25 ºC	95,6	95,8	98,6	94,5	93,7	90,4	89,6	100,3
IPB, Aire, 40 ºC	95,7	95,5	94,1	92,3	91,2	89,5	68,7	40,0
MeOH al 50 %, Aire, 25 ºC	97,7	97,1	106,9	103,6	104,5	98,6	102,8	98,0

MeOH al 50 %, Aire, 40 ºC	99,2	98,8	99,4	98,5	100,5	101,5	81,9	60,5
Agua, N_2, 25 ºC	106,7	114,9	96,8	96,7	99,7	97,6	100,8	92,7
Agua, N_2, 40 ºC	97,0	97,5	98,3	93,0	90,4	87,3	59,8	22,0
HCl 0,01 M, N_2, 25 ºC	102,7	112,0	103,6	98,8	101,7	98,9	99,6	93,1
HCl 0,01 M, N_2, 40 ºC	99,3	99,6	100,2	98,3	100,4	102,9	94,1	88,8
IPB, N_2, 25 ºC	99,6	96,5	96,9	95,3	96,6	91,9	90,9	97,5
IPB, N_2, 40 ºC	92,8	90,9	92,7	91,2	93,3	88,1	68,0	40,3
MeOH al 50 %, N_2, 25 ºC	101,2	97,3	105,1	104,2	102,0	105,0	101,0	100,2
MeOH al 50 %, N_2, 40 ºC	99,8	100,5	99,3	98,9	101,5	103,6	83,8	63,6
Los datos son las medias de dos valores expresados como un porcentaje del valor en el tiempo cero. La estabilidad de la solución de mesilato de Mitoquinona-C10 en cuatro disolventes también se muestra en las Figuras 16, 17, 18 y 19.								

Estabilidad en estado sólido del mesilato de Mitoquinona-C10

[0288] Se estudió la estabilidad en estado sólido del mesilato de Mitoquinona-C10 en ausencia de luz en tres condiciones diferentes; a 40 ºC, 75 % de RH; a 25 ºC, 50 % de RH; y a 4 ºC en gel de sílice azul según el procedimiento operativo habitual del Solicitante.

[0289] Se colocó un peso conocido de mesilato de Mitoquinona-C10 en frascos de vidrio transparente y se almacenaron en diferentes condiciones. Se recogieron muestras por duplicado a los 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 125 días y se determinó la concentración del mesilato de Mitoquinona-C10 mediante una HPLC después de disolver las muestras en agua. Los resultados se proporcionan en la Tabla 6 y en la Figura 20.

[0290] El mesilato de Mitoquinona-C10 era estable (< 10 % de descomposición) a 4 ºC en gel de sílice durante 125 días y a 25 ºC / 50 % de RH durante 60 días.

Tabla 6. Estabilidad en estado sólido del mesilato de Mitoquinona-C10 a 40 ºC, 75 % de RH; a 25 ºC, 50 % de RH; y a 4 ºC en gel de sílice azul.

Tiempo (Días)	**1**	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**125**
4 ºC en sílice	101,6	103,4	102,4	108,2	113,5	96,6	98,2	96,0
25 ºC / 50 % de RH	109,2	110,7	110,2	108,1	107,6	95,	91,6	73,7
40 ºC / 75 % de RH	98,0	101,7	101,3	98,5	93,1	86,1	82,1	59,9
Los datos son las medias de dos valores expresados como un porcentaje del valor en el tiempo cero.								

EJEMPLO 9. Estudios de estabilidad de una solución de un complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:2)

Estabilidad de la solución del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:2)

[0291] La estabilidad de la solución del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:2) se determinó en cinco disolventes; agua, HCl 0,01 M, NaOH 0,01 M, IPB (pH 7,4) y MeOH al 50 % a dos temperaturas, 25 ºC y 40 ºC, en dos condiciones atmosféricas, al aire y con nitrógeno, durante 64 días, según el procedimiento operativo habitual del Solicitante.

[0292] Se prepararon soluciones del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:2) (100 µg/ml en forma de mesilato de Mitoquinona-C10) en los cinco disolventes mediante la dilución de una solución madre del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:2) (1 mg/ml en forma de mesilato de Mitoquinona-C10) en agua. Las soluciones (5 ml) se colocaron en viales de vidrio, se purgaron con aire o con nitrógeno, se precintaron y se colocaron para su almacenamiento. Se recogieron alícuotas (0,25 ml) a los 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 125 días y se determinó la concentración mediante una HPLC.

[0293] Los resultados se proporcionan en la Tabla 7 y en las Figuras 21, 22, 23 y 24. La estabilidad del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:2) en NaOH 0,01 M no está incluida debido a que el complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:2) se descompuso en este disolvente en 15 minutos. Los resultados demuestran que (a) la estabilidad de la solución es independiente de la atmósfera que haya por encima de la solución, y (b) la temperatura tiene un efecto significativo sobre la estabilidad del mesilato de Mitoquinona-C10 en el complejo 1:2 con β-ciclodextrina en todos los disolventes excepto en HCl.

Tabla 7. Estabilidad de la solución del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:2) en 4 disolventes diferentes en diferentes condiciones.

Condiciones	**Tiempo** (Días)							
	1	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**125**
Agua, Aire, 25 ºC	106,5	103,3	96,7	98,1	97,9	97,5	100,0	105,8
Agua, Aire, 40 ºC	102,0	98,7	101,3	101,4	92,8	80,5	55,9	17,2
HCl 0,01 M, Aire, 25 ºC	96,4	100,5	99,9	98,6	101,5	97,6	104,5	101,6
HCl 0,01 M, Aire, 40 ºC	96,6	98,4	107,1	104,0	100,4	96,4	101,0	96,2
IPB, Aire, 25 ºC	97,4	94,3	98,3	96,1	107,5	97,3	97,3	99,5
IPB, Aire, 40 ºC	95,2	93,2	97,8	98,8	91,7	87,5	74,2	55,9
MeOH al 50 %, Aire, 25 ºC	97,8	96,2	95,8	97,5	102,8	98,3	99,7	104,5
MeOH al 50 %, Aire, 40 ºC	99,5	98,1	106,5	106,5	102,9	92,6	84,6	64,6
Agua, N_2, 25 ºC	101,1	98,3	102,4	103,5	109,3	96,8	100,3	91,3
Agua, N_2, 40 ºC	100,6	100,3	104,8	101,6	94,1	78,1	52,8	14,9
HCl 0,01 M, N_2, 25 ºC	100,1	100,7	97,9	101,0	103,0	100,6	104,3	100,0
HCl 0,01 M, N_2, 40 ºC	98,6	96,8	103,7	104,2	100,6	97,8	100,3	95,14
IPB, N_2, 25 ºC	102,0	97,9	99,6	95,6	104,6	93,9	96,9	98,7
IPB, N_2, 40 ºC	92,1	93,7	95,2	93,1	90,3	86,6	73,9	54,8
MeOH al 50 %, N_2, 25 ºC	105,0	96,0	94,1	96,1	106,4	97,0	100,0	105,7
MeOH al 50 %, N_2, 40 ºC	98,3	98,9	104,2	105,3	99,4	94,9	88,8	64,4
Los datos son las medias de dos valores expresados como un porcentaje del valor en el tiempo cero.								

Estabilidad en estado sólido del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:2)

[0294] La estabilidad en estado sólido del complejo de mesilato de Mitoquinona-β-ciclodextrina (1:2) se estudió en ausencia de luz en tres condiciones diferentes; a 40 ºC, 75 % de RH; a 25 ºC, 50 % de RH; y a 4 ºC en gel de sílice azul según el procedimiento operativo habitual del Solicitante.

[0295] Se puso un peso conocido del complejo de mesilato de Mitoquinona-β-ciclodextrina (1:2) en frascos de vidrio transparente y se almacenaron en diferentes condiciones. Se tomaron muestras por duplicado a los 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 125 días y se determinó la concentración de mesilato de Mitoquinona-C10 mediante una HPLC después de disolver las muestras en agua. Los resultados se proporcionan en la Tabla 8 y en la Figura 25. Los resultados demuestran que el mesilato de Mitoquinona era estable en el complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:2) a 4 ºC en gel de sílice azul y a 25 ºC, 50 % de RH. A 40 ºC, 75 % de RH, un 37 % del mesilato de Mitoquinona estaba degradado en el complejo de mesilato de Mitoquinona-β-ciclodextrina (1:2) en su almacenamiento durante 64 días.

Tabla 8. Estabilidad en estado sólido del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:2) a 40 ºC, 75 % de RH; a 25 ºC, 50 % e RH y a 4 ºC en gel de sílice azul.

Tiempo (Días)	**1**	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**125**
4 ºC en sílice	97,6	107,6	111,8	106,3	106,8	97,7	96,8	99,9
25 ºC / 50 % de RH	96,0	99,7	101,0	104,1	102,9	98,1	98,7	99,6
40 ºC / 75 % de RH	105,5	109,7	110,6	114,3	110,5	92,0	65,5	51,5 *
Los datos son las medias de dos valores expresados como un porcentaje del valor en el tiempo cero. * Media de dos valores muy diferentes (71,9 y 31,1 %),								

EJEMPLO 10. Estudios de estabilidad del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10- β-ciclodextrina (1:1)

Estabilidad de la solución

[0296] La estabilidad de la solución del complejo de mesilato de Mitoquinona- β-ciclodextrina (1:1) se determinó en cinco disolventes; agua, HCl 0,01 M, NaOH 0,01 M, IPB (pH 7,4) y MeOH al 50 % a dos temperaturas, 25 ºC y 40 ºC, en dos condiciones atmosféricas, al aire y con nitrógeno, durante 64 días según el procedimiento operativo habitual del Solicitante.

[0297] Las soluciones del complejo de mesilato de Mitoquinona-β-ciclodextrina (1:1) (100 µg/ml en mesilato de Mitoquinona) en los cinco disolventes se prepararon mediante la dilución de una solución madre del complejo de mesilato de Mitoquinona-β-ciclodextrina (1:1) (1 mg/ml en forma de mesilato de Mitoquinona) en agua. Las soluciones (5 ml) se colocaron en viales de vidrio purgados con aire o con nitrógeno, se precintaron y se colocaron para su almacenamiento. Se tomaron alícuotas (0,25 ml) a los 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 125 días y se determinó la concentración mediante una HPLC.

[0298] Los resultados se proporcionan en la Tabla 9 y en las Figuras 26, 27 28, y 29. La estabilidad del mesilato de Mitoquinona-β-ciclodextrina (1:1) en NaOH 0,01 M no está incluida porque el mesilato de Mitoquinona se descompuso en este disolvente en 15 minutos. Los resultados demuestran que (a) la estabilidad de la solución es independiente de la atmósfera que haya por encima de la solución, y (b) la temperatura tiene un efecto significativo sobre la estabilidad del mesilato de Mitoquinona-C10 en el complejo 1:1 con β-ciclodextrina en agua y en IPB, pero no en HCl ni en MeOH al 50 %.

Tabla 9. Estabilidad de la solución de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:1) en 4 disolventes diferentes en diferentes condiciones.

Condiciones	**Tiempo** (Días)						
	1	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**
Agua, Aire, 25 ºC	101,3	98,2	99,5	99,0	94,0	92,7	89,8
Agua, Aire, 40 ºC	89,4	87,2	90,4	88,1	89,8	83,9	55,2
HCl 0,01 M, Aire, 25 ºC	103,0	104,3	109,4	104,6	99,1	102,2	100,0
HCl 0,01 M, Aire, 40 ºC	94,9	88,22	91,17	99,76	99,74	108,5	102,6
IPB, Aire, 25 ºC	97,9	95,7	96,1	97,1	96,1	97,1	95,5
IPB, Aire, 40 ºC	93,5	94,1	99,4	105,4	93,6	86,9	75,3
MeOH al 50 %, Aire, 25 ºC	104,8	103,7	108,7	106,4	97,6	96,9	98,1
MeOH al 50 %, Aire, 40 ºC	89,3	85,68	91,01	93,0	93,1	92,9	85,9
Agua, N_2, 25 ºC	101,7	101,3	106,4	102,7	92,0	92,4	89,6
Agua, N_2, 40 ºC	96,2	91,7	95,9	101,6	88,0	84,5	56,5
HCl 0,01 M, N_2, 25 ºC	103,7	106,5	108,7	108,2	102,7	97,2	100,3
HCl 0,01 M, N_2, 40 ºC	96,2	90,9	97,5	98,5	98,5	106,7	104,8
IPB, N_2, 25 ºC	100,1	99,2	100,4	97,1	96,4	98,2	95,5
IPB, N_2, 40 ºC	98,4	95,3	102,7	101,0	91,4	87,9	75,7

MeOH al 50 %, N_2, 25 ºC	101,2	101,4	104,5	102,4	97,6	96,4	99,0
MeOH al 50 %, N_2, 40 ºC	94,7	86,4	90,0	86,4	92,1	97,4	87,7
Los datos son las medias de dos valores expresados como un porcentaje del valor en el tiempo cero.							

Estabilidad en estado sólido

[0299] Se estudió la estabilidad en estado sólido del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:1) en ausencia de luz en tres condiciones diferentes; a 40 ºC, 75 % de RH; a 25 ºC, 50 % de RH; y a 4 ºC en gel de sílice azul según el procedimiento operativo habitual del Solicitante.

[0300] Se colocó un peso conocido del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:1) en frascos de vidrio transparentes y se almacenaron en diferentes condiciones. Se recogieron muestras por duplicado a los 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 125 días y se determinó la concentración del mesilato de Mitoquinona-C10 mediante una HPLC después de disolver las muestras en agua. Los resultados se proporcionan en la Tabla 10 y en la Figura 30. Los resultados demuestran que el mesilato de Mitoquinona-C10 era estable a 4 ºC en gel de sílice y a 25 ºC, 50 % de RH, pero un 37 % del mesilato de Mitoquinona-C10 se había degradado en mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:1) en su almacenamiento durante 125 días a 40 ºC, 75 % de RH.

Tabla 10. Estabilidad en estado sólido del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:1) a 40 ºC, 75 % de RH; a 25 ºC, 50 % de RH y a 4 ºC en gel de sílice azul.

Tiempo (Días)	**1**	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**125**
4 ºC en sílice	102,1	97,7	100,0	98,5	103,4	101,4	100,6	102,3
25 ºC / 50 % de RH	99,7	101,6	104,2	101,8	102,4	100,7	95,2	101,9
40 ºC / 75 % de RH	98,2	101,6	98,3	97,8	98,8	96,0	87,2	66,7
Los datos son las medias de dos valores expresados como un porcentaje del valor en el tiempo cero.								

EJEMPLO 11. Estudio farmacocinético de una única dosis IV y oral del complejo de mesilato de Mitoquinona-β-ciclodextrina (1:2) en rata (P2 & P3)

[0301] Tomando como base los resultados de un estudio farmacocinético previo de bromuro de Mitoquinona-C10 y un estudio de toxicidad aguda oral del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:2), las dosis del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:2) para el estudio farmacocinético eran de 50 mg/kg de mesilato de Mitoquinona-C10 para la dosis oral, y de 10 mg/kg de mesilato de Mitoquinona-C10 para la dosis IV.

[0302] Se canularon diez ratas Wistar hembra (con un peso medio de aproximadamente 236 g) con tubos de Silastic en la vena yugular derecha bajo anestesia con halotano 48 h antes del experimento. Se preparó una solución acuosa del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:2) (10 mg/ml en forma de mesilato de Mitoquinona-C10) y se administró inmediatamente bien por vía oral (n = 5) o bien por vía IV (n = 5). Se recogieron muestras sanguíneas (0,2 ml) a los 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 720 y 1.440 (24 h) min después de la dosis IV y a los 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 420, 540, 720 y 1.440 (24 h) min después de la dosis oral. Las muestras sanguíneas se centrifugaron y las muestras plasmáticas (0,1 ml) se almacenaron en el congelador a -20 ºC. También se recogieron muestras de orina de 24 h y de heces.

[0303] La concentración plasmática de mesilato de Mitoquinona-C10 se determinó mediante una ESR mediante el uso de una CL/EM (Tabla 12).

Análisis farmacocinético

[0304] Se analizó la farmacocinética de la Mitoquinona-C10 mediante un análisis de regresión no lineal de mínimos cuadrados iterativo no ponderado mediante el uso de MINIM. Los datos IV se ajustaron mediante el uso de modelos mono, bi y tricompartimentales. El modelo que proporcionó el mejor ajuste era aquel con un valor mínimo de acuerdo con el criterio de información de Akaike (A.I.C). Se averiguó que las curvas de concentración plasmática del fármaco-tiempo después de la administración del fármaco eran mejores y se ajustaban mejor a un modelo tricompartimental abierto descrito por la siguientes ecuación

$$C = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} + Ee^{-\gamma t}$$

en la que C es la concentración plasmática del fármaco, A, B y E son coeficientes matemáticos, α es la constante de velocidad para la fase de distribución, β es la constante de velocidad para una fase intermedia (distribución o eliminación) y γ Es la constante de velocidad para una fase terminal más lenta de eliminación. La semivida de eliminación del fármaco ($t_{1/2}$) en la fase terminal se calculó como $t_{1/2}$= 0,693 / γ. Los datos orales (después de 4 h) se ajustaron a un modelo monocompartimental. El pico de concentración ($C_{máx}$) y el tiempo hasta alcanzar la $C_{máx}$ ($t_{máx}$) se obtuvieron directamente a partir del perfil de concentración-tiempo. El área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo (AUC) se estimó mediante el uso de la regla de los trapecios, con una extrapolación desde la última concentración medida hasta el infinito determinada mediante el uso de la constante de velocidad de eliminación terminal (γ). Los aclaramientos plasmáticos totales después de la administración intravenosa (CL) y oral (CL / F) se estimaron como CL = dosis / AUC. Los volúmenes de distribución se calcularon como V_β = dosis / (AUC · β y $V\gamma$ = dosis / (AUC · γ). La biodisponibilidad absoluta (F) se calculó como: F = AUC_{po} x $Dosis_{iv}$ / AUC_{iv} x $Dosis_{po}$. El tiempo medio de residencia (MRT) se calculó como AUMC / AUC. El volumen de distribución aparente en el estado estacionario (Vss) se calculó como $dosis_{iv}$ x AUMC / $(AUC)^2$.

Resultados y análisis

[0305] Los perfiles de concentración plasmática media-tiempo del mesilato de Mitoquinona-C10 después de la administración IV y oral del complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-β-ciclodextrina (1:2) se muestran en la Figura 31, y los parámetros farmacocinéticos medios están recogidos en la Tabla 11. Se adjuntan los datos originales de los niveles plasmáticos del mesilato de Mitoquinona-C10 (Tabla 12).

Tabla 11. Parámetros farmacocinéticos del mesilato de Mitoquinona-C10 administrado en forma de un complejo de mesilato de Mitoquinona-C10-P-ciclodextrina (1:2) en rata después de una única dosis IV (10 mg/kg) y oral (50 mg/kg)

	Mitoquinona-C10 IV (n = 5)	Mitoquinona-C10 oral (n = 5)
Peso corporal (g)	236,8 ± 21,0	236,8 ± 22,9
$C_{máx}$ (ng/ml)	-	35,1
$t_{máx}$ (min)	-	30
$t_{1/2\alpha}$ (min)		-
$t_{1/2\beta}$ (min)	10,4 ± 3,2	-
$t_{1/2\gamma}$ (h)	1,83 ± 0,44	-
$t_{1/2}$ (h)	14,3*	13,9 **
AUC (µg-min/ml)	47,3 ± 11,1	29,3 ± 2,7
AUMC (µg-min^2/ml)	5292 ± 831	7477 ± 365
F (%)	100	12,4
CL (1/min/kg)	0,22 ± 0,04	-
CL / F (1/min/kg)	-	13,7 ± 1,3
V_β (1/kg)	3,33 ± 1,46	-
V_γ (1/kg)	24,04 ± 18,3	-
MRT (h)	4,2 ± 0,5	9,5 ± 2,2
Vss (1/kg)	25,2 ± 6,5	-

* $t_{1/2}$ valor obtenido a partir de las concentraciones medias en los tiempos > 4 h
** $t_{1/2}$ valor obtenido a partir de las concentraciones medias en los tiempos > 4 h

Tabla 12. Concentración de Mitoquinona-C10 en plasma de rata para el estudio P2-IV y P3-PO

Tiempo (min)	01 IV (ng/ml)	2 IV (ng/ml)	3 IV (ng/ml)	4 IV (ng/ml)	5 IV (ng/ml)	Tiempo (H)	Media
0	0,495	0,348	30,4	1,39	1,39	0	
5	1010	867	1550	2300	1640	0,1	1473,4
10	306	391	572	641	476	0,2	477,2
20	199	186	221	251	192	0,3	209,8
30	132	111	117	158	111	0,5	125,8
45	90,5	87,5	70	113	72,3	0,8	86,7
60	62,1	59,4	56,4	72,5	48,7	1,0	59,8
90	36,4	37,9	38,9	57,4	29,4	1,5	40,0
120	23,2	25,3	24,2	54,8	18,8	2,0	29,3
180	17,8	21,3	20,7	30,2	22	3,0	22,4
240	13,1	12,9	16,4	27,4	9,63	4,0	15,9
360	7,01	8,89	11,5	16,7	7,46	6,0	10,3
720	2,8	3,44	5,66	4,07	2,19	12,0	3,6
1440	1,49	1,63	1,47	1,37	1,96	24,0	1,6
Orina	19,3	52,6	48,5	10,1	12,9		
Tiempo (min)	**06 PO (ng/ml)**	**07 PO (ng/ml)**	**08 PO (ng/ml)**	**09 PO (ng/ml)**	**10 PO (ng/ml)**	**Tiempo (H)**	**Media**
0	0,878	2,15	1,35	1,39	0,279	0	1,2
15	18,3	21,2	17,5	18,3	44,8	0,3	24,0
30	29,9	36,9	26,7	28	54	0,5	35,1
60	16	25,4	19,5	20,3	40,8	1,0	24,4
90	10,7	25,3	20,2	21,1	25,3	1,5	20,5
120	24,3	23,2	24,5	25,6	13,5	2,0	22,2
150	20,1	23,8	25,7	26,9	10,4	2,5	21,4
180	21	22,4	19,2	20,1	8,72	3,0	18,3
240	33,9	20,9	12	22	7,67	4,0	19,3
300	22,4	17,4	13	13,5	17,3	5,0	16,7
420	9,19	21,8	5,03	5,24	21,4	7,0	12,5
540	6,27	20,1	14,5	15,1	15,2	9,0	14,2
720	8,25	7,31	4,38	4,57	6,08	12,0	6,1
1440	2,12	0,418	2,93	3,05	1,71	24,0	2,0
Orina	1,54	35,4	4,42	4,61	20,7		

[0306] Después de la administración IV, una fase de distribución muy rápida está seguida por una distribución más lenta o fase de eliminación inicial, seguida aproximadamente a las 4 h por una fase de eliminación prolongada. El perfil de concentración-tiempo de la Mitoquinona-C10 se ajustó a un modelo tricompartimental con una semivida terminal de 1,8 h, aunque la semivida basada en los datos recogidos 4 h después de la dosis es de 14,3 h (Tabla 13).

[0307] Después de la administración oral, la absorción de la Mitoquinona-C10 en el tracto GI de la rata era rápida. El pico de concentración plasmática de la Mitoquinona-C10 se produjo en 1 h después de la administración oral, y después disminuyó lentamente con el tiempo, con una semivida de eliminación basada en los datos 4 h después de la dosis de aproximadamente 14 h.

[0308] El valor estimado de F es del 12,4 %.

Tabla 13. Farmacocinética IV (P2) y oral (P3) del complejo de mesilato de Mitoquinona-β-ciclodextrina 1:2)

	modelo tricompartimental													
Código de rata	**A**		**K1**		**B**		**K2**		**C**		**K3**		r2	**A.I.C**
valor final		**DT**	**valor final**	**DT**	**valor final**	**DT**	**valor final**	**DT**	**valor final**	**DT**	**valor final**	**DT**	0,9999	69,21
P201 IV	22766,1	12412,7	0,7080	0,1143	378,5	23,2	0,0456	0,0047	49,6	13,2	0,0057	0,0016		
P2 02 IV	2868,7	1502,0	0,3945	0,1855	591,0	325,4	0,0902	0,0317	105,0	26,2	0,0100	0,0024	0,9996	85,45
P2 03 IV	6736,1	1535,2	0,4168	0,0738	1029,7	248,0	0,0945	0,0128	72,2	11,4	0,0067	0,0013	0,9999	77,63
P2 04 IV	13002,7	880,7	0,3973	0,0198	591,4	96,3	0,0639	0,0092	88,5	13,7	0,0050	0,0010	1,0000	82,32
P2 05 IV	9353,2	943,4	0,4073	0,0257	510,0	80,0	0,0638	0,0094	50,4	14,0	0,0060	0,0020	0,9999	77,42
Media	**10945,3**	**3454,8**	**0,4648**	**0,0838**	**620,1**	**154,6**	**0,0716**	**0,0136**	**73,1**	**15,7**	**0,0067**	**0,0017**	**0,9999**	**78,4**
SD	7573,8	5016,9	0,1362	0,0686	244,9	126,6	0,0204	0,0105	24,1	6,0	0,0020	0,0005	0,0001	6,1
	modelo bicompartimental													
Código de rata	**A**		**Kl**		**B**		**K2**							**A.I.C**
valor final		DT	**valor final**	DT	**valor final**	**DT**	**valor final**	**DT**					0,9990	96,46
P2 01 IV	8722,0	2340,9	0,4962	0,0583	320,2	28,9	0,0267	0,0027						
P2 02 IV	2131,2	135,1	0,2295	0,0158	219,5	27,7	0,0199	0,0029					0,9986	97,56
P2 03 IV	4787,7	303,8	0,2642	0,0173	313,8	61,8	0,0289	0,0056					0,9990	108,04
P2 04 IV	10519,2	755,6	0,3306	0,0165	316,4	46,5	0,0203	0,0038					0,9992	117,86
P2 05 IV	7711,2	581,3	0,3466	0,0187	324,2	46,0	0,0317	0,0044					0,9995	100,53
Media	**6774,2**	**823,3**	**0,3334**	**0,0253**	**298,8**	**42,2**	**0,0255**	**0,0039**					**0,9991**	**104,1**
DT	3324,2	881,7	0,1028	0,0185	44,53	14,17	0,0052	0,0012					0,0003	8,9

[0309] Todas las patentes, publicaciones, artículos científicos y otros documentos y materiales referenciados o mencionados en el presente documento son indicativos de los niveles de pericia de los expertos en la materia a la que pertenece la invención. Los solicitantes se reservan el derecho de incorporar físicamente en esta memoria descriptiva cualquiera y todos los materiales e informaciones de cualquiera de dichas patentes, publicaciones, artículos científicos, sitios web, información disponible electrónicamente y otros materiales o documentos referenciados.

[0310] Los métodos y las composiciones específicas descritos en el presente documento son representativos de las diversas formas de realización o formas de realización preferidas, y únicamente ejemplares. A los expertos en la materia se les ocurrirán otros objetos, aspectos, ejemplos y formas de realización tras la consideración de esta memoria descriptiva, y están englobadas en la invención según se define por el ámbito de las reivindicaciones. La invención descrita ilustrativamente en el presente documento puede llevarse a la práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos o limitación o limitaciones que no estén específicamente divulgados en el presente documento como esenciales. Por lo tanto, por ejemplo, en cada caso del presente documento, en las formas de realización o en los ejemplos de la presente invención, cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" pueden ser sustituidos con cualquiera de los otros dos términos en la memoria descriptiva. También, los términos "que comprende", "que incluye", "que contiene", etc. deben ser interpretados ampliamente y sin limitación. Los métodos y los procesos descritos ilustrativamente en el presente documento pueden ser llevados a la práctica adecuadamente en diferentes órdenes de etapas, ya que no están restringidos necesariamente a los órdenes de etapas indicados en el presente documento o en las reivindicaciones. También, según se usa en el presente documento y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un," "uno/a" y "el / la" incluyen las referencias plurales, salvo que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por lo tanto, por ejemplo, una referencia a "una célula hospedadora" incluye una pluralidad (por ejemplo, un cultivo o una población) de dichas células hospedadoras, y así sucesivamente. Bajo ninguna circunstancia debe interpretarse la patente, según se define en las reivindicaciones, como limitada a los ejemplos o formas de realización o métodos específicos divulgados específicamente en el presente documento.

[0311] Los términos y las expresiones que se han empleado se usan como términos descriptivos y no limitantes, y no hay ninguna intención de usar dichos términos y expresiones para excluir cualquier equivalente de las características mostradas y descritas, o de porciones de las mismas, pero que se reconoce que son posibles diversas modificaciones en el ámbito de la invención según se reivindica. Por lo tanto, se entenderá que, aunque la presente invención se ha divulgado específicamente mediante las formas de realización preferidas y las características opcionales, los expertos en la materia pueden recurrir a una modificación y variación de los conceptos divulgados en el presente documento, y se considera que dichas modificaciones y variaciones están en el ámbito de esta invención según se define mediante las reivindicaciones anexas.

[0312] La invención ha sido descrita ampliamente y genéricamente en el presente documento. Cada una de las especies menores y agrupamientos subgenéricos que están en la divulgación genérica también forman parte de la invención. Esto incluye la descripción genérica de la invención con una condición o limitación negativa que elimina cualquier asunto en cuestión del género, independientemente de si el material excluido se ha mencionado específicamente o no en el presente documento.

[0313] Otras formas de realización están en las siguientes reivindicaciones. Además, cuando se describen características o aspectos de la invención en términos de grupos de Markush, los expertos en la materia reconocerán que la invención también se describe por tanto en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush.

[0314] Los compuestos de la invención tienen aplicación en terapias antioxidantes selectivas para pacientes humanos para la prevención de daños en las mitocondrias. Esto puede ser para prevenir el elevado estrés oxidativo mitocondrial asociado con algunas enfermedades en particular, tales como la enfermedad de Parkinson o enfermedades asociadas con mutaciones en el ADN mitocondrial. También podrían usarse junto con terapias de trasplante celular para enfermedades neurodegenerativas, para aumentar la tasa de supervivencia de las células implantadas.

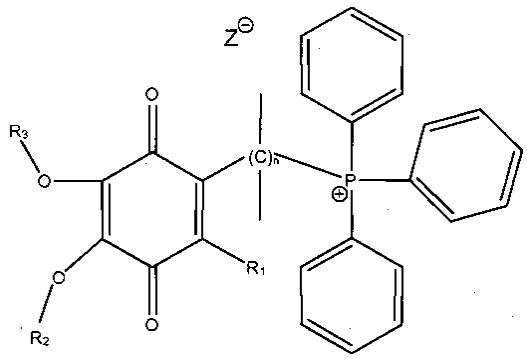
[0315] Además, estos compuestos podrían usarse como profilácticos para proteger órganos durante un trasplante, o para mejorar las lesiones por reperfusión isquémica que se producen durante la cirugía. Los compuestos de la invención también podrían usarse para reducir el daño celular después de una apoplejía y de un infarto de corazón, o ser administrados profilácticamente a bebés prematuros, que son susceptibles a una isquemia cerebral. Los métodos de la invención tienen una importante ventaja sobre las terapias antioxidantes actuales -

permitirán que los antioxidantes se acumulen selectivamente a las mitocondrias, la parte de la célula bajo un mayor estrés oxidativo. Esto aumentará en gran medida la eficacia de las terapias antioxidantes.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto antioxidante químicamente estable que comprende:

una fracción catiónica lipófila unida por una fracción de conexión a una fracción antioxidante; y
un complemento aniónico para dicha fracción catiónica, en el que la fracción catiónica es capaz de dirigir la fracción antioxidante a las mitocondrias,
en el que el compuesto antioxidante es un compuesto de fórmula I:



I

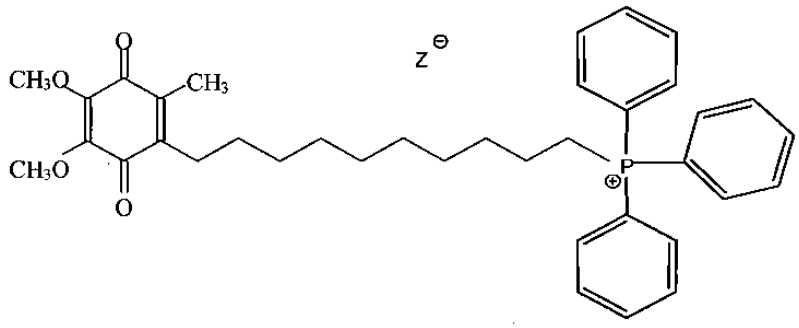
o su forma de quinol, en la que R_1, R_2 y R_3, son iguales o diferentes y se eligen de entre fracciones alquilo C_1 hasta C_5 e H, y en la que n es un número entero entre 2 y 20, y en la que Z es un anión que no muestra reactividad frente a la fracción antioxidante, la fracción catiónica o la fracción de conexión y se elige de entre un sulfonato de alquilo, un sulfonato de arilo, trifluorometansulfonato, tetrafenilborato, tetrafluoroborato, hexafluoroantimoniato, hexafluoroarseniato y hexafluorofosfato.

2. El compuesto de la reivindicación 1 en el que el anión farmacéuticamente aceptable se elige de entre el grupo que consiste en metansulfonato, p-toluensulfonato, etansulfonato, bencensulfonato y 2-naftalensulfonato.

3. El compuesto de la reivindicación 1 el que el anión farmacéuticamente aceptable es metansulfonato.

4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 el que C de $(C)_n$ está saturado.

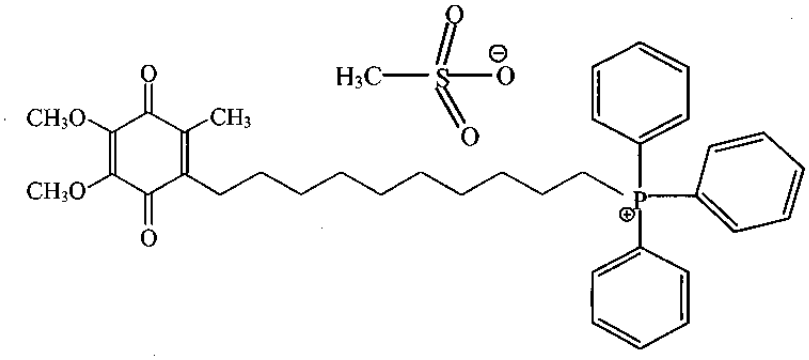
5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la fórmula:



II

y/o su forma de quinol, en la que Z es el anión que no muestra reactividad frente al compuesto antioxidante y que se elige de entre un sulfonato de alquilo, un sulfonato de arilo, trifluorometansulfonato, tetrafenilborato, tetrafluoroborato, hexafluoroantimoniato, hexafluoroarseniato y hexafluorofosfato.

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la fórmula:



(III)

y/o su forma de quinol.

7. Una composición farmacéutica, que comprende:

un compuesto antioxidante químicamente estable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6; y un portador o excipiente.

8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 en la que el portador o excipiente comprende ciclodextrina.

9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8 en la que el compuesto antioxidante y la ciclodextrina están presentes en una proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina que es de desde aproximadamente 10:1 hasta aproximadamente 1:10.

10. La composición farmacéutica de la reivindicación 8 en la que el compuesto antioxidante y la ciclodextrina están presentes en una proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina que se elige de entre el grupo que consiste en (i) desde aproximadamente 5:1 hasta aproximadamente 1:5, (ii) desde aproximadamente 4:1 hasta aproximadamente 1:4, (iii) desde aproximadamente 2:1 hasta aproximadamente 1:2, (iv) de aproximadamente 1:1 y (v) de aproximadamente 1:2.

11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 en la que la ciclodextrina es la β-ciclodextrina.

12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 en la que el compuesto antioxidante comprende el compuesto de la reivindicación 6 y el portador o excipiente comprende ciclodextrina, en la que el compuesto antioxidante y la ciclodextrina están presentes en una proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina que es de aproximadamente 1:2.

13. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 que se elige de entre el grupo que consiste en una composición farmacéutica que está formulada para su administración oral y una composición farmacéutica que está formulada para su administración parenteral.

14. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12 que comprende ciclodextrina, y que se elige de entre el grupo que consiste en una composición farmacéutica que está formulada para su administración oral y una composición farmacéutica que está formulada para su administración parenteral.

15. Un método para reducir el estrés oxidativo en una célula *in vitro*, que comprende:

poner en contacto una célula con un compuesto antioxidante químicamente estable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, y reducir así el estrés oxidativo en la célula.

16. El método de la reivindicación 15 en el que el compuesto antioxidante está complejado con

ciclodextrina.

17. El método de la reivindicación 16 en el que el compuesto antioxidante y la ciclodextrina están presentes a una proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina que es de desde aproximadamente 10:1 hasta aproximadamente 1:10.

18. El método de la reivindicación 16 en el que el compuesto y la ciclodextrina están presentes en una proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina que se elige de entre el grupo que consiste en (i) desde aproximadamente 5:1 hasta aproximadamente 1:5, (ii) desde aproximadamente 4:1 hasta aproximadamente 1:4, (iii) desde aproximadamente 2:1 hasta aproximadamente 1:2, (iv) de aproximadamente 1:1 y (v) de aproximadamente 1:2.

19. El método de la reivindicación 16 en el que la ciclodextrina es la β-ciclodextrina.

20. El método de la reivindicación 16 en el que el compuesto y la ciclodextrina están presentes en una proporción molar entre el compuesto y la ciclodextrina que es de aproximadamente 1:2.

21. Un compuesto antioxidante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 para su uso como un medicamento.

22. Uso de un compuesto antioxidante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 o de una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 - 14 en la preparación de un medicamento para la reducción de los síntomas del envejecimiento en un paciente.

23. Un compuesto antioxidante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 - 14 para uso en la reducción de los síntomas del envejecimiento en un paciente.

24. Uso de un compuesto antioxidante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 o de una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 - 14 en la preparación de un medicamento para la terapia o la profilaxis del estrés oxidativo, de una enfermedad degenerativa asociada con el envejecimiento, de la inflamación y/o de lesiones tisulares por reperfusión isquémica en una apoplejía, un infarto cardíaco, una cirugía o un trasplante de órganos.

25. Un compuesto antioxidante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 - 14 para uso en la terapia o en la profilaxis del estrés oxidativo, de una enfermedad degenerativa asociada con el envejecimiento, de la inflamación y/o de lesiones tisulares por reperfusión isquémica en una apoplejía, un infarto cardíaco, una cirugía o un trasplante de órganos.

26. Uso de un compuesto antioxidante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 o de una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 - 14 en la preparación de un medicamento para la terapia o la profilaxis de la enfermedad de Parkinson, de la enfermedad de Alzheimer, de la corea de Huntington o de la ataxia de Friedreich.

27. Un compuesto antioxidante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 - 14 para su uso en la terapia o la profilaxis de la enfermedad de Parkinson, de la enfermedad de Alzheimer, de la corea de Huntington o de la ataxia de Friedreich.

28. Uso de un compuesto antioxidante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 o de una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 - 14 en la preparación de un medicamento para el tratamiento del estrés oxidativo, de una enfermedad degenerativa asociada con el envejecimiento, de la inflamación y/o de lesiones tisulares por reperfusión isquémica en una apoplejía, un infarto cardíaco, una cirugía o un trasplante de órganos.

29. Un compuesto antioxidante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 - 14 para su uso en el tratamiento del estrés oxidativo, de una enfermedad degenerativa asociada con el envejecimiento, de la inflamación

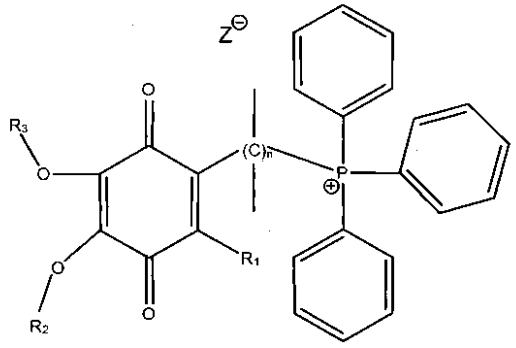
y/o de lesiones tisulares por reperfusión isquémica en una apoplejía, un infarto cardíaco, una cirugía o un trasplante de órganos.

30. Uso de un compuesto antioxidante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 o de una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 - 14 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, de la enfermedad de Alzheimer, de la corea de Huntington o de la ataxia de Friedreich.

31. Un compuesto antioxidante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 - 14 para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, de la enfermedad de Alzheimer, de la corea de Huntington o de la ataxia de Friedreich.

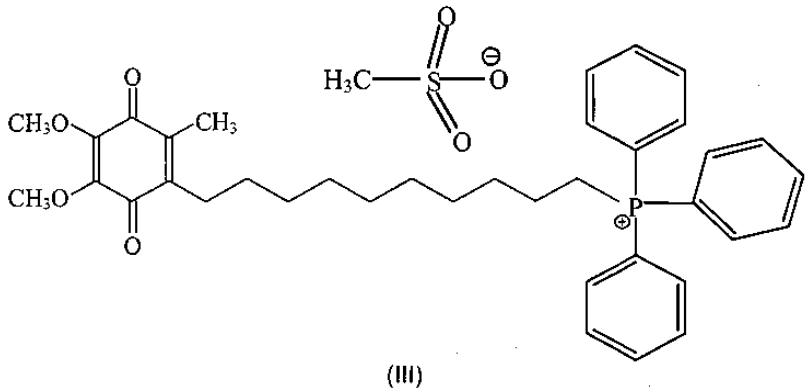
32. Un método de preparación de un compuesto antioxidante que es capaz de reducir el estrés oxidativo en una célula, que comprende la mezcla de una ciclodextrina con un compuesto que se elige de entre:

(a) un compuesto de la fórmula I



I

y/o su forma de quinol, en la que R_1, R_2 y R_3 son iguales o diferentes y se eligen de entre alquilo C_1 hasta C_5, alquilo C_1 hasta C_5 sustituido e H, en la que n es un número entero desde 2 hasta 20, y en la que Z es un anión farmacéuticamente aceptable que no muestra reactividad frente a cualquier fracción del compuesto de fórmula I y se elige de entre un sulfonato de alquilo, un sulfonato de arilo, trifluorometansulfonato, tetrafenilborato, tetrafluoroborato, hexafluoroantimoniato, hexafluoroarseniato y hexafluorofosfato; y (b) un compuesto que tiene la fórmula:



(III)

y/o su forma de quinol.

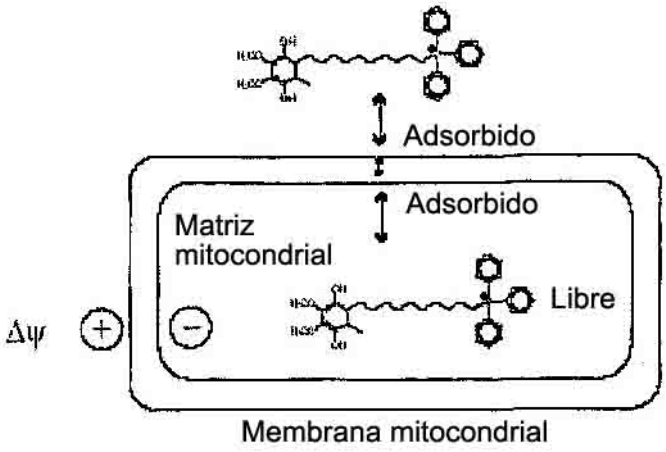

Adsorbido
Adsorbido
Matriz
mitocondrial
Libre
Δψ
Membrana mitocondrial

Figura 1

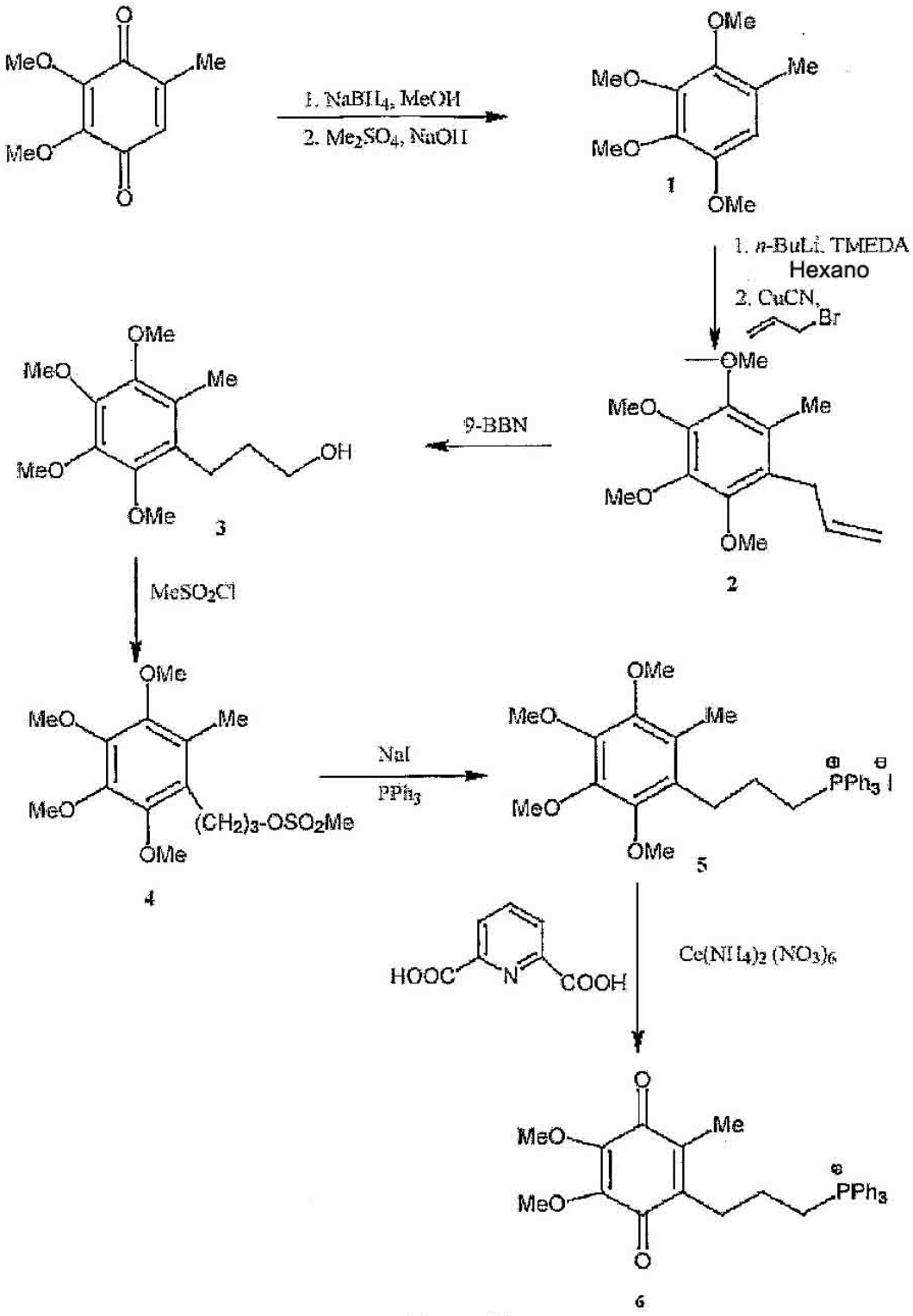

1. NaBH4, MeOH
2. Me2SO4, NaOH
1
1. n-BuLi, TMEDA
Hexano
2. CuCN,
2
9-BBN
3
MeSO2Cl
4
NaI
PPh3
5
Ce(NH4)2 (NO3)6
6

Figura 2A

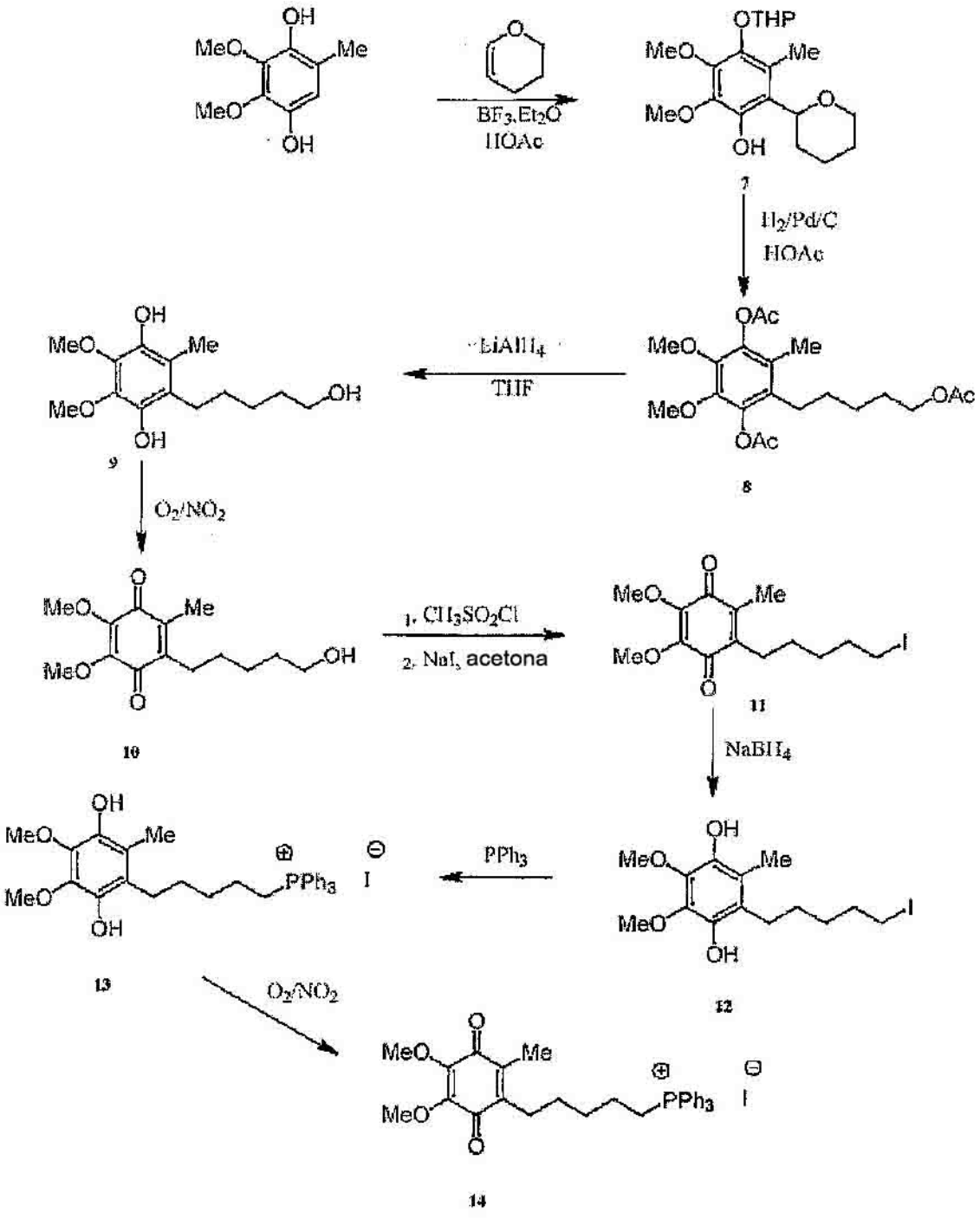

OH
MeO
Me
MeO
OH
BF3.Et2O
HOAc
OTHP
MeO
Me
MeO
OH
7
H2/Pd/C
HOAc
OAc
MeO
Me
MeO
OAc
OAc
8
LiAlH4
THF
OH
MeO
Me
MeO
OH
OH
9
O2/NO2
O
MeO
Me
MeO
OH
O
10
1. CH3SO2Cl
2. NaI, acetona
O
MeO
Me
MeO
I
O
11
NaBH4
OH
MeO
Me
MeO
OH
I
12
PPh3
OH
MeO
Me
MeO
OH
PPh3
I
13
O2/NO2
O
MeO
Me
MeO
PPh3
I
O
14

Figura 2B

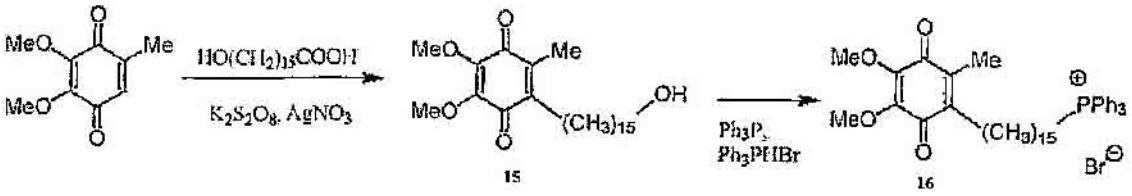
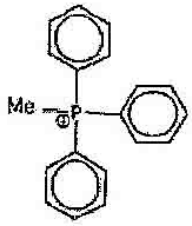
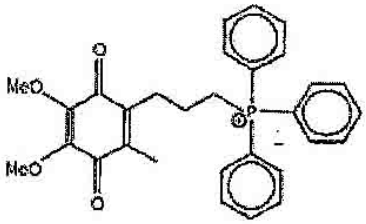

MeO
Me
MeO
HO(CH2)15COOH
K2S2O8, AgNO3
(CH2)15
OH
15
Ph3P,
Ph3PHBr
PPh3
Br
16

Figura 2C

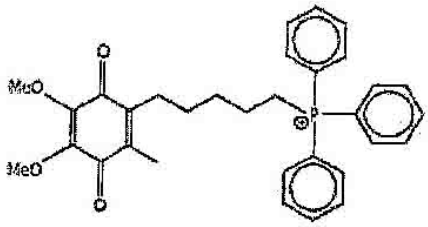
A



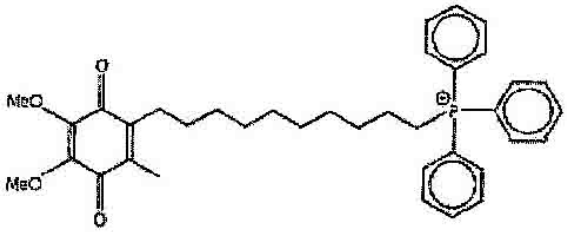
B



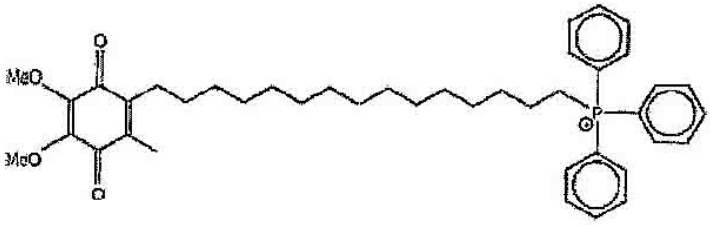
C



D



E



F

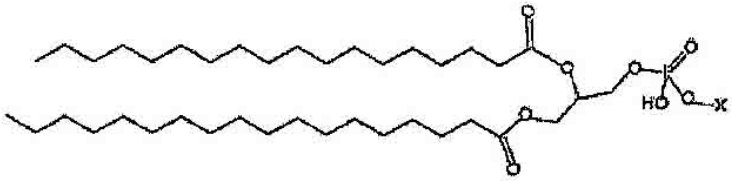


Figura 3

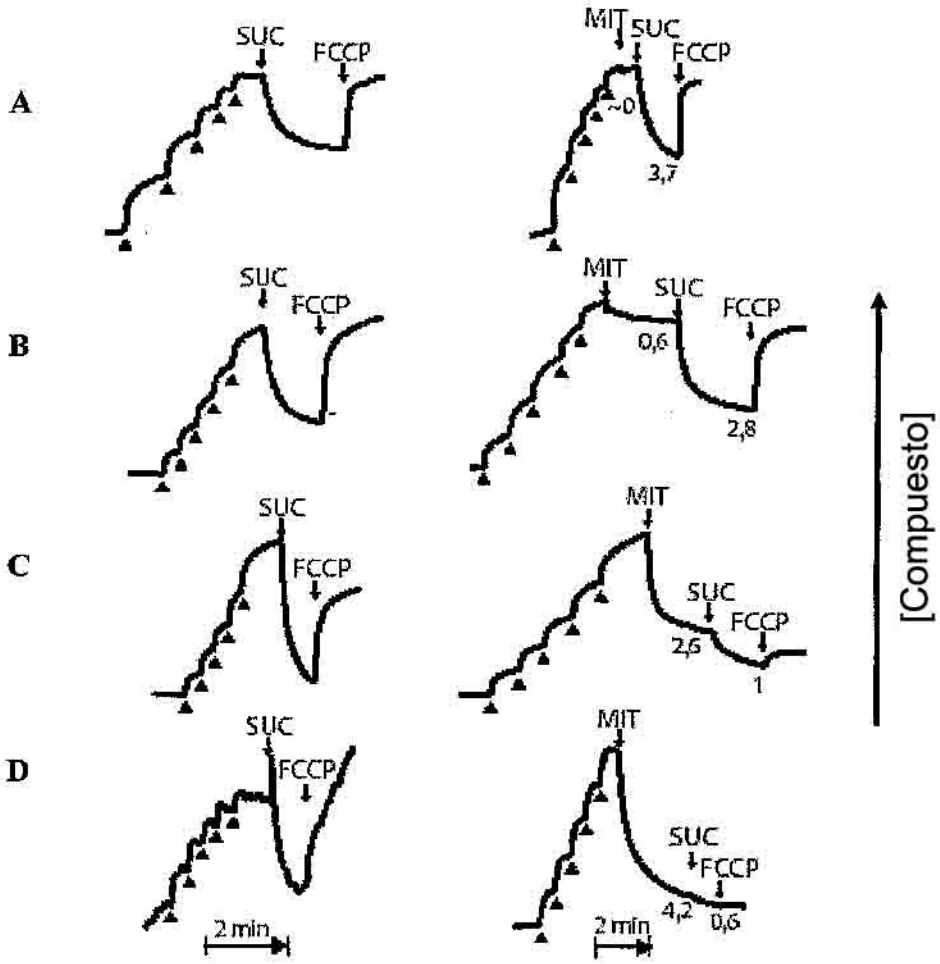


Figura 4

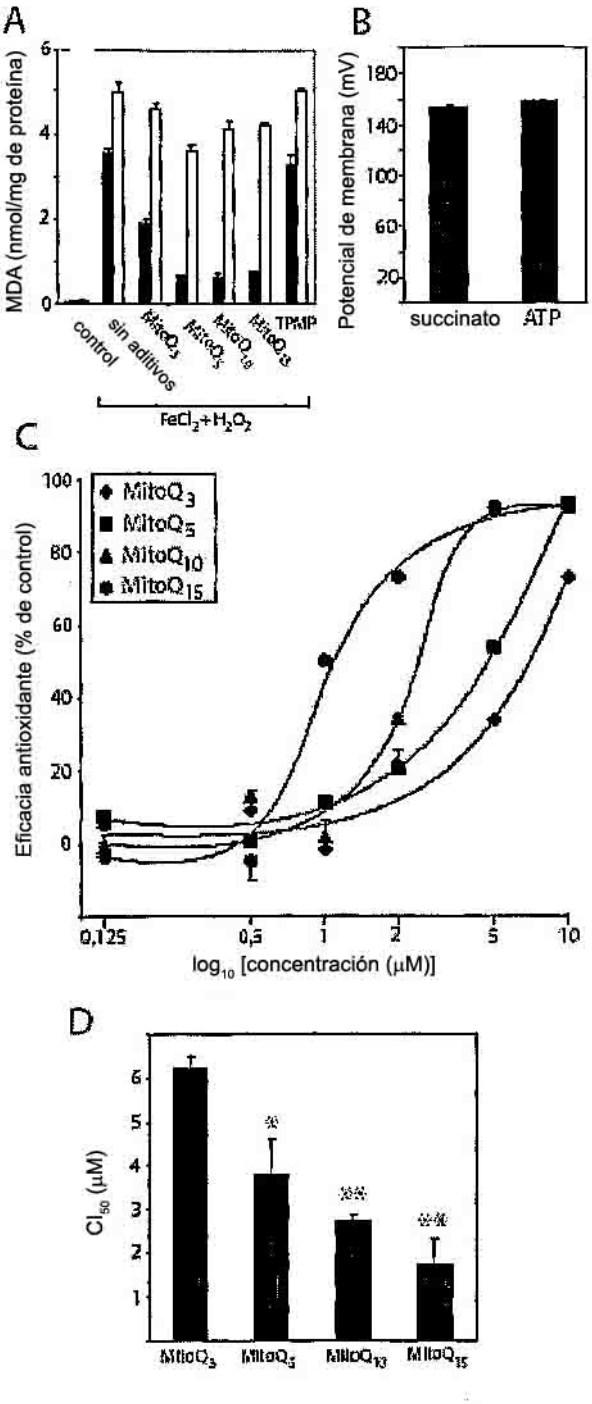

A
MDA (nmol/mg de proteína)
control
sin aditivos
TPMP
FeCl2+H2O2
B
Potencial de membrana (mV)
succinato
ATP
C
MitoQ3
MitoQ5
MitoQ10
MitoQ15
Eficacia antioxidante (% de control)
log10 [concentración (μM)]
D
CI50 (μM)

Figura 5

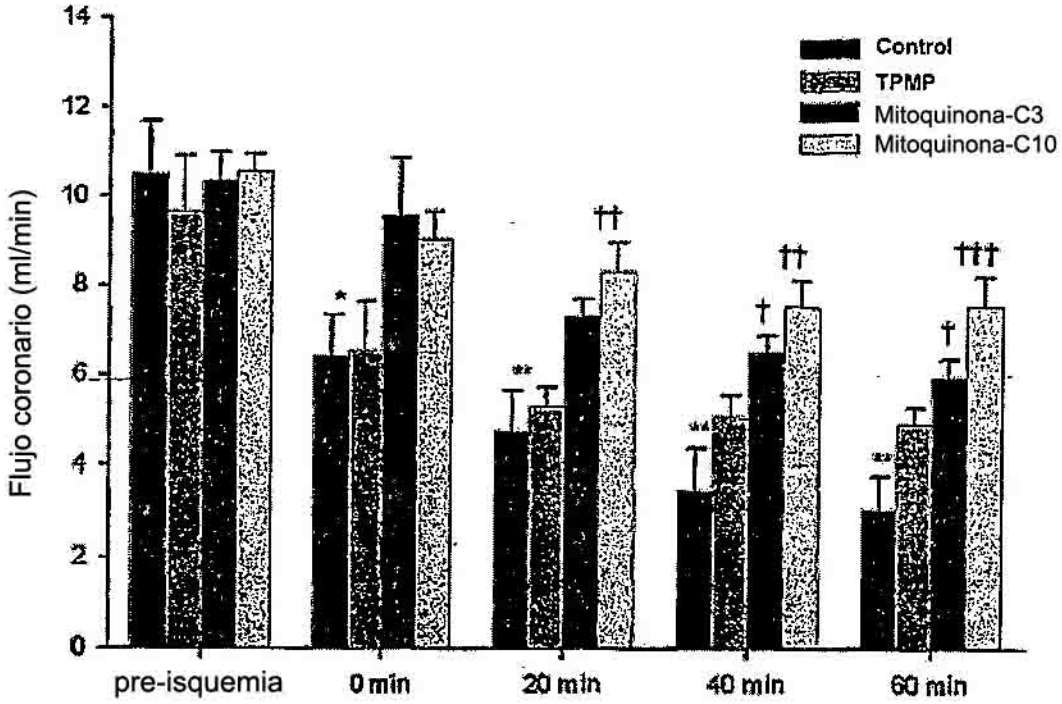

Control
TPMP
Mitoquinona-C3
Mitoquinona-C10
Flujo coronario (ml/min)
14
12
10
8
6
4
2
0
pre-isquemia
0 min
20 min
40 min
60 min

Figura 6

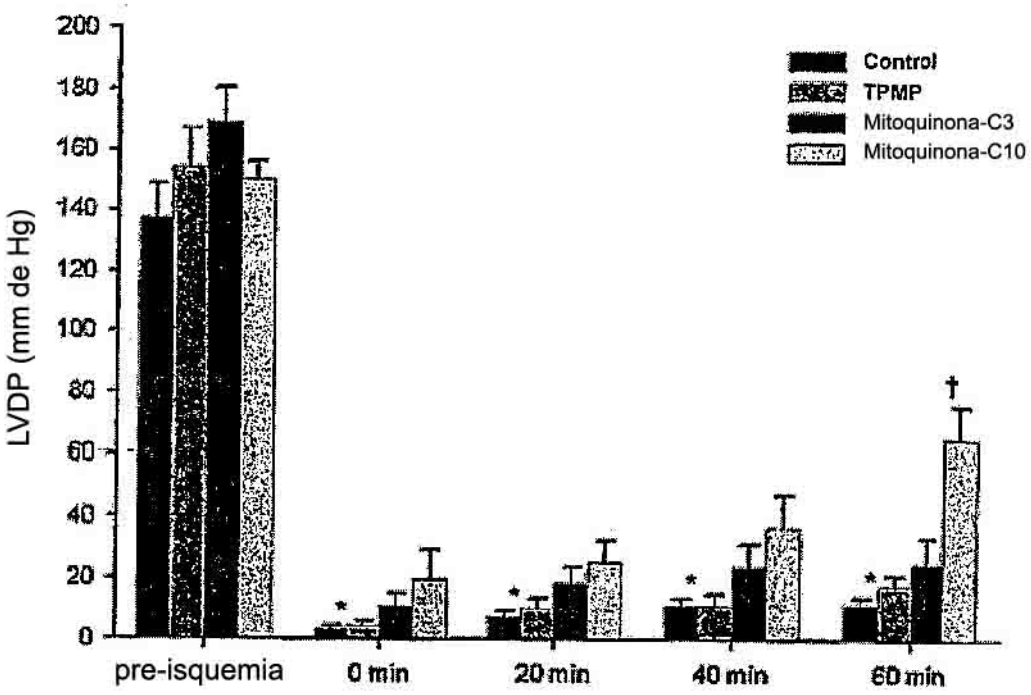

LVDP (mm de Hg)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
TPMP
Mitoquinona-C3
Mitoquinona-C10
*
*
*
*
†
pre-isquemia
0 min
20 min
40 min
60 min

Figura 7

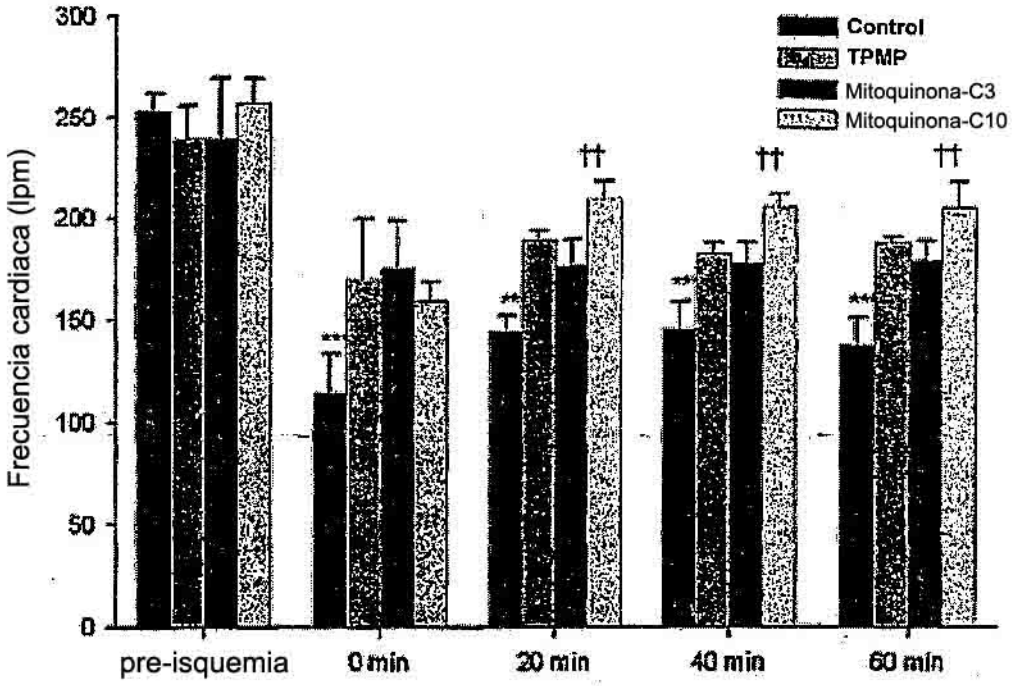

Control
TPMP
Mitoquinona-C3
Mitoquinona-C10
Frecuencia cardiaca (lpm)
300
250
200
150
100
50
0
pre-isquemia
0 min
20 min
40 min
60 min
**
††

Figura 8

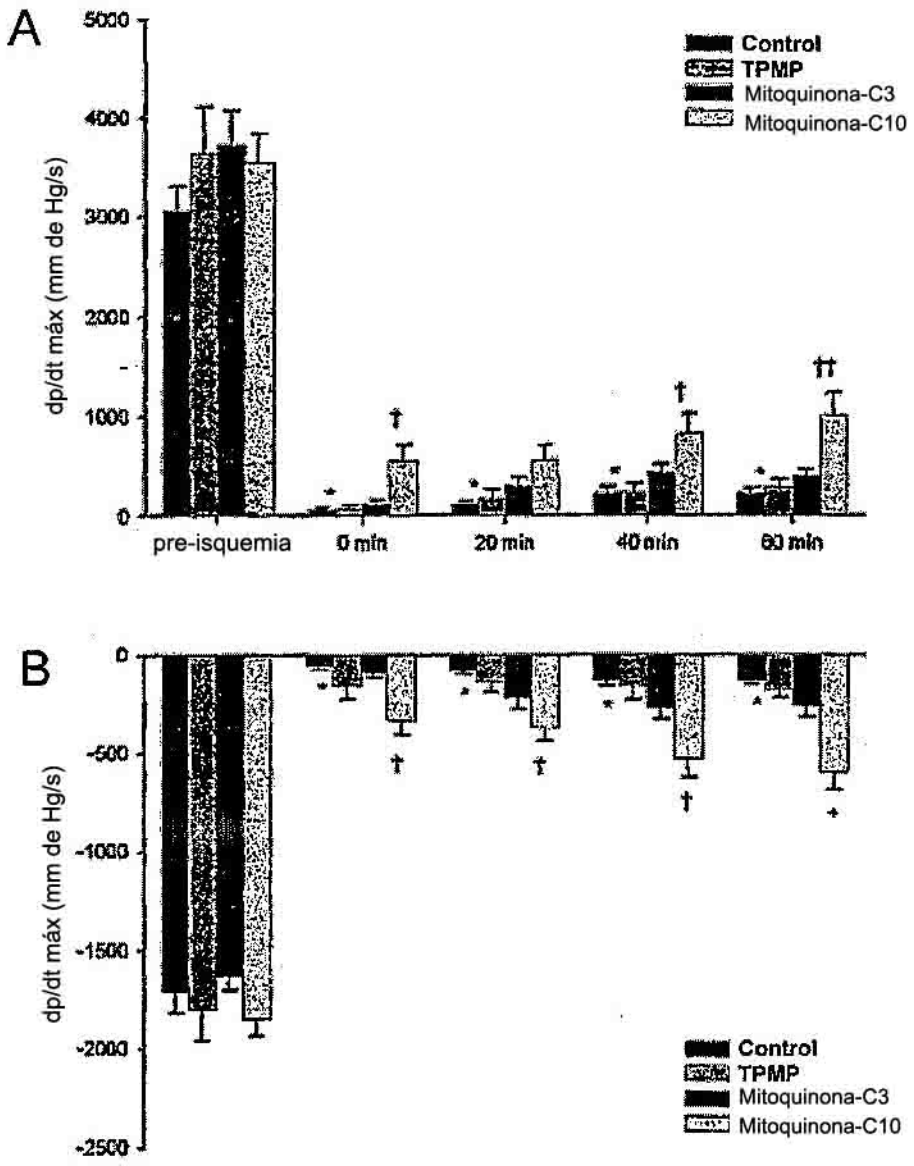

A
dp/dt máx (mm de Hg/s)
5000
4000
3000
2000
1000
0
Control
TPMP
Mitoquinona-C3
Mitoquinona-C10
pre-isquemia
0 min
20 min
40 min
60 min
B
dp/dt máx (mm de Hg/s)
0
-500
-1000
-1500
-2000
-2500
Control
TPMP
Mitoquinona-C3
Mitoquinona-C10

Figura 9

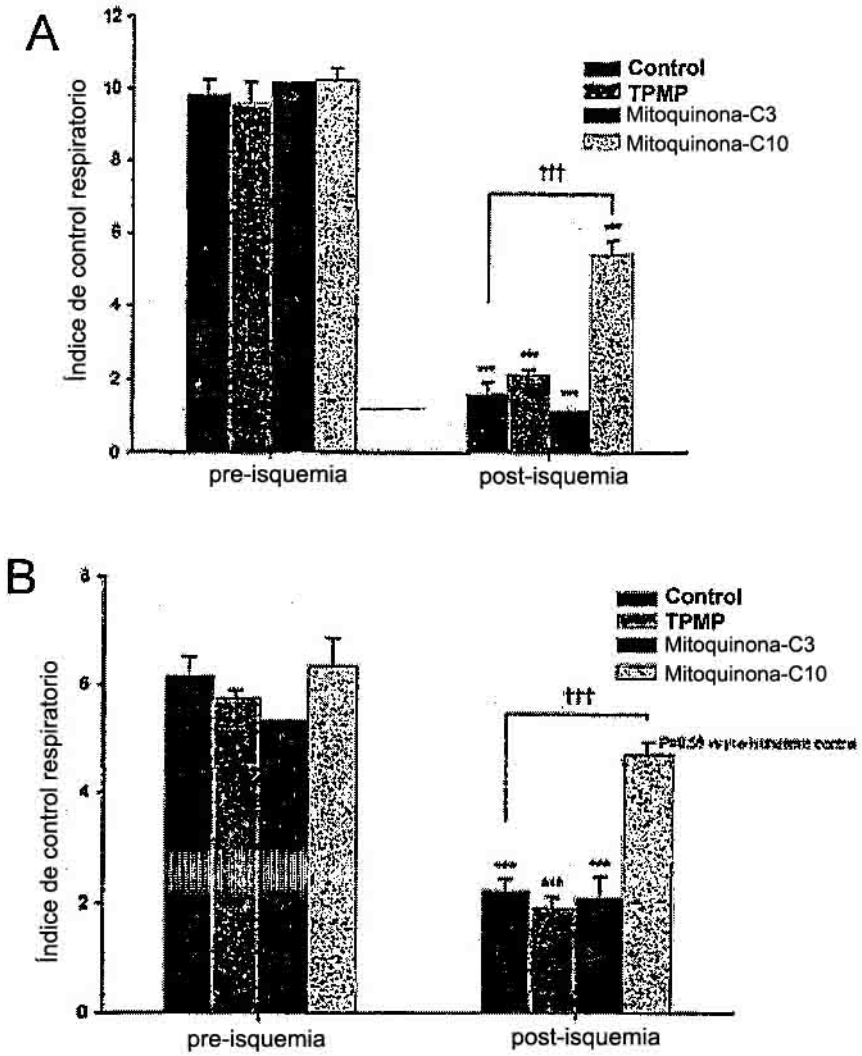

A
Índice de control respiratorio
Control
TPMP
Mitoquinona-C3
Mitoquinona-C10
†††
pre-isquemia
post-isquemia
B
Índice de control respiratorio
Control
TPMP
Mitoquinona-C3
Mitoquinona-C10
†††
pre-isquemia
post-isquemia

Figura 10

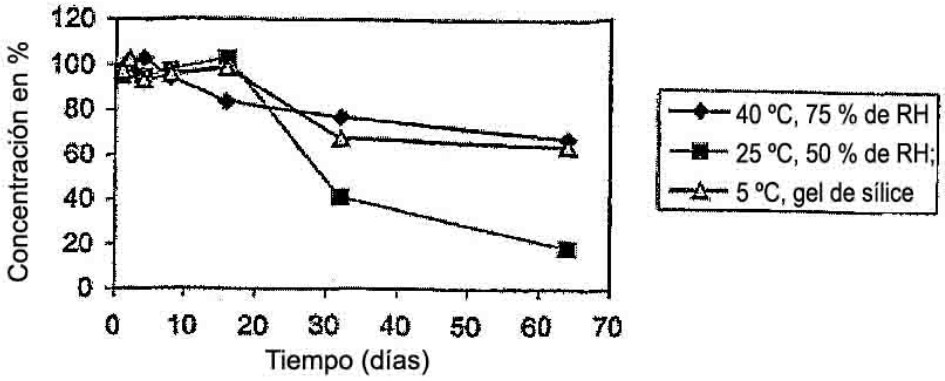


Figura 11

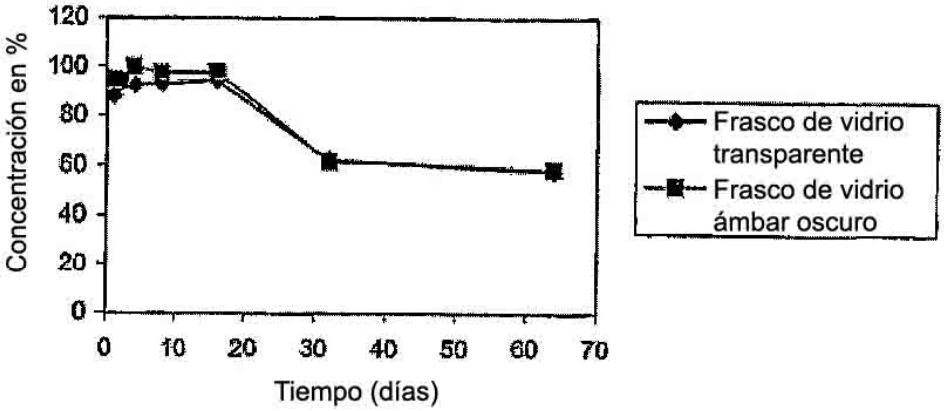


Figura 12

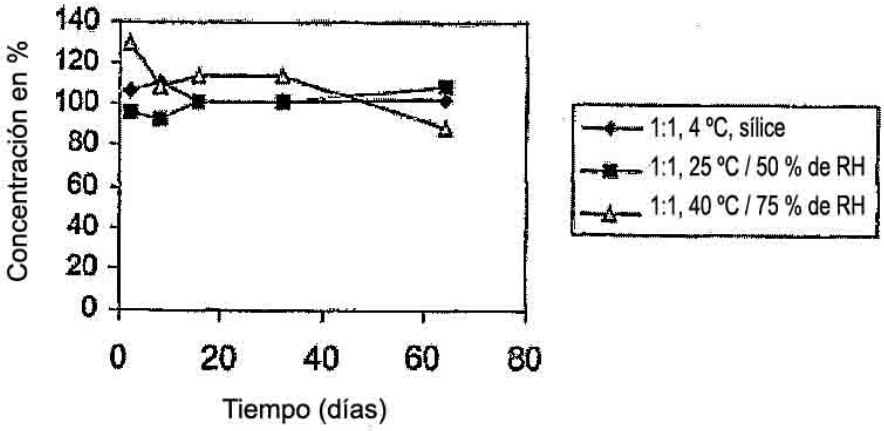


Figura 13

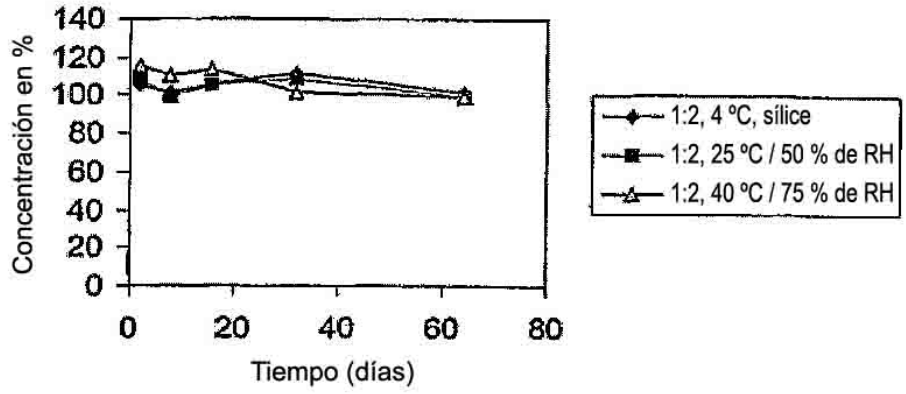


Figura 14

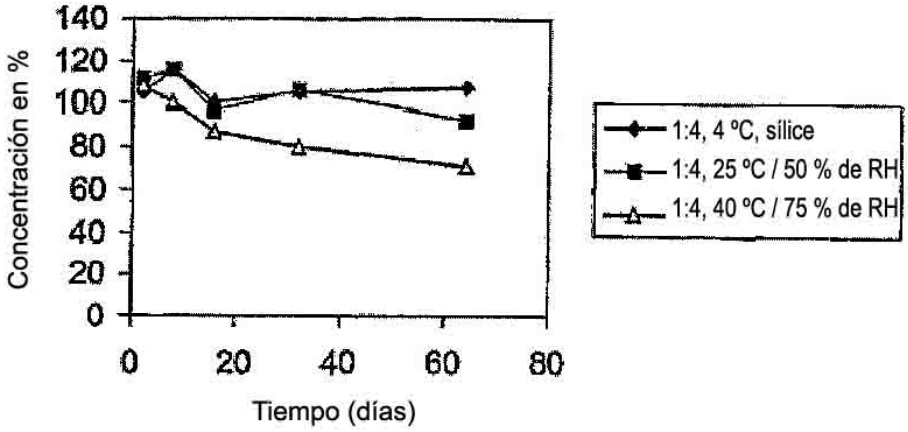


Figura 15

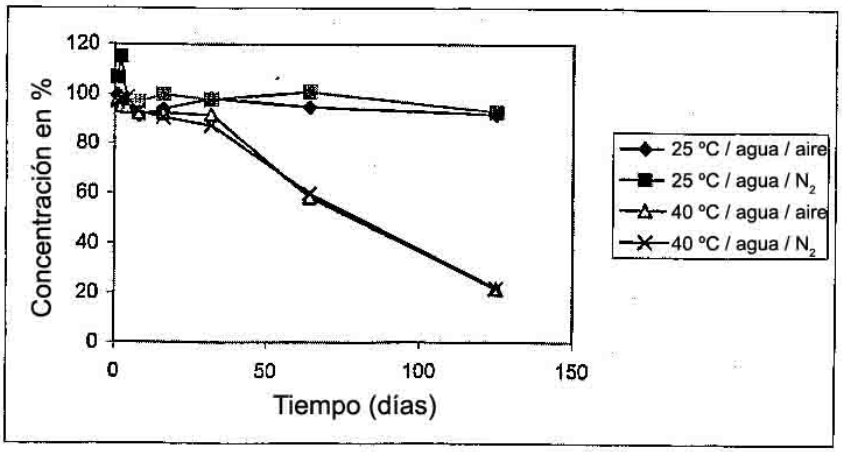


Figura 16

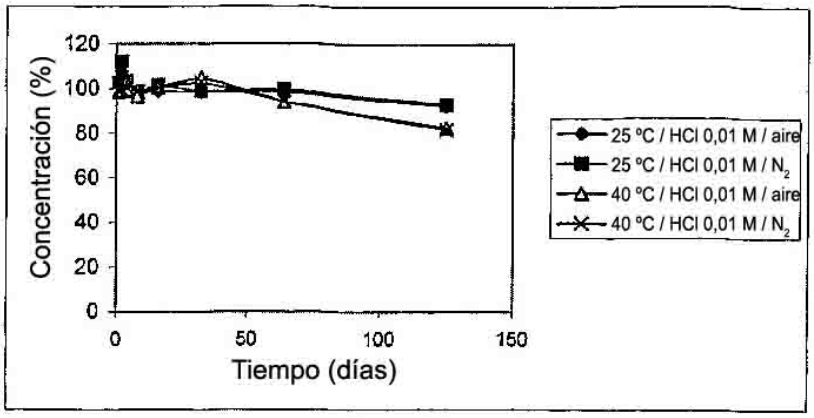


Figura 17

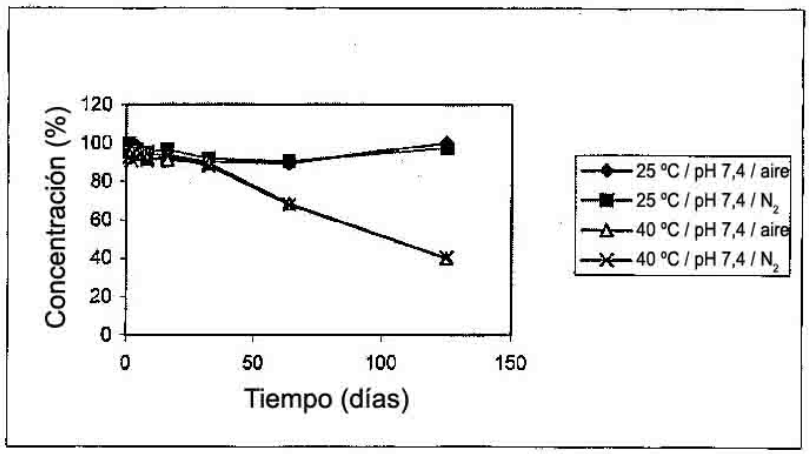


Figura 18

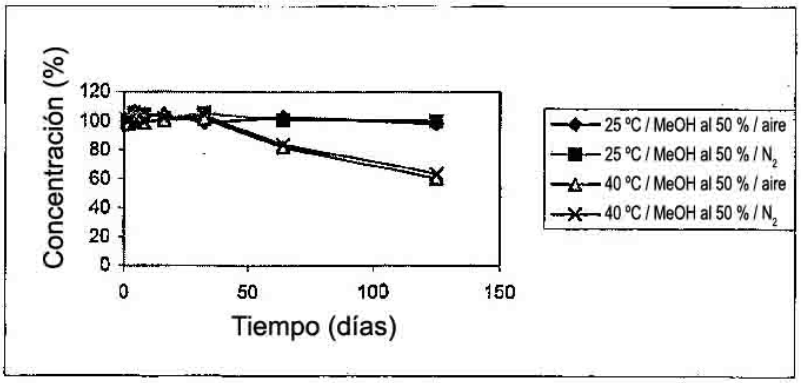


Figura 19

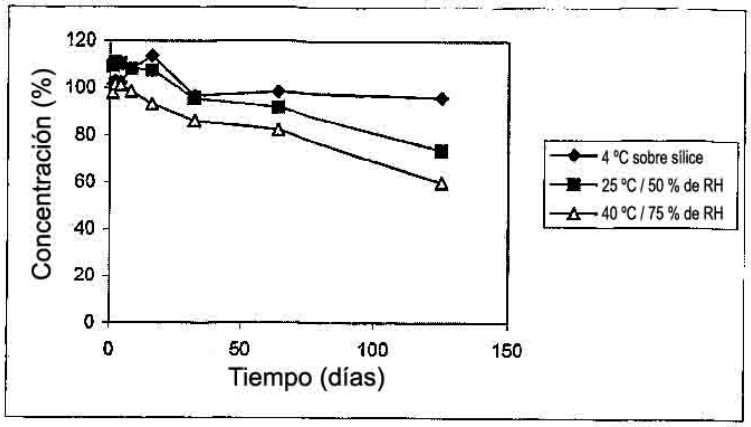


Figura 20

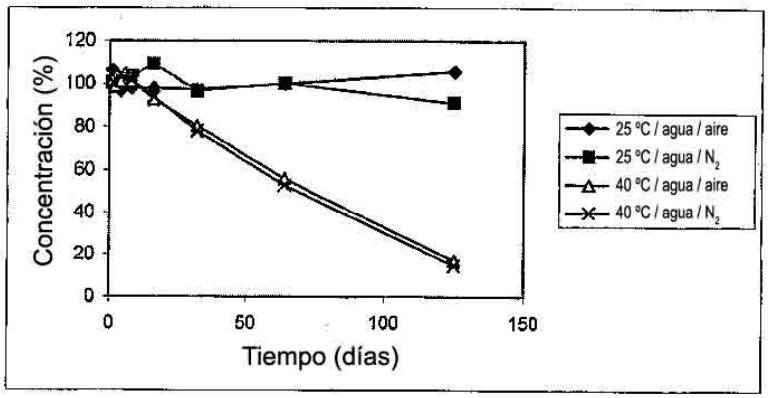


Figura 21

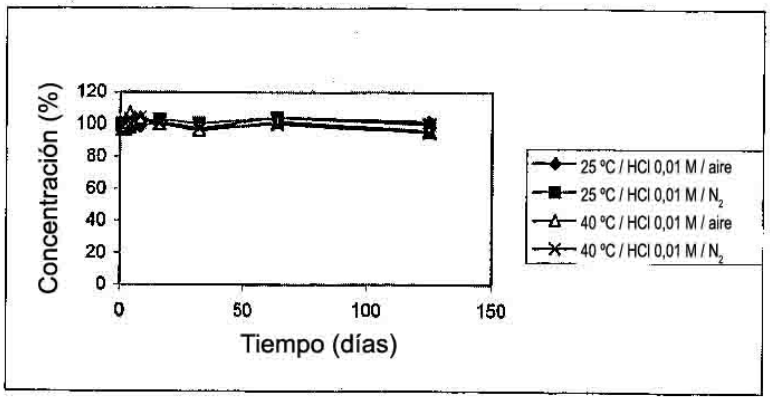


Figura 22

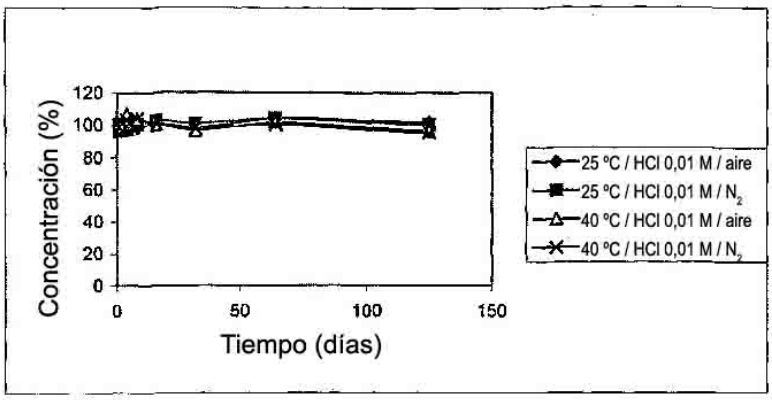


Figura 23

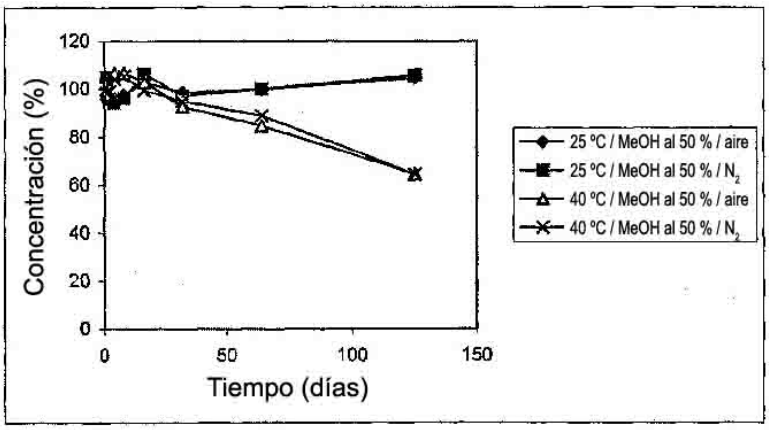


Figura 24

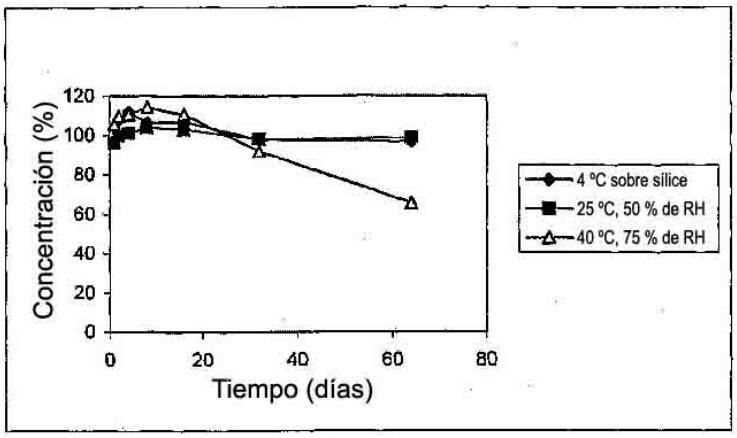


Figura 25

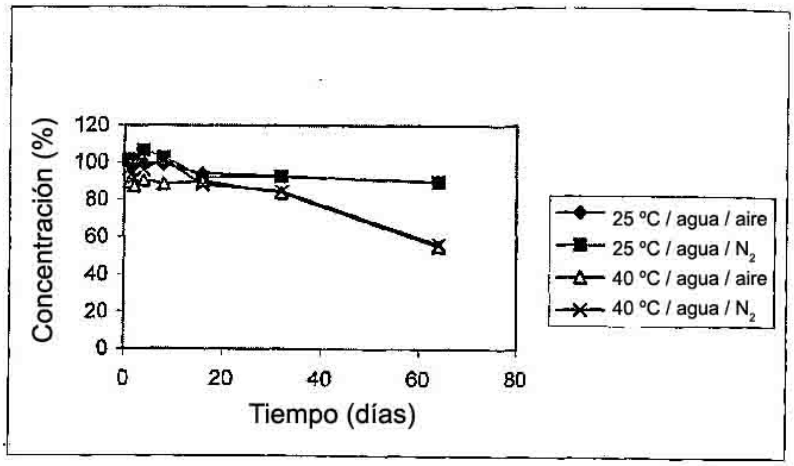


Figura 26

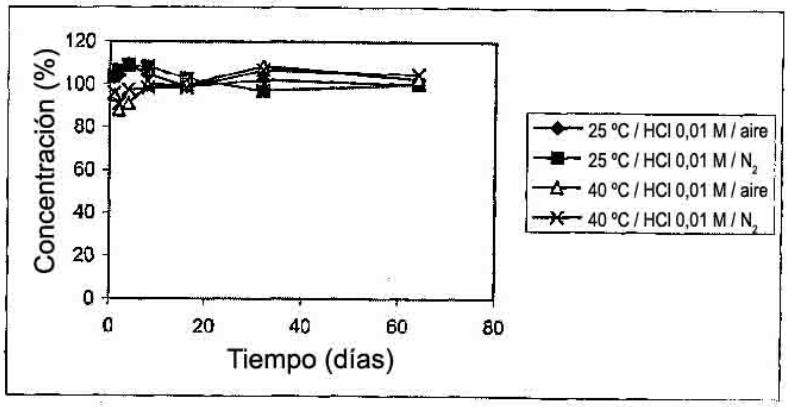


Figura 27

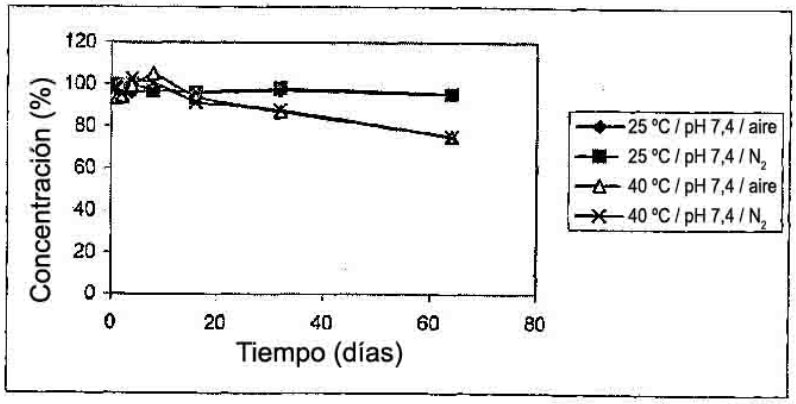


Figura 28

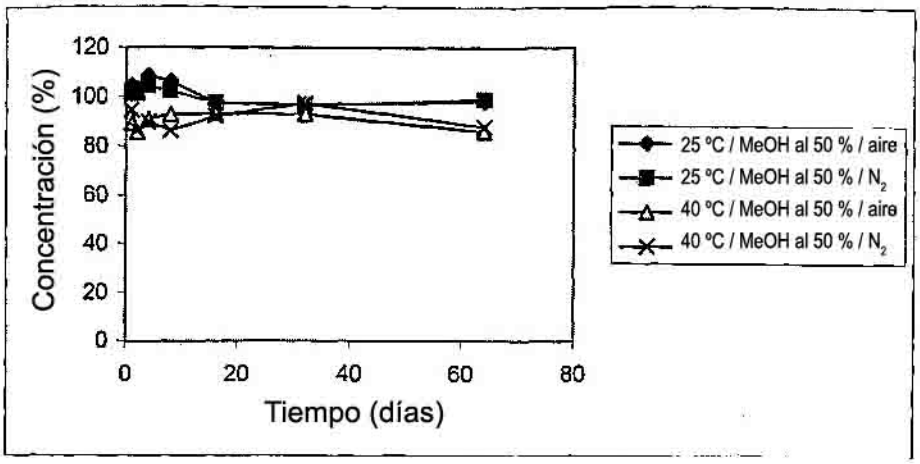


Figura 29

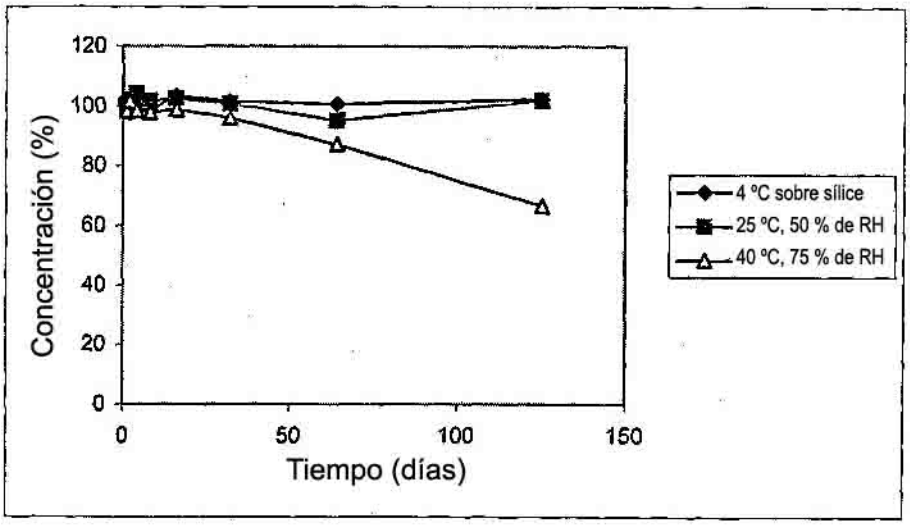
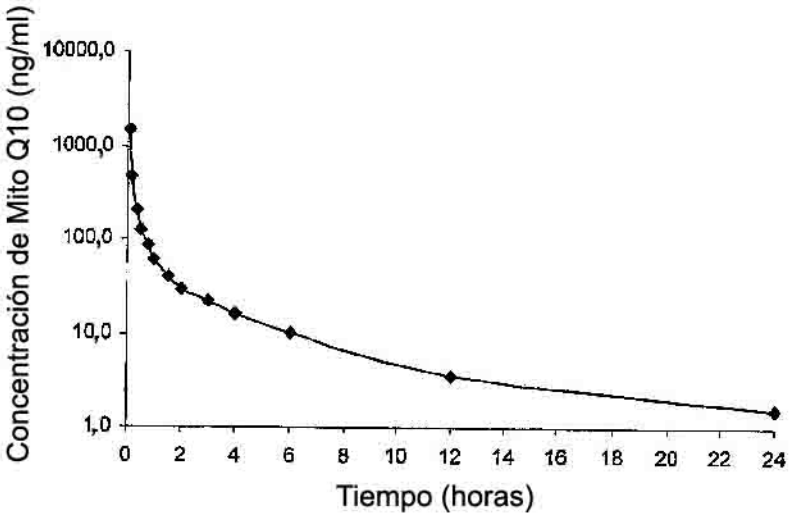


Figura 30

A


Concentración de Mito Q10 (ng/ml)
10000,0
1000,0
100,0
10,0
1,0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
Tiempo (horas)

B

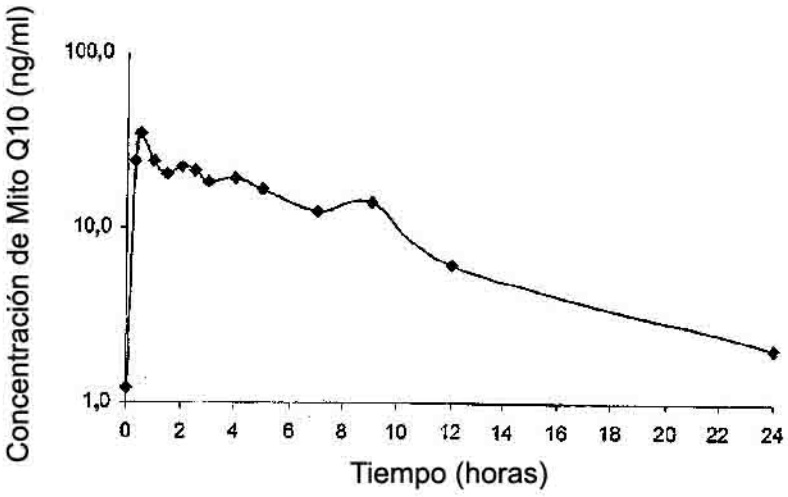

Concentración de Mito Q10 (ng/ml)
100,0
10,0
1,0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
Tiempo (horas)

Figura 31