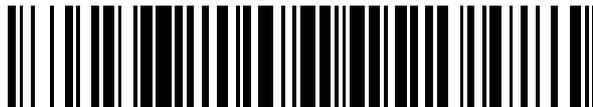


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 770**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/122** (2006.01)

**C07C 50/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.08.2011 PCT/EP2011/004123**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2012 WO12022468**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2011 E 11748898 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2605769**

54 Título: **Derivados de benzoquinona para el tratamiento de enfermedades oculares mitocondriales**

30 Prioridad:

**11.04.2011 US 201161473835 P**

**20.12.2010 US 201061424978 P**

**16.08.2010 US 373972 P**

**11.04.2011 EP 11003037**

**20.12.2010 EP 10015842**

**16.08.2010 EP 10008542**

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

**04.11.2016**

73 Titular/es:

**SANTHERA PHARMACEUTICALS (SCHWEIZ) AG**  
**(100.0%)**

**Hammerstrasse 49**  
**4410 Liestal, CH**

72 Inventor/es:

**FEURER, ACHIM;**  
**GUEVEN, NURI;**  
**HOFFMANN-ENGER, BARBARA;**  
**ERB, MICHAEL;**  
**DEPPE, HOLGER;**  
**DALLMANN, ROBERT;**  
**HAEFELI, ROMAN y**  
**HEITZ, FABRICE**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 588 770 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Derivados de benzoquinona para el tratamiento de enfermedades oculares mitocondriales

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a derivados de benzoquinona que son eficaces como moduladores de la función mitocondrial y como tales son útiles para el tratamiento de estados patológicos en los que está afectada la función mitocondrial.

**Antecedentes de la invención**

10 Las mitocondrias, descritas a veces como “plantas de energía celulares” debido a que generan la mayor parte del suministro celular de adenosina trifosfato (ATP), son esenciales para la vida de los eucariotas. Además de suministrar la energía celular, las mitocondrias también están implicadas en una gama de otros procesos, tales como señalización, diferenciación celular, muerte celular, así como el control del ciclo celular y el crecimiento celular. Se han implicado las mitocondrias en varias enfermedades humanas, incluyendo trastornos mitocondriales y disfunción cardíaca y pueden desempeñar un papel en el proceso de envejecimiento.

15 Con su lugar central place en el metabolismo celular, la disfunción mitocondrial es un factor importante en una amplia gama de enfermedades humanas.

20 Chrysostomou *et al.* (Chrysostomou V, Trounce IA, Crowston JG. *Ophthalmic Res.* 2010; 44(3): 173-8) sugirieron que la disfunción mitocondrial, heredada o como causa o consecuencia de lesión, vuelve células oculares (en particular células ganglionares de la retina) sensibles a la degeneración. Los enfoques terapéuticos que seleccionan como diana las mitocondrias deben proporcionar por tanto un medio general de protección de células ganglionares de la retina y el cristalino frente a la degeneración, independientemente de la etiología de la enfermedad.

25 Así, los compuestos que puedan proteger o recuperar la función mitocondrial en el ojo deben ser útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades asociadas con función mitocondrial afectada en el ojo. Tales enfermedades pueden ser, por una parte, trastornos mitocondriales genéticos del ojo, es decir indicaciones oftalmológicas tales como neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL), atrofia óptica autosómica dominante (AOAD), o indicaciones oftalmológicas que presentan disfunción mitocondrial tales como degeneración macular, glaucoma, retinopatía, cataratas, drusas del disco óptico (DDO). Además, algunos trastornos mitocondrial-neurodegenerativos genéticos, que podrían no ser enfermedades oftalmológicas *per se*, tales como MELAS (miopatía mitocondrial, encefalomiopatía, acidosis láctica, síntomas similares a un accidente cerebrovascular), EMFR (epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas), EMNGI (encefalomiopatía mioneurogastrointestinal), síndrome de Kearns-Sayre, deficiencia de CoQ10, o deficiencias de complejo mitocondrial (es decir deficiencia de complejo I, II, III, IV, V, y OEPC) pueden mostrar fácilmente una componente oftalmológica entre sus diversos síntomas y también se encuentran por tanto dentro del alcance de las enfermedades mencionadas anteriormente asociadas con una función mitocondrial afectada.

35 Además, los trastornos mitocondriales se presentan a menudo como trastornos neurológicos, pero también se manifiestan como trastornos multisistémicos, incluyendo miopatía, diabetes, endocrinopatía múltiple, o una variedad de otras manifestaciones sistémicas. Estos trastornos pueden estar provocados por mutaciones de ADN mitocondrial, por mutaciones de genes nucleares que codifican directamente para enzimas de fosforilación oxidativa y por defectos en genes nucleares que son generalmente importantes para la función mitocondrial. También pueden interaccionar influencias ambientales con predisposiciones hereditarias y provocar enfermedad mitocondrial. Por ejemplo, existe una fuerte vinculación entre la exposición a pesticidas y la posterior aparición de enfermedad de Parkinson. Otras numerosas patologías que implican disfunción mitocondrial incluyen esquizofrenia, trastorno bipolar, epilepsia, accidente cerebrovascular y autismo (Jou *et al.* *Chang Gung Med J.* 2009; 32(4):370-9), demencia, enfermedad de Alzheimer, de Parkinson y de Huntington (Yang *et al.* *DNA Repair (Amst).* 2008; 7(7): 1110-20), enfermedad cardiovascular (Puddu *et al.* *J Biomed Sci.* 2009; 16:1 12), tumores malignos (Singh & Kulawiec; *Methods Mol Biol.* 2009; 471: 291-303), retinitis pigmentosa, síndrome metabólico, anorexia, obesidad y diabetes mellitus (Burchell *et al.* *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14(4):369-85; Pieczenik & Neustadt *Exp Mol Pathol.* 2007; 83(1):84-92).

50 La esclerosis múltiple es la enfermedad neurológica no traumática más común en adultos jóvenes, con una prevalencia de 1:1000 en el norte de Europa y Norteamérica (Compston *A Int MS J.* 2003. 10:29-31). En primer lugar, el transcurso de la enfermedad es generalmente episódico; los agravamientos están seguidos por periodos de remisión que se caracterizan por infiltración focal de leucocitos y desmielinización en la materia blanca. Gradualmente, la enfermedad se vuelve más progresiva, en las que la desmielinización de la materia gris y la degeneración axonal en la materia blanca se vuelve más prominente (Hafler *DA J. Clin. Invest.* 2004; 1 13:788-794). Las terapias disponibles son principalmente inmunomoduladoras, que son eficaces en la reducción del número de recaídas. Sin embargo, la progresión de la enfermedad, permanece inalterada mediante estas terapias (Filippini *G et al.* *Lancet* 2003; 361: 545-552), demostrando la necesidad de estrategias terapéuticas novedosas orientadas hacia la neuroprotección.

5 Se cree que uno de los defectos subyacentes críticos de estos trastornos es la deficiencia de mitocondrias dañadas para proporcionar suficiente energía como para permitir las funciones celulares normales y/o su característica de generar estrés oxidativo en exceso. Como consecuencia de esta privación de energía y daño macromolecular, las células mueren. Esto afecta a su vez a la función tisular y provoca patologías. Esta relación es más obvia en trastornos mitocondriales que se caracterizan por patologías en tejidos con alta demanda de energía tales como cerebro y células musculares, en los que la pérdida de células o la función celular afectada en estos tejidos está vinculada íntimamente con el fenotipo del paciente.

10 Aunque existen múltiples enfoques terapéuticos para las indicaciones enumeradas anteriormente, sin embargo, sólo unos cuantos de ellos abordan la disfunción mitocondrial subyacente. Por tanto, todavía existe la necesidad de enfoques terapéuticos novedosos para tratar trastornos provocados por mitocondrias afectadas.

15 El documento WO-A-2006130775 describe un intento por tratar o suprimir enfermedades mitocondriales mediante la modulación de biomarcadores de energía tales como los niveles de ácido láctico, los niveles de NAD, NADP, NADH y NADPH, y parámetros del citocromo C. Los compuestos dados a conocer en la solicitud se han sometido a prueba para determinar su capacidad para rescatar fibroblastos dérmicos humanos de pacientes con AF del estrés oxidativo. Sin embargo, no se representan los datos en la solicitud.

El documento EP-A-0201196 se refiere a derivados de benzoquinona que pueden usarse en la profilaxis y el tratamiento de enfermedades isquémicas tales como apoplejía cerebral o enfermedades alérgicas basándose en su actividad inhibidora postulada de la generación y liberación de SRS-A.

20 K. Okamoto *et al.* comentan la síntesis, el metabolismo y las actividades biológicas *in vitro* de compuestos relacionados con 6-(10-hidroxidecil)-2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona en Chem. Pharm. Bull. 36(1), 178-189 (1988).

D. Y. Ouveau *et al.* prepararon e investigaron análogos de mitoQ e idebenona para definir los elementos estructurales que soportan el consumo de oxígeno en la cadena respiratoria mitocondrial en Bioorg. Med. Chem. 18 (2010), 6429-6411.

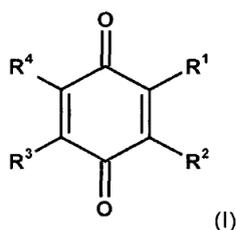
25 El documento JP-A-58077839 da a conocer 6-(10-hidroxidodecil)-2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona como agente terapéutico para hipertensión maligna y trastorno cerebrovascular.

Es el objeto de la presente invención proporcionar un tratamiento terapéutico novedoso para estados patológicos en los que está afectada la función mitocondrial.

30 De manera sorprendente, se ha encontrado que derivados de benzoquinona según la fórmula (I) mostrada a continuación proporcionan una solución al objeto de la presente invención.

**Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a derivados de benzoquinona según la fórmula (I)



35 en la que R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> se definen como a continuación para su uso en el tratamiento de trastornos en los que está afectada la función mitocondrial.

Los derivados de benzoquinona de fórmula (I) son particularmente útiles en el tratamiento de enfermedades mitocondriales.

40 Las enfermedades mitocondriales se seleccionan de neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL), atrofia óptica autosómica dominante (AOAD), degeneración macular, glaucoma, retinopatía, cataratas y drusas del disco óptico (DDO).

La presente invención se refiere además a un método para tratar trastornos en los que está afectada la función mitocondrial, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un compuesto según la fórmula (I) a un sujeto que lo necesita.

En una realización preferida, el sujeto es un mamífero, más preferiblemente un ser humano.

**Breve descripción de los dibujos**

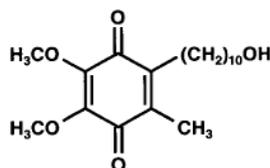
La figura 1 muestra el efecto protector del compuesto IA en células RGC-5 como modelo *in vitro* de la disfunción mitocondrial en células oftalmológicas, 1 día después de la exposición a rotenona.

5 La figura 2 muestra la comparación del compuesto IA y propentofilina sobre la supervivencia celular de células RGC en respuesta a la afectación mitocondrial por rotenona. Aunque la protección celular por propentofilina no fue significativa ( $p > 0,05$ ), el efecto del compuesto IA fue altamente significativo ( $p = 0,0005$ ).

La figura 3 muestra el efecto del pretratamiento con el compuesto IA sobre la agudeza visual en un modelo de ratón *in vivo* para trastornos oculares caracterizados por disfunción mitocondrial.

**Descripción detallada de la invención**

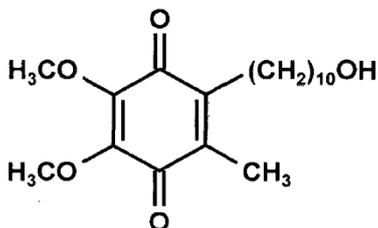
10 La presente invención se refiere a un compuesto representado por la siguiente fórmula



y tautómeros, solvatos o sales farmacéuticamente aceptables del mismo,

15 para su uso en el tratamiento oral de una enfermedad mitocondrial seleccionada del grupo que consiste en neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL), atrofia óptica autosómica dominante (AOAD), degeneración macular, glaucoma, retinopatía, cataratas y drusas del disco óptico (DDO).

En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, el compuesto está representado por la siguiente fórmula



es decir, el compuesto es idebenona.

20 En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, la enfermedad mitocondrial se selecciona del grupo que consiste en neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL), atrofia óptica autosómica dominante (AOAD), degeneración macular y glaucoma.

En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, la enfermedad mitocondrial es neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL).

25 En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, la enfermedad mitocondrial es atrofia óptica autosómica dominante (AOAD).

En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, la enfermedad mitocondrial es degeneración macular.

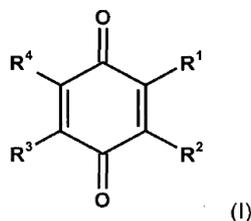
En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, la enfermedad mitocondrial es glaucoma.

30 En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, la enfermedad mitocondrial es retinopatía.

En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, la enfermedad mitocondrial es cataratas. En otras palabras, la enfermedad es la formación de cataratas.

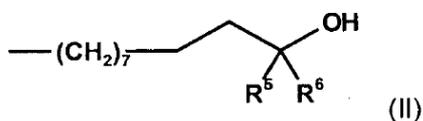
35 En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, la enfermedad mitocondrial es drusas del disco óptico (DDO).

En otra realización, la presente invención se refiere a derivados de benzoquinona según la fórmula (I)



y los enantiómeros, tautómeros, solvatos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que

- 5 a) R<sup>1</sup> es un sustituyente representado por la fórmula (II):



en la que

R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son ambos átomos de hidrógeno, o

R<sup>5</sup> es un átomo de hidrógeno y R<sup>6</sup> es un grupo etilo, o

- 10 R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son ambos grupos metilo,

R<sup>2</sup> es un grupo metilo,

R<sup>3</sup> es un grupo metoxilo, y

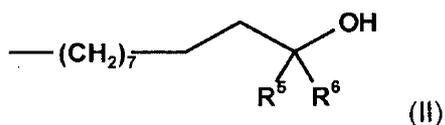
R<sup>4</sup> es un grupo metoxilo;

- 15 para su uso en el tratamiento de trastornos en los que está afectada la función mitocondrial, en particular en el tratamiento de trastornos mitocondriales.

En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, la enfermedad mitocondrial se selecciona del grupo que consiste en neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL), atrofia óptica autosómica dominante (AOAD), degeneración macular, glaucoma, retinopatía, cataratas, drusas del disco óptico (DDO).

- 20 En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, el compuesto es un compuesto de fórmula (I), en la que

R<sup>1</sup> es un sustituyente representado por la fórmula (II):



en la que

- 25 R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son ambos átomos de hidrógeno,

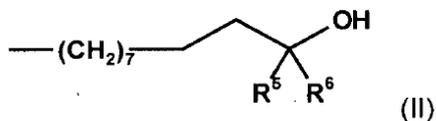
R<sup>2</sup> es un grupo metilo,

R<sup>3</sup> es un grupo metoxilo, y

R<sup>4</sup> es un grupo metoxilo.

En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, el compuesto es un compuesto de fórmula (I), en la que

R<sup>1</sup> en fórmula (I) es un sustituyente representado por la fórmula (II):



5 en la que

R<sup>5</sup> es un átomo de hidrógeno y R<sup>6</sup> es un grupo etilo,

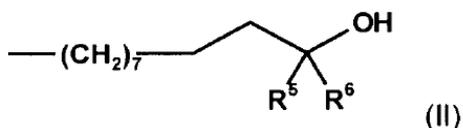
R<sup>2</sup> es un grupo metilo,

R<sup>3</sup> es un grupo metoxilo, y

R<sup>4</sup> es un grupo metoxilo.

10 En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, el compuesto es un compuesto de fórmula (I), en la que

R<sup>1</sup> en fórmula (I) es un sustituyente representado por la fórmula (II):



en la que

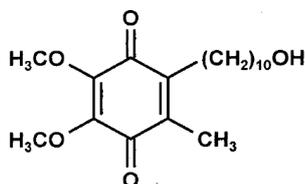
15 R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son ambos grupos metilo,

R<sup>2</sup> es un grupo metilo,

R<sup>3</sup> es un grupo metoxilo, y

R<sup>4</sup> es un grupo metoxilo.

En otra realización, la presente invención se refiere al uso de un compuesto representado por la siguiente fórmula

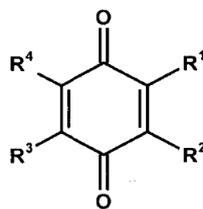


20

y tautómeros, solvatos o sales farmacéuticamente aceptables del mismo,

para la preparación de un medicamento para el tratamiento oral de una enfermedad mitocondrial seleccionada del grupo que consiste en neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL), atrofia óptica autosómica dominante (AOAD), degeneración macular, glaucoma, retinopatía, cataratas y drusas del disco óptico (DDO).

25 En otra realización, la presente invención se refiere al uso de un compuesto según la fórmula general (I)



en la que R<sup>1</sup> a R<sup>4</sup> se definen como anteriormente para la preparación de un medicamento en el tratamiento de enfermedades mitocondriales.

5 En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores y a continuación, se usan compuestos según la fórmula (I) en los que R<sup>1</sup> representa la fórmula (II) y R<sup>2</sup> a R<sup>6</sup> se definen como anteriormente. Más preferiblemente, R<sup>1</sup> representa la fórmula (II) y R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> representan ambos átomos de hidrógeno.

Según la invención, los compuestos de fórmula (I) son para su uso en el tratamiento de trastornos mitocondriales.

Los compuestos de fórmula (I) y compuestos similares son compuestos conocidos y se han descrito previamente.

10 El compuesto de fórmula (I) en el que R<sup>1</sup> representa la fórmula (II), representando ambos de R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> átomos de hidrógeno se conoce como idebenona (denominado en lo sucesivo compuesto IA). Este compuesto se usa ya como fármaco nootrópico y también se ha descrito que estimula el factor de crecimiento nervioso, una característica que podría ser importante en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas. El documento WO 2006100017 describe el uso del compuesto IA en el tratamiento de distrofias musculares tales como distrofia muscular de Duchenne y distrofia muscular de Becker. El compuesto IA y su preparación se describen por primera vez en la memoria descriptiva de la publicación de patente japonesa examinada n.º 3134/1987 presentada por Takeda Chemical Industries, Ltd.

15 El compuesto de fórmula (I) en el que R<sup>1</sup> representa la fórmula (II), siendo R<sup>5</sup> un átomo de hidrógeno y siendo R<sup>6</sup> un grupo etilo (denominado en lo sucesivo compuesto IB) se describe en el documento JP 58077839. Se sugiere que se use el fármaco en el tratamiento de hipertensión maligna y trastornos cerebrovasculares.

20 El compuesto de fórmula (I) en el que R<sup>1</sup> representa la fórmula (II), representando ambos de R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> un grupo metilo (denominado en lo sucesivo compuesto IC) y su síntesis sólo se han descrito en Okamoto *et al.*, Chem. Pharm. Bull. 1988, 36, 178 y el documento EP-A-0201196. Los autores comentaron diversos usos terapéuticos posibles de los compuestos descritos en el documento EP-A-0201196, por ejemplo la terapia de enfermedades isquémicas tales como apoplejía cerebral e insuficiencia cardíaca. También mencionaron una acción inhibidora de los compuestos descritos en ese documento sobre la generación y liberación de SRS-A en mamíferos así como su actividad de mejora de trastornos circulatorios. Sin embargo, debe observarse que los tratamientos propuestos no se han sustanciado con datos farmacológicos. Hasta la fecha, que sepan los autores, no se conoce un uso terapéutico práctico del compuesto IC.

30 El compuesto de fórmula (I) en el que R<sup>1</sup> es un grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-OH y cada uno de R<sup>2</sup> a R<sup>4</sup> representa un grupo metilo puede considerarse un análogo de idebenona (denominado en lo sucesivo compuesto ID). Un método general para la síntesis de compuestos de benzoquinona tales como el compuesto ID se describe en el documento EP-A-0038674. Dicha solicitud de patente también investiga el papel de compuestos de benzoquinona tales como el compuesto ID en la inhibición de la generación y liberación de SRS-A y contempla su uso potencial en el tratamiento de enfermedades alérgicas.

35 El compuesto de fórmula (I) en el que R<sup>1</sup> es un grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-CH<sub>3</sub>, ambos de R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> representan un grupo hidroxilo y R<sup>3</sup> es un átomo de hidrógeno (denominado en lo sucesivo compuesto IE) también se conoce con el nombre embelina ya que se identificó en primer lugar a partir de plantas de *Embelia ribes* pero hoy en día está disponible comercialmente a través de diversos proveedores. Se ha mostrado que dicho compuesto presenta actividades antitumorales, antiinflamatorias y apoptóticas a través de un mecanismo desconocido.

40 Por ejemplo, se afirma en Molecular Carcinogenesis (2010) 49(4), 324-336 que la embelina, el pequeño inhibidor molecular de XIAP, presenta un amplio espectro de actividades biológicas con fuerte inhibición del factor nuclear kappa B y genes antiapoptóticos posteriores pero que se desconoce el mecanismo de su inducción de muerte celular. Estudios adicionales sugieren que la embelina puede actuar como antioxidante competitivo en condiciones fisiológicas (Chemico-Biological Interactions (2007), 167(2), 125-134).

45 El compuesto de fórmula (I) en el que R<sup>1</sup> es un grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-CH<sub>3</sub>, ambos de R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> representan un grupo metoxilo y R<sup>3</sup> es un átomo de hidrógeno es un derivado de embelina (denominado en lo sucesivo compuesto IF). Un método para la síntesis del compuesto IF se proporciona, por ejemplo, en Tetrahedron (1998), 54(49), 14791-802. No se ha indicado un uso terapéutico para el compuesto IF, sin embargo, el compuesto posiblemente puede mostrar cierta actividad en la terapia de la hepatitis C tal como puede deducirse a partir de un estudio sobre los efectos inhibidores

de extractos vegetales usados comúnmente en la medicina tradicional sudanesa con la proteasa del virus de la hepatitis C (Phytoterapia Research (2000), 14(7), 510-6). Se encontró que dos compuestos de benzoquinona extraídos de *Embelia schimperi*, concretamente embelina y 5-O-metilembelina, son potentes inhibidores de la proteasa del virus de la hepatitis C.

- 5 Los compuestos según la fórmula (I) son moduladores de trastornos mitocondriales y son por tanto útiles en el tratamiento de enfermedades mitocondriales en general.

La biodisponibilidad oral de los compuestos de fórmula (I) es generalmente muy baja tal como se ejemplifica para el compuesto IA (Torii H, Yoshida K, Kobayashi T, Tsukamoto T, Tanayama S. J Pharmacobiodyn. Junio de 1985; 8(6):457-67). Aunque se absorben fácil y rápidamente en el intestino cuando se administran por vía oral, la mayor parte del fármaco se metaboliza mediante un efecto de primer paso extremadamente fuerte en el hígado, y así, sólo circulan en el torrente sanguíneo partes más pequeñas de la dosis.

Los intentos por sortear el fuerte efecto de primer paso de idebenona (compuesto IA) incluyen administrar el compuesto por vías distintas a la oral. Las formulaciones parenterales son difíciles de obtener ya que la idebenona sólo presenta una solubilidad en agua muy baja. Los documentos US2010/0130619, US2010/0129431 A1, US2010/0215725A1 y US2010/0099775 A1 describen una formulación parenteral de idebenona adecuada para inyección o infusión intravenosa.

El documento WO2008/019769 da a conocer una formulación transmucosa de idebenona para sortear el fuerte efecto de primer paso. Aunque esta formulación se toma por la boca, el procesamiento del fármaco por el organismo es completamente diferente en comparación con la administración oral. A diferencia de una administración oral, la formulación transmucosa (por ejemplo sublingual) de un fármaco conduce a la absorción a través de la mucosa que permite que el fármaco alcance el torrente sanguíneo incluso sin procesar por el tracto gastrointestinal, y así, evita el efecto de primer paso en el hígado. Los solicitantes afirman que la dosis del fármaco puede disminuirse significativamente en comparación con la dosis oral a la vez que se alcanzan niveles en plasma altos de manera similar y reivindican que tal formulación es útil en el tratamiento de enfermedades mitocondriales, neurológicas y neuromusculares, incluyendo AF (ataxia de Friedreich), NOHL (neuropatía óptica hereditaria de Leber), MELAS (miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica con episodios similares a un accidente cerebrovascular) y miopatías mitocondriales. La consecuencia de evitar el efecto de primer paso es que circulan mayores concentraciones del fármaco en el torrente sanguíneo y finalmente que pueden lograrse mayores concentraciones del fármaco en el tejido relevante para una enfermedad dada.

A menudo se considera que una administración parenteral, por ejemplo intravenosa, de un compuesto es o bien impracticable o bien que provoca costes de cuidados significativos en el entorno de una enfermedad genética (y por consiguiente crónica), cuando los pacientes reciben atención domiciliaria y no en un hospital pero tienen que tomar un fármaco durante toda la vida.

También podría verse dificultada una formulación transmucosa, en particular en el caso de compuestos de fórmula (I), debido a su intenso color y potencial mal sabor, por un cumplimiento reducido por parte del paciente.

Otro modo de sortear el fuerte efecto de primer paso es administrar los compuestos de fórmula (I) mediante una formulación tópica, incluyendo formulación dérmica, bucal, sublingual e intraocular.

Más allá del alto efecto de primer paso, un inconveniente adicional de los compuestos de fórmula (I), y de nuevo ejemplificado con el compuesto IA como representante para esta clase de compuestos, es el hecho de que estos compuestos alcanzan el cerebro sólo en cantidades muy limitadas cuando se administran por vía oral. Por ejemplo, se sabe a partir de la bibliografía (Torii H, Yoshida K, Kobayashi T, Tsukamoto T, Tanayama S. J Pharmacobiodyn. Junio de 1985; 8(6):457-67) que una dosis oral de 10 mg/kg de idebenona (compuesto IA) en ratas conduce a niveles en plasma de aproximadamente 1000 ng/ml de idebenona total tal como se mide mediante la radiactividad después de la dosificación oral del compuesto IA marcado de manera radiactiva. La concentración total significa idebenona incluyendo sus metabolitos. Tomado el factor de corrección calculado a partir de Torii *et al* para obtener los niveles del compuesto IA original sin metabolizar, esto da como resultado niveles en plasma de idebenona de 3 ng/ml. Los niveles correspondientes en el cerebro son 10 ng/ml de idebenona total (que significa de nuevo incluyendo los metabolitos), dando como resultado sólo 0,03 ng/ml para la propia idebenona original. Como resultado, la razón de niveles en cerebro frente a plasma es de aproximadamente el 1%. Esto está en línea con los hallazgos de Nagai *et al* (Nagai Y, Yoshida K, Narumi S, Tanayama S, Nagaoka A. Brain distribution of idebenone and its effect on local cerebral glucose utilization in rats. Arch Gerontol Geriatr. 1989; 8(3):257-72), en los que mayores dosis orales de idebenona (100 mg/kg) conducen a una baja razón en cerebro con respecto a plasma similar del 1 -2% en ratas.

Los fármacos que requieren alcanzar el cerebro para ejercer su acción, tienen que atravesar la denominada barrera hematoencefálica (BHE). Las bombas de flujo de salida como P-glicoproteínas (P-gp) y proteínas de resistencia a múltiples fármacos (RMF) presentan el mayor obstáculo para que las sustancias atraviesen la BBB y protegen al cerebro frente a la penetración de sustancias potencialmente tóxicas.

El ojo se considera habitualmente parte del sistema nervioso central. Esto resulta evidente en el hecho de que, de

manera muy similar a la barrera hematoencefálica, la barrera hematorretiniana mantiene la retina protegida frente a la difusión no deseada de compuestos potencialmente tóxicos. En efecto, la barrera hematoencefálica y la barrera hematorretiniana se denominan conjuntamente barrera hematoneural (Invest Ophthalmol Vis Sci. Marzo de 2005, 46(3), 1047-53: Functional characterization and comparison of the blood-retina barrier and the blood brain barrier: Steuer H *et al.* y Kim, JH *et al.*).

Por tanto, conociendo los bajos niveles del compuesto IA que alcanzan el cerebro después de la administración oral, se esperaría que los compuestos de este tipo, en particular compuestos de fórmula (I), por consiguiente no alcanzasen el ojo en niveles significativos, es decir terapéuticamente relevantes cuando se administran por vía oral.

Así, fue altamente sorprendente, que, después de la administración oral de dosis clínicamente relevantes del compuesto IA, pudieran detectarse concentraciones del compuesto IA en el líquido ocular de ratones (en humor vítreo y acuoso) que eran varias veces mayores que las medidas previamente en el cerebro de roedores y perros (Torii H, Yoshida K, Kobayashi T, Tsukamoto T, Tanayama S. J Pharmacobiodyn. Junio de 1985; 8(6):457-67).

En la presente invención, se dan a conocer datos farmacodinámicos que demuestran niveles significativos del compuesto IA en humor acuoso y vítreo del ojo después de una única administración oral.

Por tanto, se ha concluido por primera vez que podrían usarse formulaciones orales de compuestos de fórmula (I), en particular el compuesto IA, para contrarrestar de manera eficaz enfermedades del ojo que están asociadas con afectación mitocondrial.

Sería altamente deseable que pudieran administrarse compuestos de fórmula (I) en una simple formulación oral que se ajuste perfectamente al cumplimiento del paciente en pacientes con atención domiciliaria con necesidad de tratamiento durante toda la vida.

El descubrimiento de niveles sorprendentemente altos de compuestos de fórmula (I), tal como se ejemplifica con la administración oral de idebenona (compuesto IA) en el ojo, y así, la presente invención constituirá un fuerte fundamento para que los médicos y las autoridades reguladoras investiguen en estudios y den finalmente la aprobación a fármacos como la idebenona oral para el uso en enfermedades oculares mitocondriales tal como se expone en el presente documento.

Los niveles en el ojo del compuesto IA, obtenidos después de la administración oral, son suficientes para provocar una recuperación significativa de la pérdida visual en un modelo animal (Zhang X., Jones D., Gonzalez-Lima F. Mouse model of optic neuropathy caused by mitochondrial complex I dysfunction. Neurosci. Lett., 2002.) que es relevante para enfermedades con afectación mitocondrial subyacente en la retina.

Por una parte, estas enfermedades son oftalmológicas enfermedades mitocondriales tales como neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL), atrofia óptica autosómica dominante (AOAD), y trastornos oftalmológicos que presentan disfunción mitocondrial tales como degeneración macular, glaucoma, retinopatía, cataratas, drusas del disco óptico (DDO).

Por otra parte, estas enfermedades son enfermedades mitocondriales neurodegenerativas genéticas con una componente oftalmológica entre los diversos síntomas tales como MELAS (miopatía mitocondrial, encefalomiopatía, acidosis láctica, síntomas similares a un accidente cerebrovascular), EMFRR (epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas), EMNGI (encefalomiopatía mioneurogastrointestinal), síndrome de Kearns-Sayre, deficiencia de CoQ10 o deficiencias de complejo mitocondrial (es decir deficiencia de complejo I, II, III, IV, V, y OEPC).

Tal como se usa en el presente documento, las siguientes enfermedades se designan como "enfermedad mitocondrial": neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL), atrofia óptica autosómica dominante (AOAD), degeneración macular, glaucoma, retinopatía, cataratas, drusas del disco óptico (DDO), miopatía mitocondrial, encefalomiopatía, acidosis láctica, síntomas similares a un accidente cerebrovascular (MELAS), epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas (MERRF), encefalomiopatía mioneurogastrointestinal (EMNGI), síndrome de Kearns-Sayre, deficiencia de CoQ10 y deficiencias de complejo mitocondrial (1-5, OEPC).

Se sabe que la idebenona (compuesto IA) es un estimulador del factor de crecimiento neuronal (NGF) (Takeuchi, R., Murase, K., Furukawa, Y., Furukawa, S., Hayashi, K. Stimulation of nerve growth factor synthesis/secretion by 1,4-benzoquinone and its derivados en cultured mouse astroglial cells. FEBS Lett. 1990, 261, 63-66).

La propentofilina es un compuesto de una clase de compuestos completamente diferente y también se ha descrito como un estimulador de NGF (Shinoda *et al.*, Stimulation of nerve growth factor synthesis/secretion by 1,4-benzoquinone and its derivados en cultured mouse astroglial cells, Biochem. Pharmacol., vol. 39, 1990, 1813-1816). En el documento WO2000/032197, se dan a conocer datos que muestran efectos positivos de propentofilina en un ensayo de supervivencia de células ganglionares de la retina (RGC). Únicamente a partir de los datos obtenidos de propentofilina, los solicitantes concluyen que también se sabe que otros compuestos son estimuladores de NGF, aunque de clases de compuestos químicos completamente diferentes, tienen efectos beneficiosos similares sobre la supervivencia de RGC. Por consiguiente, los solicitantes reivindican que la idebenona y algunos otros compuestos de diversas clases de compuestos químicos son útiles en el tratamiento de neuropatía de la retina o la papila óptica.

Además, los solicitantes afirman que sus compuestos pueden usarse por vía oral. Esto es según el mecanismo de acción que, si realmente constituye el fundamento entre compuestos y tratamiento de la enfermedad, no requiere que el propio compuesto acumule niveles en el ojo sino más bien en otro lugar en el cuerpo para estimular la producción de NGF que entonces alcanza a su vez los tejidos relevantes, por ejemplo el ojo.

- 5 Con respecto a estados patológicos oftalmológicos mitocondriales, la relevancia del ensayo de supervivencia de RGC usado en el documento WO2000/032197 para demostrar efectos positivos de propentofilina es altamente cuestionable ya que las condiciones usadas, es decir reducción de suero que hace que mueran las RGC, no están reflejando las condiciones de tales enfermedades.

10 La presente solicitud da a conocer datos que muestran que la propentofilina no tiene ningún efecto sobre la supervivencia de RGC cuando se usa en un ensayo que se basa en la muertes de RGC debido a la inhibición del complejo I por rotenona, una condición que refleja bien la patología de muchos de los trastornos mitocondriales descritos anteriormente (revisado por Wong-Riley M., *Energy Metabolism of the Visual System, Eye and Brain*, 2010, 2 99-116).

15 Extrayendo una conclusión de este efecto negativo de propentofilina, y siguiendo la argumentación del documento WO2000/032197, se concluiría que se espera que la idebenona (compuesto IA) tampoco muestre ningún efecto en este ensayo de supervivencia de RGC relevante para la enfermedad, es decir basado en la inhibición del complejo I. En su lugar, fue completamente inesperado encontrar que la idebenona, en marcado contraste con la propentofilina, puede perfectamente proteger fuertemente las RGC frente a la muerte celular en condiciones que reflejan la situación patológica de la disfunción mitocondrial, respaldando por tanto adicionalmente la presente invención.

20 La atrofia óptica autosómica dominante (AOAD) puede asignarse como enfermedad mitocondrial. Las mutaciones de OPA1 patógenas provocan atrofia óptica autosómica dominante, un estado caracterizado por la pérdida preferente de células ganglionares de la retina y degeneración progresiva del nervio óptico. Aproximadamente el 20% de los pacientes afectados también desarrollarán complicaciones neuromusculares más graves, un importante grupo de enfermedades conocido como AOAD(+). Se demostró que OPA1 controlaba tanto la fusión mitocondrial como la morfología de las crestas. Además, estudios de pérdida de función de OPA1 han mostrado que OPA1 también regula la inducción de apoptosis (Liesa M *et al.* *Physiol Rev.* 2009; 89:799-845). Aunque se expresa en todos los tejidos sometidos a ensayo, OPA1 muestra un patrón de expresión tisular específico, con la mayor expresión en la retina, el cerebro, testículos, hígado, corazón, músculo esquelético y páncreas. La pérdida de OPA1 provoca una notable reducción en el potencial de la membrana mitocondrial y una reducción en la respiración basal y la incapacidad para potenciar el consumo de oxígeno en presencia del desacoplador 2,4-dinitrofenol. Los fibroblastos humanos de pacientes con determinadas mutaciones de OPA1 (que provocan atrofia óptica autosómica dominante o AOAD), además de tasas disminuidas de fusión mitocondrial, también muestran una síntesis de ATP alterada dirigida por sustratos del complejo I. Debido a su capacidad para potenciar la síntesis de ATP, los compuestos de fórmula (I) son útiles en el tratamiento de AOAD.

35 Las enfermedades mitocondriales también engloban diversos trastornos de los sistemas ópticos humanos tales como degeneración macular, glaucoma, retinopatía, cataratas, drusas del disco óptico (DDO).

Aunque algunas distrofias maculares que afectan a individuos más jóvenes se describen a veces como degeneración macular, el término se refiere generalmente a degeneración macular asociada con la edad (DMAE) y es una causa principal de deficiencia visual en adultos de más edad (>50 años). Tanto para las formas heredada (VD) como adquirida de degeneración macular, los principales factores de riesgo para este trastorno son la edad, el tabaquismo, la hipertensión y la diabetes. DMAE, como NOHL, es un estado médico que da como resultado una pérdida de visión en el centro del campo visual (la mácula) debido a daño en la retina. Aunque, cambios en la estructura y función mitocondrial, tales como pérdida de crestas y densidad de la matriz son una característica normal del envejecimiento, estas aberraciones son significativamente mayores en DMAE que en el envejecimiento normal y también se producen en un momento anterior (Feher J, Kovacs I, Artico M, Cavallotti C, Papale A, Balacco Gabrieli C. *Neurobiol Aging.* Julio de 2006; 27(7):983-937), lo que sugeriría que la gravedad de las alteraciones mitocondriales son diferentes entre DMAE y el envejecimiento normal, y que el momento del daño a las células retinianas puede ser crítico para el desarrollo de DMAE. Además, los pacientes con DMAE muestran un aumento de las mutaciones de ADNmt selectivamente en la retina en comparación con las células sanguíneas mientras que también se han notificado cambios relacionados con DMAE en el proteoma mitocondrial. De manera acorde con la implicación mitocondrial en la patología de DMAE, SanGiovanni *et al.* (2009) describieron múltiples polimorfismos (SNP) en ADNmt que se asociaban con DMAE usando una cohorte de 215 pacientes con DMAE avanzada. Estas asociaciones estaban dirigidas totalmente por el halogrupa T2, y se caracterizaban por dos variantes en los genes del complejo I (A11812G de MT-ND4 y A14233G de MT-ND6), reminiscentes de mutaciones en el complejo I que provocan NOHL. Por consiguiente, se ha intentado el tratamiento de pacientes con DMAE con compuestos que alteran la función mitocondrial (mitotrópicos) (Feher J, Papale A, Mannino G, Gualdi L, Balacco Gabrieli C. *Ophthalmologica.* Septiembre-octubre de 2003; 217(5):351-7), aunque los efectos siguieron siendo hasta la fecha solamente insignificantes.

60 El glaucoma (neuropatía óptica) es una enfermedad en la que se daña el nervio óptico, conduciendo a una pérdida de visión progresiva, irreversible, que está asociada a menudo, pero no siempre, con un aumento de la presión del

líquido en el ojo. El daño nervioso implica pérdida de células ganglionares de la retina en un patrón característico. Existen muchos subtipos diferentes de glaucoma pero todos pueden considerarse un tipo de neuropatía óptica. La presión intraocular elevada es un factor de riesgo significativo para desarrollar glaucoma. El glaucoma sin tratar conduce a daño permanente del nervio óptico y pérdida del campo visual resultante, que puede evolucionar a ceguera. La implicación mitocondrial en la patología del glaucoma está respaldada por el trabajo de Guo (Guo Y, Johnson EC, Cepurna WO, Dyck J, Doser T, Morrison JC. Invest Ophthalmol Vis Sci. 4 de noviembre de 2010. [publicación electrónica avance de la edición impresa]), que mostraron la regulación por disminución selectiva de genes mitocondriales y genes relacionados con la producción de energía en un modelo de rata de glaucoma. Además, de manera similar a los resultados descritos para la degeneración macular, también se notificó una mayor prevalencia de alteraciones de ADNmt para pacientes con glaucoma. Finalmente, la sobreexpresión de la proteína mitocondrial OPA1, mutada en AOAD, es protector en un modelo de ratón de glaucoma (Ju WK, Kim KY, Duong-Polk KX, Lindsey JD, Ellisman MH, Weinreb RN. Increased optic atrophy type 1 expression protects retinal ganglion cells in a mouse model of glaucoma. Mol Vis. 15 de julio de 2010; 16: 1331-42), lo que demuestra claramente una relación causal entre la disfunción mitocondrial en patologías oculares adquiridas tales como glaucoma. La disfunción mitocondrial puede deberse a genes o bien nucleares o bien mitocondriales, mediante estrés mecánico, insuficiente riego sanguíneo, hipoperfusión crónica como consecuencia de la presión intraocular comúnmente elevada en los ojos con glaucoma, o mediante un xenobiótico tóxico).

Retinopatía es un término general que se refiere a alguna forma de daño no inflamatorio a la retina del ojo. Junto a las formas genéticas o heredadas de retinopatía, pueden inducirse formas espontáneas por fármacos, toxinas y radiación (ionizante y ultravioleta). Frecuentemente, las retinopatías son manifestaciones oculares de enfermedades sistémicas tales como diabetes, hipertensión, anemia drepanocítica o ciliopatía tal como síndrome de Bardet-Biedl. De manera similar a la degeneración macular y el glaucoma, la implicación mitocondrial en la retinopatía se ha descrito bien (revisado por Jarrett SG, Lewin AS, Boulton ME. Ophthalmic Res. 2010; 44(3): 179-90, Lee S, Van Bergen NJ, Kong GY, Chrysostomou V, Waugh HS, O'Neill EC, Crowston JG, Trounce I A. Exp Eye Res. 4 de agosto de 2010. (publicación electrónica avance de la edición impresa).

Las cataratas son un enturbiamiento que se desarrolla en el cristalino del ojo o en su envoltura, de grado variable desde opacidad ligera hasta completa y que obstruye el paso de luz. El amarilleo y opacificación graduales del cristalino pueden reducir la percepción de colores azules. Las cataratas evolucionan normalmente de forma lenta para provocar pérdida de visión y potencialmente pueden producir ceguera si no se tratan. El estado afecta habitualmente a ambos ojos, pero de manera similar a la patología de NOHL y VD, un ojo se ve casi siempre afectado antes que el otro. Como para las patologías anteriores, se describe claramente afectación mitocondrial en la formación de cataratas. Además, la formación de cataratas está asociada directamente con algunos trastornos mitocondriales tales como atrofia óptica dominante con cataratas, oftalmoplejía externa progresiva autosómica dominante (PEOA3), PEOA2, miopatía mitocondrial provocada por mutaciones de COX II o otros diversos genes, síndrome de Sengers, así como mutaciones de genes mitocondriales tales como ARNt-Ser mitocondrial (MTTS2), GFER, OPA3 pero también grandes deleciones mitocondriales.

Las drusas del disco óptico (DDO) o drusas de la papila óptica (DPO) son glóbulos de mucoproteínas y mucopolisacáridos que calcifican progresivamente en el disco óptico. Se cree que son remanentes del sistema de transporte axonal de células ganglionares de la retina degeneradas. DDO también se ha denominado discos anómalos o elevados de manera congénita, pseudopapiledema, pseudoneuritis, drusas de disco ocultas y cuerpos hialinos de disco. Se asocian con pérdida de visión de grado variable que da como resultado ocasionalmente ceguera. Se ha sugerido afectación mitocondrial debida a una sobrecarga de  $Ca^{2+}$  en el proceso de formación de drusas (Tso MO. Ophthalmology. Octubre de 1981; 88(10):1066-80). Además, en el caso de maculopatía asociada con la edad, también se encontró que estaba asociado un mayor riesgo de drusas blandas con el haplotipo mitocondrial J, mientras que el haplotipo H estaba asociado con un riesgo significativamente menor (Jones MM, Manwaring N, Wang JJ, Rochtchina E, Mitchell P, Sue CM. Arch Ophthalmol. Septiembre de 2007; 125(9):1235-40).

Por tanto, Chrysostomou *et al.* (Chrysostomou V, Trounce IA, Crowston JG. Ophthalmic Res. 2010;44(3): 173-8) sugirieron que la disfunción mitocondrial, heredada o como causa o consecuencia de lesión, vuelve las células oculares (en particular células ganglionares de la retina) sensibles a la degeneración. Los enfoques terapéuticos que seleccionan como diana las mitocondrias deben proporcionar por tanto un medio general de protección de las células ganglionares de la retina y el cristalino frente a la degeneración, independientemente de la etiología de la enfermedad.

Los compuestos de fórmula (I) también pueden ser útiles para tratar trastornos psiquiátricos, trastornos metabólicos, cáncer, esclerosis múltiple, esclerosis múltiple progresiva primaria o disfunción inmunitaria, tal como se detallará en lo siguiente.

En la diabetes tipo II se ha establecido una relación clara entre la producción en exceso de radicales de oxígeno, la disfunción mitocondrial y la progresión de la enfermedad [revisado por Friederich M, Hansell P, Palm F Curr Diabetes Rev. Mayo de 2009; 5(2): 120-44], mientras que en un sentido más amplio la mayor parte de patologías de síndrome metabólico tales como insuficiencia cardiaca también pueden atribuirse a la desregulación mitocondrial [revisado por Bugger H, Abel ED. Clin Sci (Lond). Febrero de 2008; 114(3): 195-210].

En condiciones en las que se reduce la producción de energía celular, tales como durante el deterioro relacionado con el envejecimiento de la función mitocondrial [Boumezbeur F, Mason GF, de Graaf RA, Behar KL, Cline GW, Shulman GI, Rothman DL, Petersen KF J Cereb Blood Flow Metab. 30 de septiembre de 2009] o durante actividad vigorosa, es beneficioso elevar la producción de ATP para contrarrestar la toxicidad o pérdida celular anticipada debida a la privación de energía. Al contrario que esto, en condiciones especiales, tales como obesidad, también puede ser beneficioso restringir la capacidad mitocondrial para la producción de ATP para ayudar a esfuerzos terapéuticos de pérdida de peso.

Sorprendentemente, se encontró que los compuestos de fórmula (I) tienen un efecto sobre el aumento de peso corporal, posiblemente debido a un efecto sobre la producción de ATP, que pudo demostrarse *in vitro*. Por tanto, existe una fuerte indicación de que los compuestos de fórmula (I) muestran un efecto beneficioso en el tratamiento de diabetes tipo II, obesidad y síndrome metabólico.

Aunque se han sugerido moduladores de la función mitocondrial como agentes anticancerígenos principalmente mediante una función de inducción de apoptosis, datos recientes también vinculan el potencial metastásico de tumores directamente con la producción de ADN mitocondrial y radicales mitocondriales [revisado por Ishikawa K, Koshikawa N, Takenaga K, Nakada K, Hayashi J Mitochondrion. 2008; 8(4): 339-44]. Por tanto, la modulación de las mitocondrias en este contexto podrían emplearse no sólo como estrategia contra el cáncer sino también para prevenir metástasis de tumores malignos, lo que hace que los compuestos según la fórmula (I) sean útiles como agentes terapéuticos contra el cáncer.

El metabolismo mitocondrial alterado también se vincula con múltiples disfunciones del sistema inmunitario. En pacientes con artritis idiopática juvenil sistémica, por ejemplo, se observó expresión reducida de genes de la cadena respiratoria mitocondrial [Ishikawa S, Mima T, Aoki C, Yoshio-Hoshino N, Adachi Y, Imagawa T, Mori M, Tomiita M, Iwata N, Murata T, Miyoshi M, Takei S, Aihara Y, Yokota S, Matsubara K, Nishimoto N Ann Rheum Dis. 2009;68(2):264-72]. Se ha notificado que el estrés oxidativo y la patología mitocondrial están asociados con septicemia [Victor VM, Espulgues JV, Hernandez-Mijares A, Rocha M Infect Disord Drug Targets. 2009;9(4):376-89]. Además, se ha sugerido la selección como diana de la función mitocondrial como estrategia de tratamiento para varios trastornos autoinmunitarios tales como artritis y psoriasis [J.J. Bednarski, R.E. Warner, T. Rao, F. Leonetti, R. Yung, B.C. Richardson, K.J. Johnson, J.A. Ellman, A.W. Opipari Jr., y G.D. Glick Arthritis & Rheumatism, 2003;48, 757] y podría aplicarse para modular múltiples criterios de valoración inmunológicos tales como infección microbiana [revisado por Arnould D, Carneiro L, Tattoli I, Girardin SE Semin Immunol. 2009;21 (4):223-32] y alergia [Chodaczek G, Bacsi A, Dharajiyia N, Sur S, Hazra TK, Boldogh I. Mol Immunol. 2009;46(13):2505-14]. Por tanto, los compuestos de fórmula (I) también son útiles en el tratamiento de artritis, psoriasis, septicemia, alergia e infecciones microbianas.

Con respecto al tratamiento de la esclerosis múltiple (EM), se estableció la primera relación entre las mitocondrias y la esclerosis múltiple debido al hallazgo de una enfermedad similar a EM en un subconjunto de pacientes con neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL), una enfermedad provocada por mutaciones en el ADN mitocondrial (mt) [Olsen NK, *et al.* Acta Neurol. Scand. 1995; 91: 326-329]. De manera similar a los hallazgos de pacientes con enfermedad mitocondrial, se han encontrado niveles elevados de metabolitos del metabolismo de glucosa extramitocondrial en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EM y se correlacionaron con la progresión de la enfermedad (Regenold WT *et al.* J. Neurol. Sci. 2008; 275:106-112). Como el metabolismo de glucosa extramitocondrial aumenta con el metabolismo de glucosa mitocondrial afectado (Seyama K *et al.* Acta Neurol. Scand. 1989; 80:561-568), esto implica disfunción mitocondrial en la progresión de la enfermedad de EM. Además, se encontró que las mitocondrias en cuerpos celulares neuronales en materia gris con EM no desmielinizada tienen una actividad disminuida de los complejos I y III, y, ya que las neuronas dotan parcialmente su axón de mitocondrias, esto podría afectar adicionalmente a la función mitocondrial en axones desmielinizados de manera crónica (Dutta, R. *et al.* Ann. Neurol. 2006; 59:478-489). Por tanto, los compuestos de fórmula (I) son útiles en el tratamiento de esclerosis múltiple.

La amplia mayoría de pacientes con EM recién diagnosticados desarrollan la forma de recaída-remisión de la enfermedad (EM-RR), en la que periodos de empeoramiento neurológico van seguidos por periodos de remisión espontánea, al menos al comienzo del proceso patológico. Aproximadamente el 10-15% de los pacientes desarrollan EM progresiva primaria (EM-PP), caracterizada por la acumulación progresiva de incapacidad neurológica desde la aparición de la enfermedad, sin ningún empeoramiento superpuesto (es decir recaídas) o mejoras (remisiones).

De manera importante, los pacientes con EM progresiva primaria (EM-PP) difieren de los pacientes con EM-RR en varias características importantes: tienden a ser mayor en el momento de la aparición de la enfermedad (media de 40 años frente a 30); los hombres y mujeres tienden a verse afectados por igual; clínicamente existe una alta prevalencia de disfunción corticoespinal caracterizada por debilidad y espasticidad progresivas; los pacientes tienen una afectación más prominente de la médula espinal y generalmente una menor cantidad de lesiones de la materia blanca diferenciadas (es decir placas) en el cerebro y menos evidencia de actividad inflamatoria del cerebro y, de la manera más importante, los pacientes con EM-PP no responden a terapias inmunomoduladoras con eficacia probada en EM-RR. Tanto nuevas modalidades de obtención de imágenes como datos patológicos sugieren que en EM-PP, la patología del SNC es más difusa y se produce en cierto grado independientemente de lesiones focales.

Actualmente no existen tratamientos con eficacia terapéutica probada para EM-PP. Sorprendentemente, se ha

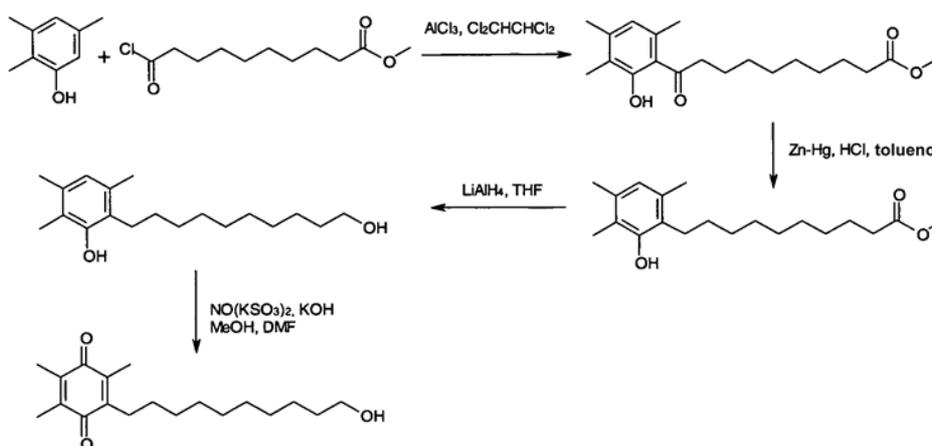
encontrado que los compuestos de fórmula (I) que son eficaces como moduladores de enfermedades mitocondriales pueden aliviar los síntomas de EM-PP.

### Preparación

5 Tal como se establece en otra parte de la solicitud, los métodos de preparación para los compuestos de fórmula (I) se describen en la bibliografía de patentes así como en la bibliografía científica.

10 Con respecto a la preparación del compuesto ID, el método general descrito en el documento EP-A-0038674 para la preparación del ácido carboxílico correspondiente (COOH en vez de CH<sub>2</sub>OH) no puede usarse para la preparación del compuesto ID ya que la reducción de la función carboxilo conduciría también a una reducción simultánea del sistema de quinona. En el documento US4139545 (Takeda) se describe un análogo con una cadena de hexametileno en vez de un dexametileno, que se cita en el documento EP-A-0038674. Sin embargo, esta ruta resultó que suministraba resultados insatisfactorios en cuanto al tratamiento final de las mezclas de reacción y los rendimientos. Se ha encontrado que el compuesto ID puede prepararse mediante el siguiente método de preparación novedoso (esquema 1).

Esquema 1



15 Tal como puede tomarse del esquema 1, se hace reaccionar 2,3,5-trimetilfenol con cloruro de metilsebacilo en presencia de un catalizador tal como cloruro de aluminio en un disolvente tal como 1,1,2,2-tetracloroetano (etapa 1) seguido por una reducción con un agente reductor tal como zinc amalgamado en un disolvente tal como tolueno (etapa 2). Se reduce el éster obtenido con un reactivo tal como hidruro de litio y aluminio en un disolvente tal como tetrahidrofurano (etapa 3). La reacción con nitrosodisulfonato de potasio en presencia de una base tal como un hidróxido de potasio produce el compuesto ID final (etapa 4).

### Sales

25 El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas a partir de bases o ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables incluyendo bases inorgánicas u orgánicas y ácidos inorgánicos u orgánicos. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen sales de aluminio, amonio, calcio, cobre, férricas, ferrosas, de litio, magnesio, mangánicas, manganosas, de potasio, sodio, zinc y similares. Se prefieren particularmente las sales de amonio, calcio, litio, magnesio, potasio y sodio. Las sales derivadas de farmacéuticamente bases orgánicas no tóxicas aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas que se producen de forma natural, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, tales como arginina, betaína, cafeína, colina, N,N'-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina y similares.

35 Cuando el compuesto de la presente invención es básico, pueden prepararse sales a partir de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos inorgánicos y orgánicos. Tales ácidos incluyen acético, bencenosulfónico, benzoico, canforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fórmico, fumárico, glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, malónico, mícico, nítrico, pamoico, pantoténico, fosfórico, propiónico, succínico, sulfúrico, tartárico, p-toluenosulfónico, ácido trifluoroacético y similares. Se prefieren particularmente los ácidos cítrico, fumárico, bromhídrico, clorhídrico, maleico, fosfórico, sulfúrico y tartárico.

Se entenderá que, tal como se usa en el presente documento, las referencias a los compuestos de fórmula (I) pretenden incluir también las sales farmacéuticamente aceptables.

#### Administración

5 Los compuestos de fórmula (I) se formulan preferiblemente en una forma de dosificación antes de la administración. Por consiguiente la presente invención también incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo y un portador farmacéutico adecuado.

10 El/los portador(es) debe(n) ser "aceptable(s)" en el sentido de ser compatible(s) con los demás componentes de la composición y no perjudiciales para el receptor del/de los mismo(s). La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida. Pueden usarse cualquiera de las técnicas, portadores, y excipientes bien conocidos según sea adecuado y se entienda en la técnica; por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden fabricarse de manera conocida en sí misma, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezclado, disolución, granulación, preparación de grageas, levigación, emulsionamiento, encapsulación, atrapamiento o compresión.

15 Puede emplearse cualquier vía de administración para proporcionar a un mamífero, especialmente un ser humano una dosificación eficaz de un compuesto de fórmula (I).

20 Las vías de administración adecuada incluyen administración oral, parenteral (incluyendo subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraarticular e intramedular), intraperitoneal, transmucosa, transdérmica, rectal y tópica (incluyendo dérmica, bucal, sublingual e intraocular) aunque la vía más adecuada puede depender, por ejemplo, del estado y trastorno del receptor.

25 En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, la vía de administración es oral. En otra realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, la vía de administración es ocular tópica. En otra realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, la vía de administración es una inyección intraocular. En otra realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, la vía de administración es un implante de depósito intraocular.

#### Formulación e intervalos de dosis

30 Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en una forma de dosificación unitaria y prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de poner en asociación un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo ("principio activo") con el portador que constituye uno o más componentes auxiliares. Generalmente, las formulaciones se preparan poniendo en asociación el principio activo uniforme e íntimamente con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos y luego, si es necesario, conformando el producto para dar la formulación deseada.

35 Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades diferenciadas tales como cápsulas, sellos o comprimidos que contienen cada uno una cantidad predeterminada del principio activo. El principio activo puede presentarse además como un polvo o gránulos; como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o en un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo también puede presentarse como un bolo, electuario o pasta.

40 Las preparaciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas duras compuestas por gelatina, así como cápsulas selladas blandas compuestas por gelatina y un plastificante, tales como glicerol o sorbitol. Pueden producirse comprimidos mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes auxiliares. Pueden prepararse comprimidos obtenidos por compresión sometiendo a compresión en una máquina adecuada el principio activo en una forma de flujo libre tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con aglutinantes, diluyentes inertes, o agentes de lubricación, tensioactivos o dispersantes. Pueden producirse comprimidos moldeados mediante moldeo en una máquina adecuada de una mezcla del compuesto pulverizado humectado con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden recubrirse o ranurarse opcionalmente y pueden formularse de modo que proporcionen la liberación lenta o controlada del principio activo en los mismos.

50 Todas las formulaciones para administración oral deben ser en dosificaciones adecuadas para tal administración. Las cápsulas duras pueden contener los principios activos en mezcla con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden estar disueltos o en suspensión en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizadores. 55 Los núcleos de gragea están dotados de recubrimientos adecuados. Para este fin, pueden usarse disoluciones concentradas de azúcar, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de

disolventes adecuados. Pueden añadirse materias colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de gragea para identificar o caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

5 Los compuestos de la presente invención pueden formularse para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo como inyección intraocular, intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraarterial. La inyección puede administrarse mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en forma de polvo o en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere sólo la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, solución salina o agua estéril libre de pirógenos, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse disoluciones y suspensiones para inyección extemporáneas a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos de la clase descrita previamente.

15 Las formulaciones para administración parenteral incluyen disoluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas (oleosas) de los compuestos activos que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor pretendido; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Los vehículos o disolventes lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.

25 Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos también pueden formularse como preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo por vía intraocular o subcutánea o por vía intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.

30 Para administración bucal o sublingual, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos, pastillas para chupar, pastillas o geles formulados de manera convencional. Tales composiciones pueden comprender el principio activo en una base saborizada tal como sacarosa y goma arábica o goma tragacanto.

Los compuestos también pueden formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

40 Los compuestos de la presente invención pueden administrarse de forma tópica, es decir mediante administración no sistémica. Esto incluye la aplicación de un compuesto de la presente invención de manera externa a la epidermis o la cavidad bucal y la instilación de un compuesto de este tipo en el oído, el ojo y la nariz, de tal manera que el compuesto no entra significativamente en el torrente sanguíneo. En cambio, la administración sistémica se refiere a administración oral, intravenosa, intraperitoneal e intramuscular.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semilíquidas adecuadas para la penetración a través de la piel hasta el sitio de inflamación tales como geles, linimentos, lociones, cremas, pomadas o pastas, y gotas adecuadas para la administración al ojo, el oído y la nariz.

45 En una formulación ocular tópica, la cantidad del compuesto de fórmula (I) estará generalmente en el intervalo del 0,001 al 10% peso/volumen (% p/v). Las concentraciones preferidas oscilan entre el 0,1 y el 5% p/v. La administración tópica al ojo se proporciona de una a seis veces al día. Una formulación típica contiene el 0,1 - 5% del compuesto de fórmula (I), el 0,5% p/v de hidroxipropilmetilcelulosa (HMPC), el 0,8% p/v de cloruro de sodio, el 0,28% p/v de fosfato de sodio, el 0,01% p/v de edetato de disodio, el 0,01% p/v de cloruro de benzalconio. Se ajusta el pH a 7,2 - 7,4. Se añade agua purificada en c.s.

50 Los geles para administración tópica o transdérmica de compuestos de la invención objeto pueden comprender, generalmente, una mezcla de disolventes volátiles, disolventes no volátiles, y agua. El componente de disolvente volátil del sistema de disolventes tamponado puede incluir preferiblemente alcoholes de alquilo inferior (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), glicoles de alquilo inferior y polímeros de glicoles inferiores. Más preferiblemente, el disolvente volátil es etanol. Se cree que el componente de disolvente volátil actúa como potenciador de la penetración, al tiempo que también produce un efecto de enfriamiento en la piel a medida que se evapora. La parte de disolvente no volátil del sistema de disolventes tamponado se selecciona de alquilenglicoles inferiores y polímeros de glicoles inferiores. Preferiblemente, se usa propilenglicol. El disolvente no volátil ralentiza la evaporación del disolvente volátil y reduce la presión de vapor del sistema de disolventes tamponado. La cantidad de este componente de disolvente no volátil,

como con el disolvente volátil, está determinada por el compuesto farmacéutico o fármaco que esté usándose. Cuando hay una cantidad demasiado pequeña del disolvente no volátil en el sistema, el compuesto farmacéutico puede cristalizar debido a la evaporación del disolvente volátil, mientras que un exceso dará como resultado una falta de biodisponibilidad debido a una escasa liberación de fármaco de la mezcla de disolventes.

5 El componente tamponante del sistema de disolventes tamponado puede seleccionarse de cualquier tampón usado comúnmente en la técnica; preferiblemente, se usa agua. Existen varios componentes opcionales que pueden añadirse a la composición tópica. Estos incluyen, pero no se limitan a, quelantes y agentes gelificantes. Los agentes gelificantes apropiados pueden incluir, pero no se limitan a, derivados de celulosa semisintéticos (tales como hidroxipropilmetilcelulosa) y polímeros sintéticos, y agentes cosméticos.

10 Las lociones según la presente invención incluyen las adecuadas para la aplicación a la piel o al ojo. Una loción ocular puede comprender una disolución acuosa estéril que contiene opcionalmente un bactericida y puede prepararse mediante métodos similares a aquellos para la preparación de gotas. Las lociones o los linimentos para la aplicación a la piel también pueden incluir un agente para acelerar el secado y enfriar la piel, tal como un alcohol o acetona, y/o un hidratante tal como glicerol o un aceite tal como aceite de ricino o aceite de maní.

15 Las cremas, pomadas o pastas según la presente invención son formulaciones semisólidas del principio activo para aplicación externa. Pueden producirse mediante mezclado del principio activo en forma finamente dividida o pulverizada, solo o en disolución o suspensión en un fluido acuoso o no acuoso, con la ayuda de la maquinaria adecuada, con una base grasa o no grasa. La base puede comprender hidrocarburos tales como parafina dura, blanda o líquida, glicerol, cera de abejas, un jabón metálico, un mucílago; un aceite de origen natural tal como aceite de almendras, maíz, maní, ricino u oliva, lanolina o sus derivados o un ácido graso tal como ácido esteárico u oleico  
20 junto con un alcohol tal como propilenglicol o un macrogel. La formulación puede incorporar cualquier agente tensioactivo adecuado tal como un surfactante aniónico, catiónico o no iónico tal como un éster de sorbitano o un derivado de polioxietileno del mismo. También pueden incluirse agentes de suspensión tales como gomas naturales, derivados de celulosa o materiales inorgánicos tales como sílices silicogénicas y otros componentes tales como  
25 lanolina.

Las gotas según la presente invención pueden comprender disoluciones o suspensiones estériles acuosas u oleosas y pueden prepararse mediante la disolución del principio activo en una disolución acuosa adecuada de un agente bactericida y/o fungicida y/o cualquier otro conservante adecuado, e incluyendo preferiblemente un agente tensioactivo.

30 Las formulaciones para administración tópica en la boca, por ejemplo por vía bucal o por vía sublingual, incluyen pastillas para chupar que comprenden el principio activo en una base saborizada tal como sacarosa y goma arábiga o goma tragacanto, y pastillas que comprenden el principio activo en una base tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábiga.

35 Para la administración por inhalación, los compuestos según la presente invención se suministran de manera conveniente en forma de un insufador, envases a presión de nebulizador u otro medio conveniente de suministro de una pulverización de aerosol. Los envases a presión pueden comprender un propelente adecuado, tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso del aerosol a presión, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Alternativamente, para la administración por inhalación o insuflación, los  
40 compuestos según la invención pueden adoptar la forma de una composición de polvo seco, por ejemplo una mezcla de polvo del compuesto y un polvo adecuado tal como lactosa o almidón. La composición de polvo puede presentarse en forma unitaria, por ejemplo, en cápsulas, cartuchos, paquetes de tipo blíster o gelatina desde los que puede estar el polvo con la ayuda de un inhalador o insufador.

45 Las formulaciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis eficaz, tal como se cita a continuación en el presente documento o una fracción apropiada de la misma, del principio activo.

Debe entenderse que además de los componentes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones de esta invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo las adecuadas para administración oral pueden incluir agentes saborizantes.

50 Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía comentada anteriormente en un intervalo de dosis para seres humanos adultos que es generalmente de desde 0,01 mg/kg/día hasta 60 mg/kg/día, más preferiblemente desde 0,01 mg/kg/día hasta 30 mg/kg/día, lo más preferiblemente desde 0,01 mg/kg/día hasta 15 mg/kg/día.

La cantidad de principio activo que puede combinarse con los materiales portadores para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del huésped tratado y del modo de administración particular.

55 Los compuestos de la invención objeto pueden administrarse de diversos modos, por ejemplo por vía oral, de forma tópica o mediante inyección. La cantidad precisa de compuesto administrado a un paciente será responsabilidad del médico encargado. El nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de

factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, las dietas, el momento de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, el trastorno preciso que esté tratándose y la gravedad de la indicación o el estado que esté tratándose. Además, la vía de administración puede variar dependiendo del estado y su gravedad.

5 CL-EM analítica

Se analizaron los compuestos de fórmula (I) mediante CL-EM analítica. Se resumen las condiciones a continuación.

Resumen de condiciones analíticas:

Bomba LC10Advp (Shimadzu) con detector por red de diodos UV/Vis SPD-M10Avp (Shimadzu) y detector EM QP2010 (Shimadzu) en modo ESI+ con detección UV a 214, 254 y 275 nm,

10 Columna: Waters XTerra MS C18, 3,5  $\mu\text{m}$ , 2,1 \* 100 mm,  
gradiente lineal con acetonitrilo en agua (HCOOH al 0,15%)

Velocidad de flujo de 0,4 ml/min;

Fase móvil A: agua (HCOOH al 0,15%)

Fase móvil B: acetonitrilo (HCOOH al 0,15%)

15 Los métodos son:

A:

Gradiente lineal de QC polar:

concentración inicial 1% de acetonitrilo

9,00	B.Conc.	30
10,00	B.Curva	3
12,00	B.Conc.	99
15,00	B.Conc.	99
15,20	B.Conc.	1
18,00	Detener bomba	

B:

20 Gradiente lineal de QC medio;

concentración inicial 10% de acetonitrilo

10,00	B.Conc.	60
11,00	B.Curva	2
12,00	B.Conc.	99
15,00	B.Conc.	99
15,20	B.Conc.	10
18,00	Detener bomba	

C:

Gradiente lineal de QC apolar:

concentración inicial 15% de acetonitrilo

12,00	B.Conc.	99
15,00	B.Conc.	99
15,20	B.Conc.	15
18,00	Detener	0

25 B.Curva Ajustar la curva de gradiente de líquido B (C, D) en el modo de gradiente. La curva en

C.Curva  $0 \leq t \leq T$  puede calcularse mediante la siguiente ecuación, en la que  $c(t)$  es la

D.Curva concentración del líquido B (C, D) en el tiempo relativo  $t$  en cada intervalo,  $T$  es el tiempo de gradiente, y  $a$  es el valor para  $[B(C,D). Curva]$ .

1.  $a > 0$ 

$$C(t) = C_1 + (C_2 - C_1) \cdot \frac{\exp(a \cdot t/T) - 1}{\exp(a) - 1}$$

2.  $a = 0$  (línea)

$$C(t) = C_1 + (C_2 - C_1) \cdot (t/T)$$

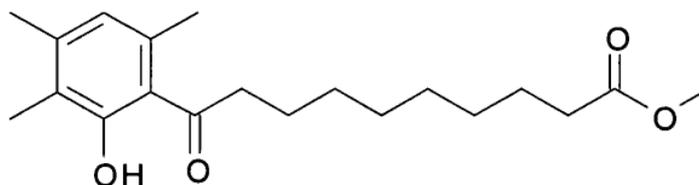
5 3.  $a < 0$ 

$$C(t) = C_1 + (C_2 - C_1) \cdot \frac{\exp\{|a| \cdot (1 - t/T)\} - 1}{\exp\{|a| - 1\}}$$

C1: Valor inicial de [B(C,D).Conc.]

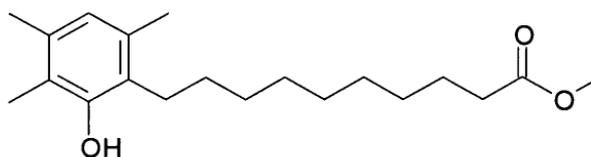
C2: Valor final de [B(C,D).Conc.] (Debe ajustarse mediante el programa de CL)

-10 - 10

10 **Ejemplos**Síntesis del compuesto ID:Producto intermedio IDa):

15 A una disolución de 2,3,5-trimetilfenol (0,5 g, 1 eq.) en 1,1,2,2-tetracloroetano (15 ml) se le añadió una disolución de cloruro de aluminio (1,22 g, 2,5 eq.) y cloruro de metilsebacoilo (1,03 g, 1,2 eq.) en 1,1,2,2-tetracloroetano (5 ml) a 0°C bajo atmósfera de argón. Se agitó la mezcla de reacción a 140°C durante 24 h y se hidrolizó a 0°C con agua (10 ml) y una disolución de ácido clorhídrico 2 N (10 ml). Se extrajo la disolución con acetato de etilo (20 ml). Después de la separación de fases, se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (2 X 20 ml), se combinaron las fases orgánicas y se eliminaron los disolventes a presión reducida. Se purificó el producto en bruto mediante

20 cromatografía ultrarrápida (acetato de etilo-ciclohexano).

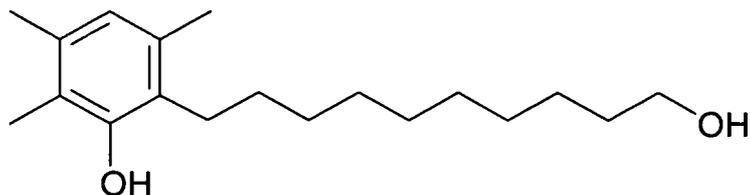
Producto intermedio IDb):

25 En un matraz de fondo redondo, se agitaron zinc (13 g, 11 eq.), cloruro de mercurio (1,3 g, 0,26 eq.), agua (15 ml) y ácido clorhídrico conc. (0,15 ml) durante 5 min y se decantó la disolución. Se lavó el zinc con agua y se transfirió a un nuevo matraz de fondo redondo limpio. A este zinc amalgamado, se le añadieron agua (2 ml), ácido clorhídrico conc. (10 ml), tolueno (10 ml) y el producto intermedio IDa (6 g, 1 eq.). Se agitó la mezcla de reacción vigorosamente a temperatura ambiente durante 10 minutos y a 140°C durante 3 días. Se le añadió la misma cantidad de zinc amalgamado que anteriormente y se agitó la mezcla de reacción durante 3 días adicionales a 140°C. Se transfirió la mezcla de reacción a un embudo de separación, y se transfirió la fase orgánica obtenida a un nuevo matraz de

30 fondo redondo limpio. A esta mezcla de reacción, se le añadieron agua (0,5 ml), ácido clorhídrico conc. (2 ml), y zinc recién activado (2 g). Se agitó la mezcla de reacción durante 2 días adicionales a 140°C. Se decantó la disolución del zinc sin reaccionar y se extrajo dos veces con acetato de etilo. Se lavó el extracto orgánico combinado con disolución acuosa de ácido clorhídrico 0,1 M (25 ml), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y se eliminaron los componentes volátiles a presión reducida. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía ultrarrápida

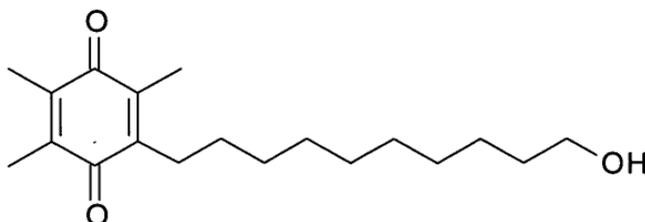
35 (acetato de etilo-ciclohexano).

Producto intermedio IDc):



Se disolvió el producto intermedio IDb (3,7 g, 1 eq.) en tetrahidrofurano (100 ml) y se le añadió hidruro de litio y aluminio (0,26 g, 1,1 eq.) a 0°C bajo atmósfera de argón. Se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 10 minutos hasta obtener una conversión completa. Se vertió la disolución sobre una disolución saturada de cloruro de amonio (200 ml) a 0°C y se le añadió acetato de etilo (200 ml). Después de la separación de fases, se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (150 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio, se filtraron y se eliminaron los disolventes a presión reducida. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía ultrarrápida (acetato de etilo-ciclohexano).

Ejemplo ID:



Se disolvió el producto intermedio IDc (1,62 g, 1 eq.) en una mezcla de metanol (50 ml) y N,N-dimetilformamida (50 ml). A esta disolución, se le añadieron una disolución del 0,5% de hidróxido de potasio (80 ml) y nitrosodisulfonato de potasio (4 g, 3 eq.) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 14 h hasta obtener una conversión completa. Se le añadió una disolución acuosa de ácido clorhídrico 1 M (100 ml) y se extrajo la disolución con acetato de etilo (2 X 200 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio, se filtraron, y se eliminaron los componentes volátiles a presión reducida. Se purificó el producto en bruto en primer lugar mediante cromatografía ultrarrápida (acetato de etilo-ciclohexano) y luego con HPLC-EM preparativa.

CL-EM: método C,  $t_R$  (min) = 8,86, MW (calc.) = 306,44,  $[M+H]^+$  (hallado) = 307.

Ensayos biológicos:

#### A. Ensayo de citotoxicidad

Este ensayo investiga la citotoxicidad que se define como la propiedad de destrucción de células de un compuesto químico, independientemente de los mecanismos de muerte celular. La línea celular de hepatoblastoma HepG2 es una de las líneas de celulares humanas más comunes para estudios de hepatotoxicidad. Aunque las células carezcan de una parte de las enzimas metabolizadoras presentes en hepatocitos nuevos, han mostrado que son una herramienta útil para estudiar la toxicidad de hepatotoxinas. Este ensayo mide la actividad de metabólica de células vivas usando el reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche Diagnostics). La sal de tetrazolio de WST-1 se escinde para dar formazán soluble en agua por enzimas celulares. Una expansión en el número de células viables da como resultado un aumento de la actividad global de deshidrogenasas mitocondriales en la muestra. Este aumento de la actividad enzimática conduce a un aumento de la cantidad de colorante formazán formado, que se correlaciona directamente con el número de células metabólicamente activas en el cultivo. El colorante formazán producido por células metabólicamente activas se cuantifica directamente en un espectrofotómetro de barrido de múltiples pocillos midiendo la absorbancia de la disolución de colorante formazán entre 420 y 480 nm. Las células HepG2 sanas, cuando se mantienen en cultivo, se dividen de manera continua y se multiplican a lo largo del tiempo. Un producto químico tóxico, independiente del sitio y el mecanismo de acción, interferirá en este proceso y dará como resultado la reducción de la tasa de crecimiento reflejada en el número de células.

Procedimiento experimental: se siembran células Hep-G2 en una microplaca de 96 pocillos y se mantienen en cultivo durante 24 horas. Entonces se exponen al compuesto de prueba a lo largo de un intervalo de ocho concentraciones. Después de la exposición durante 24 horas, se incuban las células en presencia del reactivo WST-1 durante 30 min antes de medir la absorbancia del colorante formazán formado. Se expresa la citotoxicidad como una reducción dependiente de la concentración de la formación de colorante por conversión debido a una disminución de la proliferación celular en comparación con células sin tratar. La  $CT_{50}$  (concentración tóxica al 50%), se define como la concentración de compuesto sometido a prueba requerida para reducir la viabilidad celular en el

50% con relación al cultivo de control. Cuanto menor es el valor de  $CT_{50}$ , mayor es el potencial citotóxico del compuesto de prueba. Se calcularon los valores de CT al 50% usando la siguiente fórmula:

$$CT_{50} = Conc_{>50} - \frac{(Conc_{>50} - Conc_{<50})(\%_{>50} - 50)}{(\%_{>50} - \%_{<50})}$$

a)  $Conc. > 50$  = máxima concentración medida con el % de control de disolvente > 50%

5 b)  $Conc. < 50$  = mínima concentración medida con el % de control de disolvente < 50%

c)  $\% > 50$  = absorbancia relativa en a) en %

d)  $\% < 50$  = absorbancia relativa en b) en %

Tabla 1

Compuesto	$CT_{50}$ [ $\mu$ M]
Compuesto IA	100
Compuesto IC	71,94
Compuesto IE	100
Compuesto IF	100

10 Tal como puede tomarse de la tabla 3, los compuestos de fórmula (I) demuestran claramente ausencia de toxicidad en el intervalo de dosis evaluado.

### B. Ensayo de ATP

15 Los electrones donados desde el ciclo del ácido cítrico en forma de NADH se transfieren entre los complejos I, II y III de la cadena respiratoria. En este proceso, se genera potencial de membrana mitocondrial a través de bombas de protones en la membrana mitocondrial interna. Este gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna se usa en células sanas para proporcionar la energía para dirigir la producción de ATP mitocondrial. Por consiguiente, los niveles celulares de ATP son un buen indicador de la función mitocondrial. En múltiples estados patológicos (es decir enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, de Huntington y trastornos mitocondriales) este modo de producción de ATP está afectado y se usan modos alternativos de producción de ATP que pueden estar asociados con subproductos tóxicos (es decir acidosis láctica debida a un aumento de la glicólisis anaerobia). Existe un consenso general de que especialmente en tejidos con alta demanda de energía tales como músculo y cerebro, una reducción crónica de los niveles de ATP conduce en última instancia a muerte celular. Por tanto, puede considerarse que los compuestos que reducen significativamente los niveles de ATP en condiciones de crecimiento normales *in vitro* albergan cierto potencial de toxicidad. Sin embargo, se ha descrito que algunos compuestos ejercen efectos positivos sobre la duración de vida y los criterios de valoración patológicos tales como estrés oxidativo a pesar de una reducción de la producción de energía (Onken & Driscoll 2010). Puede detectarse una posible inhibición de la respiración mitocondrial a través de condiciones de crecimiento especiales *in vitro*. C puede distinguir entre la producción mitocondrial y no mitocondrial de ATP (es decir glicólisis), puesto que en condiciones de baja concentración de glucosa, el ATP se produce principalmente mediante fosforilación oxidativa.

30 Procedimiento experimental: Este ensayo se realizó por tanto en ausencia de glucosa en el medio. Sin embargo, ha de observarse que los bajos niveles de glucosa contenidos en el suero dan como resultado concentraciones estimadas de glucosa de aproximadamente 0,5 mM. Por tanto se denomina esta condición como "baja concentración de glucosa". Se usaron células linfoblastoides inmortalizadas (BC1 LCL) para caracterizar el efecto de los compuestos sobre los niveles de ATP en diferentes niveles de glucosa mediante una reacción de luciferasa dependiente de ATP. En resumen, se sembraron células en una placa de 24 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/ml con 1 ml por pocillo en dos medios diferentes que no contenían glucosa o contenían glucosa 25 mM, respectivamente. Se complementaron ambos medios con suero bovino fetal al 10%, pen./estrep. al 1%, L-glutamina 200 mM. Se trataron las células con el 0,1% (v/v) de compuestos (10 mM en DMSO; concentración final: 10  $\mu$ M) y se incubaron durante 72 h a 37°C, el 5% de  $CO_2$ , y HR del 90%. Se contó el número de células y después de un breve lavado en PBS y recogida a través de centrifugación (5 min; 200 x g) se lisaron las células en un volumen de 0,5 ml de disolución de lisis (EDTA 4 mM, Triton X-100 al 0,2%) durante 15 min sobre hielo y se añadieron 10  $\mu$ l de lisado a una placa blanca de 96 pocillos. En paralelo, también se añadieron patrones de ATP (concentraciones: 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 12  $\mu$ M en PBS) a la placa de 96 pocillos. Se inició la reacción mediante la adición de 100  $\mu$ l de mezcla de reacción (D-luciferina 300  $\mu$ M, luciferasa de luciérnaga 5  $\mu$ g/ml, DTT 75  $\mu$ M, HEPES 25 mM,  $MgCl_2$  6,25 mM, EDTA 625  $\mu$ M y BSA 1 mg/ml) y se cuantificó la señal de luminiscencia en un lector de placas multimodo (lector de placas Tecan M1000; tiempo de integración de luminiscencia: 100 ms). Se calcula la concentración de ATP celular normalizada con respecto al número de células para cada pocillo y se promedian mediciones por triplicado. En la tabla 2, se facilitan los niveles de ATP.

Tabla 2

Compuesto	Niveles de ATP [%]
Compuesto IC	63
Compuesto IE	95

En general, en condiciones de crecimiento normales, más ATP es beneficioso para la célula. Sin embargo, en condiciones de baja concentración de glucosa, una reducción dependiente del tratamiento de los niveles de ATP puede indicar una inhibición de la respiración mitocondrial, que imita la restricción calórica y es probable por tanto que inicie todos los efectos positivos asociados con la restricción calórica, tales como longevidad (Copeland *et al.* Current Biol 2009; 19:1-8). No obstante, es necesario determinar que no se asocian efectos de toxicidad u otros efectos adversos tales como producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) con esta respiración reducida.

#### C: Ensayo de peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es un mecanismo bien definido de daño celular tanto en animales como en plantas que se produce durante el envejecimiento y en algunos estados patológicos. Este proceso avanza mediante un mecanismo de reacción en cadena por radicales libres. Con la mayor frecuencia afecta a ácidos grasos poliinsaturados, porque contienen una multiplicidad de dobles enlaces entre los que grupos metileno-CH<sub>2</sub>- presentan hidrógenos especialmente reactivos. Si no se termina lo suficientemente rápido, la peroxidación lipídica daña las membranas celulares, afecta a la fluidez de membrana y también a la función mitocondrial. Además, los productos finales de la peroxidación lipídica pueden ser mutagénicos y carcinogénicos. Por ejemplo, el producto final reactivo de la peroxidación lipídica, malondialdehído, provoca directamente daño al ADN.

Procedimiento experimental: El fluoróforo fluorescente BODIPY® (4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indaceno) es un trazador eficaz del tráfico de lípidos, así como que es útil en sondas de membranas para fines generales. BODIPY 581/591-C11 puede usarse para medir la actividad antioxidante en entornos lipídicos aprovechando su pérdida de fluorescencia tras la interacción con radicales peroxilo. Se sembraron fibroblastos humanos primarios C4 (GM04545, Coriell) (pase <12) a una concentración de 2000 células/pocillo en placas negras de 96 pocillos y se incubaron durante 72 horas en DMEM en presencia de compuesto de prueba 10 µM o DMSO solamente. Después de eso, se añadieron 0,1 ml de disolución de colorante recién preparada (HBSS, que contenía colorante BODIPY 1:1000 a partir de una disolución madre) y se devolvieron las células al incubador durante 30 min. Después de 2 lavados breves con 0,1 ml de PBS calentado, se midió la fluorescencia en 50 µl de PBS. Se cuantificó individualmente la fluorescencia para 4 áreas individuales por pocillo a dos longitudes de onda (Ex<sub>1</sub>: 490, Em<sub>1</sub>: 600; Ex<sub>2</sub>: 490, Em<sub>2</sub>: 530, ancho de banda de 10 nm, 50 parpadeos, frecuencia de 400 Hz, tiempo de integración de 20 µs).

A continuación en la tabla 3 se muestra el grado de peroxidación lipídica de diversos compuestos de la presente invención.

Tabla 3

Compuesto	Peroxidación lipídica [%]
Compuesto IA	98
Compuesto IC	92
Compuesto ID	110
Compuesto IE	110
Compuesto IF	93

La función mitocondrial alterada, tal como en trastornos mitocondriales, puede conducir a daño celular mediante peroxidación lipídica. La alteración de la función mitocondrial a través de moléculas pequeñas también tiene por tanto el riesgo inherente de producir peroxidación lipídica. En este contexto, todos los compuestos de la tabla 3 que dejan los niveles basales de peroxidación lipídica inalterados (aproximadamente del 100%) no muestran ninguna carga tóxica inherente importante tal como se demuestra mediante los datos incluidos en la tabla 1.

#### D: Medición de la actividad del complejo mitocondrial II

El complejo II (CII) es un complejo enzimático unido a la cara de la matriz de las membranas mitocondriales internas. Consiste en cuatro subunidades con varias actividades enzimáticas diferentes. Una de estas es la enzima del ciclo del ácido cítrico succinato deshidrogenasa, que cataliza la conversión de succinato en fumarato. En esta reacción, se transfieren electrones de succinato al grupo prostético FAD generando así FADH<sub>2</sub> (Ackrell 2000). Estos electrones se transfieren entonces del FADH<sub>2</sub> reducido a ubiquinona, de ubiquinona a los centros de reacción del complejo III (CIII), y finalmente al citocromo c. Durante este proceso de translocación de electrones, el complejo III bombea cuatro protones desde la matriz hasta el espacio intermembranoso. Estos flujos de protones pueden detectarse como corrientes eléctricas en sensores SURFE2R basados en SSM (<http://www.sds-heidelberg.de/index.html>). En el ensayo de CII-CIII con SURFE2R, ambos, CM y OIII se activan simultáneamente equilibrando en primer lugar los sensores con succinato y luego activando la reacción CII-CIII mediante citocromo c oxidado. El flujo de salida resultante de protones fuera del compartimento de la membrana induce corrientes negativas, que son sensibles a inhibidores de CII y CIII, malonato y antimicina A, respectivamente.

Procedimiento experimental: Los sensores de SSM SURFE2R se recubrieron con membranas mitocondriales

internas según los protocolos convencionales. En resumen, se llenaron los sensores con 50  $\mu$ l de disolución SensorPrep A y se incubaron durante 10-15 min. Después de eso, se retiró la disolución, se enjuagaron los sensores con agua desionizada tres veces, se secaron en una corriente de gas nitrógeno y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente para librarse de los disolventes restantes. Se aplicaron 1,5  $\mu$ l de disolución SensorPrep B1 al sensor y se cubrieron inmediatamente con 50  $\mu$ l del tampón (gluconato de Na 150 mM, Hepes 30 mM pH 7,2/NMG, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaPi 12,5 mM, pH 7,2, DTT 0,2 mM recién añadido). Se incubó el sensor durante 15-60 min a 4°C. Se descongeló rápidamente una alícuota (10  $\mu$ l) de la suspensión de membrana mitocondrial interna (almacenada a -80°C), se diluyó con 190  $\mu$ l del tampón de preparación de sensor usado anteriormente y se sonicó en un tubo Eppendorff de 1,5 ml aplicando 5 ráfagas con una amplitud del 30% y una razón de tiempo de ciclo de 0,5 (procesador ultrasónico UP 50 H, Dr. Hielscher GmbH, Alemania, equipado con 1 punta de EM). Se aplicaron 5  $\mu$ l de la suspensión de membrana sobre la superficie del sensor, que representaban 4,3  $\mu$ g de contenido de proteína total por sensor. Se centrifugaron los sensores durante 45 min a 2500 x g, se incubaron a 4°C durante 3-5 h y se congelaron a -80°C.

Se descongelaron los biosensores inmediatamente antes del experimento y se midieron con los dispositivos de estación de trabajo 50 ó 500 de SURFE2R. Se estudió la actividad de CII-CIII mediante un intercambio rápido de una disolución "no activante" por una "activante" que contenía el citocromo c oxidado 3  $\mu$ M. 2 s de tampón no activante estuvieron seguidos por 1 s de tampón activante y luego de nuevo por 1 s tampón no activante. Después de eso, se enjuagó el sensor 3 veces con 1 ml de tampón no activante. Se realizó una activación adicional con citocromo c después de un tiempo de incubación de ~11 min. Ambos tampones contenían succinato 1 mM y BSA 350 mg/l para potenciar la solubilidad de los compuestos de prueba. Para determinar la actividad de CII-III, se evaluó la corriente pico (amplitud de corriente). Las mediciones realizadas de actividades de CII-III consistían en dos partes. En primer lugar, se registró la actividad de CII-III en ausencia del compuesto (en su lugar DMSO al 0,01%) durante aproximadamente 50 min para obtener una actividad de CII-III constante (amplitudes de corriente pico constantes). Después de eso, se suministró un compuesto de prueba (~4  $\mu$ M) a las disoluciones no activante y activante y se registró la actividad de CII-III durante ~50 min adicionales (110 min en total). Para cada sensor, se normalizaron todas las corrientes pico con respecto a la media de las actividades después de 24, 36 y 48 min. Para cada compuesto de prueba, se sometieron a ensayo al menos dos biosensores diferentes durante ~110 min en total, indicado mediante n (t 0-110) = 2. Para aquellos compuestos de prueba que activaron CII-III en más del 30% en un tiempo de 80 a 110 min, se registró la actividad de CII-III durante ~50 min adicionales (hasta 160 min en total).

En la tabla 4 a continuación se notifican los resultados de diversos compuestos usados en la invención.

Tabla 4

Compuesto	Actividad del complejo CII-III [%]
Compuesto IA	102
Compuesto IC	97
Compuesto IE	110
Compuesto IF	--

La restricción calórica funcional, que se ha mostrado eficazmente a través de estudios que usan activadores de SIRT, puede cambiar el metabolismo de glucosa a un aumento de lípidos como fuente de energía principal (Lomb *et al.* Biochim Biophys Acta. 2010; 1804(8): 1652-7). Los lípidos se descomponen normalmente durante la beta-oxidación mitocondrial de ácidos grasos (AG). Puesto que se cree que los equivalentes electrónicos de la peroxidación lipídica se alimentan preferentemente en la cadena respiratoria mitocondrial a nivel del complejo II (Bruss *et al.* Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2010; 298:E108-E116), es de importancia evaluar que la función de este complejo no se altera mediante el tratamiento.

#### E: Ensayo de microalineamiento y análisis de rutas

Puesto que apenas está disponible ningún informe sobre los efectos de quinonas de cadena corta sobre los patrones de expresión génica *in vivo*, se realizaron análisis de microalineamientos de tejido cardíaco derivado de ratones después de un tratamiento a largo plazo con el compuesto IA.

Procedimiento experimental: Se mantuvieron ratones C57Bl/6 macho en condiciones de laboratorio habituales (12 horas de luz al día, 22  $\pm$  2°C, humedad del 40-60%) con alimento y agua disponibles a voluntad. A la edad de nueve semanas, se administró el compuesto IA (200 mg/kg, formulado en una comida para roedores convencional) por v.o. durante un periodo de tres semanas. Se administraron viales que contenían 8 g de alimento triturado a animales en jaulas individuales al inicio del ciclo de oscuridad, a la vez que se les permitía el acceso a alimento complementario a voluntad. Después del periodo de tratamiento, se sacrificaron los animales y se extirpó inmediatamente el ventrículo izquierdo del corazón y se lisó para la extracción de ARN. Se purificó el ARN siguiendo protocolos convencionales. Se sintetizó ADN bicatenario a partir de 1,8  $\mu$ g de ARN mediante transcripción inversa de ADNc monocatenario usando una polimerasa Superscript II y cebadores T7-(N)<sub>6</sub> y síntesis posterior de ADNc bicatenario usando ADN polimerasa 1. Tras la transcripción *in vitro* durante la noche para generar ARNc, se sintetizó ADNc bicatenario mediante transcripción inversa usando Superscript II, cebadores al azar y dUTP y después de eso se

limpiaron de los moldes de ARN. Se hibridaron las muestras con alineamientos de exón 1.0 ST de ratón Affymetrix GeneChip® que cubrían más de un millón de agrupamientos de exones (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE.UU.) según las instrucciones de Affymetrix. Se realizó el análisis de los datos (análisis de componentes principales; PCA y cambios en la expresión de genes individuales) usando dos programas: el software de análisis génico Partek (Partek Incorporated, St. Louis, MO, EE.UU.) y Aligent Genespring GX 10 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). Se realizaron nuevas tomas de muestras de puntuaciones de genes que incluían todos los genes usando ermineJ (Lee *et al*, BMC Bioinformatics 6:269, 2005). Para el análisis funcional que incluía sólo genes que se expresaban de diferente manera se usó DAVID (Huang DW *et al*, Nature Protoc. 4(1):44-57, 2009; Dennis G *et al*, Genome Biol. 4(5):P3, 2003). Se realizó un análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes usando Ariadne Pathway Studio 6 (Ariadne Genomics, Rockville, MD, EE.UU.).

**Resultados:** Después del tratamiento durante 3 semanas con el compuesto IA, se expresaron de diferente manera más de 650 genes. Múltiples formas de análisis, incluyendo nueva toma de muestras de puntuaciones de genes, indicaron claramente que el principal parámetro metabólico en tejido cardíaco más afectado por el tratamiento con el compuesto IA es el metabolismo de ácidos grasos.

#### 15 F: Efecto de los compuestos sobre la ingesta de alimentos y/o el peso corporal

Aunque se describe que los compuestos de quinona de cadena corta tales como el compuesto IA tienen múltiples efectos protectores sobre la función mitocondrial, no hay actualmente información publicada con respecto a los cambios en el metabolismo *in vivo*. Debido a los resultados del análisis de microalineamientos, se evaluaron los posibles efectos de los compuestos sobre el peso corporal y la ingesta de alimentos.

20 **Procedimiento experimental:** Se adquirieron ratones C57BL/6J macho de ocho semanas de edad de Janvier (Francia). Después de un periodo de aclimatación de una semana en las instalaciones (12 horas de luz al día, 22 ± 2°C, humedad del 60%), se alojaron individualmente los animales en jaulas con un entorno enriquecido (es decir ruedas para correr) y recibieron una dosis diaria de 200 mg/kg de compuesto IA en los alimentos tal como se describió anteriormente para el análisis de microalineamientos. Se complementaron porciones que ascendían al 75% de la ingesta calórica diaria con edulcorante artificial para preferencia de gusto. Se almacenaron porciones individuales a -20 °C y se administraron diariamente antes del comienzo del periodo de oscuridad. Se prepararon las porciones para animales control de forma idéntica con la excepción de que se omitía el compuesto IA. Adicionalmente, los ratones tenían acceso a alimentos a voluntad. Se midieron el peso corporal de los animales y la ingesta de alimentos de los gránulos a voluntad tres veces a la semana a lo largo de un periodo de cuatro semanas. Se usaron el peso corporal de los animales así como la ingesta de alimentos acumulada con relación al peso corporal como criterios de valoración.

#### 30 G. Viabilidad celular de células similares a RGC

La afectación mitocondrial influye directamente en la supervivencia celular. Especialmente las células y los tejidos que presentan un alto nivel de consumo de energía, tales como neuronas, son especialmente vulnerables. Por consiguiente, es probable que estas células y tejidos sean las que más respondan a una estrategia que selecciona como diana la función mitocondrial. Se abordó esta posibilidad evaluando la viabilidad de la línea de células ganglionares de la retina RGC-5, expuesta al inhibidor del complejo I mitocondrial rotenona, en ausencia o presencia de compuestos.

40 **Procedimiento experimental:** Se cultivaron células RGC-5 en condiciones ambientales (37°C, el 5% de CO<sub>2</sub>, humedad del 90%) en DMEM (glucosa 1 g/l; suero bovino fetal (FBS) al 10%, penicilina-estreptomicina-glutamina (PSG)). Se sembrarán células RGC-5 en DMEM (glucosa 1 g/l; FBS al 2%) en placas de cultivo celular BD Falcon™. Antes de la inhibición del complejo I inducida por rotenona, se pretrataron las células con el compuesto IA o vehículo. Para el tratamiento conjunto de compuesto IA con rotenona, se añadió nuevo compuesto junto con medios de cultivo celular que contenían rotenona. Después de la exposición a rotenona, se intercambiaron los medios y se reemplazaron por BSS de Hanks para el 1 día tras la incubación. Los medios de tratamiento posterior contenían el compuesto IA o vehículo solamente. Como medida de la viabilidad celular, se analizó el contenido celular de ATP usando la luminiscencia de la oxidación enzimática de luciferina dependiente de ATP por luciferasa. Se lavaron las células RGC-5 con PBS y se lisaron en tampón de lisis (EDTA 4 mM, Triton X-100 al 0,2%) a temperatura ambiente. En placas de 96 pocillos, se combinó tampón de medición de ATP (HEPES 25 mM, pH 7,25, D-luciferina 300 µM, luciferasa de luciérnaga 5 µg/ml, DTT 75 µM, MgCl<sub>2</sub> 6,25 mM, EDTA 625 µM y BSA 1 mg/ml) con lisado para iniciar la reacción. Se cuantificó la luminiscencia inmediatamente usando un lector de placas multimodo (Tecan M1000, software Tecan iControl 1.6; Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria). Se definieron los efectos sobre la viabilidad celular como el porcentaje de cambio mediado por compuesto en la viabilidad celular con relación a la reducción inducida por rotenona de la viabilidad celular. Se presentan los datos como media ± E.E.M. Se usó la prueba de la t de Student para datos apareados para comparar datos no normalizados. Se fijó la significación estadística a p<0,05 (\*), p<0,01 (\*\*) y p<0,001 (\*\*\*).

**Resultados:** En este sistema, la rotenona provocó una reducción de la viabilidad celular del 59% en células RGC-5 tratadas con DMSO, mientras que el compuesto IA rescató significativamente la viabilidad de células RGC-5 de manera dependiente de la dosis a concentraciones de ≥ 10 nM (véase la figura 1). El tratamiento con el compuesto

IA que incluyó una preincubación de 1 día medió en un rescate significativo en la viabilidad celular a 100 nM y 1000 nM, mientras que un tratamiento que incluyó una preincubación con el compuesto IA de 2 días medió en un rescate significativo de la viabilidad celular ya a 10 nM. Específicamente, la preincubación con el compuesto IA durante 1 día (figura 1, barras blancas) aumentó la viabilidad de RGC-5 en hasta el 26% (a 1  $\mu$ M), mientras que concentraciones de 1 y 10 nM mostraron un ligero efecto protector pero no significativo. En comparación con un pretratamiento durante 1 día (figura 1, barras blancas), la protección de la viabilidad celular mejoró significativamente mediante un pretratamiento durante 2 días (figura 1, barras negras). A concentraciones de 10 nM, 100 nM y 1000 nM, el compuesto IA aumentó significativamente la viabilidad celular en el 7%, el 35% y el 58%, respectivamente.

Se cree que la supervivencia celular de células neuronales está influenciada por factores neurotróficos tales como NGF. Por tanto, se considera que los compuestos que pueden inducir la expresión de factores neurotróficos tales como propentofilina son potencialmente neuroprotectores. Sin embargo, cuando se comparó el compuesto IA con propentofilina (figura 2) con respecto a un papel protector en el sistema de cultivo celular de disfunción mitocondrial descrito anteriormente, la propentofilina (100  $\mu$ M) no demostró una actividad protectora significativa ( $p > 0,05$ ) mientras que la protección de la supervivencia celular por el compuesto IA (1  $\mu$ M) fue altamente significativa ( $p = 0,0005$ ).

Fig. 1	Preincubación durante 1 día con el compuesto IA				Preincubación durante 2 días con el compuesto IA			
	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
media	4,0	4,8	12,6	25,9	1,0	7,3	34,9	58,4
D.E.	6,3	4,7	3,0	5,1	4,8	5,3	6,6	6,1
Fig. 2	Preincubación durante 1 día con el compuesto IA (IA) o propentofilina (PP)							
	IA	PP						
media	22,0	2,2						
D.E.	1,5	2,0						

**H. Modelo de ratón para enfermedades asociadas con la afectación mitocondrial en enfermedades oculares**

Este modelo de ratón se usa para evaluar el potencial terapéutico de compuestos en trastornos oculares caracterizado por disfunción mitocondrial tales como NOHL, AOAD, degeneración macular, retinopatía y deficiencia de complejo I. Es un modelo *in vivo* ampliamente aceptado basado en una inyección intravítrea en un solo ojo del inhibidor del complejo mitocondrial I rotenona en el ratón adulto. La inyección intravítrea de rotenona induce neurotoxicidad a través de la disfunción del complejo mitocondrial I en la retina que es la disfunción molecular principal asociada con la misma. El impacto del pretratamiento oral con los compuestos de prueba durante 3 semanas se evalúa histológicamente en integridad de la retina a diferentes puntos de tiempo después de la inyección de rotenona. El análisis histológico incluye la medición cuantitativa del grosor de la retina (retina completa y capas individuales), apoptosis de RGC y muerte celular, estrés oxidativo, expresión de glutamina sintetasa y gliosis. El ojo no inyectado se usa como control dentro del sujeto, es decir intraindividual.

**Procedimiento experimental (I):** Análisis histopatológicos de la degeneración de la retina

Se alojan individualmente ratones C57BL/6J silvestres macho (7 semanas de edad, aproximadamente 25 g de peso corporal) en jaulas Makrolon tipo II con lecho convencional y libre acceso a alimento y agua bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas regular (de 8 a.m. a 8 p.m.). Se tratan los ratones una vez al día durante 3 semanas con un intervalo de dosis del compuesto de prueba (de 20 a 2000 mg/kg de peso corporal en CMC al 0,5%) o con vehículo (CMC al 0,5%) administrados en la dieta (mezclados 1:1 con alimento en polvo esterilizado en autoclave complementado con el 10% de sacarosa; 5,5 g/día) o mediante sonda nasogástrica (v.o.; 10 ml/kg de peso corporal/día) antes de una inyección intravítrea en un solo ojo de rotenona (15 mM en DMSO, 1  $\mu$ l) o vehículo de DMSO (1  $\mu$ l). Se anestesian los ratones (mediante inhalación del 1,5% al 2% de isoflurano) y se inyecta rotenona (o vehículo de DMSO) en la cámara vítrea del ojo derecho usando una jeringa Hamilton de 10  $\mu$ l adaptada con una aguja pequeña. Se inserta la punta de la aguja en el hemisferio superior del ojo, al nivel de la pars plana y con un ángulo de 45° a través de la esclerótica. Se realiza la inyección a lo largo de un periodo de 2 min y se mantiene la aguja en su sitio durante 3 min adicionales, tras lo cual se retira suavemente. Se usa pegamento quirúrgico estéril (Histoacryl, BRAUN/Aesculap AG, Alemania) para sellar el sitio de la inyección y se aplica una pomada oftálmica antimicrobiana estéril (Neosporin, GlaxoSmithKline, RU) al ojo inyectado para evitar cualquier infección. Se devuelven entonces los ratones a sus jaulas domésticas en donde se exponen de manera continua al compuesto de prueba (o vehículo) hasta que se sacrifican para el análisis histológico (1 y 7 días tras la inyección de rotenona). En resumen, se anestesian los ratones son mediante inyección i.p. de ketamina/xilazina (2/1, 200  $\mu$ l) y posteriormente se perfunden por vía intracardiaca con una disolución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB 0,1 M) para la fijación del ojo. Se extraen los globos oculares, se disecan las retinas, se fijan durante 2 h adicionales a 4°C, se incuban en PB 0,1 M y sacarosa al 30% durante la noche, se congelan en compuesto de temperatura de corte óptima (O.C.T., Tissue-Tek, Miles Laboratories, Elkhart, EN, EE.UU.), se cortan a 14  $\mu$ m y se recogen sobre portaobjetos de vidrio para la inmunotinción. Se realiza la inmunotinción por consiguiente según un método convencional usando anticuerpos primarios múltiples. Se usan anticuerpos secundarios conjugados fluorescentes y DAPI para la visualización bajo un microscopio de fluorescencia. Se realizan todos los procedimientos según la

regulación Suiza y con una licencia aprobada por el "Kantonales Veterinäramt Basel-Land".

5 Resultados: En un primer estudio, el pretratamiento de ratones C57/B6 adultos con compuesto IA (400 y 2000 mg/kg/día) durante 3 semanas mostró fuertes efectos protectores frente a la toxicidad de la inyección intravítrea del inhibidor del complejo I rotenona, con respecto a múltiples criterios de valoración relacionados con NOHL tales como muerte celular de células ganglionares de la retina (RGC), grosor reducido de la retina, gliosis y expresión de glutamina sintetasa. Los resultados se muestran en la tabla 5 a continuación.

Tabla 5

Tratamiento/criterio de valoración	Número de RGC	Grosor de la retina	Gliosis	Glutamina sintetasa
Inyectado de manera simulada (DMSO)	100 ± 12,2 (n=3)	100 ± 4,1 (n=6)	100 ± 9,7 (n=6)	100 ± 0,5 (n=3)
Vehículo + rotenona	73,5 ± 2,9 (n=3)	61,5 ± 3,9 (n=4)	241,4 ± 33,7 (n=4)	89,4 ± 3,3 (n=6)
IA 400 + rotenona	94,6 ± 3,2 ** (n=3)	84,3 ± 2,9 ** (n=3)	112,7 ± 11,9* (n=3)	98,5 ± 1,9 (n=5)
IA 2000 + rotenona	101,3 ± 11,3 (n=3)	76,9 ± 10,1 (n=4)	134,7 ± 10,7 * (n=3)	99 ± 2,9 * (n=6)

10 En la tabla 5, se expresan los datos histológicos como % del control inyectado de manera simulada (DMSO) ± EEM. El número de RGC se basa en células RGC / mm<sup>2</sup> en el 1 día tras la inyección; el grosor de la retina (µm) se basa en 7 días tras la inyección; la gliosis se basa en unidades relativas de fluorescencia (RFU) de la inmunotinción específica de GFAP a los 7 días tras la inyección; la glutamina-sintetasa (GS) se basa en unidades relativas de fluorescencia (RFU) de inmunotinción específica de GS 1 día tras la inyección. IA 400 significa un pretratamiento con compuesto IA a 400 mg/kg, de manera similar IA 2000 significa un pretratamiento con compuesto IA a 2000 mg/kg. La significación estadística con relación al grupo de vehículo + rotenona es p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*). n es el número de retinas por grupo.

15 Se repitieron estos resultados en un segundo estudio *in vivo* con la inclusión de una concentración inferior del compuesto IA (concretamente 200 mg/kg/día), usando el mismo sistema modelo. Se usó un método de inyección modificado, menos invasivo para minimizar adicionalmente el daño provocado por la propia inyección. Como consecuencia no se detectó una reducción significativa en el número de RGC 24 h después de la inyección de rotenona y por consiguiente, no pudo demostrarse un efecto protector en este punto de tiempo. No obstante, 7 días después de la exposición a rotenona, los números de RGC se redujeron significativamente (< 35% de células residuales) en comparación con el control inyectado con vehículo (tabla 2). En estas condiciones, el compuesto IA mostró una protección significativa de la supervivencia de RGC a dosis de 400 y 2000 mg/kg y una tendencia (p = 0,102) hacia la protección a una dosis de 200 mg/kg. El compuesto IA también protegió significativamente frente a la disminución del grosor de la retina 7 días después de la inyección de rotenona (tabla 2). Mientras que la rotenona, en promedio, redujo el grosor de la retina desde aproximadamente 300 µm (inyectado de manera simulada) hasta 220 µm (inyectado con rotenona), el pretratamiento con compuesto IA impidió esta reducción en un grado diferente dependiendo de la concentración. Los animales pretratados compuesto IA con 200 mg/kg mostraron protección del grosor de la retina (272 µm), aunque este efecto no alcanzó la significación (p = 0,1347). A 400 mg/kg de compuesto IA, se observó una protección significativa clara (269 µm; p = 0,03), mientras que a 2000 mg/kg se detectó una tendencia protectora fuerte (258 µm; p = 0,06). Además, en respuesta a rotenona, era evidente una señal fuerte específica de GFAP asociada a fibras, indicativa de gliosis, después de 7 días, que se redujo en gran medida mediante el compuesto IA. Los datos obtenidos se resumen en la tabla 6 a continuación.

Tabla 6

Tratamiento	Número de RGC	Grosor de la retina	Gliosis
S+V	100 ± 7,33 (n=8)	100 ± 5,2 (n=6)	100 ± 9,7 (n=7)
R+V	34,79 ± 9 (n=3)	73,74 ± 7,92 (n=3)	178,14 ± 21,6 (n=3)
R + IA 200	62,53 ± 9,13 (n=7)	91,17 ± 5,72 (n=8)	124,46 ± 7,37 * (n=7)
R + IA 400	63,68 ± 5,98 * (n=6)	89,93 ± 2,16 * (n=6)	125,04 ± 9,12 * (n=6)
R + IA 2000	64,44 ± 4,56 * (n=8)	86,58 ± 2,51 (n=8)	129,86 ± 7,32 * (n=7)

35 En Tabla 6, se expresan los datos histológicos a los 7 días tras la inyección como el % de del control inyectado de manera simulada (DMSO) ± EEM. El número de RGC se basa células RGC / mm<sup>2</sup>; el grosor de la retina se mide en

$\mu\text{m}$  y la gliosis se basa en unidades relativas de fluorescencia (RFU) de inmunotinción específica de GFAP. “S” dentro de la tabla 6 significa inyectado de manera simulada (DMSO); “V” significa tratado con vehículo; “R” significa inyectado con rotenona. El término IA 200 define un tratamiento con compuesto IA a una concentración de 200 mg/kg; de manera similar, IA 400 e IA 2000: definen un tratamiento con compuesto IA a 400 mg/kg y a 2000 mg/kg, respectivamente. La significación estadística con relación al grupo de vehículo + rotenona se expresa como  $p \leq 0,05$  (\*). n designa el número de retinas por grupo.

#### Procedimiento experimental (II): Pruebas optomotoras

Puesto que la pérdida de RGC está asociada con alteración de la agudeza visual, se sometió a prueba si el efecto neuroprotector del compuesto de prueba IA también se correlaciona con una recuperación de la función visual. Para este fin, se detectó la agudeza visual mediante la cuantificación de la respuesta optomora de animales sometidos al sistema de prueba descrito anteriormente. Se midió la respuesta optomora tal como se describió previamente (véase Jellali A., Meziane H., Ouagazzal A-M., *et al.* Vis. Res., 2005). Se colocaron ratones en una plataforma central rodeada por un tambor motorizado con tiras verticales blancas y negras que puede rotar en ambos sentidos, horario y antihorario, a diferentes velocidades (que pueden ajustarse para provocar la respuesta cinética óptima), y bajo niveles de luz constantes. Se permitió que los ratones se habituaran durante 5 min a las condiciones experimentales antes de que se hicieran rotar las tiras alternativamente en sentido horario y antihorario, durante 2 min en cada sentido y con un intervalo de 30 s entre las dos rotaciones. Se grabaron los ratones en un ordenador usando una cámara de video digital montada por encima del aparato para puntuar posteriormente el número de movimientos de la cabeza mediante recuento manual. Se puntuaron los movimientos de la cabeza sólo cuando la velocidad angular del giro de la cabeza se correspondía con la rotación del tambor. Después de la adquisición y codificación por un investigador, un segundo investigador ciego para el tratamiento realizó todas las evaluaciones. Un tercer investigador rompió los códigos tras la finalización de la adquisición de datos. Se sometió a prueba cada ratón a diferentes puntos de tiempo y el aparato se limpiará entre ratones. Los datos se presentarán como media  $\pm$  EEM. Se usará la prueba de la t de Student para datos apareados y análisis de la varianza (ANOVA) para comparar datos no normalizados. La significación estadística se fijará a  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*).

Tabla 7: Efecto de pretratamiento con idebenona sobre la agudeza visual en un modelo de ratón *in vivo* para NOHL.

Tiempo tras la inyección (días)	Número de movimientos de la cabeza	
	Vehículo	Idebenona (2000 mg/kg)
-7	7,6 $\pm$ 1,2 (n=5)	9,7 $\pm$ 0,7 (n=7)
1	0 $\pm$ 0 (n=5)	0 $\pm$ 0 (n=7)
7	0 $\pm$ 0 (n=5)	0,5 $\pm$ 0,5 (n=7)
14	0 $\pm$ 0 (n=5)	1,8 $\pm$ 0,8 (n=7)
21	0 $\pm$ 0 (n=5)	2,8 $\pm$ 1,4 (n=7)
28	0 $\pm$ 0 (n=5)	2,8 $\pm$ 1,4 (n=7)
35	0,4 $\pm$ 0,4 (n=5)	3,5 $\pm$ 1,5 (n=7)
56	0 $\pm$ 0 (n=3)	6 $\pm$ 2,1 (n=4)

La cuantificación de la agudeza visual del ratón se basó en la respuesta optomora en ratones pretratados durante 3 semanas con vehículo e idebenona 2000 mg/kg en la dieta. Los resultados se expresan como la media de movimientos de la cabeza/2 min  $\pm$  EEM; n = número de ratones por grupo.

Cuantificación de la respuesta optomora 5 semanas después de la inyección de rotenona 1 y 5 mM. Se trataron los ratones durante 3 semanas con vehículo e idebenona 2000 mg/kg en la dieta antes de la inyección de rotenona. Se examinó la respuesta optomora en ambos sentidos de movimiento horario (a) y antihorario (b), reflejando el seguimiento en sentido horario y antihorario de los movimientos de la cabeza la agudeza visual del ojo inyectado con rotenona (izquierdo) y no inyectado (derecho), respectivamente. Número de movimientos de la cabeza en sentido horario/2 min: vehículo + rotenona 1 mM = 0,5  $\pm$  0,5 (n = 2), vehículo + rotenona 5 mM = 0,4  $\pm$  0,4 (n = 5), idebenona 2000 mg/kg + rotenona 1 mM = 9  $\pm$  2 (n = 2), idebenona 2000 mg/kg + rotenona 5 mM = 3,5  $\pm$  1,5 (n = 7). Número de movimientos de la cabeza en sentido antihorario/2 min: vehículo + rotenona 1 mM = 12  $\pm$  0 (n = 2), vehículo + rotenona 5 mM = 13,6  $\pm$  1 (n = 5), idebenona 2000 mg/kg + rotenona 1 mM = 12,5  $\pm$  4,5 (n = 2), idebenona 2000 mg/kg + rotenona 5 mM = 10,5  $\pm$  0,6 (n = 6). Los resultados se expresan como la media de movimientos de la cabeza/2 min  $\pm$  EEM; n = número de ratones por grupo; id2000 = idebenona 2000 mg/kg de peso corporal.

#### Resultados:

Después de la inyección intravítrea de rotenona, los animales que se trataron de manera simulada perdieron la agudeza visual (evidenciado por una pérdida total de movimientos de la cabeza en sentido horario). Sin embargo, los animales pretratados por vía oral con compuesto de prueba IA recobraron la agudeza visual a lo largo de un periodo de 56 días (tabla 7, figuras 3 y 4).

#### I. Análisis farmacocinético del compuesto de prueba y metabolitos relacionados en plasma y fluidos oculares

El análisis farmacocinético de compuestos de prueba después de la administración oral tiene como objetivo determinar su biodisponibilidad y aclaramiento en el plasma y en los fluidos oculares (humor acuoso y vítreo). Los compuestos de prueba se cuantifican en el plasma y en el humor acuoso y vítreo después del tratamiento agudo y repetido (con diferentes vías de administración). Entonces se determina la concentración dependiente del tiempo y se calculan los parámetros farmacocinéticos ( $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$ ,  $t_{max}$ ).

**Procedimiento experimental:** Se alojan individualmente ratones C57BLJ6J silvestres macho (7 semanas de edad, aproximadamente 25 g de peso corporal) en jaulas Makrolon tipo II con lecho convencional y libre acceso a alimento y agua bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas regular (de 8 a.m. a 8 p.m.). Los ratones reciben dosis orales repetidas diariamente o individuales de los compuestos de prueba (que oscilan entre 20 y 2000 mg/kg de peso corporal) o el vehículo administradas a través de la dieta o mediante sonda nasogástrica al final de la fase de luz. El tratamiento puede ir seguido de un periodo de lavado. Se toman muestras para el análisis farmacocinético a diferentes intervalos de tiempo tras la administración del compuesto. Se anestesian los ratones mediante inhalación de isoflurano al 5% en una cámara de inducción y se sacrifican mediante dislocación cervical. Se recoge sangre del corte de la cabeza para la extracción de plasma. Se disecan los globos oculares para recoger el humor acuoso y vítreo. Se congelan instantáneamente las muestras en nitrógeno líquido y se almacenan (-80°C) hasta que se analizan mediante CK-EM/EM y por consiguiente según procedimientos normalizados. Todos los procedimientos con ratones se realizan según la regulación Suiza y con una licencia aprobada por el "Kantonales Veterinäramt Basel-Land".

Se evaluó el perfil farmacocinético de idebenona (compuesto IA), tras una sola dosis por sonda nasogástrica oral a ratones macho. Tras una sola dosis oral de 400 mg/kg las concentraciones de idebenona en plasma, y humores vítreo y acuoso alcanzaron generalmente un máximo en el primer tiempo de toma de muestras (15 min tras la dosis), lo que sugiere una rápida absorción y una rápida captación de idebenona en el ojo (tabla 8). Después de eso, las concentraciones de idebenona en plasma, y humores vítreo y acuoso disminuyeron generalmente a lo largo de un periodo tras la dosis de 6 h, lo que sugiere una falta de secuestro de idebenona en el ojo. Además, la razón (humor vítreo/plasma y humor acuoso/plasma) parecía ser independiente del tiempo tras la dosis, lo que concuerda con una falta de acumulación de idebenona en el ojo. El grado global de exposición a idebenona en el humor vítreo, tal como se mide mediante  $AUC_{0-6 h}$ , representó aproximadamente el 2% del observado en plasma (razón vítreo/plasma; tabla 8). De manera similar, el grado de exposición a idebenona en el humor acuoso representó aproximadamente el 3% del observado en plasma (razón acuoso/plasma; tabla 8).

La semivida terminal aparente ( $t_{1/2}$ ) de idebenona en plasma era de 1,70 h, respectivamente (tabla 8). (Las semividas terminales aparentes  $t_{1/2}$  de idebenona no pudieron estimarse en el humor vítreo y en el humor acuoso, debido a datos limitados).

Tabla 8 Parámetros farmacocinéticos del compuesto IA, en plasma, humor vítreo y humor acuoso tras una sola administración oral a 400 mg/kg a ratones macho.

Plasma						
Analito	$C_{max}$ (ng/ml)	$t_{max}$ (h)	$AUC_{0-6 h}$ (ng.h/ml)	$AUC_{0-\infty}$ (ng.h/ml)	$\lambda_z$ (/h)	$t_{1/2}$ (h)
IA	1070	0,25	1857	1963	0,409	1,70

Humor vítreo								
Analito	$C_{max}$ (ng/ml)	$t_{max}$ (h)	$AUC_{0-6 h}$ (ng.h/ml)	$AUC_{0-\infty}$ (ng.h/ml)	$\lambda_z$ (/h)	$t_{1/2}$ (h)	Acuoso/plasma	
							$C_{max}$	$AUC_{0-6 h}$
IA	37,9	0,25	38,1	NC	NC	NC	0,0354	0,0205

Humor acuoso								
Analito	$C_{max}$ (ng/ml)	$t_{max}$ (h)	$AUC_{0-6 h}$ (ng.h/ml)	$AUC_{0-\infty}$ (ng.h/ml)	$\lambda_z$ (/h)	$t_{1/2}$ (h)	Acuoso/plasma	
							$C_{max}$	$AUC_{0-6 h}$
IA	86,2	0,25	62,6	NC	NC	NC	0,0806	0,0337

NC: No calculado; no pudo identificarse inequívocamente una fase monoexponencial terminal

Resultados:

En resumen, tras una administración con sonda nasogástrica o en la dieta oral del compuesto IA al ratón, hubo una rápida absorción de idebenona a partir del tracto GI.

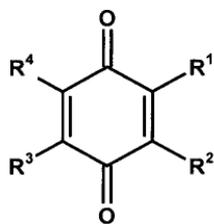
Sorprendentemente, se observó una rápida recaptación de idebenona al interior del ojo, es decir los humores vítreo y acuoso del ratón (máximo < 15 min tras la dosis). Por lo que conocen los autores, no hay precedentes en la bibliografía de cualquier estudio que se refiera al examen de los niveles oculares del compuesto IA. En particular, no hay precedentes de ninguna medición de los niveles oculares de idebenona después de una administración oral simple (mediante sonda nasogástrica o en la dieta).

5 Por tanto, se encontró sorprendentemente que una dosificación oral simple (mediante sonda nasogástrica o en la dieta) da como resultado suficientes niveles del compuesto IA en el ojo como para que ejerza efectos beneficiosos sobre enfermedades mitocondriales como NOHL, atrofia óptica autosómica dominante (AOAD), degeneración macular, glaucoma, retinopatía, cataratas, drusas del disco óptico (DDO), miopatía mitocondrial, encefalomiopatía, acidosis láctica, síntomas similares a un accidente cerebrovascular (MELAS), epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas (MERRF), encefalomiopatía mioneurogastrointestinal (EMNGI), síndrome de Kearns-Sayre, deficiencia de CoQ10 o deficiencias de complejo mitocondrial (1-5, OEPC) ya que todas estas enfermedades están asociadas con un fenotipo oftalmológico.

10 Las concentraciones correspondientes del compuesto IA en humor vítreo y acuoso aumentaron de manera aproximadamente proporcional a la dosis. Por tanto, como una importante característica con respecto a la capacidad de desarrollo terapéutico, el compuesto IA (IA) presenta una cinética de absorción lineal de los fluidos oculares, puesto que la razón ratio (humor vítreo/plasma y humor acuoso/plasma) es independiente de la dosis usada. Además, no hubo acumulación del compuesto IA en el ojo, puesto que la razón (humor vítreo/plasma y humor acuoso/plasma) es independiente de la duración de la dosificación o el tiempo tras la dosificación. Tampoco se  
15 encontró secuestro del compuesto IA en el ojo.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto representado por la siguiente fórmula general (I)

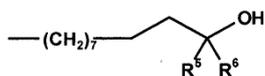


(I)

y los enantiómeros, tautómeros, solvatos o sales farmacéuticamente aceptables del mismo,

5 en la que

R<sup>1</sup> es un sustituyente representado por la fórmula (II):



(II)

en la que

R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son ambos átomos de hidrógeno, o

10 R<sup>5</sup> es un átomo de hidrógeno y R<sup>6</sup> es un grupo etilo, o

R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son ambos grupos metilo,

R<sup>2</sup> es un grupo metilo,

R<sup>3</sup> es un grupo metoxilo, y

R<sup>4</sup> es un grupo metoxilo;

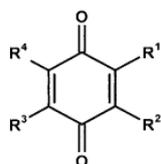
15 para su uso en el tratamiento de una enfermedad mitocondrial, en la que la enfermedad mitocondrial se selecciona del grupo que consiste en neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL), atrofia óptica autosómica dominante (AOAD), degeneración macular, glaucoma, retinopatía, cataratas y drusas del disco óptico (DDO).

2. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son ambos átomos de hidrógeno.

20 3. Compuesto para su uso según la reivindicación 2, en el que el compuesto se administra por vía oral.

4. Compuesto para su uso según la reivindicación 3, en el que la enfermedad mitocondrial se selecciona del grupo que consiste en neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL), atrofia óptica autosómica dominante (AOAD), degeneración macular y glaucoma.

5. Uso de un compuesto según la fórmula general (I)



(I)

25 en la que R<sup>1</sup> a R<sup>4</sup> son tal como se definen en la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento en el tratamiento de una enfermedad mitocondrial, en la que la enfermedad mitocondrial se selecciona del grupo que consiste en neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL), atrofia óptica autosómica dominante (AOAD), degeneración macular, glaucoma, retinopatía, cataratas y drusas del disco óptico (DDO).

30

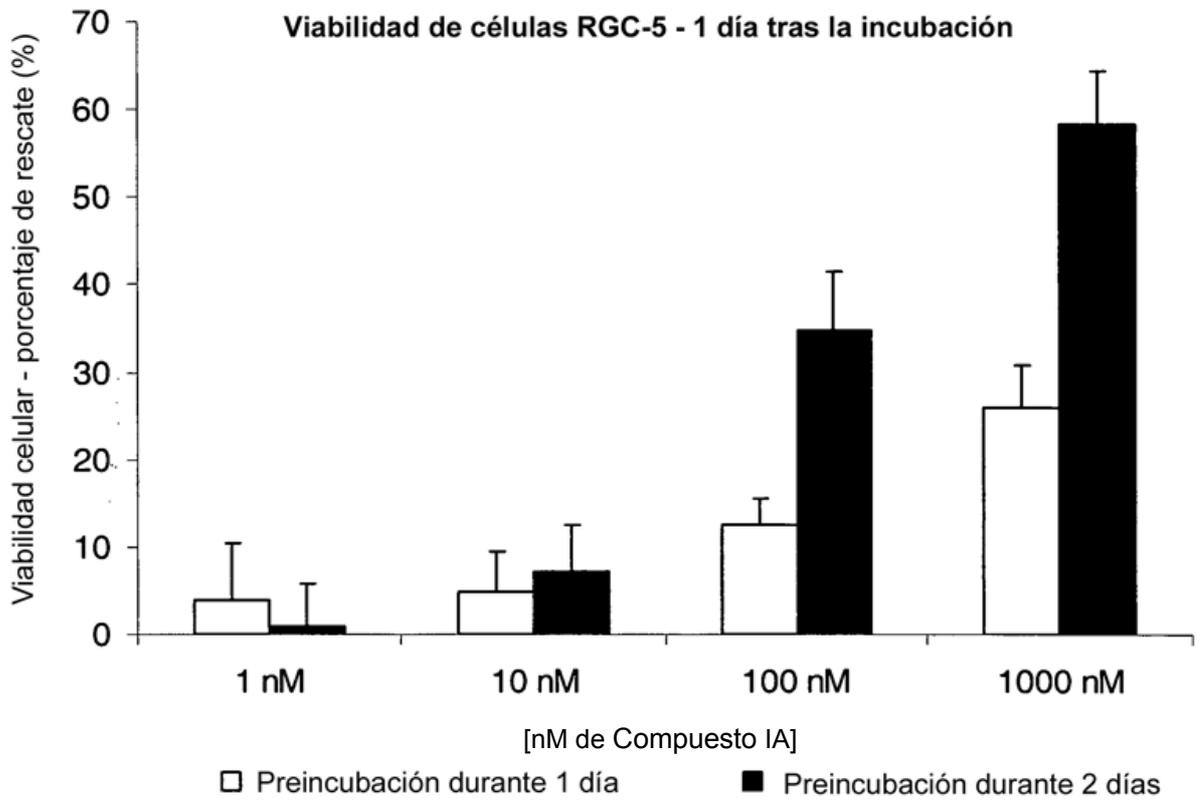


Figura 1: Efecto del compuesto IA sobre la supervivencia celular de células RGC en respuesta a disfunción mitocondrial por rotenona

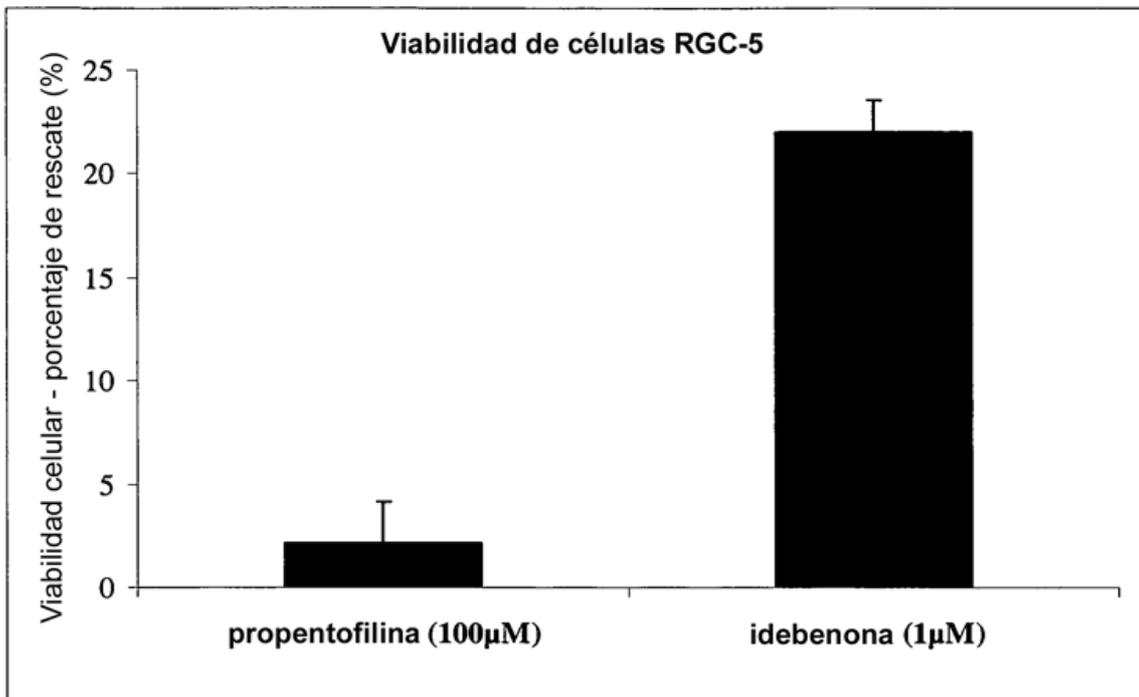


Figura 2: Comparación del compuesto IA y propentofilina sobre la supervivencia celular de células RGC en respuesta a la afectación mitocondrial por rotenona. Aunque la protección celular por propentofilina no fue significativa ( $p > 0,05$ ), el efecto del compuesto IA fue altamente significativo ( $p = 0,0005$ ).

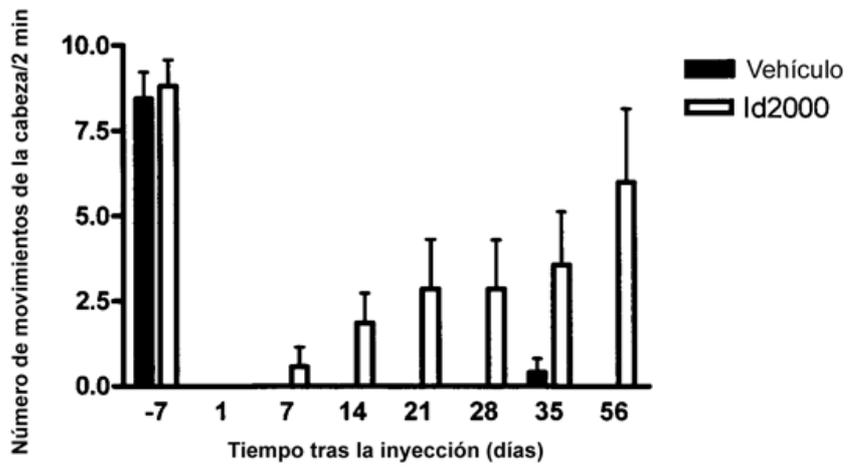


Figura 3: Efecto del pretratamiento con el compuesto IA sobre la agudeza visual en un modelo de ratón *in vivo* para trastornos oculares caracterizados por disfunción mitocondrial.