

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 190**

51 Int. Cl.:

**C07D 311/66** (2006.01)

**A61K 31/353** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**A61Q 19/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2013 PCT/NL2013/050528**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14011047**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2013 E 13759838 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2872497**

54 Título: **Derivados de cromanilo para tratar una enfermedad mitocondrial**

30 Prioridad:

**12.07.2012 EP 12176128**  
**12.07.2012 US 201261670644 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.07.2017**

73 Titular/es:

**KHONDRION IP B.V (100.0%)**  
**Van Heemstraweg 49 e**  
**6641 AA Beuningen (Gld), NL**

72 Inventor/es:

**BLAAUW, RICHARD HENDRIK;**  
**LEENDERS, RUBEN GERARDUS GEORGE;**  
**STERK, GEERT JAN y**  
**HERMKENS, PEDRO HAROLD HAN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 622 190 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 cromanilo para tratar una enfermedad mitocondrial

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere al campo de las enfermedades humanas y animales y de los productos cosméticos. La invención se refiere en particular a compuestos tales como los derivados de Trolox™ para tratar afecciones que están asociadas a la disfunción mitocondrial o las deficiencias mitocondriales, que incluyen los efectos farmacológicos adversos que provocan la disfunción mitocondrial, para tratar enfermedades neoplásicas y para el uso cosmético contra el envejecimiento de la piel.

**Antecedentes de la invención**

10 Las mitocondrias son orgánulos esenciales que constituyen las "centrales energéticas" de la célula. Los defectos en estos orgánulos conducen a menudo a una diversidad de trastornos metabólicos graves que afectan a los órganos que tienen una necesidad elevada de energía, tales como el músculo y el cerebro. Con una incidencia de al menos 1 de 5000 individuos, se reconoce como el grupo más frecuente de errores congénitos del metabolismo. Además, debido a que las mitocondrias desencadenan la muerte celular programada (apoptosis), los defectos de estos orgánulos tienen consecuencias mucho más allá de las enfermedades, lo que inicialmente llamó la atención sobre ellos, y se ha demostrado su implicación en el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson. Muchos fármacos usados habitualmente como los NRTIs, ciertos antibióticos y fármacos anti-epilépticos, pueden provocar la disfunción mitocondrial. Hasta ahora no existe un tratamiento eficaz para curar o mejorar estos estados patológicos.

20 Una de las funciones principales de las mitocondrias es la fosforilación oxidativa (OXPHOS). La molécula de trifosfato de adenosina (ATP) funciona como una "moneda" energética o portador de energía en la célula, y las células eucarióticas obtienen la mayoría de su ATP de procesos bioquímicos llevados a cabo por las mitocondrias, que incluyen el ciclo del ácido cítrico, que genera NADH + H<sup>+</sup> reducido a partir de NAD<sup>+</sup> oxidado, y OXPHOS, durante la cual se oxida NADH + H<sup>+</sup> de vuelta a NAD<sup>+</sup>. Los electrones liberados por la oxidación de NADH + H<sup>+</sup> se transfieren a una serie de complejos proteicos (Complejo I, Complejo II, Complejo III, y Complejo IV) conocidos como la cadena respiratoria mitocondrial. Estos complejos están incrustados en la membrana interna de la mitocondria. El Complejo IV, al final de la cadena, transfiere los electrones al oxígeno, que se reduce a agua. La energía liberada a medida que estos electrones atraviesan los complejos se usa para generar un gradiente de protones a través de la membrana interna de la mitocondria, que crea un potencial electroquímico a través de la membrana interna. Otro complejo proteico, el Complejo V (que no está asociado directamente a los Complejos I, II, III y IV) usa la energía almacenada por el gradiente electroquímico para convertir ADP en ATP.

35 La contribución de la disfunción mitocondrial a la enfermedad humana ya se reconoció a finales de la década de 1980, cuando se descubrió que las mutaciones puntuales de herencia materna, así como las deleciones que surgen espontáneamente durante el desarrollo, están asociadas a síndromes neurológicos infrecuentes. La disfunción mitocondrial contribuye a diversos estados patológicos. Algunas enfermedades mitocondriales se deben a mutaciones o deleciones en el genoma mitocondrial. Si una proporción umbral de las mitocondrias de la célula son defectuosas, y si una proporción umbral de tales células dentro de un tejido tienen mitocondrias defectuosas, se pueden generar síntomas de disfunción del tejido u órgano. Prácticamente cualquier tejido puede verse afectado, y puede existir una gran diversidad de síntomas, dependiendo del grado en el que estén implicados los diferentes tejidos. Algunos ejemplos de enfermedades mitocondriales son la ataxia de Friedreich (FRDA), neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL), atrofia óptica dominante (AOD); miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica, y accidente cerebrovascular (MELAS), síndrome de epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas (MERRF), síndrome de Leigh, y trastornos de la fosforilación oxidativa. La mayoría de enfermedades mitocondriales afectan a niños que manifiestan signos y síntomas de envejecimiento acelerado, que incluyen enfermedades neurodegenerativas, accidente cerebrovascular, ceguera, deterioro auditivo, diabetes, e insuficiencia cardíaca.

45 Existen muy pocos tratamientos para los pacientes que padecen estas enfermedades mitocondriales. Se ha aprobado el fármaco idebenona (una variante de CoQ<sub>10</sub>) para el tratamiento de la ataxia de Friedreich (Bénit et al., 2010, Trends Mol Med, 16:210-7; Klopstock et al., 2011, Brain, 134:2677-86). Otro compuesto, MitoQ<sub>10</sub> (mitoquinona), se ha propuesto para tratar los trastornos mitocondriales (documento US 7.179.928), pero todavía no se ha informado de los resultados clínicos de MitoQ. Se ha desarrollado con éxito una estrategia de tratamiento para los pacientes con un trastorno mitocondrial secundario asociado a la distrofia muscular congénita de Ullrich y la miopatía de Bethlem. El mecanismo patogénico en estas miopatías implica una apertura inadecuada del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial. Esta acción se previno en pacientes tratados con el desensibilizador del poro de transición de la permeabilidad CSA (ciclosporina A; Angelin et al., 2007, Proc Natl Acad Sci U S A, 104:991-6; Merlini et al., 2008, Proc Natl Acad Sci U S A, 105:5225-9).

Se puede hallar un resumen de los ensayos clínicos actuales relacionados con las enfermedades mitocondriales en línea ([www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=mitochondrial+disease](http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=mitochondrial+disease)); estos incluyen estudios de CoQ<sub>10</sub> para el tratamiento de la debilidad muscular y las enfermedades mitocondriales, suplementos alimenticios para MELAS, EPI-

743 para las enfermedades mitocondriales, hormona del crecimiento humana para la obesidad, terapia nutricional para la diabetes, pioglitazona para la diabetes, idebenona para MELAS, y vitamina E para la deficiencia de proteína trifuncional mitocondrial.

5 El documento WO 2012/019032 describe métodos de tratamiento, prevención, o inhibición de los síntomas asociados a un trastorno mitocondrial y/o de modulación, normalización, o mejora de uno o más biomarcadores de energía, por el cual se administran análogos de vitamina K.

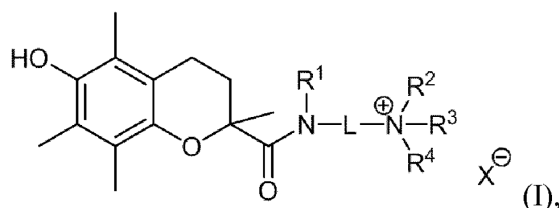
El documento WO 2012/019029 describe métodos de tratamiento, prevención, o inhibición de los síntomas asociados a un trastorno mitocondrial y/o de modulación, normalización, o mejora de uno o más biomarcadores de energía, por el cual se administran naftoquinonas y derivados de las mismas.

10 Distelmaier et al. (Antioxid Redox Signal. 2012, 13 de junio (en prensa), PMID 22559215) describe que Trolox™ (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) reduce los niveles de ROS, incrementa la filamentación mitocondrial mediada por mitofusinas y la expresión del complejo I mitocondrial, la actividad de la citrato sintasa y las enzimas de OXPHOS y el consumo celular de O<sub>2</sub> en fibroblastos cutáneos humanos sanos cultivados.

15 Sin embargo, todavía existe la necesidad en la técnica de medios eficaces para modular la función mitocondrial para usarlos en tratamientos de enfermedades mitocondriales y/o afecciones asociadas a la disfunción mitocondrial, en el tratamiento de enfermedades neoplásicas o para uso cosmético.

### Sumario de la invención

En un primer aspecto la invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I)



20 en la que

- L es un ligador que comprende de 1 a 10 átomos de esqueleto sustituidos opcionalmente, seleccionados de carbono, nitrógeno y oxígeno; y
- R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> están unidos entre sí para formar un segundo ligador entre el átomo de nitrógeno de amida y el átomo de nitrógeno catiónico, o R<sup>1</sup> está unido a un átomo de esqueleto del ligador L en una estructura cíclica y/o R<sup>2</sup> está unido a un átomo de esqueleto del ligador L en una estructura cíclica; y
- R<sup>3</sup> se selecciona de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, en el que el resto alquilo puede estar sustituido con uno o más átomos de halógeno o restos (halo)alcoxi, o R<sup>3</sup> está ausente cuando el átomo de nitrógeno catiónico es parte de un resto imina; y
- R<sup>4</sup> se selecciona de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, en el que el resto alquilo puede estar sustituido con uno o más átomos de halógeno o restos (halo)alcoxi; y
- X<sup>-</sup> es un anión farmacéuticamente aceptable.

Preferiblemente el compuesto según la invención es un compuesto en el que:

- L = L<sup>1</sup>, R<sup>1</sup>-R<sup>2</sup> = L<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H, X = Cl; o
- 35 - L = L<sup>1</sup>, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
- L = L<sup>2</sup>, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
- L = L<sup>3</sup>, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
- L = L<sup>4</sup>, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = ausente, R<sup>4</sup> = H; X = TFA; o
- L = L<sup>5</sup>, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = ausente, R<sup>4</sup> = H; X = TFA; o
- 40 - L = L<sup>6</sup>, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = ausente, R<sup>4</sup> = H; X = TFA; o
- L = L<sup>3</sup>, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Me, R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = Me; X = I; o

- $L = L^1, R^1 = H, R^2 = Me, R^3 = Me, R^4 = Me; X = I; o$
- $L = L^7, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = \text{ausente}, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^8, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = \text{ausente}, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^9, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = \text{ausente}, R^4 = H; X = Cl; o$
- 5 -  $L = L^{10}, R^1-R^1 = L^1, R^2 = H, R^3 = \text{ausente}, R^4 = H; X = TFA; o$
- $L = L^{11}, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^1, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = \text{ausente}, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^{13}, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^{14}, R^1 = H, R^1 = H, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl; o$
- 10 -  $L = L^{15}, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^{11}, R^1 = H, R^2 = Me, R^3 = Me, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^{16}, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^{17}, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^{16}, R^1 = H, R^2 = Me, R^3 = Me, R^4 = H; X = Cl; o$
- 15 -  $L = L^{18}, R^1 = H, R^2-R^2 = L^3, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^{19}, R^1 = H, R^2-R^2 = L^3, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^{20}, R^1 = H, R^2 = H, R^6-R^6 = L^3, R^3 = \text{ausente}, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^{21}, R^1 = H, R^2-R^2 = L^1, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^{22}, R^1-R^1 = L^1, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl; o$
- 20 -  $L = L^{23}, R^1-R^1 = L^1, R^2 = H, R^3 = H, R^3 = H; X = Cl; o$
- $L = L^{24}, R^1-R^1 = L^3, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^{25}, R^1-R^1 = L^3, R^2 = H, R^3 = \text{ausente}, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^{26}, R^1 = H, R^2 = H, R^6-R^6 = L^1, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^{19}, R^1 = H, R^2-R^2 = L^3, R^3 = Me, R^4 = H; X = Cl; o$
- 25 -  $L = L^{19}, R^1 = H, R^2-R^2 = L^1, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^{21}, R^1 = H, R^2-R^2 = L^1, R^3 = Me, R^4 = H; X = Cl.$

En una realización preferida, el compuesto según la invención es un compuesto en el que:

- $L = L^5, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = \text{ausente}, R^4 = H; X = TFA; o$
- $L = L^8, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = \text{ausente}, R^4 = H; X = Cl; o$
- 30 -  $L = L^{11}, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^1, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = \text{ausente}, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^{17}, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^{16}, R^1 = H, R^2 = Me, R^3 = Me, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^{19}, R^1 = H, R^2-R^2 = L^3, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl; o$
- 35 -  $L = L^{21}, R^1 = H, R^2-R^2 = L^1, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^{26}, R^1 = H, R^2 = H, R^5-R^5 = L^1, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl; o$
- $L = L^{19}, R^1 = H, R^2-R^2 = L^3, R^3 = Me, R^4 = H; X = Cl; o$

-  $L = L^{21}$ ,  $R^1 = H$ ,  $R^2-R^{2'} = L^1$ ,  $R^3 = Me$ ,  $R^4 = H$ ;  $X = Cl$ .

En otra realización preferida, el compuesto según la invención es un compuesto en el que:

-  $L = L^3$ ,  $R^1 = H$ ,  $R^2 = Me$ ,  $R^3 = Me$ ,  $R^4 = Me$ ;  $X = I$ ; o

-  $L = L^1$ ,  $R^1 = H$ ,  $R^2 = Me$ ,  $R^3 = Me$ ,  $R^4 = Me$ ;  $X = I$ .

5 En un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica o cosmética que comprende un compuesto según la invención.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un compuesto según la invención para el uso como medicamento.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un compuesto según la invención para el uso en la modulación de al menos uno de la morfología mitocondrial y la expresión de enzimas de OXPHOS.

10 En un quinto aspecto, la invención se refiere a un compuesto según la invención para el uso en el tratamiento, la prevención, o la inhibición de los síntomas asociados a un trastorno mitocondrial o a una afección asociada a la disfunción mitocondrial, en el que el compuesto es preferiblemente un compuesto en el que:

-  $L = L^5$ ,  $R^1 = H$ ,  $R^2 = H$ ,  $R^3 = \text{ausente}$ ,  $R^4 = H$ ;  $X = TFA$ ; o

-  $L = L^8$ ,  $R^1 = H$ ,  $R^2 = H$ ,  $R^3 = \text{ausente}$ ,  $R^4 = H$ ;  $X = Cl$ ; o

15 -  $L = L^{11}$ ,  $R^1 = H$ ,  $R^2 = H$ ,  $R^3 = H$ ,  $R^4 = H$ ;  $X = Cl$ ; o

-  $L = L^1$ ,  $R^1 = H$ ,  $R^2 = H$ ,  $R^3 = \text{ausente}$ ,  $R^4 = H$ ;  $X = Cl$ ; o

-  $L = L^{17}$ ,  $R^1 = H$ ,  $R^2 = H$ ,  $R^3 = H$ ,  $R^4 = H$ ;  $X = Cl$ ; o

-  $L = L^{16}$ ,  $R^1 = H$ ,  $R^2 = Me$ ,  $R^3 = Me$ ,  $R^4 = H$ ;  $X = Cl$ ; o

-  $L = L^{19}$ ,  $R^1 = H$ ,  $R^2-R^{2'} = L^3$ ,  $R^3 = H$ ,  $R^4 = H$ ;  $X = Cl$ ; o

20 -  $L = L^{21}$ ,  $R^1 = H$ ,  $R^2-R^{2'} = H$ ,  $R^3 = H$ ,  $R^4 = H$ ;  $X = Cl$ ; o

-  $L = L^{26}$ ,  $R^1 = H$ ,  $R^2 = H$ ,  $R^5-R^5' = L^1$ ,  $R^3 = H$ ,  $R^4 = H$ ;  $X = Cl$ ; o

-  $L = L^{19}$ ,  $R^1 = H$ ,  $R^2-R^{2'} = L^3$ ,  $R^3 = Me$ ,  $R^4 = H$ ;  $X = Cl$ ; o

-  $L = L^{21}$ ,  $R^1 = H$ ,  $R^2-R^{2'} = L^1$ ,  $R^3 = Me$ ,  $R^4 = H$ ;  $X = Cl$ .

25 Preferiblemente en el quinto aspecto, el trastorno mitocondrial es un trastorno seleccionado del grupo que consiste en: Epilepsia mioclónica; epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas (MERRF); neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL); neuropatía, ataxia y retinosis pigmentaria (NARP); miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica, accidente cerebrovascular (MELAS); síndrome de Leigh; síndrome similar a Leigh; atrofia óptica dominante (AOD); síndrome de Kearns-Sayre (KSS); diabetes y sordera de herencia materna (MIDD); síndrome de Alpers-Huttenlocher; espectro ataxia-neuropatía; oftalmoplejía externa progresiva crónica (OEPC); síndrome de Pearson; 30 encefalopatía neuro-gastro-intestinal mitocondrial (MNGIE); síndrome de Sengers; aciduria 3-metilglutacónica, sordera neurosensorial, encefalopatía y hallazgos neurorradiológicos del síndrome similar a Leigh (MEGDEL); miopatía; miopatía mitocondrial; cardiomiopatía; y encefalomiopatía, SURFS1 (síndrome de Leigh con deficiencia de COX debido a deficiencia de proteína del complejo IV asociada al gen surfeit) y deficiencias de OXPHOS aisladas o combinadas con defectos genéticos hasta ahora sin resolver, que incluyen oxidación de piruvato y tasas de 35 producción de ATP más PCr alteradas.

Preferiblemente en el quinto aspecto, la afección asociada a la disfunción mitocondrial es una afección seleccionada del grupo que consiste en: Ataxia de Friedreich (FRDA); acidosis tubular renal; retinopatía, enfermedad de Parkinson; enfermedad de Alzheimer; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); enfermedad de Huntington; trastornos generalizados del desarrollo; pérdida auditiva; sordera; diabetes; envejecimiento y efectos farmacológicos adversos 40 que conducen a la disfunción mitocondrial.

De manera más preferida en el quinto aspecto, se usa un marcador clínico medible para determinar la eficacia de la terapia que usa los compuestos de la invención, por lo que, preferiblemente, el marcador clínico es uno o más 45 marcadores seleccionados del grupo que consiste en los niveles de ácido láctico (lactato), en sangre completa, plasma, líquido cefalorraquídeo, o líquido ventricular cerebral; niveles de ácido pirúvico (piruvato), en sangre completa, plasma, líquido cefalorraquídeo, o líquido ventricular cerebral; proporciones lactato/piruvato, en sangre completa, plasma, líquido cefalorraquídeo, o líquido ventricular cerebral; aminoácidos, en particular alanina, citrulina y prolina en sangre completa, plasma o líquido cefalorraquídeo, ácidos orgánicos en fluidos corporales; FGF21 en suero y músculo esquelético; niveles de fosfocreatina, niveles de NADH (NADH + H<sup>+</sup>) o NADPH (NADPH + H<sup>+</sup>); niveles de NAD o NADP; niveles de ATP; umbral anaeróbico; niveles de coenzima Q reducida (CoQ<sup>red</sup>); niveles

coenzima Q oxidada (CoQ<sup>ox</sup>); niveles totales de coenzima Q (CoQ<sup>tot</sup>); niveles de citocromo C oxidado; niveles de citocromo C reducido; proporción citocromo C oxidado/citocromo C reducido; niveles de acetoacetato, niveles de beta-hidroxi butirato, proporción acetoacetato/betahidroxi butirato, niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG); niveles de especies reactivas de oxígeno; y niveles de consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>), niveles de producción de dióxido de carbono (VCO<sub>2</sub>), y cociente respiratorio (VCO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>).

5 En un sexto aspecto, la invención se refiere a un compuesto según la invención, para el uso en el tratamiento, la prevención, o la inhibición de los síntomas asociados a una enfermedad neoplásica, en el que, preferiblemente, el compuesto es un compuesto en el que:

- L = L<sup>3</sup>, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Me, R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = Me; X = I; o

10 - L = L<sup>1</sup>, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Me, R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = Me; X = I.

Preferiblemente en el sexto aspecto, la enfermedad neoplásica es cáncer, preferiblemente un cáncer seleccionado del grupo que comprende carcinoma de células basales, cáncer de hueso, cáncer intestinal, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, melanoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata o cáncer de tiroides.

15 En un séptimo aspecto, la invención se refiere a un método cosmético para el tratamiento o el retraso del envejecimiento adicional de la piel en un sujeto, y el método comprende la etapa de administrar en la piel del sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto según la invención, en el que el compuesto es preferiblemente un compuesto en el que:

- L = L<sup>5</sup>, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = ausente, R<sup>4</sup> = H; X = TFA; o

20 - L = L<sup>8</sup>, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = ausente, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o

- L = L<sup>11</sup>, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o

- L = L<sup>1</sup>, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = ausente, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o

- L = L<sup>17</sup>, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o

- L = L<sup>16</sup>, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Me, R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o

25 - L = L<sup>19</sup>, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup>-R<sup>2'</sup> = L<sup>3</sup>, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o

- L = L<sup>21</sup>, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup>-R<sup>2'</sup> = L<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o

- L = L<sup>26</sup>, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>5</sup>-R<sup>5'</sup> = L<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o

- L = L<sup>19</sup>, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup>-R<sup>2'</sup> = L<sup>3</sup>, R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o

- L = L<sup>21</sup>, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup>-R<sup>2'</sup> = L<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = H; X = Cl.

30 En un octavo aspecto, la invención se refiere a un compuesto de la invención para el uso en un método de tratamiento, prevención, o inhibición de los síntomas asociados a un trastorno mitocondrial o a una afección asociada a la disfunción mitocondrial, y el método comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un compuesto según la invención. En el método, el trastorno mitocondrial es preferiblemente un trastorno como se definió anteriormente en la presente memoria, o la afección es preferiblemente una afección como se definió

35 anteriormente en la presente memoria. De manera más preferida en el método, se usa un marcador clínico medible para determinar la eficacia de la terapia que usa los compuestos de la invención, por lo que, preferiblemente, el marcador clínico es uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en los niveles de ácido láctico (lactato), en sangre completa, plasma, líquido cefalorraquídeo, o líquido ventricular cerebral; niveles de ácido pirúvico (piruvato), en sangre completa, plasma, líquido cefalorraquídeo, o líquido ventricular cerebral; proporciones

40 lactato/piruvato, en sangre completa, plasma, líquido cefalorraquídeo, o líquido ventricular cerebral; niveles de fosfocreatina, niveles de NADH (NADH + H<sup>+</sup>) o NADPH (NADPH + H<sup>+</sup>); niveles de NAD o NADP; niveles de ATP; umbral anaeróbico; niveles de coenzima Q reducida (CoQ<sup>red</sup>); niveles coenzima Q oxidada (CoQ<sup>ox</sup>); niveles totales de coenzima Q (CoQ<sup>tot</sup>); niveles de citocromo C oxidado; niveles de citocromo C reducido; proporción citocromo C oxidado/citocromo C reducido; niveles de acetoacetato, niveles de beta-hidroxi butirato, proporción

45 acetoacetato/betahidroxi butirato, niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG); niveles de especies reactivas de oxígeno; y niveles de consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>), niveles de producción de dióxido de carbono (VCO<sub>2</sub>), y cociente respiratorio (VCO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>).

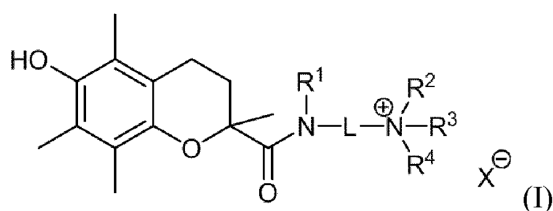
### Descripción de la invención

50 En un primer aspecto, la invención se refiere a un compuesto que es un derivado de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, que también se conoce por su nombre comercial, Trolox<sup>TM</sup>. En un compuesto de la

invención, el resto de ácido carboxílico está sustituido por un resto amida, en el que el átomo de nitrógeno del resto amida está conectado por medio de un ligador a un átomo de nitrógeno catiónico. Este átomo de nitrógeno catiónico preferiblemente se origina formalmente de la protonación o alquilación, preferiblemente protonación o metilación de un átomo de nitrógeno trivalente. El átomo de nitrógeno trivalente es preferiblemente un resto amina, primaria, secundaria o terciaria, o un resto imina, primaria o secundaria. El contraión ( $X^-$ ) del átomo de nitrógeno catiónico es un ión cargado negativamente, preferiblemente un ión cargado negativamente monovalente, más preferiblemente un anión, tal como se indica más adelante en la presente memoria.

La síntesis de los compuestos de la invención no necesita abarcar la protonación o alquilación de un átomo de nitrógeno de amina o imina. El átomo de nitrógeno catiónico también se puede formar por medio de una vía diferente. Como tal, el átomo de nitrógeno catiónico solamente se origina "formalmente" de la protonación o alquilación de un átomo de nitrógeno de amina o imina.

El compuesto de la invención se puede identificar mediante la fórmula general (I):



En la que,

- 15 - L es un ligador entre el átomo de nitrógeno de amida y el átomo de nitrógeno catiónico; y
- $R^1$  y  $R^2$  se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno (H) o alquilo  $C_1-C_6$ , o  $R^1$  y  $R^2$  están unidos entre sí y así forman un segundo ligador entre el átomo de nitrógeno de amida y el átomo de nitrógeno catiónico, o  $R^1$  está unido a un átomo de esqueleto del ligador L en una estructura cíclica y/o  $R^2$  está unido a un átomo de esqueleto del ligador L en una estructura cíclica; y
- 20 -  $R^3$  se selecciona de hidrógeno (H) o alquilo  $C_1-C_6$ , en el que el resto alquilo puede estar sustituido con uno o más átomos de halógeno o restos (halo)alcoxi, o  $R^3$  está ausente cuando el átomo de nitrógeno catiónico es parte de un resto imina; y
- $R^4$  se selecciona de hidrógeno (H) o alquilo  $C_1-C_6$ , en el que el resto alquilo puede estar sustituido con uno o más átomos de halógeno o restos (halo)alcoxi; y
- 25 -  $X^-$  es un anión, preferiblemente un anión farmacéuticamente aceptable.

El compuesto identificado mediante la fórmula general (I) comprende al menos un átomo de carbono quiral (estereocentro), es decir, el átomo de la posición 2 del resto de Trolox™. Tanto el compuesto que tiene una configuración *S* como el compuesto que tiene una configuración *R* del átomo de carbono de la posición 2 están abarcados en la presente invención, así como las mezclas de los diferentes estereoisómeros. Tal mezcla puede tener una de las configuraciones en exceso enantiomérico, o puede ser racémica. Cuando haya un estereocentro adicional en el compuesto según la invención, por ejemplo en el ligador, puede existir como la configuración *S*, como la configuración *R*, o como una mezcla de ambas configuraciones. Tal mezcla puede tener una de las configuraciones en exceso enantiomérico, o puede ser racémica. Si hay más de un estereocentro en el compuesto según la invención, lo anterior es válido para cada estereocentro independientemente.

- 35 Cuando el átomo de nitrógeno catiónico es parte de un resto imina, el ligador L comprende al menos un enlace doble, localizado entre el átomo de nitrógeno catiónico y el átomo de esqueleto adyacente del ligador. En tal caso,  $R^3$  está ausente. Cuando el átomo de nitrógeno catiónico es parte de un resto amina, está conectado al ligador por medio de un enlace simple, y  $R^3$  está presente. En el caso en el que  $R^3$  está presente,  $R^3$  se selecciona de hidrógeno (H) o alquilo  $C_1-C_6$ , en el que el resto alquilo puede estar sustituido con uno o más átomos de halógeno o restos (halo)alcoxi, preferiblemente  $R^3$  es H o alquilo  $C_1-C_4$ , en el que el resto alquilo puede estar sustituido con uno o más átomos de halógeno o restos (halo)alcoxi, más preferiblemente  $R^3$  es H o alquilo  $C_1-C_2$ , en el que el resto alquilo puede estar sustituido con uno o más átomos de halógeno o restos (halo)alcoxi. Los átomos de halógeno incluyen flúor (F), cloro (Cl), bromo (Br), yodo (I), y astato (At), preferiblemente el átomo de halógeno es flúor (F). Los restos alcoxi preferidos incluyen metoxi y etoxi. En los restos haloalcoxi, al menos un átomo de hidrógeno de un resto alcoxi está sustituido por un átomo de halógeno, preferiblemente por F. Los restos adecuados para  $R^3$  incluyen, preferiblemente se limitan a, H, metilo (Me), trifluorometilo ( $-CF_3$ ), etilo (Et), isopropilo (iPr), ciclopropilo ( $-cPr$ ), metilen ciclopropilo ( $-CH_2cPr$ ), *n*-propilo (*n*-Pr), 2,2,2-trifluoroetilo ( $-CH_2CF_3$ ), metoximetilo ( $-CH_2OCH_3$ ). Más preferiblemente,  $R^3$  es H o metilo (Me), lo más preferiblemente  $R^3$  es H. De manera alternativa,  $R^3$  es preferiblemente alquilo  $C_1-C_4$ , en el que el resto alquilo puede estar sustituido con uno o más átomos de halógeno o restos (halo)alcoxi, más preferiblemente  $R^3$  es alquilo  $C_1-C_2$ , en el que el resto alquilo puede estar sustituido con uno
- 50

o más átomos de halógeno o restos (halo)alcoxi. Los restos preferidos que comprenden un resto imina incluyen guanidina y amidina, en los que uno de los átomos de nitrógeno está sustituido para formar la conexión con el átomo de nitrógeno de amida por medio del ligador L.

5  $R^4$  es el sustituyente del átomo de nitrógeno catiónico, que se origina de la protonación o alquilación formal del resto amina o imina. Así, el compuesto según la invención, en vista de la presencia del átomo de nitrógeno catiónico y  $X^-$ , es una sal, preferiblemente una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables son las sales que se pueden administrar como fármacos o productos farmacéuticos a seres humanos y/o animales. Las sales farmacéuticamente aceptables del resto amina o imina del compuesto según la invención son conocidas para los expertos en la técnica, y se originan del tratamiento formal del compuesto con un ácido o un agente alquilante. 10 Los ácidos adecuados incluyen los ácidos orgánicos o los ácidos inorgánicos. Los ejemplos de ácidos inorgánicos incluyen, pero sin limitación, ácido clorhídrico (HCl), ácido bromhídrico (HBr), ácido yodhídrico (HI), ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), ácido nítrico ( $HNO_3$ ), ácido trifluoroacético (TFAH o  $CF_3CO_2H$ ) y ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ). Los ejemplos de ácidos orgánicos incluyen, pero sin limitación, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, 15 ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácidos sulfónicos y ácido salicílico. Cuando un ácido tal como se ejemplifica en la presente memoria se usa para preparar formalmente la sal,  $R^4$  es hidrógeno, y el tipo de ácido determina el contraión X. De manera alternativa, se puede formar la sal mediante el tratamiento formal con un agente alquilante. Los agentes alquilantes adecuados incluyen, pero sin limitación, los haluros de alquilo  $C_1-C_6$  (tales como yoduro de metilo, yoduro de etilo, yoduro de propilo, cloruro de butilo, fluoruro de butilo, bromuro de butilo), sulfato de dimetilo, carbonato de dimetilo, triflato de metilo, fluorosulfonato de metilo, clorosulfonato de metilo, metanosulfonato de metilo y bencenosulfonato de metilo. La sal se puede preparar mediante el tratamiento real del compuesto no salino con un ácido o agente de alquilación, como se indicó anteriormente, o por medio de otro medio conocido en la técnica y/o ejemplificado adicionalmente más adelante.

25  $R^4$  se selecciona de hidrógeno (H) o alquilo  $C_1-C_6$ , en el que el resto alquilo puede estar sustituido con uno o más átomos de halógeno o restos (halo)alcoxi, preferiblemente  $R^4$  es H o alquilo  $C_1-C_4$ , en el que el resto alquilo puede estar sustituido con uno o más átomos de halógeno o restos (halo)alcoxi, más preferiblemente  $R^4$  es H o alquilo  $C_1-C_2$ , en el que el resto alquilo puede estar sustituido con uno o más átomos de halógeno o restos (halo)alcoxi. Los átomos de halógeno incluyen flúor (F), cloro (Cl), bromo (Br), yodo (I), y astato (At), preferiblemente el átomo de halógeno es flúor (F). Los restos alcoxi preferidos incluyen metoxi y etoxi. En los restos haloalcoxi, al menos un 30 átomo de hidrógeno de un resto alcoxi está sustituido por un átomo de halógeno, preferiblemente por F. Los restos adecuados para  $R^4$  incluyen, preferiblemente se limitan a, H, metilo (Me), trifluorometilo ( $-CF_3$ ), etilo (Et), isopropilo (iPr), ciclopropilo (-cPr), metilen ciclopropilo ( $-CH_2cPr$ ), *n*-propilo (*n*-Pr), 2,2,2-trifluoroetilo ( $-CH_2CF_3$ ), metoximetilo ( $-CH_2OCH_3$ ). Aún más preferiblemente,  $R^4$  es H o metilo (Me), lo más preferiblemente  $R^4$  es H. X puede ser cualquier anión, preferiblemente un anión fisiológicamente o farmacéuticamente aceptable, más preferiblemente un anión monovalente. X se selecciona preferiblemente de F, Cl, Br, I,  $HSO_4$ ,  $NO_3$ , TFA ( $CF_3CO_2$ ), formiato, acetato, propionato, glicolato, piruvato, oxalato, maleato, malonato, succinato, fumarato, tartrato, citrato, benzoato, cinamato, mandelato, sulfonato y salicilato. Preferiblemente, X es Cl, I, TFA o formiato, más preferiblemente Cl, I o TFA, lo más preferiblemente X es Cl. Cuando el átomo de nitrógeno catiónico se origina a partir de la protonación formal, esta protonación se lleva a cabo preferiblemente con cloruro de hidrógeno (HCl), ácido trifluoroacético (TFAH o 40  $CF_3CO_2H$ ) o ácido fórmico ( $HCOOH$ ), más preferiblemente con HCl o TFAH. La metilación formal se lleva a cabo preferiblemente con yoduro de metilo (MeI). Así, en una realización preferida,  $R^4 = Me$  cuando  $X^- = I^-$ , y  $R^4 = H$  cuando  $X^- = Cl^-$ , TFA $^-$  o formiato.

45 Aparte de los casos descritos más adelante en la presente memoria,  $R^1$  y  $R^2$  se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno (H) o alquilo  $C_1-C_6$ . Preferiblemente,  $R^1$  es H o alquilo  $C_1-C_2$ , más preferiblemente  $R^1$  es H o metilo (Me), lo más preferiblemente  $R^1$  es H. Preferiblemente,  $R^2$  es H o alquilo  $C_1-C_2$ , más preferiblemente  $R^2$  es H o metilo (Me), lo más preferiblemente  $R^2$  es Me.

50 En una realización, el átomo de nitrógeno de amida está conectado al átomo de nitrógeno catiónico por medio de un segundo ligador. Este segundo ligador se define uniendo  $R^1$  del átomo de nitrógeno de amida y  $R^2$  del átomo de nitrógeno catiónico. Así, el átomo de nitrógeno de amida, el átomo de nitrógeno catiónico, el primer ligador y el segundo ligador forman juntos una estructura cíclica, preferiblemente una estructura cíclica de 4 - 10 miembros, más preferiblemente una estructura cíclica de 5 - 8 miembros, lo más preferiblemente una estructura cíclica de 6 miembros. En una realización preferida, el segundo ligador es un puente  $-CH_2-CH_2-$  o  $-CH_2-CH_2-CH_2-$ , lo más preferiblemente un puente  $-CH_2-CH_2-$ , en el que dos o tres, preferiblemente dos, átomos de carbono están presentes entre el átomo de nitrógeno de amida y el átomo de nitrógeno catiónico.

55 En otra realización, el átomo de nitrógeno de amida está conectado a un átomo de esqueleto del ligador, por lo que se forma una estructura cíclica, preferiblemente una estructura cíclica de 4 - 10 miembros, más preferiblemente una estructura cíclica de 5 - 8 miembros, lo más preferiblemente una estructura cíclica de 6 miembros. El átomo de esqueleto del ligador al que está conectado el átomo de nitrógeno, a este respecto, tiene un sustituyente  $R^1$  que está unido a  $R^1$  del átomo de nitrógeno de amida. En esta realización, el átomo de nitrógeno catiónico no está incluido en la estructura cíclica, sino que solamente está incluida parte del esqueleto del ligador. En una realización preferida, esta conexión entre el átomo de nitrógeno de amida y un átomo de esqueleto del ligador es un puente  $-CH_2-CH_2-$  o  $-CH_2-CH_2-CH_2-$ , lo más preferiblemente un puente  $-CH_2-CH_2-$ , en el que están presentes dos o tres, preferiblemente 60



dos, átomos de carbono entre el átomo de nitrógeno de amida y el átomo de esqueleto del ligador.

En otra realización, el átomo de nitrógeno catiónico está conectado a un átomo de esqueleto del ligador, por lo que se forma una estructura cíclica, preferiblemente una estructura cíclica de 4 - 10 miembros, más preferiblemente una estructura cíclica de 5 - 8 miembros, lo más preferiblemente una estructura cíclica de 6 miembros. El átomo de esqueleto del ligador al que está conectado el átomo de nitrógeno, a este respecto, tiene un sustituyente  $R^2$  que está unido a  $R^2$  del átomo de nitrógeno catiónico. En esta realización, el átomo de nitrógeno de amida no está incluido en la estructura cíclica, sino que solamente está incluida parte del esqueleto del ligador. En una realización preferida, esta conexión entre el átomo de nitrógeno catiónico y un átomo de esqueleto del ligador es un puente  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  o  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ , lo más preferiblemente un puente  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ , en el que están presentes dos o tres, preferiblemente dos, átomos de carbono entre el átomo de nitrógeno catiónico y el átomo de esqueleto del ligador. También es posible que exista una conexión entre  $R^1$  del átomo de nitrógeno de amida y un sustituyente  $R^1$  del ligador, y entre  $R^2$  del átomo de nitrógeno catiónico y un sustituyente  $R^2$  del ligador.

En una realización preferida, la solubilidad del compuesto de la invención en agua, expresada como  $\log(P_{ow})$  es de entre 2,0 y 5,0, preferiblemente entre 2,5 y 4,5, más preferiblemente entre 3,0 y 4,0.  $\log(P_{ow})$ , el logaritmo del coeficiente de partición entre 1-octanol y agua, es una medida muy conocida de la solubilidad en agua. Los compuestos que tienen un valor de  $\log(P_{ow})$  entre 3 y 4 están equilibrados de manera ideal entre una solubilidad en agua suficiente para la preparación de soluciones o suspensiones acuosas y una lipofilia suficiente para asegurar un transporte eficaz del compuesto a través de la membrana celular. La persona experta apreciará cómo determinar qué combinaciones de L,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y X como se definieron anteriormente proporcionan un compuesto que tiene un valor de  $\log(P_{ow})$  entre 3 y 4. Los ensayos adecuados para definir el valor de  $\log(P_{ow})$  de un compuesto son muy conocidos para la persona experta, e incluyen, pero sin limitación, el método de matraz agitado, ITIES, el método de gotículas o el uso de HPLC. El  $\log(P_{ow})$  de un compuesto también se puede predecir mediante el uso de algoritmos QSPR.

Los ligadores adecuados L para conectar el átomo de nitrógeno de amida al átomo de nitrógeno catiónico son ligadores que comprenden preferiblemente 1 a 10 átomos de esqueleto sustituidos opcionalmente, más preferiblemente que comprenden 1 a 8 átomos de esqueleto sustituidos opcionalmente. L puede comprender, así, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 átomos de esqueleto sustituidos opcionalmente. En la presente memoria, los átomos de esqueleto son los átomos que constituyen la cadena más corta entre el átomo de nitrógeno de amida y el átomo de nitrógeno catiónico. El esqueleto puede ser una estructura lineal, pero también puede ser parte de una estructura cíclica. Cuando el esqueleto es parte una estructura cíclica, el esqueleto se define como la cadena más corta entre el átomo de nitrógeno de amida y el átomo de nitrógeno catiónico. En tales casos, uno de los átomos de esqueleto comprende un sustituyente  $R^5$ , y uno de los átomos de esqueleto comprende un sustituyente  $R^5$ , preferiblemente dos átomos de esqueleto diferentes comprenden los sustituyentes  $R^5$  y  $R^5$ , en los que  $R^5$  y  $R^5$  están unidos para formar una estructura cíclica, preferiblemente una estructura cíclica de 4 - 10 miembros, más preferiblemente una estructura cíclica de 5 - 8 miembros, lo más preferiblemente una estructura cíclica de 6 miembros. En esta realización, el átomo de nitrógeno de amida y el átomo de nitrógeno catiónico no están incluidos en la estructura cíclica, sino que solamente está incluida parte del esqueleto del ligador. En una realización preferida, esta conexión entre el/los átomo(s) de esqueleto del ligador, que alberga los sustituyentes  $R^5$  y  $R^5$ , es un puente  $-(\text{CH}_2)_n$ , en el que  $n = 1 - 6$ , preferiblemente un puente  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  o  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ , en el que hay presentes uno a seis, preferiblemente dos o tres, átomos de carbono entre el/los átomo(s) de esqueleto sustituido(s) del ligador.

En una realización preferida, los átomos de esqueleto se seleccionan de carbono, nitrógeno y oxígeno, preferiblemente de carbono y nitrógeno. Tal esqueleto según esta realización preferida se puede identificar como  $C_n N_m$ , en el que n designa el número total de átomos del esqueleto, y m el número de átomos de nitrógeno del esqueleto. Cada n y m es un número entero no negativo. Los ligadores adecuados tienen  $n = 1 - 10$  y  $m = 0 - 4$ , preferiblemente  $n = 2 - 7$  y  $m = 0 - 3$ , más preferiblemente  $n = 4 - 7$  y  $m = 0 - 2$ . Los ligadores especialmente preferidos tienen un esqueleto identificado como  $C_n N_m$ , en el que  $n = 2$  y  $m = 0$  ( $C_2$ );  $n = 5$  y  $m = 1$  ( $C_4N$ );  $n = 3$  y  $m = 0$  ( $C_3$ );  $n = 4$  y  $m = 1$  ( $C_3N$ );  $n = 7$  y  $m = 2$  ( $C_5N_2$ );  $n = 4$  y  $m = 0$  ( $C_4$ );  $n = 6$  y  $m = 1$  ( $C_5N$ ); o  $n = 5$  y  $m = 0$  ( $C_5$ ). Lo más preferiblemente, todos los átomos del esqueleto son átomos de carbono ( $m = 0$ ).

Para cumplir los requerimientos de valencia, los átomos de esqueleto de carbono y de nitrógeno del ligador pueden albergar átomos de hidrógeno, pueden estar sustituidos, o puede haber enlaces dobles o triples entre átomos de esqueleto adyacentes, como entenderá la persona experta. En el contexto de la invención, el hidrógeno no se considera un sustituyente. Cuando hay un átomo de oxígeno como átomo de esqueleto en el ligador, la persona experta entenderá que el átomo de esqueleto de oxígeno no alberga átomos de hidrógeno, sustituyentes o enlaces dobles o triples. Los enlaces triples pueden estar presentes entre dos átomos de carbono del esqueleto. Los átomos de esqueleto, junto con los átomos de hidrógeno y/o los sustituyentes, constituyen el ligador. En el contexto de la presente invención, "sustituido opcionalmente" se usa para indicar que un átomo (de esqueleto) puede albergar uno o más sustituyentes, o puede no albergar sustituyentes y puede haber 0 - 3 hidrógenos en su lugar, para cumplir los requerimientos de valencia de dicho átomo (de esqueleto).

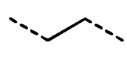
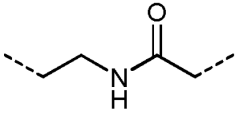
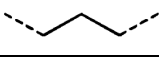
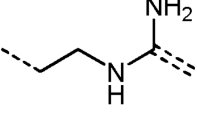
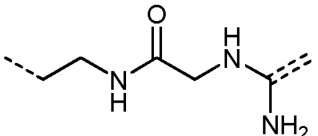
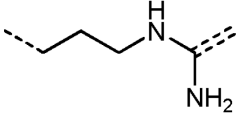
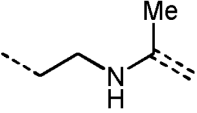
Los sustituyentes adecuados incluyen, pero sin limitación, halógeno,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{NHR}^6$ ,  $\text{N}(\text{R}^6)_2$ ,  $\text{NHNH}_2$ ,  $\text{N}_3$ ,  $\text{NHC}(=\text{O})\text{R}^6$ ,  $\text{NHC}(=\text{O})\text{NHR}^6$ ,  $\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}_2$ ,  $\text{NHC}(=\text{O})\text{OR}^6$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{OR}^6$ ,  $\text{OC}(=\text{O})\text{R}^6$ ,  $\text{R}^6$  (p.ej. alquilo, cicloalquilo), aralquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo,  $\text{OC}(=\text{O})\text{OR}^6$ ,  $\text{OC}(=\text{O})\text{NHR}^6$ ,  $\text{O}(\text{SO}_2)\text{R}^6$ ,  $\text{O}(\text{SO}_2)\text{OH}$ ,  $\text{O}(\text{PO}_2)\text{OH}$ ,  $\text{SH}$ ,  $\text{SR}^6$ ,  $\text{C}(=\text{O})\text{R}^6$ , alquil-

5 NH<sub>2</sub>, alquil-OH, alquil-SH, C(=O)CF<sub>3</sub>, C(=O)OR<sup>6</sup>, C(=O)OH, C(=O)H, C(=O)OR<sup>6</sup>, C(=O)NH<sub>2</sub>, C(=O)NMe<sub>2</sub>, C(=O)N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>, C(=S)NH<sub>2</sub>, C(=S)SH, CN, NC, CNO, ONC, OCN, SCN, SNC, CNS, S(=O)R<sup>6</sup>, S(=O)<sub>2</sub>R<sup>6</sup>, S(=O)<sub>2</sub>(OH), P(=O)(OH)<sub>2</sub> o P(=O)(OH)(OR<sup>6</sup>). Los átomos que tienen dos o más valencias restantes, tales como los átomos de esqueleto de carbono, pueden albergar un sustituyente unido mediante enlace doble, tal como oxo (=O), imino (=NH o =NR<sup>6</sup>), tioxo (=S), alquilideno (=CH<sub>2</sub> o =CHR<sup>6</sup> o =C(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>). Además, dos sustituyentes del mismo átomo o de átomos diferentes pueden estar unidos para formar estructuras cíclicas. Si dos sustituyentes de un único átomo de esqueleto están unidos en una estructura cíclica, esta estructura cíclica se puede considerar conectada por medio de una unión espiro al esqueleto. Si dos sustituyentes de diferentes átomos de esqueleto están unidos en una estructura cíclica, parte de esta estructura cíclica es (parte de) el esqueleto, y se considera que el esqueleto es la cadena más corta de átomos entre el átomo de nitrógeno de amida y el átomo de nitrógeno catiónico. Como se indica adicionalmente más adelante, también se puede formar una estructura cíclica uniendo un sustituyente de un átomo de esqueleto con R<sup>1</sup> del átomo de nitrógeno de amida o con R<sup>2</sup> del átomo de nitrógeno catiónico. Las estructuras cíclicas formadas, como tales, pueden ser totalmente de carbono o pueden comprender 0-3 heteroátomos (p.ej. N, O, S y/o P), y pueden comprender 0-3 enlaces dobles. Todos los átomos de estas estructuras cíclicas pueden estar sustituidos opcionalmente. Los ejemplos de estructuras cíclicas adecuadas son cicloalquilo sustituido opcionalmente, cicloheteroalquilo sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente o heteroarilo sustituido opcionalmente. Anteriormente en la presente memoria, cada R<sup>6</sup> es independientemente un resto alquilo, preferiblemente un resto alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, más preferiblemente un resto alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>. En R<sup>6</sup>, uno o más restos CH<sub>2</sub> pueden estar sustituidos cada uno independientemente por uno de O, S o NH, y/o uno o más restos CH pueden estar sustituidos por N.

En el contexto de la presente invención, el término "alquilo" se refiere a grupos alifáticos saturados que incluyen una cadena lineal, cadena ramificada, grupos cíclicos, y combinaciones de los mismos, que tienen el número de átomos de carbono especificado, o si no se especifica un número, que tienen preferiblemente hasta 12 átomos de carbono. Grupo "alquilo de cadena lineal" o "alquilo lineal" se refiere a grupos alquilo que no son cíclicos ni ramificados, denominados habitualmente grupos "n-alquilo". Un subgrupo de grupos alquilo es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, que incluye grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, pentilo, n-pentilo, hexilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, y cualquier otro grupo alquilo que contenga entre uno y seis átomos de carbono, en el que los grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> se pueden unir por medio de cualquier valencia de los grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

Los sustituyentes preferidos de los átomos de esqueleto son alquilo, tal como metilo (Me o-CH<sub>3</sub>), carboxi (-C(=O)OH), oxo (=O), amino primario (-NH<sub>2</sub>).

Los ligadores preferidos se identifican más adelante en la presente memoria como L<sup>1</sup> a L<sup>26</sup>:

L <sup>1</sup> =		-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> - o -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -
L <sup>2</sup> =		-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH-C(O)-CH <sub>2</sub> - o -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHC(O)CH <sub>2</sub> -
L <sup>3</sup> =		-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> - o -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -
L <sup>4</sup> =		-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH-C(NH <sub>2</sub> )= o -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHC(NH <sub>2</sub> )=
L <sup>5</sup> =		-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH-C(O)-CH <sub>2</sub> -NH-C(NH <sub>2</sub> )= o -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHC(O)CH <sub>2</sub> NHC(NH <sub>2</sub> )=
L <sup>6</sup> =		-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH-C(NH <sub>2</sub> )= o -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHC(NH <sub>2</sub> )=
L <sup>7</sup> =		-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH-C(Me)= o -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHC(Me)=

$L^8 =$		$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{Me})=$ o $-(\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(\text{Me})=$
$L^9 =$		$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{Me})=$ o $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(\text{Me})=$
$L^{10} =$		$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^1-\text{C}(\text{NH}_2)=$ o $-(\text{CH}_2)_2\text{NR}^1\text{C}(\text{NH}_2)=$
$L^{11} =$		$-\text{C}(\text{CO}_2\text{H})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{C}(\text{CO}_2\text{H})(\text{CH}_2)_3-$
$L^{12} =$		$-\text{C}(\text{CO}_2\text{H})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=$ o $-\text{C}(\text{CO}_2\text{H})(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(\text{NH}_2)=$
$L^{13} =$		$-\text{C}(\text{CO}_2\text{H})-\text{CH}_2-$ o $-\text{C}(\text{CO}_2\text{H})\text{CH}_2-$
$L^{14} =$		$-\text{C}(\text{CO}_2\text{H})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{C}(\text{CO}_2\text{H})(\text{CH}_2)_2-$
$L^{15} =$		$-\text{C}(\text{CO}_2\text{H})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{C}(\text{CO}_2\text{H})(\text{CH}_2)_4-$
$L^{16} =$		$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-(\text{CH}_2)_4-$
$L^{17} =$		$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-(\text{CH}_2)_5-$
$L^{18} =$		$-\text{CHR}^2-\text{C}(\text{O})-$ o $-\text{CHR}^2\text{C}(\text{O})-$
$L^{19} =$		$-\text{CHR}^2-\text{CH}_2-$ o $-\text{CHR}^2\text{CH}_2-$
$L^{20} =$		$-\text{CHR}^5-\text{CH}_2-\text{NR}^5-\text{C}(\text{Me})=$ o $-\text{CHR}^5\text{CH}_2\text{NR}^5\text{C}(\text{Me})=$
$L^{21} =$		$-\text{CHR}^2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{CHR}^2(\text{CH}_2)_2-$
$L^{22} =$		$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CHR}^1-$ o $-(\text{CH}_2)_2\text{CHR}^1-$

L <sup>23</sup> =		-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CHR <sup>1</sup> -NH-C(O)-C(Me)- o -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CHR <sup>1</sup> NHC(O)C(Me)-
L <sup>24</sup> =		-CH <sub>2</sub> -CHR <sup>1</sup> - o -CH <sub>2</sub> CHR <sup>1</sup> -
L <sup>25</sup> =		-CH <sub>2</sub> -CHR <sup>1</sup> -NH-C(Me)= o -CH <sub>2</sub> CHR <sup>1</sup> NHC(Me)=
L <sup>26</sup> =		-CHR <sup>5</sup> -CH <sup>2</sup> -CH <sup>2</sup> -CHR <sup>5'</sup> - o -CHR <sup>5</sup> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CHR <sup>5'</sup>

En la presente memoria, el enlace discontinuo al lado izquierdo de cada una de las estructuras de L<sup>1</sup> a L<sup>26</sup> indica el enlace entre el ligador y el átomo de nitrógeno de amida, y el enlace discontinuo al lado derecho de cada una de las estructuras de L<sup>1</sup> a L<sup>26</sup> indica el enlace entre el ligador y el átomo de nitrógeno catiónico. Los ligadores representados en forma de fórmulas químicas están orientados en la misma dirección, es decir, el enlace que pende del lado izquierdo de cada una de las fórmulas químicas de L<sup>1</sup> a L<sup>26</sup> indica el enlace entre el ligador y el átomo de nitrógeno de amida, y el enlace discontinuo del lado derecho de cada una de las fórmulas químicas de L<sup>1</sup> a L<sup>26</sup> indica el enlace entre el ligador y el átomo de nitrógeno catiónico.

Cada caso de R<sup>1</sup> es un puente entre el ligador y el átomo de nitrógeno de amida, en el que R<sup>1</sup> está unido con R<sup>1</sup> por medio de dicho puente, y así se forma una estructura cíclica de 4 - 10 miembros, preferiblemente una estructura cíclica de 5 - 8 miembros, lo más preferiblemente una estructura cíclica de 6 miembros, que está constituida por el átomo de nitrógeno de amida, 1-4 átomos del esqueleto del ligador, y 1-4 átomos que constituyen el puente que une R<sup>1</sup> y R<sup>1</sup>. De forma similar, cada caso de R<sup>2</sup> es un puente entre el ligador y el átomo de nitrógeno catiónico, en el que R<sup>2</sup> está unido con R<sup>2</sup> por medio de dicho puente, y así se forma una estructura cíclica de 4 - 10 miembros, preferiblemente una estructura cíclica de 5 - 8 miembros, lo más preferiblemente una estructura cíclica de 6 miembros, que está constituida por el átomo de nitrógeno catiónico, 1-4 átomos del esqueleto del ligador, y 1-4 átomos que constituyen el puente que une R<sup>2</sup> y R<sup>2</sup>. De forma similar, cada caso de R<sup>5</sup> y R<sup>5'</sup> es un puente entre un átomo de esqueleto del ligador, que alberga R<sup>5</sup>, y otro átomo de esqueleto del ligador, que alberga R<sup>5'</sup>, en el que R<sup>5</sup> está unido con R<sup>5'</sup> por medio de dicho puente, y así se forma una estructura cíclica de 4 - 10 miembros, preferiblemente una estructura cíclica de 5 - 8 miembros, lo más preferiblemente una estructura cíclica de 6 miembros, que está constituida por 2-5 átomos del esqueleto del ligador, y 1-5 átomos que constituyen el puente que une R<sup>5</sup> y R<sup>5'</sup>. Así, en los ligadores L<sup>10</sup>, L<sup>22</sup>, L<sup>23</sup>, L<sup>24</sup> y L<sup>25</sup>, R<sup>1</sup> está unido a R<sup>1</sup> por medio de un puente, preferiblemente un puente -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, más preferiblemente un puente -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-. Así, en un compuesto que comprende el ligador L<sup>10</sup>, en el que R<sup>1</sup> y R<sup>1</sup> están unidos por medio de un puente -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, el átomo de nitrógeno de amida está incrustado en una estructura cíclica de seis miembros, que está constituida por el átomo de nitrógeno de amida, dos átomos de carbono y un átomo de nitrógeno del esqueleto del ligador, y dos átomos de carbono más que constituyen el puente de R<sup>1</sup> y R<sup>1</sup>. Este puente -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- entre el átomo de nitrógeno de amida y el átomo de nitrógeno central del esqueleto del ligador L<sup>10</sup> se puede representar como L<sup>1</sup>. De forma similar, en los ligadores L<sup>18</sup>, L<sup>19</sup> y L<sup>21</sup>, R<sup>2</sup> está unido a R<sup>2</sup> por medio de un puente, preferiblemente un puente -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, más preferiblemente un puente -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-. De forma similar, en los ligadores L<sup>20</sup> y L<sup>26</sup>, R<sup>5</sup> está unido a R<sup>5'</sup> por medio de un puente, preferiblemente un puente -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, más preferiblemente un puente -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-.

Los ligadores L<sup>11</sup>, L<sup>12</sup>, L<sup>13</sup>, L<sup>14</sup>, L<sup>15</sup>, L<sup>18</sup> (con tal de que R<sup>2</sup>-R<sup>2</sup> no sea -C(O)-), L<sup>19</sup> (con tal de que R<sup>2</sup>-R<sup>2</sup> no sea -CH<sub>2</sub>-), L<sup>20</sup> (con tal de que R<sup>5</sup>-R<sup>5'</sup> no sea -CH<sub>2</sub>-), L<sup>21</sup> (con tal de que R<sup>2</sup>-R<sup>2</sup> no sea -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), L<sup>22</sup> (con tal de que R<sup>1</sup>-R<sup>1</sup> no sea -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), L<sup>23</sup> (con tal de que R<sup>1</sup>-R<sup>1</sup> no sea -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), L<sup>24</sup> (con tal de que R<sup>1</sup>-R<sup>1</sup> no sea -CH<sub>2</sub>-) y L<sup>25</sup> (con tal de que R<sup>1</sup>-R<sup>1</sup> no sea -CH<sub>2</sub>-) comprenden un estereocentro adicional. El estereoisómero anterior, cuando se indica en las estructuras de esos ligadores, pretende ser ilustrativo, no limitante. Como se indicó además anteriormente, cada estereocentro presente en los compuestos según la invención puede estar presente individualmente en cada una de sus formas estereoisoméricas, S o R, o como una mezcla de ambos isómeros en cualquier proporción. El ligador L<sup>26</sup> comprende un resto cicloalquilo disustituido, preferiblemente un resto ciclohexilo disustituido, y por tanto se puede dar en la forma *cis* o la forma *trans*, preferiblemente en la forma *trans*.

En una realización de la invención, los ligadores especialmente preferidos son L<sup>5</sup>, L<sup>8</sup>, L<sup>11</sup> y L<sup>12</sup>, los ligadores aún más preferidos son L<sup>8</sup> y L<sup>11</sup>, y el ligador más preferido según esta realización de la invención es L<sup>11</sup>. Los ligadores adicionalmente preferidos según esta realización son L<sup>16</sup>, L<sup>17</sup>, L<sup>19</sup>, L<sup>21</sup> y L<sup>26</sup>, más preferiblemente L<sup>16</sup> y L<sup>19</sup>. Así, según

esta realización, los ligadores preferidos son  $L^5, L^8, L^{11}, L^{12}, L^{16}, L^{17}, L^{19}, L^{21}$  y  $L^{26}$ , más preferiblemente  $L^8, L^{12}, L^{16}, L^{17}, L^{19}, L^{21}$  y  $L^{26}$ , lo más preferiblemente  $L^{16}$  y  $L^{19}$ . Preferiblemente,  $L^{19}$  se combina con  $R^2-R^{2'} = L^1$  o  $L^3$ , lo más preferiblemente con  $R^2-R^{2'} = L^3$ . Preferiblemente,  $L^{21}$  se combina con  $R^2-R^{2'} = L^1$  o  $L^3$ , lo más preferiblemente con  $R^2-R^{2'} = L^1$ . Preferiblemente,  $L^{26}$  se combina con  $R^5-R^{5'} = L^1$  o  $L^3$ , más preferiblemente con  $R^5-R^{5'} = L^1$ , lo más preferiblemente con  $R^5-R^{5'} = L^1$ , en los que el ciclohexilo está *trans*-1,4-disustituido. Se prefiere especialmente la combinación de ligador  $L^{19}$  con  $R^2-R^{2'} = L^3$  y  $R^3 = H, Me, Et, iPr, CH_2OCH_3$  o  $CH_2CF_3$ , más preferiblemente  $R^3 = Me, Et, iPr$  o  $CH_2CF_3$ .

En otra realización de la invención, los ligadores especialmente preferidos son  $L^7$  y  $L^1$ , y un ligador aún más preferido es  $L^7$ .

10 Los compuestos preferidos según la invención se identifican más adelante en la presente memoria como los compuestos A a O, que se definen mediante la fórmula general (I), en la que:

- para el compuesto A:  $L = L^1, R^1-R^2 = L^1, R^3 = H, R^4 = H, X = Cl^-$ ;
- para el compuesto B:  $L = L^1, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl^-$ ;
- para el compuesto C:  $L = L^2, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl^-$ ;
- 15 - para el compuesto D:  $L = L^3, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl^-$ ;
- para el compuesto E:  $L = L^4, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = \text{ausente}, R^4 = H; X = TFA^-$ ;
- para el compuesto F:  $L = L^5, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = \text{ausente}, R^4 = H; X = TFA^-$ ;
- para el compuesto G:  $L = L^6, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = \text{ausente}, R^4 = H; X = TFA^-$ ;
- para el compuesto H:  $L = L^3, R^1 = H, R^2 = Me, R^3 = Me, R^4 = Me; X = I^-$ ;

20 - para el compuesto I:  $L = L^1, R^1 = H, R^2 = Me, R^3 = Me, R^4 = Me; X = I^-$ ;

- para el compuesto J:  $L = L^7, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = \text{ausente}, R^4 = H; X = Cl^-$ ;

- para el compuesto K:  $L = L^8, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = \text{ausente}, R^4 = H; X = Cl^-$ ;

- para el compuesto L:  $L = L^9, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = \text{ausente}, R^4 = H; X = Cl^-$ ;

- para el compuesto M:  $L = L^{10}, R^1-R^{1'} = L^1, R^2 = H, R^3 = \text{ausente}, R^4 = H; X = TFA^-$ ;

25 - para el compuesto N:  $L = L^{11}, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl^-$ ;

- para el compuesto O:  $L = L^{12}, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = \text{ausente}, R^4 = H; X = Cl^-$ .

Los compuestos preferidos adicionales según la invención se identifican más adelante en la presente memoria como los compuestos P a AH, que se definen mediante la fórmula general (I), en la que:

- para el compuesto P:  $L = L^{13}, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl^-$ ;
- 30 - para el compuesto Q:  $L = L^{14}, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl^-$ ;
- para el compuesto R:  $L = L^{15}, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl^-$ ;
- para el compuesto S:  $L = L^{11}, R^1 = H, R^2 = Me, R^3 = Me, R^4 = H; X = Cl^-$ ;
- para el compuesto T:  $L = L^{16}, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl^-$ ;
- para el compuesto U:  $L = L^{17}, R^1 = H, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl^-$ ;
- 35 - para el compuesto V:  $L = L^{16}, R^1 = H, R^2 = Me, R^3 = Me, R^4 = H; X = Cl^-$ ;
- para el compuesto W:  $L = L^8, R^1 = H, R^2-R^{2'} = L^3, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl^-$ ;
- para el compuesto X:  $L = L^{19}, R^1 = H, R^2-R^{2'} = L^3, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl^-$ ;
- para el compuesto Y:  $L = L^{20}, R^1 = H, R^2 = H, R^5-R^{5'} = L^3, R^3 = \text{ausente}, R^4 = H; X = Cl^-$ ;
- para el compuesto Z:  $L = L^{21}, R^1 = H, R^2-R^{2'} = L^1, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl^-$ ;
- 40 - para el compuesto AA:  $L = L^{22}, R^1-R^{1'} = L^1, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl^-$ ;
- para el compuesto AB:  $L = L^{23}, R^1-R^{1'} = L^1, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H; X = Cl^-$ ;

- para el compuesto AC:  $L = L^{24}$ ,  $R^1-R^1 = L^3$ ,  $R^2 = H$ ,  $R^3 = H$ ,  $R^4 = H$ ;  $X = Cl^-$ ;
- para el compuesto AD:  $L = L^{25}$ ,  $R^1-R^1 = L^3$ ,  $R^2 = H$ ,  $R^3 =$  ausente,  $R^4 = H$ ;  $X = Cl^-$ ;
- para el compuesto AE:  $L = L^{26}$ ,  $R^1 = H$ ,  $R^2 = H$ ,  $R^5-R^5 = L^1$ ,  $R^3 = H$ ,  $R^4 = H$ ;  $X = Cl^-$ .
- para el compuesto AF:  $L = L^{19}$ ,  $R^1 = H$ ,  $R^2-R^2 = L^3$ ,  $R^3 = Me$ ,  $R^4 = H$ ;  $X = Cl^-$ ;
- 5 - para el compuesto AG:  $L = L^{19}$ ,  $R^1 = H$ ,  $R^2-R^2 = L^1$ ,  $R^3 = H$ ,  $R^4 = H$ ;  $X = Cl^-$ ;
- para el compuesto AH:  $L = L^{21}$ ,  $R^1 = H$ ,  $R^2-R^2 = L^1$ ,  $R^3 = Me$ ,  $R^4 = H$ ;  $X = HCOO^-$

En una realización, el compuesto de la invención no es el compuesto D, y se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en los compuestos A a C y E a AH, más preferiblemente del grupo que consiste en los compuestos A a C y E a P.

- 10 En una realización de la invención, los compuestos especialmente preferidos son los compuestos F, K, N y O. Los compuestos aún más preferidos según la invención son los compuestos K y N. El compuesto más preferido según esta realización de la invención es el compuesto N. Los compuestos preferidos adicionales según esta realización son los compuestos U, V, T, X, Z, AE, AF, AG y AH, más preferiblemente los compuestos U, V, X, Z, AE, AF y AH, lo más preferiblemente los compuestos V, X y AF. Así, según esta realización, los compuestos preferidos son F, K, N,
- 15 O, U, V, T, X, Z, AE, AF, AG y AH, más preferiblemente K, N, U, V, X, Z, AE, AF y AH, lo más preferiblemente V, X y AF.

El compuesto F puede tener la configuración *R*, la configuración *S* o una mezcla de las mismas, preferiblemente el compuesto F es una mezcla de los enantiómeros *R* y *S*, más preferiblemente una mezcla racémica. El compuesto K puede tener la configuración *R*, la configuración *S* o una mezcla de las mismas, preferiblemente el compuesto K es una mezcla de los enantiómeros *R* y *S*, más preferiblemente una mezcla racémica. El compuesto N puede tener la configuración *R,R*, la configuración *R,S*, la configuración *S,R*, la configuración *S,S* o cualquier mezcla de las mismas, preferiblemente el compuesto N es una mezcla de los diastereómeros *R,S* y *S,S*, más preferiblemente una mezcla 1/1 (mol/mol). El compuesto O puede tener la configuración *R,R*, la configuración *R,S*, la configuración *S,R*, la configuración *S,S* o cualquier mezcla de las mismas, preferiblemente el compuesto O es una mezcla de los diastereómeros *R,S* y *S,S*, más preferiblemente una mezcla 1/1 (mol/mol). El compuesto U puede tener la configuración *R*, la configuración *S* o una mezcla de las mismas, preferiblemente el compuesto U tiene la configuración *R* o la configuración *S*. El compuesto V puede tener la configuración *R*, la configuración *S* o una mezcla de las mismas, preferiblemente el compuesto V tiene la configuración *R*. El compuesto T puede tener la configuración *R*, la configuración *S* o una mezcla de las mismas, preferiblemente el compuesto T tiene la configuración *R* o la configuración *S*. El compuesto X puede tener la configuración *R,R*, la configuración *R,S*, la configuración *S,R*, la configuración *S,S* o cualquier mezcla de las mismas, preferiblemente el compuesto X tiene la configuración *S,R*. El compuesto Z puede tener la configuración *R*, la configuración *S* o una mezcla de las mismas, preferiblemente el compuesto Z es una mezcla de los enantiómeros *R* y *S*, más preferiblemente una mezcla racémica. El compuesto AE puede tener la configuración *R,trans*, la configuración *R,cis*, la configuración *S,trans*, la configuración *S,cis* o cualquier mezcla de las mismas, preferiblemente el compuesto AE tiene la configuración *R,trans* o la configuración *S,trans*. El compuesto AF puede tener la configuración *R,R*, la configuración *R,S*, la configuración *S,R*, la configuración *S,S* o cualquier mezcla de las mismas, preferiblemente el compuesto AF tiene la configuración *S,R*. El compuesto AG puede tener la configuración *R,R*, la configuración *R,S*, la configuración *S,R*, la configuración *S,S* o cualquier mezcla de las mismas, preferiblemente el compuesto AG tiene la configuración *S,S* o la configuración *S,R*. El compuesto AH puede tener la configuración *R*, la configuración *S* o una mezcla de las mismas, preferiblemente el compuesto AH tiene la configuración *R*. En la presente memoria, el primer designador (*R* o *S*) de la configuración es para la posición 2 del resto de Trolox, y en caso de que un estereocentro adicional esté presente en el compuesto según la invención, la configuración del mismo se define mediante el segundo designador. Los compuestos más preferidos según la invención son el compuesto V en la configuración *R* (*R-V*), el compuesto X en la configuración *S,R* (*S,R-X*) y el compuesto AF en la configuración *S,R* (*S,R-AF*).

En otra realización de la invención, los compuestos especialmente preferidos son los compuestos I y J, y un compuesto aún más preferido es el compuesto J.

La invención también incluye todos los estereoisómeros e isómeros geométricos de los compuestos, que incluyen los diastereómeros, enantiómeros, e isómeros *cis/trans* (*E/Z*). La invención también incluye las mezclas de estereoisómeros y/o isómeros geométricos en cualquier proporción, que incluyen, pero sin limitación, las mezclas racémicas.

En una realización, el compuesto según la invención no es el compuesto representado mediante la fórmula (I), en el que:

- $L = -(CH_2)_3-(L^3)$ ,  $R^1 = H$ ,  $R_2 = H$ ,  $R^3 = H$ ,  $R^4 = H$ ;  $X = Cl$ ; y/o
- 55 -  $L = -(CH_2)_2-CHR^1-CH_2-NH-(CH_2)_4-$ ,  $R^1-R^1 = -(CH_2)_2-(L^1)$ ,  $R^2 = H$ ,  $R^3 = -(CH_2)_2-CH_3$  (propilo),  $R^4 = H$ ;  $X = Cl$ ; y/o

- L =  $-(\text{CH}_2)_3(\text{L}^3)$ ,  $\text{R}^1 = \text{H}$ ,  $\text{R}^2 = \text{H}$ ,  $\text{R}^3 = \text{H}$ ,  $\text{R}^4 = \text{H}$ ; X = TFA, que está en la configuración S en la posición 2 del resto de Trolox™.

5 Los compuestos se pueden administrar en forma de profármaco. Los profármacos son derivados de los compuestos que son relativamente inactivos por sí mismos, pero que se convierten en el compuesto activo cuando se introducen en el sujeto en el que se usan, mediante un proceso químico o biológico *in vivo*, tal como una conversión enzimática. Las formulaciones de profármacos adecuadas incluyen, pero sin limitación, conjugados con péptidos de los compuestos de la invención y ésteres de los compuestos de la invención. Se proporciona una discusión adicional de los profármacos adecuados en H. Bundgaard, Design of Prodrugs (Nueva York: Elsevier, 1985); en R. Silverman, The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action (Boston: Elsevier, 2004); en R. L. Juliano, Biological Approaches to the Controlled Delivery of Drugs (Annals of the New York Academy of Sciences, volumen 507, Nueva York: N. Y. Academy of Sciences, 1987); y en E. B. Roche, Design of Biopharmaceutical Properties Through Prodrugs and Analogs (simposio patrocinado por la Medicinal Chemistry Section, APhA Academy of Pharmaceutical Sciences, reunión nacional de noviembre de 1976, Orlando, Florida), publicado por la academia en Washington, 1977.

15 Los diversos compuestos de la invención se pueden administrar como agentes terapéuticos o cosméticos de por sí, o como profármacos que se convertirán en otras sustancias eficaces en el cuerpo.

Los compuestos de la invención son útiles para modular la morfología mitocondrial, es decir, la fragmentación mitocondrial o la filamentación mitocondrial, y/o para modular la expresión (es decir, los niveles en el estado estacionario) de las enzimas de OXPHOS, tales como el complejo I y el complejo II. Así, en un aspecto, la invención se refiere al uso de los compuestos de la invención en métodos terapéuticos y/o cosméticos para modular al menos uno de la morfología mitocondrial y la expresión de enzimas de OXPHOS.

25 En una realización, el efecto de los compuestos de la invención incluye una o más de la inducción de la filamentación mitocondrial, la prevención o reducción de la fragmentación mitocondrial, y la expresión incrementada de enzimas de OXPHOS. Los compuestos preferidos para esta realización son los compuestos en los que los ligadores son  $\text{L}^5$ ,  $\text{L}^8$ ,  $\text{L}^{11}$ ,  $\text{L}^{12}$ ,  $\text{L}^{16}$ ,  $\text{L}^{17}$ ,  $\text{L}^{19}$ ,  $\text{L}^{21}$  y  $\text{L}^{26}$ , preferiblemente en estos compuestos los ligadores son  $\text{L}^8$ ,  $\text{L}^{11}$ ,  $\text{L}^{16}$ ,  $\text{L}^{17}$ ,  $\text{L}^{19}$ ,  $\text{L}^{21}$  y  $\text{L}^{26}$ , y los ligadores más preferidos según esta realización de la invención son  $\text{L}^{16}$  y  $\text{L}^{19}$ . De manera más específica, los compuestos preferidos de la invención que tienen uno o más de estos efectos son los compuestos F, K, N, O, U, V, T, X, Z, AE, AF, AG y AH. Los compuestos más preferidos según la invención que tienen uno o más de estos efectos son los compuestos K, N U, V, X, Z, AE, AF y AH. Los compuestos más preferidos según esta realización de la invención son los compuestos V, X y AF.

35 En otra realización, el efecto de los compuestos de la invención incluye uno o más de la reducción de la filamentación mitocondrial, la inducción de la fragmentación mitocondrial, y la expresión reducida de enzimas de OXPHOS. Los compuestos preferidos para esta realización son los compuestos en los que los ligadores son  $\text{L}^7$  y  $\text{L}^1$ , y un ligador aún más preferido es  $\text{L}^7$ . De manera más específica, los compuestos preferidos de la invención que tienen uno o más de estos efectos son los compuestos I y J, y un compuesto aún más preferido que tiene uno o más de estos efectos es el compuesto J.

En otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto de la invención como se definió anteriormente en la presente memoria para el uso como medicamento. El medicamento se puede usar para aplicaciones tanto médicas (humanas) como veterinarias (animales).

40 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un compuesto de la invención para el uso en un método de tratamiento, prevención, o inhibición de los síntomas asociados a un trastorno mitocondrial o a una afección asociada a la disfunción mitocondrial, y el método comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de uno o más compuestos de la invención como se definieron anteriormente en la presente memoria. De manera alternativa, la invención se refiere a un compuesto de la invención como se definió anteriormente en la presente memoria, para el uso en un método de tratamiento, prevención, o inhibición de los síntomas asociados a un trastorno mitocondrial o a una afección asociada a la disfunción mitocondrial. Los métodos de la invención comprenden preferiblemente administrar a un sujeto una cantidad eficaz de uno o más compuestos de la invención como se definieron anteriormente en la presente memoria, y un vehículo o excipiente aceptable, preferiblemente un vehículo o excipiente farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable.

50 Los compuestos preferidos de la invención para el tratamiento de un trastorno mitocondrial y/o una afección asociada a la disfunción mitocondrial son compuestos de los cuales el efecto incluye uno o más de la inducción de la filamentación mitocondrial, la prevención o reducción de la fragmentación mitocondrial, y la expresión incrementada de enzimas de OXPHOS, como se definió anteriormente en la presente memoria.

55 Preferiblemente, el trastorno mitocondrial y/o la afección asociada a la disfunción mitocondrial es una afección caracterizada por una deficiencia de OXPHOS. Todas las células necesitan energía. La escasez de energía, por lo tanto, afecta a la actividad de todas las células. Así, en principio, todas las células se ven afectadas por una cantidad subóptima de uno o más de los complejos OXPHOS. Sin embargo, la cantidad exacta que es subóptima varía de célula a célula. Las células que tienen un consumo relativamente elevado de energía, tales como las células

5 cerebrales y musculares, requieren en general una cantidad mayor de complejos del sistema OXPHOS que las células que tienen un consumo bajo de energía, tales como las células T en reposo. Así, las células que se ven afectadas por dicha deficiencia asociada a una deficiencia de la fosforilación oxidativa son, en general pero no necesariamente, células musculares o células cerebrales. Los trastornos mitocondriales son pleiotrópicos en su manifestación clínica. Se pueden ver afectados diversos tejidos, como por ejemplo páncreas, corazón, hígado, ojo, oído interno, sangre, colon y riñón. Además, también las células de tejidos sin afectación clínica como los fibroblastos muestran con frecuencia un defecto mitocondrial. Las células afectadas por una deficiencia de OXPHOS se pueden tratar, y se les puede proporcionar una cantidad mayor de complejo OXPHOS proporcionando a la célula un compuesto de la invención. Una célula está afectada por una deficiencia de OXPHOS cuando la capacidad de OXPHOS es inferior a la normal (es decir, una célula comparable de la misma especie de un individuo sano). La capacidad es inferior en general a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. Aparte de proceder de un individuo con una deficiencia de OXPHOS, existen varios métodos para determinar si una célula tiene una deficiencia de OXPHOS, y tales ensayos abarcan, pero sin limitación, el consumo de oxígeno, la capacidad de producción de ATP, y las actividades enzimáticas de los complejos OXPHOS individuales (Chretien y Rustin J Inherit Metab Dis. 2003; 26 (2-3): 189-98). Se ha descubierto sorprendentemente que la administración de un compuesto de la invención a una célula da como resultado cantidades mayores de complejos OXPHOS, (es decir, las mitocondrias de las células).

20 Preferiblemente, el trastorno mitocondrial es un trastorno seleccionado del grupo que consiste en: Epilepsia mioclónica; epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas (MERRF); neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL); neuropatía, ataxia y retinosis pigmentaria (NARP); miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica, accidente cerebrovascular (MELAS); síndrome de Leigh; síndrome similar a Leigh; atrofia óptica dominante (AOD); síndrome de Kearns-Sayre (KSS); diabetes y sordera de herencia materna (MIDD); síndrome de Alpers-Huttenlocher; espectro ataxia-neuropatía; oftalmoplejía externa progresiva crónica (OEPC); síndrome de Pearson; encefalopatía neurogastro-intestinal mitocondrial (MNGIE); síndrome de Sengers; aciduria 3-metilglutacónica, sordera neurosensorial, encefalopatía y hallazgos neurorradiológicos del síndrome similar a Leigh (MEGDEL); síndrome de Leigh asociado a SURF1; miopatía; miopatía mitocondrial; cardiomiopatía; y encefalopatía y trastornos de la fosforilación oxidativa aislados o combinados.

30 Preferiblemente, la afección asociada a la disfunción mitocondrial es una afección seleccionada del grupo que consiste en: Ataxia de Friedreich (FRDA); acidosis tubular renal; enfermedad de Parkinson; enfermedad de Alzheimer; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); enfermedad de Huntington; síndrome de Barth (también conocido como aciduria 3-metilglutacónica tipo II); degeneración macular, preferiblemente degeneración macular relacionada con la edad; trastornos generalizados del desarrollo; pérdida auditiva, sordera; diabetes; envejecimiento; efectos farmacológicos adversos que dificultan la función mitocondrial (normal), que incluyen, p.ej., la disfunción mitocondrial provocada por inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (NRTIs), ciertos antibióticos y fármacos antiepilépticos; y lesión por isquemia y reperfusión, preferiblemente lesión por reperfusión isquémica tras infarto agudo de miocardio (IAM), tras accidente cerebrovascular, que incluye accidente cerebrovascular perinatal, tras choque hemorrágico, tras isquemia intestinal, tras cirugía coronaria urgente para angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP) fallida, tras cirugía vascular con pinzamiento cruzado de vasos sanguíneos (p.ej. de la aorta, que conduce a isquemia del músculo esquelético), tras pancreatitis tras manipulación de conductos pancreáticos o biliares (ERCP), y/o tras trasplante de órganos.

40 En la presente memoria se entiende que "sujeto", "individuo", o "paciente" es un organismo individual, preferiblemente un vertebrado, más preferiblemente un mamífero, lo más preferiblemente un ser humano.

45 "Tratamiento" de una enfermedad con los compuestos y métodos discutidos en la presente memoria se define como la administración de uno o más de los compuestos discutidos en la presente memoria, con o sin agentes terapéuticos adicionales, para reducir o eliminar la enfermedad o uno o más síntomas de la enfermedad, o retrasar la progresión de la enfermedad o de uno o más síntomas de la enfermedad, o reducir la gravedad de la enfermedad o de uno o más síntomas de la enfermedad. La "inhibición" de una enfermedad con los compuestos y métodos discutidos en la presente memoria se define como la administración de uno o más de los compuestos discutidos en la presente memoria, con o sin agentes terapéuticos adicionales, para inhibir la manifestación clínica de la enfermedad, o para inhibir la manifestación de los síntomas adversos de la enfermedad. La distinción entre tratamiento e inhibición es que el tratamiento se da después de que se manifiesten los síntomas adversos de la enfermedad en un sujeto, mientras la inhibición se da antes de que se manifiesten los síntomas adversos de la enfermedad en un sujeto. La inhibición puede ser parcial, sustancialmente total, o total. Debido a que muchos de los trastornos mitocondriales son hereditarios, se puede usar el cribado genético para identificar los pacientes con riesgo hacia la enfermedad. Los compuestos y métodos de la invención se pueden administrar entonces a pacientes asintomáticos con riesgo de desarrollar los síntomas clínicos de la enfermedad, para inhibir la aparición de cualquier síntoma adverso. El "uso terapéutico" de los compuestos discutidos en la presente memoria se define como el uso de uno o más de los compuestos discutidos en la presente memoria para tratar o inhibir una enfermedad, como se definió anteriormente. Una "cantidad eficaz" de un compuesto es una cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un sujeto, es suficiente para reducir o eliminar uno o más síntomas de una enfermedad, o para retrasar la progresión de uno o más síntomas de una enfermedad, o para reducir la gravedad de uno o más síntomas de una enfermedad, o para inhibir la manifestación de una enfermedad, o para inhibir la manifestación de los síntomas adversos de una enfermedad. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones.



Se usan varios marcadores clínicos fácilmente medibles para estudiar el estado metabólico de los pacientes con trastornos mitocondriales. Estos marcadores también se pueden usar como indicadores de la eficacia de la terapia que usa los compuestos de la invención, a medida que el nivel de un marcador se desplaza desde el valor patológico hasta el valor normal. Estos marcadores clínicos incluyen, pero sin limitación, uno o más de los biomarcadores de energía, tales como los niveles de ácido láctico (lactato), en sangre completa, plasma, líquido cefalorraquídeo, o líquido ventricular cerebral; niveles de ácido pirúvico (piruvato), en sangre completa, plasma, líquido cefalorraquídeo, o líquido ventricular cerebral; proporciones lactato/piruvato, en sangre completa, plasma, líquido cefalorraquídeo, o líquido ventricular cerebral; aminoácidos, en particular alanina, citrulina y prolina en sangre completa, plasma, líquido cefalorraquídeo, ácidos orgánicos en fluidos corporales, FGF21 en suero y músculo esquelético, niveles de fosfocreatina, niveles de NADH (NADH + H<sup>+</sup>) o NADPH (NADPH + H<sup>+</sup>); niveles de NAD o NADP; niveles de ATP; umbral anaeróbico; niveles de coenzima Q reducida (CoQ<sup>red</sup>); niveles coenzima Q oxidada (CoQ<sup>ox</sup>); niveles totales de coenzima Q (CoQ<sup>tot</sup>); niveles de citocromo C oxidado; niveles de citocromo C reducido; proporción citocromo C oxidado/citocromo C reducido; niveles de acetoacetato, niveles de beta-hidroxi butirato, proporción acetoacetato/betahidroxi butirato, niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG); niveles de especies reactivas de oxígeno; y niveles de consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>), niveles de producción de dióxido de carbono (VCO<sub>2</sub>), y cociente respiratorio (VCO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>). Varios de estos marcadores clínicos se miden de manera rutinaria en los laboratorios de fisiología del ejercicio, y proporcionan determinaciones adecuadas del estado metabólico de un sujeto. En una realización de la invención, el nivel de uno o más biomarcadores de energía en un paciente que padece una enfermedad mitocondrial, tal como ataxia de Friedreich, neuropatía óptica hereditaria de Leber, atrofia óptica dominante, síndrome de Leigh, SURF1, MERRF, MELAS, o KSS, se mejora hasta un valor dentro de dos desviaciones estándar del nivel medio en un sujeto sano. En otra realización de la invención, el nivel de uno o más de estos biomarcadores de energía en un paciente que padece una enfermedad mitocondrial, tal como ataxia de Friedreich, neuropatía óptica hereditaria de Leber, atrofia óptica dominante, síndrome de Leigh, SURF1, MERRF, MELAS, o KSS, se mejora hasta un valor dentro de una desviación estándar del nivel medio en un sujeto sano. La intolerancia al ejercicio también se puede usar como indicador de la eficacia de una terapia determinada, en la que una mejora de la tolerancia al ejercicio (es decir, una disminución de la intolerancia al ejercicio) indica la eficacia de una terapia determinada.

Ya se han usado varios biomarcadores metabólicos para determinar la eficacia de CoQ<sub>10</sub>, y estos biomarcadores metabólicos se pueden monitorizar como biomarcadores de energía para el uso en los métodos de la presente invención. El piruvato, un producto del metabolismo anaerobio de la glucosa, se elimina mediante la reducción a ácido láctico en un entorno anaerobio o mediante el metabolismo oxidativo, que depende de una OXPHOS mitocondrial funcional. La disfunción de la OXPHOS puede conducir a la eliminación inadecuada de lactato y piruvato de la circulación, y se observan proporciones lactato/piruvato elevadas en las citopatías mitocondriales (véase Scriver CR, *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7<sup>a</sup> ed., Nueva York: McGraw-Hill, Health Professions Division, 1995; y Munnich et al., *J. Inherit. Metab. Dis.* 15(4):448-55 (1992)). La proporción lactato/piruvato en sangre (Chariot et al., *Arch. Pathol. Lab. Med.* 118(7):695-7 (1994)) se usa de manera generalizada, por lo tanto, como un ensayo no invasivo para la detección de citopatías mitocondriales (véase de nuevo Scriver CR, *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7<sup>a</sup> ed., Nueva York: McGraw-Hill, Health Professions Division, 1995; y Munnich et al., *J. Inherit. Metab. Dis.* 15(4):448-55 (1992)) y miopatías mitocondriales tóxicas (Chariot et al., *Arthritis Rheum.* 37(4):583-6 (1994)). Los cambios del estado redox de las mitocondrias del hígado se pueden investigar midiendo la tasa de cuerpos cetónicos arteriales (acetoacetato/3-hidroxi-butanato: AKBR) (Ueda et al., *J. Cardiol.* 29(2):95-102 (1997)). La excreción urinaria de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) se ha usado a menudo como biomarcador para estudiar el grado de reparación del daño del ADN inducido por ROS en entornos tanto clínicos como ocupacionales (Erhola et al., *FEBS Lett.* 409(2):287-91 (1997); Honda et al., *Leuk. Res.* 24(6):461-8 (2000); Pilger et al., *Free Radic. Res.* 35(3):273-80 (2000); Kim et al., *Environ Health Perspect* 112(6):666-71 (2004)).

La espectroscopía de resonancia magnética (MRS) ha sido útil en los diagnósticos de citopatía mitocondrial mediante la demostración de elevaciones de lactato en líquido cefalorraquídeo (LCR) y sustancia blanca cortical mediante el uso de MRS de protón (<sup>1</sup>H-MRS) (Kaufmann et al., *Neurology* 62(8):1297-302 (2004)). Se ha usado MRS de fósforo (<sup>31</sup>P-MRS) para demostrar los niveles bajos de fosfocreatina cortical (PCr) (Matthews et al., *Ann. Neurol.* 29(4):435-8 (1991)), y un retraso de la cinética de recuperación de PCr tras el ejercicio en músculo esquelético (Matthews et al., *Ann. Neurol.* 29(4):435-8 (1991); Barbiroli et al., *J. Neurol.* 242(7):472-7 (1995); Fabrizi et al., *J. Neurol. Sci.* 137(1):20-7 (1996)). También se ha confirmado una PCr baja en músculo esquelético en pacientes con citopatía mitocondrial mediante medidas bioquímicas directas.

Las pruebas de ejercicio son especialmente útiles como determinación y herramienta de cribado en las miopatías mitocondriales. Una de las características distintivas de las miopatías mitocondriales es una reducción del consumo máximo de oxígeno de todo el cuerpo (VO<sub>2</sub>max) (Taivassalo et al., *Brain* 126(Pt 2):413-23 (2003)). Dado que el VO<sub>2</sub>max se determina mediante el gasto cardíaco (GC) y la diferencia de extracción de oxígeno periférica (contenido de oxígeno total arterial-venoso), algunas citopatías mitocondriales afectan a la función cardíaca, en las que el transporte puede estar alterado; sin embargo, la mayoría de miopatías mitocondriales muestran un déficit característico de extracción de oxígeno periférica (diferencia de O<sub>2</sub> A-V) y un transporte de oxígeno incrementado (circulación hipercinética) (Taivassalo et al., *Brain* 126(Pt 2):413-23 (2003)). Esto se puede demostrar por la ausencia de desoxigenación inducida por el ejercicio de la sangre venosa con medidas de equilibrio AV directas

(Taivassalo et al., *Ann. Neurol.* 51(1):38-44 (2002)) y de manera no invasiva mediante espectroscopía de infrarrojo cercano (Lynch et al., *Muscle Nerve* 25(5):664-73 (2002); van Beekvelt et al., *Ann. Neurol.* 46(4):667-70 (1999)).

5 Varios de estos biomarcadores de energía se discuten con más detalle como sigue. Se debería recalcar que, aunque se discuten y enumeran ciertos biomarcadores de energía en la presente memoria, la invención no se limita a la modulación, la normalización o el aumento solamente de estos biomarcadores de energía enumerados.

10 Niveles de ácido láctico (lactato): La disfunción mitocondrial en general da como resultado niveles anormales de ácido láctico, ya que se incrementan los niveles de piruvato y el piruvato se convierte en lactato para mantener la capacidad de glicolisis. La disfunción mitocondrial también puede dar como resultado niveles anormales de NADH + H<sup>+</sup>, NADPH + H<sup>+</sup>, NAD, o NADP, ya que los dinucleótidos de nicotinamida adenina reducidos no se procesan de manera eficaz en la cadena respiratoria. Los niveles de lactato se pueden medir tomando muestras de fluidos corporales adecuados, tales como sangre completa, plasma, o líquido cefalorraquídeo. Mediante el uso de resonancia magnética, se pueden medir los niveles de lactato en prácticamente cualquier volumen del organismo deseado, tal como el cerebro.

15 La medida de la acidosis láctica cerebral mediante el uso de resonancia magnética en pacientes de MELAS se describe en Kaufmann et al., *Neurology* 62(8):1297 (2004). Se presentan los valores de los niveles de ácido láctico en los ventrículos laterales del cerebro para dos mutaciones que dan como resultado MELAS, mt.3243A>G y mt.8344A>G. Los niveles de lactato en sangre completa, plasma, y líquido cefalorraquídeo se pueden medir mediante un equipo disponible comercialmente, tal como YSI 2300 STAT Plus Glucose & Lactate Analyzer (YSI Life Sciences, Ohio).

20 Niveles de NAD, NADP, NADH y NADPH: La medida de NAD, NADP, NADH (NADH + H<sup>+</sup>) o NADPH (NADPH + H<sup>+</sup>) se puede realizar mediante una diversidad de técnicas fluorescentes, enzimáticas o electroquímicas, p.ej., el ensayo electroquímico descrito en el documento US2005/0067303.

25 Consumo de oxígeno (vO<sub>2</sub> o VO<sub>2</sub>), producción de dióxido de carbono (vCO<sub>2</sub> o VCO<sub>2</sub>), y cociente respiratorio (VCO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>): vO<sub>2</sub> se mide normalmente en reposo (vO<sub>2</sub> en reposo) o a una intensidad máxima de ejercicio (vO<sub>2</sub> max). De manera óptima, se medirán ambos valores. Sin embargo, para los pacientes gravemente incapacitados, la medida de vO<sub>2</sub> max puede ser poco práctica. La medida de ambas formas de vO<sub>2</sub> se lleva a cabo fácilmente mediante el uso de un equipo estándar de una diversidad de proveedores, p.ej. Korr Medical Technologies, Inc. (Salt Lake City, Utah). VCO<sub>2</sub> también se puede medir fácilmente, y la proporción de VCO<sub>2</sub> a VO<sub>2</sub> en las mismas condiciones (VCO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>, en reposo o a una intensidad máxima de ejercicio) proporciona el cociente respiratorio (CR).

30 Citocromo C oxidado, Citocromo C reducido, y proporción de Citocromo C oxidado respecto del Citocromo C reducido: Los parámetros de citocromo C, tales como los niveles de citocromo C oxidado (Cyt C<sup>ox</sup>), los niveles de citocromo C reducido (Cyt C<sup>red</sup>), y la proporción de citocromo C oxidado/citocromo C reducido (Cyt C<sup>ox</sup>)/(Cyt C<sup>red</sup>), se pueden medir mediante espectroscopía de infrarrojo cercano *in vivo*. Véase, p.ej., Rolfe, P., "In vivo near-infrared spectroscopy", *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2:715-54 (2000) y Strangman et al., "Non-invasive neuroimaging using near-infrared light" *Biol. Psychiatry* 52:679-93 (2002).

35 Tolerancia al ejercicio/intolerancia al ejercicio: La intolerancia al ejercicio se define como "la capacidad reducida de llevar a cabo actividades que implican un movimiento dinámico de músculos esqueléticos grandes debido a síntomas de disnea o fatiga" (Pina et al., *Circulation* 107:1210 (2003)). La intolerancia al ejercicio va acompañada a menudo de mioglobulinuria, debida a la ruptura del tejido muscular y la excreción posterior de mioglobina muscular en la orina. Se pueden usar diversas medidas de intolerancia al ejercicio, tales como el tiempo transcurrido caminando o corriendo en una cinta antes del agotamiento, el tiempo transcurrido en una bicicleta fija (bicicleta estática) antes del agotamiento, y similares. El tratamiento con los compuestos o métodos de la invención puede dar como resultado una mejora de la tolerancia al ejercicio de alrededor de un 10% o más (por ejemplo, un incremento de alrededor de un 10% o más del tiempo hasta el agotamiento, p.ej. de 10 minutos a 11 minutos), una mejora de la tolerancia al ejercicio de alrededor de un 20% o más, una mejora de la tolerancia al ejercicio de alrededor de un 30% o más, una mejora de la tolerancia al ejercicio de alrededor de un 40% o más, una mejora de la tolerancia al ejercicio de alrededor de un 50% o más, una mejora de la tolerancia al ejercicio de alrededor de un 75% o más, o una mejora de la tolerancia al ejercicio de alrededor de un 100% o más. Aunque la tolerancia al ejercicio no es, estrictamente hablando, un biomarcador de energía, para los fines de la invención, la modulación, la normalización, o el aumento de los biomarcadores de energía incluyen la modulación, la normalización, o el aumento de la tolerancia al ejercicio.

40 De forma similar, los ensayos para los valores normales y anormales de los niveles de ácido pirúvico (piruvato), la proporción lactato/piruvato, los niveles de ATP, el umbral anaeróbico, los niveles de coenzima Q reducida (CoQ<sup>red</sup>), los niveles de coenzima Q oxidada (CoQ<sup>ox</sup>), los niveles de coenzima Q total (CoQ<sup>tot</sup>), los niveles de citocromo C oxidado, los niveles de citocromo C reducido, la proporción de citocromo C oxidado/citocromo C reducido, los niveles de acetoacetato, los niveles de beta-hidroxi butirato, la proporción acetoacetato/betahidroxi butirato, los niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), y los niveles de especies reactivas de oxígeno se conocen en la técnica y se pueden usar para determinar la eficacia de los compuestos y métodos de la invención. (Para los fines de la invención, la modulación, la normalización, o el aumento de los biomarcadores de energía incluyen la modulación, la

normalización, o el aumento del umbral anaeróbico).

La Tabla 1, a continuación, ilustra el efecto que pueden tener diversas disfunciones sobre los biomarcadores bioquímicos y de energía. También indica el efecto físico (tal como un síntoma de enfermedad u otro efecto de la disfunción) asociado en general a una disfunción determinada. Se debería indicar que cualquiera de los biomarcadores de energía enumerados en la tabla, además de los biomarcadores de energía enumerados en otra parte, también se pueden modular, incrementar, o normalizar mediante los compuestos y métodos de la invención. CR=cociente respiratorio; TMB=tasa metabólica basal; FC (GC)=frecuencia cardiaca (gasto cardiaco); T=temperatura corporal (preferiblemente medida como la temperatura central); UA=umbral anaeróbico; pH=pH sanguíneo (venoso y/o arterial).

5

10 Tabla 1

Sitio de disfunción	Suceso bioquímico	Biomarcador de Energía Medible	Efecto Físico
OXPPOS	↑ NADH	Δ lactato, Δ proporción lactato:piruvato, Δ proporción acetoacetato:β-hidroxibutirato	Discrasia metabólica y fatiga
OXPPOS	↑ NADH	Aminoácidos	Discrasia metabólica y fatiga
OXPPOS	↑ NADH	Ácidos orgánicos	Discrasia metabólica y fatiga
OXPPOS	↑ NADH	FGF21	Discrasia metabólica y fatiga
OXPPOS	↓ gradiente de H <sup>+</sup>	Δ ATP	Disfunción dependiente de órgano
OXPPOS	↓ Flujo de electrones	Δ VO <sub>2</sub> , CR, TMB, ΔT, UA, pH	Discrasia metabólica y fatiga
Mitocondrias y citosol	↓ ATP, ↓ VO <sub>2</sub>	Δ Esfuerzo, ΔHR (GC)	Intolerancia al ejercicio
Mitocondrias y citosol	↓ ATP	Δ PCr	Intolerancia al ejercicio
Cadena Respiratoria	↓ Cyt c <sup>Ox/Red</sup>	Δ ~ 700 - 900 nm (espectroscopía NIR)	Intolerancia al ejercicio
Metabolismo intermediario	↓ Catabolismo	Δ sustratos marcados con C <sup>14</sup>	Discrasia metabólica y fatiga
Cadena Respiratoria	↓ Flujo de electrones	Δ VO <sub>2</sub> venoso mixto	Discrasia metabólica y fatiga
Mitocondrias y citosol	↑ Estrés oxidativo	Δ Tocoferol y Tocotrienoles, CoQ10 ácido docosahexaenoico	Incierto
Mitocondrias y citosol	↑ Estrés oxidativo	Δ Glutation <sup>red</sup>	Incierto
Mitocondrias y citosol	Oxidación de ácidos nucleicos	Δ 8-hidroxi 2-desoxi guanosina	Incierto
Mitocondrias y citosol	Oxidación de lípidos	Δ Isoprostano(s), eicosanoides	Incierto
Membranas celulares	Oxidación de lípidos	Δ Etano (aliento)	Incierto
Membranas celulares	Oxidación de lípidos	Δ Malondialdehído	Incierto

El tratamiento de un sujeto afectado por una enfermedad mitocondrial puede dar como resultado la inducción de una reducción o mitigación de los síntomas en el sujeto, p.ej. para detener la progresión adicional del trastorno.

15

La inhibición parcial o completa de la enfermedad mitocondrial puede dar como resultado una disminución de la gravedad de uno o más de los síntomas que el sujeto experimentaría de otra manera. Por ejemplo, la inhibición parcial de MELAS podría dar como resultado la reducción del número padecido de episodios similares a accidente cerebrovascular o convulsiones.

Cualquier biomarcador de energía o cualquier combinación de los biomarcadores de energía descritos en la presente memoria proporciona de manera conveniente referencias medibles mediante las cuales calibrar la eficacia del tratamiento o la terapia inhibitoria. Además, los expertos en la técnica conocen otros biomarcadores de energía, y se pueden monitorizar para determinar la eficacia del tratamiento o la terapia inhibitoria.

5 La disfunción mitocondrial es una causa común de enfermedad multisistémica hereditaria que a menudo implica al sistema nervioso. A pesar de los avances importantes en la comprensión de la fisiopatología de las enfermedades mitocondriales, el tratamiento clínico de estas afecciones sigue siendo en gran medida sintomático. Mediante el uso de una aproximación sistemática (Pfeffer et al., 2013, *Nat. Rev. Neurol.* (en prensa) PMID: 23817350), se han identificado 1.039 publicaciones sobre tratamientos para enfermedades mitocondriales, de las cuales solamente 35  
10 incluían observaciones sobre más de cinco pacientes. Los informes de un resultado positivo basándose en un biomarcador de importancia clínica sin demostrar fueron más habituales en los estudios sin aleatorización y sin enmascaramiento, lo que sugiere un sesgo de las publicaciones hacia estudios positivos pero mal ejecutados. Aunque está mejorando el diseño de los ensayos, existe la necesidad fundamental de desarrollar biomarcadores nuevos de la enfermedad mitocondrial. Un ensayo clínico es tan fiable solamente como sus resultados, por lo tanto  
15 es extremadamente importante la selección cuidadosa y sistemática de los criterios de valoración. En la actualidad, la selección de los criterios de valoración para los ensayos clínicos diseñados para estudiar fármacos nuevos en pacientes con trastornos mitocondriales es ineficaz y no se ha abordado de manera sistemática. Dado que se pueden obtener datos significativos solamente a partir de ensayos en los que los resultados se estudian mediante el uso de instrumentos válidos, habría que centrarse primero en la validación de un grupo de instrumentos seleccionados en la población objetivo. Mediante el uso de una búsqueda exhaustiva en la bibliografía publicada, se recopiló sistemáticamente un conjunto de herramientas con criterios de valoración basados en una búsqueda primaria de posibles instrumentos (Koene et al., 2013, *Dev. Med. Child Neurol.* 55:698-706). Posteriormente, se redujo este conjunto de herramientas mediante el uso de criterios estrictos que se adaptaron de la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos. En los próximos años, se debe obtener más experiencia con el  
20 uso de estos criterios de valoración en niños con diversos fenotipos de enfermedades mitocondriales antes de poder extraer conclusiones fiables con respecto a la validez de estos instrumentos.

Así, en una realización preferida, se puede determinar la eficacia del tratamiento o la terapia inhibitoria con los métodos de la invención mediante el uso de uno o más de los criterios de valoración del conjunto de herramientas tal como se enumera en la Tabla 1 de Koene et al. (2013, anteriormente mencionado), y más preferiblemente se  
30 determina la eficacia mediante el uso de uno o más de los criterios de valoración del "grupo central común" de la Tabla 1 de Koene et al (2013, anteriormente mencionado).

En un aspecto adicional la invención se refiere a un compuesto de la invención para el uso en un método para el tratamiento, la prevención, o la inhibición de síntomas de una enfermedad neoplásica, y el método comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de uno o más compuestos de la invención como se definieron  
35 anteriormente en la presente memoria. De manera alternativa, la invención se refiere a un compuesto de la invención como se definió anteriormente en la presente memoria, para el uso en un método para el tratamiento, la prevención, o la inhibición de los síntomas de una neoplasia. Preferiblemente el método comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de uno o más compuestos de la invención como se definieron anteriormente en la presente memoria, y un vehículo o excipiente aceptable, preferiblemente un vehículo o excipiente farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable. Todas las células, lo que incluye las células neoplásicas, necesitan energía. La escasez de energía, por lo tanto, afecta a la actividad de todas las células, y en principio todas las células se ven afectadas por un funcionamiento subóptimo de las mitocondrias. Sin embargo, la cantidad exacta que es subóptima varía de célula a célula. Las células que tienen un consumo relativamente elevado de energía, tales como las células neoplásicas que se dividen rápidamente, requieren en general una cantidad mayor de complejos OXPHOS que las células que tienen un consumo bajo de energía, tales como las células en reposo. Así, las células neoplásicas son más sensibles a la inhibición de la función mitocondrial, que incluye OXPHOS, que las células normales. Los compuestos de la invención que tienen el efecto de uno o más de reducción de la filamentación mitocondrial, inducción de la fragmentación mitocondrial, y expresión reducida de enzimas de OXPHOS, tendrán por lo tanto un efecto más intenso sobre la actividad y el crecimiento de las células neoplásicas en comparación con las células normales.  
40  
45  
50 Como tales, los compuestos que tienen estos efectos se pueden usar para reducir o inhibir el crecimiento o incluso destruir células neoplásicas.

En una realización preferida del método de tratamiento, prevención, o inhibición de los síntomas de una enfermedad neoplásica, la enfermedad neoplásica o proliferativa es cáncer. En las realizaciones particulares, el cáncer se puede seleccionar del grupo que comprende carcinoma de células basales, cáncer de hueso, cáncer intestinal, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, melanoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata o cáncer de tiroides. En otras realizaciones, el cáncer se puede seleccionar del grupo que comprende leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielóide aguda, carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con el SIDA, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitoma, linfoma de células B, carcinoma de células basales, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, cáncer  
55 intestinal, glioma del tronco encefálico, tumor cerebral, cáncer de mama, adenomas/carcinoides bronquiales, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, astrocitoma cerebral/glioma maligno, cáncer de cuello uterino, cánceres infantiles, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, linfoma de células T cutáneas, tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, cáncer endometrial,  
60

ependimoma, cáncer esofágico, tumor extracraneal de células germinales, tumor extragonadal de células germinales, cáncer de vías biliares extrahepáticas, cáncer de ojo, melanoma intraocular/retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumor estromal gastrointestinal (GIST), tumor de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, glioma, carcinoide gástrico, cáncer de cabeza y/o cuello, cáncer de corazón, cáncer hepatocelular (hígado), cáncer hipofaríngeo, glioma de vía óptica e hipotalámico, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer laríngeo, leucemia (linfoblástica aguda/mieloide aguda/linfocítica crónica/mielógena crónica/células vellosas), cáncer de labios y/o de la cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, linfoma (relacionado con el SIDA/Burkitt/células T cutáneas/Hodgkin/no Hodgkin/sistema nervioso central primario), macroglobulinemia, histiocitoma fibroso maligno de hueso/osteosarcoma, meduloblastoma, melanoma, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer escamoso metastásico de cuello, cáncer de boca, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena, leucemia mieloide, trastornos mieloproliferativos, cáncer de la cavidad nasal y/o seno paranasal, carcinoma nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso, cáncer ovárico, cáncer epitelial ovárico, tumor de células germinales ováricas, cáncer pancreático, cáncer de células de los islotes, cáncer del seno paranasal y de la cavidad nasal, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer faríngeo, feocromocitoma, astrocitoma pineal, germinoma pineal, pineoblastoma y/o tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, adenoma hipofisario, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, linfoma del sistema nervioso central primario, cáncer de próstata, cáncer rectal, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer de glándula salivar, sarcoma de Ewing, sarcoma de Kaposi, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma uterino, síndrome de Sezary, cáncer de piel (no melanoma), cáncer de piel (melanoma), carcinoma de piel (células de Merkel), cáncer de pulmón microcítico, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer escamoso de cuello con tumor oculto metastásico primario, cáncer de estómago, tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial, linfoma de células T, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma y/o carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer transicional, tumor trofoblástico, cáncer de uréter y/o pelvis renal, cáncer uretral, cáncer endometrial uterino, sarcoma uterino, cáncer vaginal, glioma de vía óptica e hipotalámico, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom o tumor de Wilms.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso cosmético de los compuestos de la invención. Los compuestos de la invención se pueden usar así (en métodos) para revitalizar la piel de un individuo tratado, en particular en individuos con piel envejecida, debido al envejecimiento o debido a una exposición excesiva al sol. Ambas afecciones están relacionadas con la producción de radicales libres en la piel. Mediante al menos uno de inducción de la filamentación mitocondrial, prevención o reducción de la fragmentación mitocondrial, y expresión incrementada de enzimas de OXPHOS en una célula de dicho individuo, es posible disminuir la acción de los radicales libres en la piel y al menos retrasar el envejecimiento adicional de la piel. Como tal, también se puede usar una composición de la invención como producto profiláctico, es decir, para reducir al menos los radicales libres que podrían actuar sobre la piel, si se dejara sin tratar. Así, preferiblemente, en este aspecto de la invención se aplican los compuestos de la invención, cuyo efecto incluye uno o más de inducción de la filamentación mitocondrial, prevención o reducción de la fragmentación mitocondrial, y expresión incrementada de enzimas de OXPHOS. Los compuestos preferidos que tienen estos efectos se indican anteriormente en la presente memoria.

Los compuestos de la invención se pueden usar también en aplicaciones de investigación, tal como experimentos *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo* para modular uno o más biomarcadores de energía en un sistema experimental. Tales sistemas experimentales pueden ser muestras de células, muestras de tejidos, componentes de células o mezclas de componentes de células, órganos parciales, órganos completos, u organismos. Tales aplicaciones de investigación pueden incluir, pero sin limitación, el uso como reactivos de ensayo, la dilucidación de rutas bioquímicas, o la determinación de los efectos de otros agentes sobre el estado metabólico del sistema experimental en presencia/ausencia de uno o más compuestos de la invención.

Además, los compuestos de la invención se pueden usar en pruebas o ensayos bioquímicos. Tales ensayos pueden incluir la incubación de uno o más compuestos de la invención con un tejido o muestra de células de un sujeto para determinar la respuesta potencial de un sujeto (o la respuesta de un subgrupo específico de sujetos) a la administración de dicho o dichos compuestos, o para determinar qué compuesto de la invención produce el efecto óptimo en un sujeto específico o subgrupo de sujetos. Tal prueba o ensayo implicaría 1) obtener una muestra de células o muestra de tejidos de un sujeto o grupo de sujetos en los que se puede ensayar la modulación de uno o más biomarcadores de energía; 2) administrar uno o más compuestos de la invención a la(s) muestra(s) de célula(s) o muestra(s) de tejido(s); y 3) determinar la cantidad de modulación del o de los biomarcadores de energía después de la administración del o de los compuestos, en comparación con el estado del biomarcador de energía antes de la administración del o de los compuestos.

Otra prueba o ensayo implicaría 1) obtener una muestra de células o muestra de tejidos de un sujeto o grupo de sujetos en los que se puede ensayar la modulación de uno o más biomarcadores de energía; 2) administrar al menos dos compuestos de la invención a la(s) muestra(s) de célula(s) o muestra(s) de tejido(s); 3) determinar la cantidad de modulación del o de los biomarcadores de energía después de la administración de los al menos dos compuestos, en comparación con el estado del biomarcador de energía antes de la administración de los al menos dos compuestos, y 4) seleccionar un compuesto para el uso en el tratamiento, la inhibición, o la modulación

basándose en la cantidad de modulación determinada en la etapa 3).

Las composiciones que comprenden los compuestos de la invención, como se describieron anteriormente, se pueden preparar como una preparación medicinal o cosmética o en otros diversos medios, tales como alimentos para seres humanos o animales, que incluyen los alimentos médicos y los suplementos alimenticios. Un "alimento médico" es un producto que se destina al tratamiento alimenticio específico de una enfermedad o afección para la que existen necesidades nutricionales características. A modo de ejemplo, pero no de limitación, los alimentos médicos pueden incluir formulaciones de vitaminas y minerales administradas a través de un tubo de alimentación (denominado administración enteral). Un "suplemento alimenticio" significará un producto que se destina a suplementar la dieta humana, y se proporciona en general en forma de una píldora, cápsula, y comprimido o formulación similar. A modo de ejemplo, pero no de limitación, un suplemento alimenticio puede incluir uno o más de los siguientes ingredientes: vitaminas, minerales, hierbas medicinales, extractos naturales; aminoácidos, sustancias alimenticias destinadas a suplementar la dieta incrementando el consumo alimenticio total, y concentrados, metabolitos, constituyentes, extractos o combinaciones de cualquiera de lo anterior. Los suplementos alimenticios se pueden incorporar también en alimentos, que incluyen, pero sin limitación, barras alimenticias, bebidas, polvos, cereales, alimentos cocinados, aditivos alimentarios y caramelos; u otros alimentos funcionales diseñados para estimular la salud cerebral o para prevenir o detener la progresión de una enfermedad neurodegenerativa que implica una disfunción mitocondrial. Si se administra en forma de una preparación medicinal, la composición se puede administrar como profilaxis o tratamiento a un paciente con cualquiera de varios métodos. Las composiciones se pueden administrar solas o en combinación con otros agentes farmacéuticos o cosméticos, y se pueden combinar con un vehículo fisiológicamente aceptable de los mismos. La cantidad eficaz y el método de administración de la formulación particular pueden variar basándose en el sujeto individual, la afección o la etapa de la enfermedad, y otros factores evidentes para un experto en la técnica. Durante el transcurso del tratamiento, se puede monitorizar la concentración de las composiciones de interés para asegurar que se mantiene el nivel deseado. Las composiciones de interés se pueden mezclar con otros materiales fisiológicamente aceptables que se pueden ingerir que incluyen, pero sin limitación, alimentos.

Los compuestos descritos en la presente memoria se pueden formular como composiciones farmacéuticas o cosméticas mediante la formulación con aditivos tales como excipientes y vehículos farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables. Los excipientes y vehículos farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables adecuados incluyen agentes de procesamiento y modificadores y potenciadores de la administración de fármacos, tales como, por ejemplo, fosfato cálcico, estearato magnésico, talco, monosacáridos, disacáridos, almidón, gelatina, celulosa, metil celulosa, carboximetil celulosa sódica, dextrosa, hidroxipropil-P-ciclodextrina, polivinilpirrolidona, ceras de temperatura de fusión baja, resinas de intercambio iónico, y similares, así como combinaciones de dos o más de las mismas. Otros excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Pub. Co., Nueva Jersey (1991), y "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, 20ª edición (2003) y 21ª edición (2005), incorporados en la presente memoria como referencia.

Una composición farmacéutica o cosmética puede comprender una formulación de dosis unitaria, en la que la dosis unitaria es una dosis suficiente para tener un efecto terapéutico o inhibidor, o una cantidad eficaz para modular, normalizar, o aumentar un biomarcador de energía. La dosis unitaria puede ser suficiente en forma de una única dosis para tener un efecto terapéutico o inhibidor, o una cantidad eficaz para modular, normalizar, o aumentar un biomarcador de energía. De manera alternativa, la dosis unitaria puede ser una dosis administrada periódicamente en un curso de tratamiento para la inhibición de un trastorno, o para modular, normalizar, o aumentar un biomarcador de energía.

Las composiciones farmacéuticas o cosméticas que contienen los compuestos de la invención pueden estar en cualquier forma adecuada para el método deseado de administración, que incluyen, por ejemplo, una disolución, una suspensión, o una emulsión. Se usan en general vehículos líquidos al preparar las disoluciones, suspensiones, y emulsiones. Los vehículos líquidos contemplados para el uso en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, agua, solución salina, disolvente(s) orgánico(s) farmacéuticamente aceptable(s), aceites o grasas farmacéuticamente aceptables, y similares, así como mezclas de dos o más de los mismos. El vehículo líquido puede contener otros aditivos farmacéuticamente aceptables adecuados tales como solubilizantes, emulsionantes, nutrientes, tampones, conservantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, reguladores de la viscosidad, estabilizantes, y similares. Los disolventes orgánicos adecuados incluyen, por ejemplo, alcoholes monohídricos, tales como etanol, y alcoholes polihídricos, tales como glicoles. Los aceites adecuados incluyen, por ejemplo, aceite de soja, aceite de coco, aceite de oliva, aceite de cártamo, aceite de algodón, y similares. Para la administración parenteral, el vehículo también puede ser un éster oleoso tal como oleato de etilo, miristato de isopropilo, y similares. Las composiciones de la presente invención pueden estar también en forma de microparticulas, microcápsulas, encapsulados liposómicos, y similares, así como combinaciones de dos o más de los mismos.

Se pueden usar sistemas de administración de liberación retardada o de liberación controlada, tal como un sistema de matriz de difusión controlada o un sistema erosionable, como se describió por ejemplo en: Lee, "Diffusion-Controlled Matrix Systems", págs. 155-198 y Ron y Langer, "Erodible Systems", págs. 199-224, en "Treatise on Controlled Drug Delivery", A. Kydonieus Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York 1992. La matriz puede ser, por ejemplo, un material biodegradable que se puede degradar espontáneamente *in situ* e *in vivo*, por ejemplo, mediante

hidrólisis o escisión enzimática, p.ej., mediante proteasas. El sistema de administración puede ser, por ejemplo, un polímero o copolímero natural o sintético o, por ejemplo, en forma de un hidrogel. Los polímeros ejemplares con uniones escindibles incluyen poliésteres, poliortoésteres, polianhídridos, polisacáridos, poli(fosfoésteres), poliamidas, poliuretanos, poli(imidocarbonatos) y poli(fosfacenos).

5 Los compuestos de la invención se pueden administrar de manera enteral, oral, parenteral, sublingual, mediante inhalación (p.ej. en forma de nebulizaciones o esprays), de manera rectal o tópica en formulaciones de unidades de dosis que contienen vehículos y adyuvantes farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables atóxicos convencionales según se desee. Por ejemplo, los modos adecuados de administración incluyen la vía oral, subcutánea, transdérmica, transmucosa, iontoforética, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, intranasal (p.ej. a través de la mucosa nasal), subdural, rectal, gastrointestinal, y similares, y directamente en un órgano o tejido específico o afectado. Para la administración al sistema nervioso central, se puede usar la administración cefalorraquídea y epidural, o la administración en los ventrículos cerebrales. La administración tópica puede implicar también el uso de administración transdérmica, tal como parches transdérmicos o dispositivos de iontoforesis. El término parenteral, tal como se usa en la presente memoria, incluye las inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, la inyección intraesternal o las técnicas de infusión. Los compuestos se mezclan con vehículos y adyuvantes farmacéuticamente aceptables adecuados para la vía deseada de administración. La administración oral es una vía preferida de administración, y las formulaciones adecuadas para la administración oral son las formulaciones preferidas. Los compuestos descritos para el uso en la presente memoria se pueden administrar en forma sólida, en forma líquida, en forma de aerosol, o en forma de comprimidos, píldoras, mezclas de polvos, cápsulas, gránulos, inyectables, cremas, soluciones, supositorios, enemas, irrigaciones de colon, emulsiones, dispersiones, premezclas con alimentos, y en otras formas adecuadas. Los compuestos también se pueden administrar en formulaciones de liposomas. Los compuestos también se pueden administrar en forma de profármacos, en los que el profármaco experimenta una transformación en el sujeto tratado hasta una forma que es terapéuticamente eficaz. Se conocen en la técnica métodos adicionales de administración.

25 Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, se pueden formular según la técnica conocida mediante el uso de agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable atóxico, por ejemplo en forma de una disolución en propilen glicol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, disolución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean de manera convencional aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo suave, lo que incluye los mono- o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como ácido oleico tienen utilidad en la preparación de composiciones inyectables.

35 Se pueden preparar supositorios para la administración rectal del fármaco mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado tal como manteca de cacao y polietilén glicoles que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura rectal, y que por lo tanto se fundirán en el recto y liberarán el fármaco.

40 Las formas farmacéuticas sólidas para administración oral pueden incluir cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas farmacéuticas sólidas, el compuesto activo se puede mezclar con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa, o almidón. Tales formas farmacéuticas pueden comprender también sustancias adicionales distintas de diluyentes inertes, p.ej., agentes lubricantes tales como estearato magnésico. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas farmacéuticas pueden comprender además agentes tamponadores. Los comprimidos y las píldoras se pueden preparar además con revestimientos entéricos.

45 Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral pueden incluir emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, y elixires farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes inertes usados habitualmente en la técnica, tales como agua. Tales composiciones pueden comprender además adyuvantes, tales como agentes humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, ciclodextrinas, y edulcorantes, aromatizantes, y agentes perfumantes.

50 Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar en forma de liposomas. Como se conoce en la técnica, los liposomas en general son derivados de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas están formados por cristales líquidos hidratados mono- o multilamelares que están dispersados en un medio acuoso. Se puede usar cualquier lípido atóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. Las presentes composiciones en forma de liposomas pueden contener, además de un compuesto de la presente invención, estabilizantes, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferidos son los fosfolípidos y fosfatidil colinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticas. Los métodos para formar liposomas se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volumen XIV, Academic Press, Nueva York, N. Y., pág. 55 33 y siguientes (1976).

60 La invención también proporciona artículos de fabricación y kits que contienen materiales útiles para el tratamiento, la prevención, o la inhibición de los síntomas asociados a un trastorno mitocondrial o a una afección asociada a la disfunción mitocondrial. El artículo de fabricación comprende un recipiente con una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados de una

diversidad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente alberga una composición que tiene un agente activo que es eficaz para el tratamiento, la prevención, o la inhibición de los síntomas asociados a un trastorno mitocondrial o a una afección asociada a la disfunción mitocondrial. El agente activo de la composición es uno o más de los compuestos de la invención. La etiqueta del recipiente indica preferiblemente que la composición se usa para el tratamiento, la prevención, o la inhibición de los síntomas asociados a un trastorno mitocondrial o a una afección asociada a la disfunción mitocondrial, y puede indicar también las instrucciones para el uso *in vivo* o *in vitro*, tal como los descritos anteriormente.

La invención también proporciona kits que comprenden uno o varios de los compuestos de la invención. En ciertas realizaciones, el kit de la invención comprende el recipiente descrito anteriormente. En otras realizaciones, el kit de la invención comprende el recipiente descrito anteriormente y un segundo recipiente que comprende un tampón. Puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, lo que incluye otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, y prospectos del envase con las instrucciones para llevar a cabo cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria.

En otros aspectos, los kits se pueden usar para cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, que incluyen, por ejemplo, métodos para el tratamiento, la prevención, o la inhibición de los síntomas asociados a un trastorno mitocondrial o a una afección asociada a la disfunción mitocondrial.

La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los vehículos para producir una única forma farmacéutica variará dependiendo del hospedador al que se administra el ingrediente activo y del modo particular de administración. Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el área corporal, el índice de masa corporal (IMC), la salud general, el sexo, la dieta, el momento de la administración, la vía de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, y el tipo, la progresión, y la gravedad de la enfermedad particular que se somete a terapia o la afección a tratar. La dosis unitaria elegida normalmente se fabrica y se administra para proporcionar una concentración final definida de fármaco en la sangre, los tejidos, órganos, u otra región seleccionada como objetivo del cuerpo. La cantidad eficaz para una situación concreta se puede determinar fácilmente mediante experimentación rutinaria, y está dentro de la experiencia y el juicio del médico habitual o persona experta.

Los ejemplos de dosis que se pueden usar son una cantidad eficaz de los compuestos de la invención en el intervalo de dosis de alrededor de 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a alrededor de 300  $\text{mg}/\text{kg}$ , o de alrededor de 1,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a alrededor de 40  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, o de alrededor de 1,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a alrededor de 20  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, o de alrededor de 1,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a alrededor de 10  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, o de alrededor de 10,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a alrededor de 10  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, o de alrededor de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a alrededor de 10  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, o de alrededor de 1,0  $\text{mg}/\text{kg}$  a alrededor de 10  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, o de alrededor de 10  $\text{mg}/\text{kg}$  a alrededor de 100  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, o de alrededor de 50  $\text{mg}/\text{kg}$  a alrededor de 150  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, o de alrededor de 100  $\text{mg}/\text{kg}$  a alrededor de 200  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, o de alrededor de 150  $\text{mg}/\text{kg}$  a alrededor de 250  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, o de alrededor de 200  $\text{mg}/\text{kg}$  a alrededor de 300  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, o de alrededor de 250  $\text{mg}/\text{kg}$  a alrededor de 300  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal. Otras dosis que se pueden usar son alrededor de 0,01  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, alrededor de 0,1  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, alrededor de 1  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, alrededor de 10  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, alrededor de 20  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, alrededor de 30  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, alrededor de 40  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, alrededor de 50  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, alrededor de 75  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, alrededor de 100  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, alrededor de 125  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, alrededor de 150  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, alrededor de 175  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, alrededor de 200  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, alrededor de 225  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, alrededor de 250  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, alrededor de 275  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal, o alrededor de 300  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar en una única dosis diaria, o la dosis diaria total se puede administrar en dosis divididas en dos, tres o cuatro veces al día.

Aunque los compuestos de la invención se pueden administrar como el único agente farmacéutico o cosmético activo, también se pueden usar en combinación con otro u otros agentes usados en el tratamiento o la inhibición de los trastornos. Los agentes representativos útiles en combinación con los compuestos de la invención para el tratamiento, la prevención, o la inhibición de los síntomas asociados a un trastorno mitocondrial o a una afección asociada a la disfunción mitocondrial incluyen, pero sin limitación, Coenzima Q, vitamina E, idebenona, MitoQ, EPI-743, vitamina K y los análogos de los mismos, naftoquinonas y derivados de las mismas, otras vitaminas, y compuestos antioxidantes.

Cuando se usan agentes activos adicionales en combinación con los compuestos de la presente invención, los agentes activos adicionales se pueden emplear en general en cantidades terapéuticas tal como se indica en el vademécum estadounidense (PDR), 53ª Edición (1999), que se incorpora en la presente memoria como referencia, o las cantidades terapéuticamente útiles como conocería alguien de experiencia habitual en la técnica. Los compuestos de la invención y los otros agentes terapéuticamente activos se pueden administrar a la dosis clínica máxima recomendada o a dosis inferiores. Los niveles de dosis de los compuestos activos en las composiciones de la invención se pueden variar para obtener una respuesta terapéutica deseada dependiendo de la vía de administración, la gravedad de la enfermedad y la respuesta del paciente. Cuando se administran en combinación con otros agentes terapéuticos, los agentes terapéuticos se pueden formular como composiciones diferentes que se



administran al mismo tiempo o en momentos diferentes, o los agentes terapéuticos se pueden administrar como una única composición.

5 En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitante para significar que se incluyen los elementos tras la palabra, pero que no se excluyen los elementos que no se mencionan de manera específica. Además, la referencia a un elemento mediante el artículo indefinido "un/una" o "uno/una" no excluye la posibilidad de que haya más de uno del elemento, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solamente uno de los elementos. El artículo indefinido "un/una" o "uno/una", así, normalmente significa "al menos uno/una".

10 Todas las patentes y referencias bibliográficas citadas en la presente memoria descriptiva se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad.

Los ejemplos siguientes se ofrecen con fines ilustrativos solamente, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

### Descripción de las figuras

15 Figura 1. Los niveles de expresión de proteínas del complejo I y II tal como se determinan mediante transferencia de Western tras la exposición de las células durante 72 horas al compuesto F (KH001; Fig. 1a), al compuesto K (KH002; Fig. 1b) o al compuesto N (KH003; Fig. 1c) a las concentraciones indicadas. CT es la línea celular de fibroblastos cutáneos humanos de control 5120-C, P1 es la línea celular de paciente 7206-S7, P2 es la línea celular de paciente 5175-S7, C I es el complejo I proteico completamente ensamblado, y C II es el complejo II proteico completamente ensamblado.

20 Figura 2. Los niveles de proteínas del complejo I (Fig. 2a) o del complejo II (Fig. 2b) completamente ensamblados se determinaron tras la exposición de la línea celular de control 5120-C o la línea celular de paciente 5175-S7 al compuesto N (KH003) a las concentraciones indicadas durante 72 horas. Los números de las barras indican el número de experimentos independientes. \*, \*\* y \*\*\* indican las diferencias significativas ( $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  y  $P < 0,001$ ) respecto de las células de control o de paciente tratadas con vehículo.

25 Figura 3. Las líneas celulares de pacientes tal como se indican en la figura, que contenían diferentes mutaciones en la subunidad del complejo I, se incubaron con concentraciones crecientes de compuesto F (KH001; Fig. 3a), compuesto K (KH002; Fig. 3b) o compuesto N (KH003; Fig. 3c). Después de 72 horas, se midió la formación de CM-DCF como indicación indirecta de los niveles intracelulares de ROS. N indica el número de experimentos independientes, n indica el número de muestras en cada experimento, y vehículo (el vehículo se ajusta al 100%) indica que la línea celular se trata solamente con DMSO al 0,1%.

Figura 4. Efecto *in vivo* del compuesto N (KH003) sobre la fuerza de agarre en ratones con inactivación génica de Ndufs4, ensayado como se describe en el Ejemplo 4. KO = ratones con inactivación génica de Ndufs4; WT = ratones de tipo natural correspondientes; Vehículo = inyecciones de control sin ingrediente activo; KH003 = inyecciones con compuesto N como ingrediente activo.

### 35 Lista de Abreviaturas

8-OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
Ac	acetato
ACBT	ácido $\epsilon$ -aminocaproico y Bis-Tris/HCl
ADP	difosfato de adenosina
40 AKBR	acetoacetato/3-hidroxibutirato
ELA	esclerosis lateral amiotrófica
UA	umbral anaeróbico
ATP	trifosfato de adenosina
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
45 IMC	índice de masa corporal
TMB	tasa metabólica basal
BN-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida azul nativa
CM-H <sub>2</sub> DCFDA	diacetato de 5-(y -6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína

	GC	gasto cardiaco
	OEPC	oftalmoplejía externa progresiva crónica
	CSA	ciclosporina A
	CT	línea celular de fibroblastos cutáneos primarios humanos de control
5	CIT C	citocromo c
	DCM	diclorometano
	DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
	DMF	dimetilformamida
	DMSO	sulfóxido de dimetilo
10	AOD	atrofia óptica dominante
	EDCI	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
	EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
	Et	etilo
	FRDA	Ataxia de Friedreich
15	Gly	glicilo
	HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico
	HOBt	hidroxibenzotriazol
	HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
	FC	frecuencia cardiaca
20	ITIES	interfase entre dos disoluciones de electrolitos inmiscibles
	KSS	Síndrome de Kearns-Sayre
	NOHL	neuropatía óptica hereditaria de Leber
	Me	metilo
25	MEGDEL	aciduria 3-metilglutacónica, sordera neurosensorial, encefalopatía y hallazgos neurorradiológicos del síndrome similar a Leigh
	MELAS	miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica, y accidente cerebrovascular
	MERRF	epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas
	MIDD	diabetes y sordera de herencia materna
	MitoQ <sub>10</sub>	mitoquinona
30	MNGIE	encefalopatía neuro-gastro-intestinal mitocondrial
	MRS	espectroscopía de resonancia magnética
	NAD <sup>+</sup>	dinucleótido de nicotinamida adenina
	NADH	dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
	NARP	neuropatía, ataxia y retinosis pigmentaria
35	NMM	<i>N</i> -metilmorfolina
	Orn	ornitilo
	OXPPOS	fosforilación oxidativa

	PBS	solución salina tamponada con fosfato
	PCr	fosfocreatina
	PDR	vademécum estadounidense
	PVDF	poli(difluoruro de vinilideno)
5	GC	gasto cardíaco
	QSPR	relación cuantitativa estructura-propiedad
	ROS	especies reactivas de oxígeno
	CR	cociente respiratorio
	Su	succinimida
10	THF	tetrahidrofurano
	TFA	trifluoroacetato
	TFAH	ácido trifluoroacético
	VCO <sub>2</sub>	niveles de producción de dióxido de carbono
	VO <sub>2</sub>	niveles de consumo de oxígeno
15	VO <sub>2</sub> max	consumo de oxígeno de todo el cuerpo
	Z	benciloxicarbonilo

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Síntesis de compuestos

#### 1.1 Síntesis de los compuestos F, K, N y O

##### 20 1.1.1 Información general

A menos que se indique de otra manera, los materiales se adquirieron de proveedores comerciales y se usaron tal como se recibieron. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se destiló con hidruro cálcico. Todas las reacciones sensibles al aire y la humedad se llevaron a cabo bajo una atmósfera inerte de nitrógeno seco. La cromatografía en columna se llevó a cabo mediante el uso de gel de sílice Acros (0,035-0,070 mm, 6 nm).

##### 25 1.1.2 Síntesis de trifluoroacetato de Trolox™ 2-guanidinoglicilaminoetilamida (compuesto F)

30 ETAPA A: A una disolución de Trolox™ (1,2 g, 4,65 mmol) en DMF (45 mL) se le añadió HOBt (0,691 g, 5,12 mmol), seguido de EDCI (0,981 g, 5,12 mmol). La mezcla se agitó hasta que se obtuvo una disolución clara. A continuación, se añadió DIPEA (0,891 mL, 5,12 mmol) gota a gota. La disolución se enfrió a 4 °C (baño de hielo) y se añadió Boc-etilendiamina (0,811 mL, 4,88 mmol). La mezcla se agitó a 4 °C durante 5 min, se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h más. La mezcla se diluyó después con EtOAc (200 mL) y se lavó con ácido cítrico acuoso (10 %p, 2 × 60 mL). Las fases acuosas combinadas se extrajeron con EtOAc (60 mL), tras lo cual se combinaron las fases orgánicas y se lavaron con H<sub>2</sub>O (60 mL), NaHCO<sub>3</sub> ac. sat. (60 mL), H<sub>2</sub>O (60 mL) y salmuera (60 mL), se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron a vacío. El INTERMEDIO A obtenido (1,8 g) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

35 ETAPA B: A una disolución de INTERMEDIO A (1,75 g, 4,46 mmol) en EtOAc (25 mL) se le añadió una disolución saturada recién preparada de HCl en EtOAc (45 mL). La disolución se agitó durante 45 min, durante lo cual se formó un precipitado blanco. La suspensión se diluyó después con Et<sub>2</sub>O (150 mL) y la mezcla resultante se agitó durante otros 30 min. Los sólidos se recogieron mediante filtración, se lavaron con Et<sub>2</sub>O (2 × 30 mL) y se secaron a vacío. El INTERMEDIO B obtenido (1,36 g) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

40 ETAPA C: Una disolución de INTERMEDIO B (1,32 g, 4,0 mmol) en DMF (40 mL) se enfrió a 4 °C (baño de hielo). A continuación, se añadió DIPEA (1,5 mL, 8,8 mmol) gota a gota, seguido de la adición por partes de Boc-Gly-OSu (1,1 g, 4,0 mmol). La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1,5 h. Después, la mezcla se diluyó con EtOAc (250 mL) y se lavó con ácido cítrico acuoso (10 %p, 2 × 50 mL), H<sub>2</sub>O (50 mL), NaHCO<sub>3</sub> ac. sat. (2 × 50 mL), H<sub>2</sub>O (50 mL) y salmuera (50 mL), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a vacío. El  
45 INTERMEDIO C obtenido (1,52 g) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

ETAPA D: A una disolución de INTERMEDIO C (1,42 g, 3,16 mmol) en EtOAc (20 mL) se le añadió una disolución saturada recién preparada de HCl en EtOAc (40 mL). La disolución se agitó durante 1 h, durante lo cual se formó un precipitado blanco. La suspensión se diluyó después con Et<sub>2</sub>O (120 mL) y la mezcla resultante se agitó durante otros 30 min. Los sólidos se recogieron mediante filtración, se lavaron con Et<sub>2</sub>O (2 × 25 mL) y se secaron a vacío. El INTERMEDIO D obtenido (925 g) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

ETAPA E: A una disolución de INTERMEDIO D (200 mg, 0,52 mmol) en DMF (3 mL) se le añadió NMM (0,15 mL, 1,35 mmol), seguido de 1,3-di-Boc-2-(trifluorometilsulfonyl)guanidina (223 mg, 0,57 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 16 h. A continuación, la mezcla se diluyó con EtOAc (15 mL), se extrajo con ácido cítrico acuoso (10 %p, 2 × 5 mL), H<sub>2</sub>O (5 mL), salmuera (2 × 5 mL), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna rápida (EtOAc/heptano 2:1) proporcionó el INTERMEDIO E (259 mg) en forma de un sólido blanco.

ETAPA F: Una disolución de INTERMEDIO E (144 mg, 0,24 mmol) en TFA/DCM (1:1 v/v, 4 mL) se agitó durante 2 h. La disolución se diluyó después con tolueno (2 × 10 mL) y se concentró a vacío. El residuo se arrastró con H<sub>2</sub>O (2 × 10 mL) y se liofilizó a partir de H<sub>2</sub>O (3 mL), lo que proporcionó trifluoroacetato de Trolox™ 2-guanidinoglicilaminoetilamida (123 mg) en forma de un polvo blanco.

<sup>1</sup>H RMN del compuesto F (D<sub>2</sub>O, 400 MHz): δ (ppm) = 3,74 (s, 2H), 3,44-3,21 (m, 4H), 2,72-2,60 (m, 1H), 2,54-2,41 (m, 1H), 2,35-2,25 (m, 1H), 2,17 (s, 3H), 2,16 (s, 3H), 2,07 (s, 3H), 1,88-1,77 (m, 1H), 1,50 (s, 3H).

#### 1.1.3 Hidrocloruro de Trolox™ 2-acetamidinoglicilaminoetilamida (compuesto K)

ETAPA G: A una disolución de INTERMEDIO D (136 mg, 0,35 mmol) en metanol (4 mL) se le añadió NH<sub>3</sub> en metanol (7 N, 0,2 mL), seguido de la adición por partes de hidrocloruro de acetimidato de etilo (65 mg, 0,53 mmol). La mezcla se agitó durante 15 min. A continuación, se añadió gel de sílice (400 mg) a la disolución y la mezcla resultante se concentró a presión reducida. La purificación mediante cromatografía en columna rápida (DCM/metanol 9:1 a 8:2), seguido de liofilización a partir de H<sub>2</sub>O (3 mL) proporcionó hidrocloruro de Trolox™ 2-acetamidinoglicilaminoetilamida (120 mg) en forma de un polvo blanquecino.

<sup>1</sup>H RMN del compuesto K (D<sub>2</sub>O, 400 MHz): δ (ppm) = 3,86-3,75 (m, 2H), 3,46-3,23 (m, 4H), 2,72-2,63 (m, 1H), 2,51-2,47 (m, 1H), 2,35-2,28 (m, 1H), 2,29 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 2,16 (s, 3H), 2,07 (s, 3H), 1,87-1,78 (m, 1H), 1,51 (s, 3H).

#### 1.1.4 Hidrocloruro de Trolox™ ornitilamida (compuesto N)

ETAPA H: Una disolución de Z-Orn(Boc)-OH (2,5 g, 6,8 mmol) en DMF (7 mL) se enfrió a 4 °C (baño de hielo), tras lo cual se añadió carbonato potásico (0,94 g, 6,8 mmol) por partes. La suspensión resultante se dejó con agitación durante 5 min, tras lo cual se añadió yodometano (0,51 mL, 8,2 mmol) gota a gota. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 2,5 h. A continuación se añadió H<sub>2</sub>O (10 mL) y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 × 10 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> acuoso (2,5 %p, 5 mL) y salmuera (5 mL), se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron a vacío. El INTERMEDIO H obtenido (2,43 g) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

ETAPA I: A una disolución de INTERMEDIO H (2,4 g, 6,4 mmol) en *iso*-propanol (54 mL) se le añadió gota a gota ácido acético (0,4 mL, 7 mmol), seguido de una suspensión de paladio sobre carbono (10 %p, 0,68 g, 0,64 mmol) en H<sub>2</sub>O (6 mL). La suspensión negra resultante se colocó bajo una atmósfera de H<sub>2</sub> y se agitó durante 3 h. A continuación, la mezcla de reacción se purgó con gas nitrógeno durante 5 min, tras lo cual la mezcla se filtró a través de Celite. El filtrado se concentró a vacío, lo que proporcionó el INTERMEDIO I (1,76 g) en forma de un aceite incoloro que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

ETAPA J: A una disolución de Trolox™ (0,72 g, 2,8 mmol) en DMF (22 mL) se le añadió HOBt (0,42 g, 3,1 mmol), seguido de EDCI (0,59 g, 3,1 mmol). La mezcla se agitó hasta que se obtuvo una disolución clara. A continuación, se añadió DIPEA (0,54 mL, 3,1 mmol) gota a gota. La disolución se enfrió a 4 °C (baño de hielo) y se añadió INTERMEDIO I (900 mg, 2,94 mmol). La mezcla se agitó a 4 °C durante 5 min, se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h más. La mezcla se diluyó después con EtOAc (120 mL) y se lavó con ácido cítrico acuoso (10 %p, 2 × 40 mL). Las fases acuosas combinadas se extrajeron con EtOAc (40 mL), tras lo cual se combinaron las fases orgánicas y se lavaron con H<sub>2</sub>O (40 mL), NaHCO<sub>3</sub> ac. sat. (40 mL), H<sub>2</sub>O (40 mL) y salmuera (40 mL), se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna rápida (EtOAc/heptano 1:1) proporcionó el INTERMEDIO J (1,1 g) en forma de una espuma blanca.

ETAPA K: Una disolución de INTERMEDIO J (587 mg, 1,23 mmol) en THF (2,5 mL) se enfrió a 4 °C (baño de hielo). A continuación, se añadió NaOH acuoso (1 M, 2,5 mL, 2,5 mmol) gota a gota. La disolución se dejó calentar a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 1 h. Después, la mezcla se diluyó con H<sub>2</sub>O (15 mL) y Et<sub>2</sub>O (15 mL). Las capas se mezclaron y después se separaron. La fase acuosa se lavó con Et<sub>2</sub>O (15 mL), se acidificó hasta pH = 2,5 mediante el uso de KHSO<sub>4</sub> ac. sat., y se extrajo con Et<sub>2</sub>O (2 × 10 mL). Las últimas dos fases orgánicas se combinaron, se lavaron con NH<sub>4</sub>Cl ac. sat. (2 × 10 mL), salmuera (10 mL), se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron a vacío. El INTERMEDIO K obtenido (490 g) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

ETAPA L: Una disolución de INTERMEDIO K (170 mg, 0,36 mmol) en EtOAc (4 mL) se purgó con HCl (g) durante 25 min. A continuación, la disolución se purgó con argón durante 15 min, lo que dio como resultado la formación de un precipitado. La mezcla se diluyó con Et<sub>2</sub>O (20 mL), se agitó durante 15 min, tras lo cual los sólidos formados se recogieron mediante filtración. Los sólidos se liofilizaron a partir de H<sub>2</sub>O (3 mL), lo que proporcionó hidrocloreto de Trolox™ ornitilamida (115 mg) en forma de un sólido blanquecino.

<sup>1</sup>H RMN del compuesto N (mezcla 1:1 de diastereómeros, D<sub>2</sub>O, 400 MHz): δ (ppm) = 4,38-4,23 (m, 2 × 1H), 3,01-2,93 (m, 2H), 2,73-2,27 (m, 2H + 2 × 3H), 2,21 (s, 3H), 2,19 (s, 3H), 2,15 (s, 2 × 3H), 2,05 (s, 2 × 3H), 2,00-1,73 (m, 2 × 3H), 1,68-1,51 (m, 2 × 1H), 1,58 (s, 3H), 1,55 (s, 3H), 1,12-0,94 (m, 2 × 1H).

#### 1.1.5 Hidrocloreto de Trolox™ arginilamida (compuesto O)

ETAPA M: A una disolución de Trolox™ (0,49 g, 1,9 mmol) en DMF (20 mL) se le añadió HOBt (0,29 g, 2,1 mmol), seguido de EDCI (0,40 g, 2,1 mmol). La mezcla se agitó hasta que se obtuvo una disolución clara. A continuación, se añadió DIPEA (0,37 mL, 2,1 mmol) gota a gota. La disolución se enfrió a 4 °C (baño de hielo) y se añadió H-Arg(PMC)-OtBu (1,0 g, 2,0 mmol). La mezcla se agitó a 4 °C durante 5 min, se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h más. La mezcla se diluyó después con EtOAc (100 mL) y se lavó con ácido cítrico acuoso (10 %p, 2 × 30 mL). Las fases acuosas combinadas se extrajeron con EtOAc (30 mL), tras lo cual se combinaron las fases orgánicas y se lavaron con H<sub>2</sub>O (30 mL), NaHCO<sub>3</sub> ac. sat. (30 mL), H<sub>2</sub>O (30 mL) y salmuera (30 mL), se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron a vacío. El INTERMEDIO M obtenido (1,31 g) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

ETAPA N: Una disolución de INTERMEDIO M (200 mg, 0,27 mmol) en DCM/TFA (1:1 v/v, 3 mL) se agitó durante 30 min. A continuación, la mezcla se diluyó con tolueno (10 mL) y se concentró a presión reducida. El residuo se arrastró con tolueno (2 × 10 mL) y se resuspendió en agua (10 mL). La suspensión resultante se acidificó mediante el uso de HCl acuoso (1 M, 55 mL), se diluyó con Et<sub>2</sub>O (10 mL) y se agitó enérgicamente durante 15 min. Las capas se separaron y la fase acuosa se lavó con Et<sub>2</sub>O (2 × 10 mL). La liofilización de la fase acuosa proporcionó hidrocloreto de Trolox™ arginilamida (120 mg) en forma de un sólido blanquecino.

<sup>1</sup>H RMN del compuesto O (mezcla 1:1 de diastereómeros, D<sub>2</sub>O, 400 MHz): δ (ppm) = 4,35 (dd, *J* = 8,6, 4,0 Hz, 1H), 4,24 (dd, *J* = 8,6, 4,8 Hz, 1H), 3,08 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,76 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 2,59-2,33 (m, 2 × 3H), 2,23 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 2,16 (s, 2 × 3H), 2,07 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 1,98-1,73 (m, 2 × 3H), 1,62 (s, 3H), 1,57 (s, 3H), 1,57-1,30 (m, 2 × 1H), 1,00-0,76 (m, 2 × 1H).

1.2 Síntesis de los compuestos *R*-T, *S*-T, *R*-U, *S*-U, *R*-V, *S*-V, *R,R*-X, *R,S*-X, *S,R*-X, *S,S*-X, *rac*-Z, *R,trans*-AE, *S,trans*-AE, *S,R*-AF, *S,R*-AG, *S,S*-AG y *S*-AH.

#### 1.2.1 Información general

PROCEDIMIENTO GENERAL A para el acoplamiento en EDCI/HOAt de aminas a Trolox™: A una mezcla de Trolox™ (1 eq) y amina (1 eq) en DMF (seca, ~0,2 M) bajo una atmósfera de nitrógeno se le añadieron EDCI.HCl (1,1 eq) y HOAt (0,1 eq). La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta la conversión completa (LCMS). La mezcla se diluyó con H<sub>2</sub>O (20 mL) y se extrajo con EtOAc (3 x 20 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron sucesivamente con KHSO<sub>4</sub> 0,5 M (20 mL), NaHCO<sub>3</sub> ac. sat. (20 mL) y salmuera (3x 20 mL). La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a vacío.

PROCEDIMIENTO GENERAL B para la desprotección de BOC: A una disolución de INTERMEDIO A (1 eq) en DCM (-0,03 M) se le añadió HCl 4 N en dioxano (36 eq). La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta la conversión completa (LCMS), se concentró, se coevaporó con DCM (2x), se purificó mediante cromatografía en columna de fase inversa (H<sub>2</sub>O + 0,01% (p/p) de ácido fórmico/MeCN) y se liofilizó.

#### 1.2.2 Hidrocloreto de Trolox™ piperidin-3-amida (compuesto X, estereoisómero *R,R*)

ETAPA A: Según el procedimiento general A, se preparó el INTERMEDIO Xa mediante el uso de (*R*)-Trolox™ (250 mg) y (*R*)-3-amino-1-*N*-Boc-piperidina (200 mg). El INTERMEDIO Xa (349 mg) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

ETAPA B: Según el procedimiento general B, se preparó el COMPUESTO FINAL *R,R*-X (209 mg). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO): δ (ppm): 8,23 (1H, s), 7,55 (1H, s ancho), 7,30 (1H, d, *J*=8,4 Hz), 3,85 - 3,73 (1H, m), 2,99 - 2,90 (1H, m), 2,89 - 2,79 (1H, m), 2,73 - 2,64 (1H, m), 2,64 - 2,37 (3H, m), 2,23 - 2,14 (1H, m), 2,11 (3H, s), 2,07 (3H, s), 1,99 (3H, s), 1,79 - 1,67 (1H, m), 1,54 - 1,45 (1H, m), 1,44 - 1,26 (3H, m), 1,39 (3H, s).

#### 1.2.3 Hidrocloreto de Trolox™ piperidin-3-amida (compuesto X, estereoisómero *R,S*)

ETAPA A: Según el procedimiento general A, se preparó el INTERMEDIO Xb mediante el uso de (*R*)-Trolox™ (100 mg) y (*S*)-3-amino-1-*N*-Boc-piperidina (80 mg). El INTERMEDIO Xb (143 mg) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

ETAPA B: Según el procedimiento general B, se preparó el COMPUESTO FINAL *R,S*-X (68 mg). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz,

DMSO):  $\delta$  (ppm): 8,25 (1H, s), 7,53 (1H, s ancho), 7,26 (1H, d, J=8,4 Hz), 3,78 - 3,64 (1H, m), 2,83 - 2,71 (2H, m), 2,63 - 2,34 (4H, m), 2,17 - 2,03 (1H, m), 2,09 (3H, s), 2,07 (3H, s), 1,99 (3H, s), 1,82 - 1,72 (1H, m), 1,72 - 1,55 (2H, m), 1,54 - 1,41 (2H, m), 1,36 (3H, s).

#### 1.2.4 Hidrocloruro de Trolox™ 4-dimetilaminobutilamida (compuesto V, estereoisómero R)

- 5 Según el procedimiento general A, se preparó el COMPUESTO FINAL R-V mediante el uso de (R)-Trolox™ (100 mg) y 4-(Dimetilamino)butilamina (46 mg). Cuando la reacción alcanzó la conversión completa, la mezcla se paró con H<sub>2</sub>O (20 mL), se basificó con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ac. sat. hasta pH ~9 y se extrajo con EtOAc (3 x 40 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron a vacío. El material bruto se purificó mediante cromatografía en columna de sílice (DCM/NH<sub>3</sub> 7 N en MeOH), se disolvió en éter dietílico (5 mL) y se trató con HCl 1 N en éter dietílico (1 mL). La mezcla se concentró a vacío, se coevaporó con DCM (3x) y se liofilizó (H<sub>2</sub>O/MeCN) para obtener el COMPUESTO FINAL R-V (86 mg). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm): 10,14 (1H, s), 7,53 (1H, s ancho), 7,46 - 7,38 (1H, m), 3,17 - 2,99 (2H, m), 2,98 - 2,87 (2H, m), 2,63 (6H, s), 2,57 - 2,35 (2H, m), 2,22 - 2,13 (1H, m), 2,10 (3H, s), 2,07 (3H, s), 1,99 (3H, s), 1,78 - 1,65 (1H, m), 1,50 - 1,29 (4H, m), 1,37 (3H, s).

#### 1.2.5 Hidrocloruro de Trolox™ 4-dimetilaminobutilamida (compuesto V, estereoisómero S)

- 15 Según el procedimiento general A, se preparó el COMPUESTO FINAL S-V mediante el uso de (S)-Trolox™ (100 mg) y 4-(Dimetilamino)butilamina (46 mg). Cuando la reacción alcanzó la conversión completa, la mezcla se paró con H<sub>2</sub>O (20 mL), se basificó con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ac. sat. hasta pH ~9 y se extrajo con EtOAc (3 x 40 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron a vacío. El material bruto se purificó mediante cromatografía en columna de sílice (DCM/NH<sub>3</sub> 7 N en MeOH), se disolvió en éter dietílico (5 mL) y se trató con HCl 1 N en éter dietílico (1 mL). La mezcla se concentró a vacío, se coevaporó con DCM (3x) y se liofilizó (H<sub>2</sub>O/MeCN) para obtener el COMPUESTO FINAL S-V (92 mg). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm): 10,12 (1H, s), 7,53 (1H, s ancho), 7,42 (1H, t, J=5,92 Hz), 3,16 - 2,99 (2H, m), 2,98 - 2,86 (2H, m), 2,63 (6H, s), 2,58 - 2,35 (2H, m), 2,23 - 2,14 (1H, m), 2,11 (3H, s), 2,07 (3H, s), 1,99 (3H, s), 1,78 - 1,64 (1H, m), 1,53 - 1,29 (4H, m), 1,37 (3H, s).

#### 1.2.6 Hidrocloruro de Trolox™ piperidin-3-amida (compuesto X, estereoisómero S,R)

- 25 ETAPA A: Según el procedimiento general A, se preparó el INTERMEDIO Xc mediante el uso de (S)-Trolox™ (5,49 g) y (R)-3-amino-1-N-Boc-piperidina (4,39 g). Tras la purificación mediante cromatografía en columna de sílice (Heptano/EtOAc) se usó el INTERMEDIO Xc (6,11 g) en la siguiente etapa.

- 30 ETAPA B: Según el procedimiento general B, sin purificación mediante cromatografía en columna de fase inversa, se preparó el COMPUESTO FINAL S,R-X (4,43 g). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm): 8,95 (2H, s), 7,58 - 7,48 (2H, m), 4,03 - 3,88 (1H, m), 3,16 - 3,05 (1H, m), 3,03 - 2,93 (1H, m), 2,76 - 2,62 (2H, m), 2,60 - 2,37 (2H, m), 2,18 - 2,03 (1H, m), 2,08 (3H, s), 2,07 (3H, s), 2,00 (3H, s), 1,86 - 1,72 (3H, m), 1,72-1,45 (2H, m), 1,36 (3H, s).

#### 1.2.7 Hidrocloruro de Trolox™ piperidin-3-amida (compuesto X, estereoisómero S,S)

- 35 ETAPA A: Según el procedimiento general A, se preparó el INTERMEDIO Xd mediante el uso de (S)-Trolox™ (100 mg) y (S)-3-amino-1-N-Boc-piperidina (80 mg). El INTERMEDIO Xd (158 mg) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

- 40 ETAPA B: Según el procedimiento general B, se preparó el COMPUESTO FINAL S,S-X (122 mg). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm): 8,24 (1H, s), 7,56 (1H, s ancho), 7,28 (1H, d, J = 8,4 Hz), 3,82 - 3,69 (1H, m), 2,95 - 2,85 (1H, m), 2,85 - 2,73 (1H, m), 2,70 - 2,61 (1H, m), 2,61 - 2,35 (3H, m), 2,23 - 2,13 (1H, m), 2,11 (3H, s), 2,07 (3H, s), 1,99 (3H, s), 1,79 - 1,66 (1H, m), 1,53 - 1,42 (1H, m), 1,42 - 1,24 (3H, m), 1,39 (3H, s).

- 40 1.2.8 Formiato de Trolox™ 1-metilpiperidinio-4-amida (compuesto AH, estereoisómero S)

- 45 A una mezcla de (S)-Trolox™ (100 mg) y 1-metilpiperidin-4-amina (46 mg) en DMF (seca, 2 ml) se le añadió PyBOP (249 mg, 1,2 eq). Después de agitar durante una noche a temperatura ambiente, la mezcla se paró con H<sub>2</sub>O (20 ml). Se añadió NaHCO<sub>3</sub> ac. sat. (30 ml) y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron a vacío. El material bruto se purificó mediante cromatografía en columna de fase inversa ((H<sub>2</sub>O + 0,01% (p/p) de ácido fórmico/MeCN) y se liofilizó para obtener el COMPUESTO FINAL S-AH (75 mg). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm): 8,21 (1H, s), 7,57 (1H, s ancho), 6,91 (1H, d, J = 7,32 Hz), 3,64 - 3,43 (1H, m), 2,62 - 2,27 (4H, m), 2,24 - 2,01 (3H, m), 2,14 (3H, s), 2,10 (3H, s), 2,07 (3H, s), 1,98 (3H, s), 1,78 - 1,62 (2H, m), 1,57 - 1,42 (2H, m), 1,42 - 1,29 (1H, m), 1,38 (3H, s).

#### 1.2.9 Hidrocloruro de Trolox™ 4-aminociclohexilamida (compuesto AE, estereoisómero R,trans)

- 50 ETAPA A: Según el procedimiento general A, se preparó el INTERMEDIO AEa mediante el uso de (R)-Trolox™ (100 mg) y N-Boc-trans-1,4-ciclohexanodiamina (86 mg). El INTERMEDIO AEa (186 mg) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

ETAPA B: Según el procedimiento general B, se preparó el COMPUESTO FINAL R,trans-AE (102 mg). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm): 8,42 (1H, s), 7,57 (2H, s ancho), 6,92 (1H, d, J = 8,3 Hz), 3,79 - 2,98 (1H, m), 2,84 -

2,69 (1H, m), 2,61 - 2,36 (2H, m), 2,19 - 1,91 (1H, m), 2,07 (3H, s), 2,06 (3H, s), 1,99 (3H, s), 1,89 - 1,65 (4H, m), 1,61 - 1,46 (1H, m), 1,40 - 1,05 (4H, m), 1,35 (3H, s).

#### 1.2.10 Hidrocloruro de Trolox™ 4-aminociclohexilamida (compuesto AE, estereoisómero *S,trans*)

5 ETAPA A: Según el procedimiento general A, se preparó el INTERMEDIO AEb mediante el uso de (*S*)-Trolox™ (100 mg) y N-Boc-*trans*-1,4-ciclohexanodiamina (86 mg). El INTERMEDIO AEb (182 mg) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

10 ETAPA B: Según el procedimiento general B, se preparó el COMPUESTO FINAL *S,trans*-AE (84 mg). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO): δ (ppm): 8,43 (1H, s), 7,57 (2H, s ancho), 6,93 (1H, d, J = 8,4 Hz), 3,53 - 3,35 (1H, m), 2,86 - 2,72 (1H, m), 2,60 - 2,36 (2H, m), 2,21 - 1,92 (1H, m), 2,08 (3H, s), 2,07 (3H, s), 1,98 (3H, s), 1,90 - 1,66 (4H, m), 1,61 - 1,47 (1H, m), 1,41 - 1,08 (4H, m), 1,35 (3H, s).

#### 1.2.11 Hidrocloruro de Trolox™ 4-aminobutilamida (compuesto T, estereoisómero *R*)

15 ETAPA A: Se preparó el INTERMEDIO Ta mediante el uso de (*R*)-Trolox™ (200 mg) y N-Boc-1,4-butanodiamina (150 mg). A una mezcla enfriada (0 °C) de los reactivos en DMF (seca, 0,05 M) bajo una atmósfera de nitrógeno se le añadieron EDCI.HCl (1,1 eq) y HOAt (0,1 eq). La mezcla se agitó 1 hora a 0 °C y se dejó que alcanzase la temperatura ambiente, y se agitó hasta la conversión completa (LCMS). La mezcla de reacción se vertió en 10 eq (respecto de DMF) de agua y se extrajo con EtOAc (3x 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron sucesivamente con KHSO<sub>4</sub> 0,5 M (50 mL), NaHCO<sub>3</sub> ac. sat. (50 mL) y salmuera (3x 50 mL). La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a vacío. El INTERMEDIO Ta (100 mg) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

20 Etapa B: Según el procedimiento general B, se preparó el COMPUESTO FINAL *R*-T (66 mg). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO): δ (ppm): 8,41 (1H, s), 7,34 (2H, t, J=6,0 Hz), 3,14 - 2,95 (2H, m), 2,72 - 2,59 (2H, m), 2,54 (1H, s), 2,47 - 2,34 (2H, m), 2,21 - 2,12 (1H, m), 2,09 (3H, s), 2,07 (3H, s), 1,99 (3H, s), 1,79 - 1,65 (1H, m), 1,45 - 1,27 (4H, m), 1,35 (3H, s).

#### 1.2.12 Hidrocloruro de Trolox™ 4-aminobutilamida (compuesto T, estereoisómero *S*)

25 Etapa A: Se preparó el INTERMEDIO Tb mediante el uso de (*S*)-Trolox™ (200 mg) y N-Boc-1,4-butanodiamina (150 mg). A una mezcla enfriada (0 °C) de los reactivos en DMF (seca, 0,05 M) bajo una atmósfera de nitrógeno se le añadieron EDCI.HCl (1,1 eq) y HOAt (0,1 eq). La mezcla se agitó 1 hora a 0 °C y se dejó que alcanzase la temperatura ambiente, y se agitó hasta la conversión completa (LCMS). La mezcla de reacción se vertió en 10 eq (respecto de DMF) de agua y se extrajo con EtOAc (3x 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron sucesivamente con KHSO<sub>4</sub> 0,5 M (50 mL), NaHCO<sub>3</sub> ac. sat. (50 mL) y salmuera (3x 50 mL). La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a vacío. El INTERMEDIO Tb (100 mg) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

35 Etapa B: Según el procedimiento general B, se preparó el COMPUESTO FINAL *S*-T (67 mg). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO): δ (ppm): 8,41 (1H, s), 7,37 - 7,30 (1H, m), 3,13 - 2,97 (3H, m), 2,68 - 2,61 (2H, m), 2,20 - 2,11 (1H, m), 2,09 (3H, s), 2,07 (3H, s), 1,99 (3H, s), 1,79 - 1,66 (1H, m), 1,46 - 1,23 (4H, m), 1,35 (3H, s).

#### 1.2.13 Hidrocloruro de Trolox™ 5-aminopentilamida (compuesto U, estereoisómero *R*)

40 Etapa A: Se preparó el INTERMEDIO Ua mediante el uso de (*R*)-Trolox™ (200 mg) y 1-Boc-amino-1,5-pentanodiamina (162 mg). A una mezcla enfriada (0 °C) de los reactivos en DMF (seca, 0,05 M) bajo una atmósfera de nitrógeno se le añadieron EDCI.HCl (1,1 eq) y HOAt (0,1 eq). La mezcla se agitó 1 hora a 0 °C y se dejó que alcanzase la temperatura ambiente, y se agitó hasta la conversión completa (LCMS). La mezcla de reacción se vertió en 10 eq (respecto de DMF) de agua y se extrajo con EtOAc (3x 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron sucesivamente con KHSO<sub>4</sub> 0,5 M (50 mL), NaHCO<sub>3</sub> ac. sat. (50 mL) y salmuera (3x 50 mL). La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a vacío. El INTERMEDIO Ua (232 mg) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

45 Etapa B: Según el procedimiento general B, se preparó el COMPUESTO FINAL *R*-U (134 mg). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 8,51 (1H, s), 7,22 - 6,45 (2H, s ancho), 6,29 - 6,16 (1H, m), 3,64 - 3,41 (1H, m), 2,89 - 2,72 (1H, m), 2,69 - 2,40 (5H, m), 2,19 (3H, s), 2,18 (3H, s), 2,08 (3H, s), 1,83 - 1,68 (1H, m), 1,55 (3H, s), 1,45 - 1,33 (2H, m), 1,33 - 1,21 (1H, m), 1,20 - 1,03 (1H, m), 0,80 - 0,58 (2H, m).

#### 1.2.14 Hidrocloruro de Trolox™ 5-aminopentilamida (compuesto U, estereoisómero *S*)

50 Etapa A: Se preparó el INTERMEDIO Ub mediante el uso de (*S*)-Trolox™ (200 mg) y 1-Boc-amino-1,5-pentanodiamina (162 mg). A una mezcla enfriada (0 °C) de los reactivos en DMF (seca, 0,05 M) bajo una atmósfera de nitrógeno se le añadieron EDCI.HCl (1,1 eq) y HOAt (0,1 eq). La mezcla se agitó 1 hora a 0 °C y se dejó que alcanzase la temperatura ambiente, y se agitó hasta la conversión completa (LCMS). La mezcla de reacción se vertió en 10 eq (respecto de DMF) de agua y se extrajo con EtOAc (3x 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se

lavarón sucesivamente con  $\text{KHSO}_4$  0,5 M (50 mL),  $\text{NaHCO}_3$  ac. sat. (50 mL) y salmuera (3x 50 mL). La fase orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y se concentró a vacío. El INTERMEDIO Ub (242 mg) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

5 Etapa B: Según el procedimiento general B, se preparó el COMPUESTO FINAL S-U (164 mg).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm): 8,51 (1H, s ancho), 6,26 - 6,23 (2H, dd), 3,64 - 3,37 (1H, m), 2,91 - 2,74 (1H, m), 2,72 - 2,61 (3H, m), 2,60 - 2,42 (3H, m), 2,19 (3H, s), 2,18 (3H, s), 2,08 (3H, s), 1,83 - 1,67 (1H, m), 1,55 (3H, s), 1,47 - 1,34 (2H, m), 1,34 - 1,22 (1H, m), 1,21 - 1,05 (1H, m), 0,80 - 0,62 (2H, m).

#### 1.2.15 Hidrocloruro de Trolox™ 1-metilpiperidin-3-amida (compuesto AF, estereoisómero S,R)

10 Etapa A: Se preparó el INTERMEDIO AFa mediante el uso de 3-aminopiperidin-1-carboxilato de (*R*)-terc-butilo (200 mg). El sustrato se disolvió en THF (seco, 0,1 M) y se enfrió hasta 0 °C con un baño de hielo. Se añadió  $\text{LiAlH}_4$  (5 eq 2,4 M en THF) gota a gota a la disolución enfriada. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a 0 °C y se dejó que alcanzase la temperatura ambiente. Después la mezcla se sometió a reflujo hasta la conversión completa (GCMS). La mezcla se enfrió a 0 °C y se paró de manera secuencial con agua (0,2 mL), disolución del 15% de NaOH (0,2 mL) y agua (0,6 mL), y se agitó durante 1 hora. El precipitado se eliminó mediante filtración, y se añadió HCl 4 M en dioxano al filtrado. El filtrado se concentró a vacío y se trituró en MeCN/MeOH para obtener un sólido blanco.

20 Etapa B: El COMPUESTO FINAL S,R-AF se preparó mediante el uso de (*S*)-Trolox™ (60 mg) y el INTERMEDIO AFa (45 mg). Ambos reactivos se disolvieron en DMF (seca, 0,25 M). Se añadió trietilamina (2,5 eq) y PyBOP (1,2 eq) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta la conversión completa (LCMS). La mezcla se paró con  $\text{H}_2\text{O}$  (20 ml). Se añadió  $\text{NaHCO}_3$  ac. sat. (30 ml) y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y se concentraron a vacío. El material bruto se purificó mediante cromatografía en columna de fase inversa ( $\text{H}_2\text{O}$  + 0,01% (p/p) de ácido fórmico/MeCN) y se liofilizó para obtener el COMPUESTO FINAL S,R-AF (34 mg).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm): 8,19 (1H, s), 7,53 (1H, s ancho), 7,14 - 7,12 (1H, d), 3,70 (1H, s ancho), 2,59 - 2,36 (2H, m), 2,36 - 2,25 (1H, m), 2,24 - 2,11 (2H, m), 2,08 (3H, s), 2,07 (3H, s), 2,03 (3H, s), 1,99 (3H, s), 1,91 - 1,82 (1H, m), 1,81 - 1,68 (1H, m), 1,65 - 1,51 (1H, m), 1,50 - 1,40 (3H, m), 1,39 - 1,33 (3H, m).

#### 1.2.16 Hidrocloruro de Trolox™ piperidin-4-amida (compuesto Z, racemato)

30 Etapa A: Se preparó el INTERMEDIO Za mediante el uso de Trolox™ (500 mg) y terc-butilaminopiperidin-1-carboxilato (400 mg). A una mezcla enfriada (0 °C) de los reactivos en DMF (seca, 0,05 M) bajo una atmósfera de nitrógeno se le añadieron EDCI.HCl (1,1 eq) y HOAt (0,1 eq). La mezcla se agitó 1 hora a 0 °C y se dejó que alcanzase la temperatura ambiente, y se agitó hasta la conversión completa (LCMS). La mezcla de reacción se vertió en 10 eq (respecto de DMF) de agua. Se formó un precipitado blanco y se filtró. El residuo se lavó con agua en el filtro y se secó. El INTERMEDIO Za (80 mg) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

35 Etapa B: Según el procedimiento general B, se preparó el COMPUESTO FINAL Z (60 mg).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm): 8,32 (1H, s), 7,14 - 7,12 (1H, d), 3,78 - 3,63 (1H, m), 3,61 - 3,45 (1H, m), 3,13 - 3,02 (1H, m), 3,01 - 2,91 (1H, m), 2,83 - 2,65 (2H, m), 2,62 - 2,36 (2H, m), 2,24 - 2,13 (1H, m), 2,09 (3H, s), 2,07 (3H, s), 1,99 (3H, s), 1,86 - 1,68 (2H, m), 1,67 - 1,44 (2H, m), 1,43 - 1,24 (1H, m), 1,38 (3H, s).

#### 1.2.17 Hidrocloruro de Trolox™ pirrolidin-3-amida (compuesto AG, estereoisómero S,R)

40 Etapa A: Según el procedimiento general A, se preparó el INTERMEDIO AGa mediante el uso de (*S*)-Trolox™ (100 mg) y 3-aminopirrolidin-1-carboxilato de (*R*)-terc-butilo (74 mg). El INTERMEDIO AGa (110 mg) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

45 Etapa B: Según el procedimiento general B, se preparó el COMPUESTO FINAL S,R-AG (80 mg).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm): 8,36 (1H, s ancho), 7,60 - 7,59 (1H, d), 4,37 - 4,01 (2H, m), 3,15 - 2,98 (2H, m), 2,97 - 2,79 (1H, m), 2,77 - 2,59 (1H, m), 2,58 - 2,38 (2H, m), 2,26 - 2,10 (2H, m), 2,09 (3H, s), 2,07 (3H, s), 1,99 (3H, s), 1,85 - 1,54 (2H, m), 1,35 (3H, s).

#### 1.2.18 Hidrocloruro de Trolox™ pirrolidin-3-amida (compuesto AG, estereoisómero S,S)

Etapa A: Según el procedimiento general A, se preparó el INTERMEDIO AGb mediante el uso de (*S*)-Trolox™ (100 mg) y 3-aminopirrolidin-1-carboxilato de (*S*)-terc-butilo (74 mg). El INTERMEDIO AGb (115 mg) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

50 Etapa B: Según el procedimiento general B, se preparó el COMPUESTO FINAL S,S-AG (80 mg).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm): 9,11 (2H, s ancho), 7,74 - 7,72 (1H, d), 7,52 (1H, s), 4,48 - 4,20 (1H, s), 3,33 - 3,18 (2H, m), 3,17 - 3,09 (1H, m), 3,08 - 2,99 (1H, m), 2,62 - 2,38 (2H, m), 2,22 - 2,12 (1H, m), 2,10 (3H, s), 2,06 (3H, s), 1,99 (3H, s), 1,82 - 1,62 (2H, m), 1,37 (3H, s).

Ejemplo 2: Efecto de los compuestos sobre los niveles de expresión de proteínas del complejo I y complejo II



completamente ensamblados en células sanas y de pacientes

## 2.1 Métodos y materiales

### 2.1.1 Aislamiento de mitocondrias y complejos OXPHOS

5 Para determinar el efecto de los compuestos sobre los niveles de Complejo I y II en fibroblastos cutáneos humanos normales y de pacientes, se trataron las células con el compuesto F (300  $\mu$ M), el compuesto K (300  $\mu$ M) o el compuesto N (10 o 100 nM). Los fibroblastos cutáneos de pacientes proceden de pacientes con una mutación en diferentes subunidades del Complejo I, y las células de control son fibroblastos cutáneos humanos procedentes de controles sanos.

10 Después de una incubación de 72 horas con el compuesto, las células (aprox.  $2 \times 10^6$ ) se recogieron mediante tripsinización y se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato helada (PBS; Life Technologies, Bleiswijk, Holanda). A continuación, las suspensiones celulares se centrifugaron durante 5 min; 287  $\times$ g; 4  $^{\circ}$ C y los sedimentos celulares se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido.

15 Antes del aislamiento de las mitocondrias y los complejos OXPHOS, los sedimentos se descongelaron sobre hielo y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de PBS helado. Para la preparación de una fracción enriquecida de mitocondrias, se añadieron 100  $\mu$ l (4 mg/ml) de digitonina (Sigma, Zwijndrecht, Holanda), y la suspensión celular se dejó sobre hielo durante 10 min. La digitonina disocia las membranas que contienen colesterol. Por lo tanto, disocia la membrana celular y la membrana mitocondrial externa, pero no la membrana mitocondrial interna. A continuación, se añadió 1 ml de PBS helado para diluir la digitonina, seguido de centrifugación (10 min; 15.600  $\times$ g; 4  $^{\circ}$ C). Tras la centrifugación, los sedimentos contuvieron una fracción celular que estaba enriquecida en mitoplastos. Se eliminó el sobrenadante y los sedimentos se resuspendieron en 100  $\mu$ l de PBS helado. Posteriormente se añadió 1 ml de PBS helado y la suspensión se centrifugó (5 min; 15.600  $\times$ g; 4  $^{\circ}$ C) de nuevo, seguido de eliminación del sobrenadante y resuspensión del sedimento en 100  $\mu$ l de PBS helado, adición de 1 ml de PBS helado y centrifugación (5 min; 15.600  $\times$ g; 4  $^{\circ}$ C). El sobrenadante se eliminó con una jeringa y aguja, y los sedimentos que contenían la fracción de mitoplastos se almacenaron durante la noche (-20  $^{\circ}$ C).

25 Los complejos del sistema OXPHOS se extraen de la membrana interna con  $\beta$ -lauril maltósido y ácido aminocaproico. El  $\beta$ -lauril maltósido es un detergente suave que solubiliza la membrana mitocondrial, y el ácido aminocaproico extrae los complejos. El ácido aminocaproico es una sal dipolar que tiene una carga neta cero a pH 7 y, por lo tanto, no afecta a la electroforesis. Así, para el aislamiento de los complejos OXPHOS, se descongelaron los sedimentos sobre hielo y se solubilizaron en 100  $\mu$ l de tampón ACBT que contenía ácido  $\epsilon$ -aminocaproico 1,5 M (Serva, Ámsterdam, Holanda) y Bis-Tris/HCl 75 mM (pH 7,0) (Sigma). Posteriormente se añadieron 10  $\mu$ l de  $\beta$ -lauril maltósido del 20% (p/v) (Sigma) y la suspensión se dejó sobre hielo durante 10 min. A continuación, las suspensiones se centrifugaron (30 min; 15.600  $\times$ g; 4  $^{\circ}$ C) y los sobrenadantes que contenían los complejos aislados se transfirieron a un tubo limpio (L.G. Nijtmans, N.S. Henderson, I.J. Holt, Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes, *Methods* 26 (2002) 327-334.).

### 35 2.1.2 Ensayo de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas de los complejos OXPHOS aislados mediante el uso de un ensayo de proteínas de Biorad (Biorad, Veenendaal, Holanda). Se preparó una curva patrón con 0, 2, 4, 6, 8, 10 o 15  $\mu$ l de 1 mg/ml de BSA (Sigma) por duplicado. A cada muestra de la curva patrón se le añadieron 5  $\mu$ l de ACBT/LM, que consistió en 150  $\mu$ l de ACBT como se describió en 2.1.1 y 15  $\mu$ l de  $\beta$ -lauril maltósido del 20%. El concentrado de reactivo de tinción 5x (Biorad) se diluyó 5x con Milli Q, y se añadieron 2 ml del reactivo diluido a una muestra de la curva patrón o a 5  $\mu$ l de las muestras que contenían los complejos OXPHOS aislados. Tras un periodo de incubación de entre 5 y 60 min, se midió la extinción a 595 nm.

### 2.1.3 BN-PAGE

45 La electroforesis en gel de poliacrilamida azul nativa (BN-PAGE) separa los cinco complejos OXPHOS entre sí sin disociarlos en sus subunidades. La separación se basa en la masa molecular. Durante la electroforesis se usa Serva Blue G (Serva) para proporcionar a los complejos proteicos una carga para la movilidad electroforética, sin disociar los complejos. La electroforesis se lleva a cabo en un gel en gradiente para una mejor separación de los complejos.

50 Se construyó un gel del 4-16% de Bis-Tris de PAGE nativa (Life Technologies) en el dispositivo XCell SureLock Mini-Cell (Life Technologies) según las instrucciones del fabricante. Las ranuras se lavaron con tampón de cátodo A, que consistió en Tricina 50 mM (Sigma), Bis-Tris 15 mM de pH 7,0 (Sigma) y 0,02% de Serva Blue G (Serva). Las ranuras se rellenaron con tampón de cátodo B, que consistió en Tricina 50 mM y Bis-Tris 15 mM de pH 7,0. A cada muestra se le añadió tampón de muestra nativa azul en una proporción en volumen 1:10. Este tampón de muestra consiste en ácido  $\epsilon$ -aminocaproico 750 mM, Bis-Tris 50 mM, EDTA 0,5 mM (Merck, Schiphol-Rijk, Holanda), 5% de Serva Blue G de pH 7,0, y se cargaron 20  $\mu$ g de proteína de cada muestra en el gel. El compartimento externo se llenó con 500 ml de tampón de ánodo (Bis-Tris 50 mM de pH 7,0) y el compartimento interno se llenó con tampón de cátodo A. El gel se sometió a electroforesis durante 30 min a 50 V, 30 min a 150 V y posteriormente el tampón de cátodo A se sustituyó por el tampón de cátodo B. El gel se sometió otra vez a 150 V hasta que el frente

azul alcanzó el fondo del gel (L.G. Nijtmans, N.S. Henderson, I.J. Holt, Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes, *Methods* 26 (2002) 327-334.).

#### 2.1.4 Detección de proteínas del complejo I o del complejo II

5 Para visualizar la cantidad de complejo I o complejo II presente en los geles de BN-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore, Ámsterdam, Holanda) mediante el uso de técnicas de transferencia de Western habituales, y se detectaron mediante inmunotinción. Después de la transferencia y antes del bloqueo de la membrana de PVDF con tampón de bloqueo Odyssey diluido con PBS 1:1 (Li-cor Biosciences, Cambridge, R.U.), la transferencia en PVDF se disoció con tampón de disociación durante 15 min a 60 °C. El tampón de disociación consiste en PBS, 0,1% de Tween-20 (Sigma) y 2% de SDS (Serva). Para la detección del Complejo I, se usó un anticuerpo primario monoclonal hacia NDUFA9 (39 kDa) (Molecular Probes, Leiden, Holanda) a una concentración final de 1 µg/ml. Para detectar el Complejo II, se usó un anticuerpo monoclonal hacia la subunidad de 70 kDa del complejo II (Molecular Probes) a una concentración final de 0,5 µg/ml. Ambos anticuerpos primarios se diluyeron en PBS, 0,1% de Tween-20 y 2,5% de Protifar Plus (Nutricia, Cuijk, Holanda) y se dejaron unir al complejo durante 4 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C. Los anticuerpos primarios unidos se detectaron posteriormente mediante anticuerpo anti-ratón conjugado a IRDye 800 CW (Li-cor Biosciences) a una concentración final de 0,1 µg/ml. Después de secar la transferencia durante 2 hr en la oscuridad, se detectó el IRDye mediante el uso de un sistema de formación de imágenes infrarrojas Odyssey.

#### 2.1.5 Análisis estadístico

20 El análisis estadístico se lleva a cabo mediante el uso del programa informático Origin Pro Plus (versión 6.1; OriginLab Corporation, Northampton, MA, EE.UU.). Las medias se compararon con el uso de una prueba t de Student para datos independientes con corrección de Bonferroni. Las barras de error indican la desviación estándar (DE).

## 2.2 Resultados

25 La adición del compuesto F a una línea celular obtenida de pacientes que contiene una mutación en una subunidad del complejo I da como resultado un incremento de los niveles de proteínas del complejo I completamente ensamblado (Figura 1A). Además, el compuesto K incrementa los niveles de proteínas del complejo I en la misma línea celular obtenida de pacientes (Figura 1B). Además, se observa un incremento dependiente de la dosis en los niveles de proteínas del complejo I tras la adición de compuesto N 10 nM o 100 nM a células obtenidas de pacientes (Figura 1 C). El incremento de los niveles anteriores se cuantificó en la Figura 1 para el complejo I (panel A) y el complejo II (panel B). Se observó un incremento estadísticamente significativo de los niveles de complejo I tras la adición de diferentes concentraciones de compuesto N a una línea celular obtenida de pacientes. Además, se detectó un incremento del nivel de complejo II de proteínas completamente ensambladas a la concentración más alta del compuesto N. Estos datos indican que un modo de acción de los compuestos F, K y N podría implicar incrementar la cantidad de complejo I completamente ensamblado y potencialmente los niveles de proteínas del complejo II.

Ejemplo 3: Efecto de los compuestos sobre los niveles incrementados de especies reactivas de oxígeno (ROS) que oxidan CM-H<sub>2</sub>DCF en células de pacientes

#### 3.1 Métodos y materiales

40 CM-H<sub>2</sub>DCFDA es una molécula indicadora permeable para las células para las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se convierte en CM-H<sub>2</sub>DCF no fluorescente e impermeable para las membranas tras la eliminación de sus grupos acetato por las esterasas intracelulares. Tras la oxidación mediante ROS, CM-H<sub>2</sub>DCF se convierte en CM-DCF fluorescente. Se acepta de manera generalizada que una amplia diversidad de ROS pueden ser responsables de la oxidación de CM-H<sub>2</sub>DCF, lo que le hace un indicador adecuado de los niveles de oxidantes celulares. La intensidad de fluorescencia por CM-DCF celular media se considera una medida indirecta de los niveles celulares de ROS.

45 Para medir el efecto de los compuestos sobre los niveles intracelulares de ROS en fibroblastos cutáneos humanos de diferentes pacientes, se sembraron células a una densidad de 1500 células/pocillo en un formato de 96 pocillos y se incubaron con concentraciones crecientes de compuestos F, K y N. Tres días tras el tratamiento, el medio de cultivo se sustituyó con 100 µl de CM-H<sub>2</sub>DCFDA/pocillo a una concentración final de 1 µM (Life Technologies). La disolución de CM-H<sub>2</sub>DCFDA se prepara diluyendo una disolución de reserva 1 mM (CM-H<sub>2</sub>DCFDA disuelto en DMSO (Sigma)) 1:1000 en tampón HT de pH 7,4. Este tampón HT consiste en NaCl 132 mM, KCl 4 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM y D-glucosa 5 mM.

55 La placa de cultivo celular que contiene CM-H<sub>2</sub>DCFDA se colocó durante exactamente 10 minutos a 37 °C o a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS y se añadieron 100 µl de tampón HT 1x a cada pocillo que contenía células, además de a 4 pocillos vacíos. En otros 4 pocillos vacíos, se añadieron 100 µl (5 pM) de fluoresceína (Sigma) disuelta en tampón HT. Los pocillos sin células pero con tampón HT o con tampón HT y fluoresceína sirvieron para corregir respectivamente la fluorescencia de fondo o la iluminación desigual.

La fluorescencia de CM-DCF se midió con el sistema BD Pathway 855, mediante el uso de los parámetros: Exposición: 0,4; Ganancia: 10; Compensación: 255. Mediante el uso del procedimiento de corrección de BD Pathway, todas las medidas se corrigieron con respecto a la fluorescencia de fondo, y tuvieron una corrección de campo plano para eliminar la iluminación desigual introducida mediante el sistema BD Pathway 855. Los valores se expresaron como la intensidad media de CM-DCF/píxeles celulares/pocillo, y los valores obtenidos de las líneas celulares de pacientes se calcularon como el porcentaje del valor medio en la línea celular de control C5120 tratada con un 0,1% de DMSO solamente.

### 3.2.1 Resultados para los compuestos F, K y N

Para determinar si los compuestos tuvieron efecto sobre los niveles intracelulares de ROS, una o varias líneas celulares de pacientes con niveles incrementados de ROS (W.J.H. Koopman, S. Verkaart, H.J. Visch, S.E. van Emst-de Vries, L.G. Nijtmans, J.A. Smeitink, P.H. Willems, Human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency: radical changes in mitochondrial morphology?, Am J Physiol Cell Physiol 293 (2007) C22-C29) se expusieron a concentraciones crecientes de los compuestos F (Figura 3A), K (Figura 3B) o N (Figura 3C). Para los tres compuestos, hubo una correlación negativa observada entre la concentración de los compuestos y los niveles de ROS, lo que significó que las concentraciones incrementadas dieron como resultado niveles disminuidos de ROS tal como se determinó mediante la formación de CM-DCF. Como se podría dar una fragmentación mitocondrial como consecuencia de niveles demasiado elevados de ROS (W.J.H. Koopman, S. Verkaart, H.J. Visch, S.E. van Emst-de Vries, L.G. Nijtmans, J.A. Smeitink, P.H. Willems, Human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency: radical changes in mitochondrial morphology?, Am J Physiol Cell Physiol 293 (2007) C22-C29; Distelmaier F., Valsecchi, F., Forkink, M., van Emst-de Vries, S., Swarts, H., Rodenburg, R., Verwiel, E., Smeitink, J., Willems, P.H.G.M., Koopman, W.J.H. (2012) Trolox™-sensitive ROS regulate mitochondrial morphology, oxidative phosphorylation and cytosolic calcium handling in healthy cells. Antioxidants and redox signaling. (en prensa), PMID 22559215) los compuestos podrían ejercer su efecto terapéutico al menos parcialmente por medio de la disminución de los niveles de ROS de vuelta a los niveles fisiológicos.

### 3.2.2 Resultados para los compuestos adicionales

Los compuestos adicionales capaces de reducir los niveles intracelulares de ROS se enumeran en la Tabla 2. Los compuestos se ensayaron por su efecto sobre la disminución de los niveles intracelulares de ROS en una línea celular de paciente (células S7-5175, que son fibroblastos de un paciente con una mutación del gen NDUFS7) con niveles incrementados de ROS, en un ensayo de DCFDA, básicamente como se describió anteriormente en 3.1. Se determinó una curva dosis-respuesta para cada compuesto enumerado, de la cual se calculó la CE<sub>50</sub> (potencia), es decir, la concentración del compuesto que proporciona una respuesta semimáxima, y se indica en la Tabla 2.

Tabla 2: Potencias de los compuestos en el ensayo de DCFDA.

Código	Compuesto	CE <sub>50</sub> en el ensayo de DCFDA*
KH001	<i>rac</i> -F	+
KH003	<i>R,S</i> -N / <i>S,S</i> -N (1/1)	++
KH004	<i>R,S</i> -O / <i>S,S</i> -O (1/1)	+
KH137	<i>rac</i> -Z	++
KH167	<i>R</i> -T	+
KH168	<i>S</i> -T	+
KH174	<i>R,R</i> -X	++
KH175	<i>R,S</i> -X	++
KH176	<i>S,R</i> -X	+++
KH177	<i>S,S</i> -X	++
KH185	<i>R</i> -U	++
KH186	<i>S</i> -U	++
KH189	<i>R</i> -V	+++
KH190	<i>S</i> -V	+
KH193	<i>R,trans</i> -AE	++
KH194	<i>S,trans</i> -AE	++
KH204	<i>S,R</i> -AF	+++

Código	Compuesto	CE <sub>50</sub> en el ensayo de DCFDA*
KH213	S-AH	++
KH217	S,R-AG	++
KH218	S,S-AG	++

\* + indica una CE<sub>50</sub> en el intervalo de 10-100 µM; ++ indica una CE<sub>50</sub> en el intervalo de 1-10 µM; y, +++ indica una CE<sub>50</sub> en el intervalo de 0,1-1 µM.

Ejemplo 4: Efecto de los compuestos I y J sobre los niveles de expresión de proteínas del complejo I completamente ensamblado

- 5 Los compuestos I y J producen una ligera reducción de la expresión del complejo I en líneas celulares de control sanas, mientras los compuestos producen una reducción drástica de la expresión del complejo I en líneas celulares de pacientes, por lo cual el efecto del compuesto J es más intenso que el efecto del compuesto I.

Ejemplo 5: Efecto *in vivo* del compuesto N sobre la fuerza de agarre en ratones con inactivación génica de Ndufs4

10 *Animales y Tratamientos:* Se generaron ratones con inactivación génica de Ndufs4 (KO) y de tipo natural (WT) cruzando machos y hembras heterocigotos para Ndufs4 (Kruse SE, et al., 2008, Cell Metab 7:312-320). El número total (n) de animales usados en este proyecto es como sigue: Vehículo WT: 7, compuesto N (KH003) WT: 7, Vehículo KO: 5, compuesto N KO: 5. Los animales se ensayaron a las 3, 5 y 6 semanas de edad. Los animales recibieron inyecciones de vehículo (control), que consistieron en agua estéril, o de compuesto N a una dosis de 400 mg/kg, con un volumen de dosis de 4 ml/kg. Los animales se sometieron a inyecciones dos veces al día (2 ml/kg por inyección). Las inyecciones comenzaron durante la semana 3 de vida, y continuaron diariamente hasta la conclusión del experimento en la semana 6.

15 *Análisis de datos:* Todos los datos se expresan como la media ± EEM. Los datos se analizaron mediante el uso de un ANOVA unidireccional en SPSS versión 20.0. Los efectos globales significativos (es decir, genotipo, tratamiento y/o interacción genotipo\*tratamiento) se analizaron adicionalmente mediante el uso de análisis post-hoc PLSD de Fisher.

20 *Paradigma de Fuerza de Agarre:* El ensayo de fuerza de agarre está diseñado para medir la fuerza muscular en roedores. El aparato consiste en una barra simple, que el animal agarrará por instinto. Una vez que la barra ha sido agarrada, el experimentador retrae suavemente al animal hasta que el animal se ve forzado a liberar la barra. La cantidad de fuerza ejercida por el animal sobre la barra se mide en Pondios (p) (1 p = 1 gramo). El ensayo de fuerza de agarre se repite 5 veces y la fuerza media ejercida se usa como la lectura cuantitativa. Todas las medidas se corrigieron por el peso corporal, mediante el uso de la ecuación siguiente:

$$\text{Índice de Fuerza de Agarre} = ((\text{ensayos } 1 + 2 + 3 + 4 + 5 \text{ de la semana } X)/5)/\text{Peso Corporal Medio}$$

semana X (g) (Semana X = semana 3, 5 o 6)

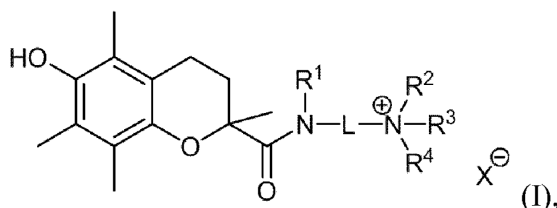
30 *Procedimiento de Ensayo:* En los días de ensayo, los animales recibieron su inyección matinal 30 minutos antes de la hora de ensayo. Tras las inyecciones, los animales se colocaron en la sala de ensayo durante un periodo de aclimatación de 30 minutos.

35 *Resultados:* El tratamiento crónico con el compuesto N dio como resultado una fuerza de agarre significativamente mejorada en los animales KO en la semana 6 de ensayo, en comparación con los animales con inactivación génica con vehículo ( $p < 0,002$ ) como se muestra en la Figura 4. Además, los animales KO tratados con el compuesto N ya no fueron significativamente diferentes en comparación con los animales de tipo natural en ambos grupos de tratamiento en la semana 6, lo que indica que el tratamiento con el compuesto N mejoró significativamente el rendimiento de la fuerza muscular, lo que la hizo comparable con los de tipo natural en ese momento. No hubo diferencias significativas entre grupos en las semanas 3 y 5.

40 Se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con el compuesto N con el compuesto S,R-X (KH176), cuando se administró a una dosis 10 veces inferior en comparación con el compuesto N, es decir, una dosis de 40 mg/kg, con un volumen de dosis de 4 ml/kg (inyecciones de 2 ml/kg dos veces al día) (datos no mostrados).

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula general (I):



en la que

- 5
- L es un ligador que comprende de 1 a 10 átomos de esqueleto sustituidos opcionalmente, seleccionados de carbono, nitrógeno y oxígeno; y
  - R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> están unidos entre sí para formar un segundo ligador entre el átomo de nitrógeno de amida y el átomo de nitrógeno catiónico, o R<sup>1</sup> está unido a un átomo de esqueleto del ligador L en una estructura cíclica y/o R<sup>2</sup> está unido a un átomo de esqueleto del ligador L en una estructura cíclica; y
  - R<sup>3</sup> se selecciona de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, en el que el resto alquilo puede estar sustituido con uno o más átomos de halógeno o restos (halo)alcoxi, o R<sup>3</sup> está ausente cuando el átomo de nitrógeno catiónico es parte de un resto imina; y
  - R<sup>4</sup> se selecciona de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, en el que el resto alquilo puede estar sustituido con uno o más átomos de halógeno o restos (halo)alcoxi; y
  - X<sup>-</sup> es un anión farmacéuticamente aceptable,

en el que el compuesto no es:

- 20
- (i) el compuesto de fórmula (I), en la que L = -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-(L<sup>3</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H y X = Cl;
  - (ii) el compuesto de fórmula (I), en la que L = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CHR<sup>1</sup>-CH<sub>2</sub>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, R<sup>1</sup>-R<sup>1</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(L<sup>1</sup>), R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, R<sup>4</sup> = H y X = Cl;
  - (iii) el compuesto de fórmula (I), en la que L = -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-(L<sup>3</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H; X = TFA, que está en la configuración S en la posición 2;
  - (iv) hidrocloreuro de 1-[2-(6-amino-4-metil-2-piridinil)etil]-4-[(3,4-dihidro-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2H-[1]-benzopirán-2-il)carbonil]-piperazina;
  - 25 (v) hidrocloreuro de 1-[4-(2-amino-6-piridinil)-3-butinil]-4-[(3,4-dihidro-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2H-[1]-benzopirán-2-il)carbonil]-piperazina; o (vi) fumarato de N-[4-(6-amino-4-metil-2-piridinil)butil]-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-cromanocarboxamida.

- 30
2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que los átomos de esqueleto de L se representan por C<sub>n-m</sub>N<sub>m</sub>, en el que n designa el número total de átomos en el esqueleto, y m el número de átomos de nitrógeno en el esqueleto, en el que n = 2 - 7 y m = 0 - 3.

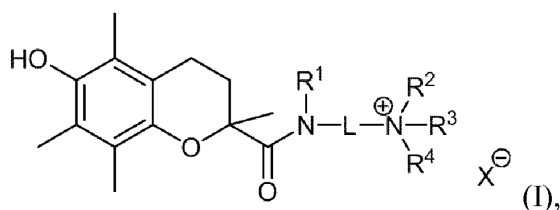
3. Un compuesto según la reivindicación 1 o 2, en el que X = Cl, I, TFA o formiato.

4. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que

- 35
- L = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(L<sup>1</sup>), R<sup>1</sup>-R<sup>2</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(L<sup>1</sup>), R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H, X = Cl; o
  - L = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(L<sup>1</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
  - L = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHC(O)CH<sub>2</sub>-(L<sup>2</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
  - L = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHC(NH<sub>2</sub>)=(L<sup>4</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = ausente, R<sup>4</sup> = H; X = TFA; o
  - L = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHC(O)CH<sub>2</sub>NHC(NH<sub>2</sub>)=(L<sup>5</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = ausente, R<sup>4</sup> = H; X = TFA; o
  - L = -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(NH<sub>2</sub>)=(L<sup>6</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = ausente, R<sup>4</sup> = H; X = TFA; o
  - L = -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-(L<sup>3</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Me, R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = Me; X = I; o



- L = -CHR<sup>2</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(L<sup>21</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup>-R<sup>2</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(L<sup>1</sup>), R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = H; X = Cl.
6. Un compuesto según la reivindicación 4, en el que
- L = -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-(L<sup>3</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Me, R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = Me; X = I; o
  - L = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(L<sup>1</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Me, R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = Me; X = I.
- 5 7. Una composición farmacéutica o cosmética que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 y un vehículo fisiológicamente aceptable.
8. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 para el uso como un medicamento.
9. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 para el uso en la modulación de al menos uno de la morfología mitocondrial y la expresión de enzimas de OXPHOS.
- 10 10. Un compuesto para el uso en el tratamiento, la prevención o la inhibición de los síntomas asociados a un trastorno mitocondrial, en el que el compuesto es un compuesto de fórmula general (I):



en la que

- 15
- L es un ligador que comprende de 1 a 10 átomos de esqueleto sustituidos opcionalmente, seleccionados de carbono, nitrógeno y oxígeno; y
  - R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> están unidos entre sí para formar un segundo ligador entre el átomo de nitrógeno de amida y el átomo de nitrógeno catiónico, o R<sup>1</sup> está unido a un átomo de esqueleto del ligador L en una estructura cíclica y/o R<sup>2</sup> está unido a un átomo de esqueleto del ligador L en una estructura cíclica; y
- 20
- R<sup>3</sup> se selecciona de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, en el que el resto alquilo puede estar sustituido con uno o más átomos de halógeno o restos (halo)alcoxi, o R<sup>3</sup> está ausente cuando el átomo de nitrógeno catiónico es parte de un resto imina; y
  - R<sup>4</sup> se selecciona de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, en el que el resto alquilo puede estar sustituido con uno o más átomos de halógeno o restos (halo)alcoxi; y
- 25
- X<sup>-</sup> es un anión farmacéuticamente aceptable.
11. Un compuesto para el uso según la reivindicación 10, en el que
- L = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHC(O)CH<sub>2</sub>NHC(NH<sub>2</sub>)=(L<sup>5</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = ausente, R<sup>4</sup> = H; X = TFA; o
  - L = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHC(O)CH<sub>2</sub>NHC(Me)=(L<sup>8</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = ausente, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
  - L = -C(CO<sub>2</sub>H)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-(L<sup>11</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
- 30
- L = -C(CO<sub>2</sub>H)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(NH<sub>2</sub>)=(L<sup>12</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = ausente, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
  - L = -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-(L<sup>17</sup>) R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
  - L = -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-(L<sup>16</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Me, R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
  - L = -CHR<sup>2</sup>CH<sub>2</sub>-(L<sup>19</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup>-R<sup>2</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-(L<sup>3</sup>), R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
  - L = -CHR<sup>2</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(L<sup>21</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup>-R<sup>2</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(L<sup>1</sup>), R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
- 35
- L = -CHR<sup>5</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CHR<sup>5</sup>-(L<sup>26</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>5</sup>-R<sup>5</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(L<sup>1</sup>), R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
  - L = -CHR<sup>2</sup>CH<sub>2</sub>-(L<sup>19</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup>-R<sup>2</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-(L<sup>3</sup>), R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
  - L = -CHR<sup>2</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(L<sup>21</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup>-R<sup>2</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(L<sup>1</sup>), R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = H; X = Cl.

12. Un compuesto para el uso según la reivindicación 10 o 11, en el que el trastorno mitocondrial es un trastorno seleccionado del grupo que consiste en: Epilepsia mioclónica; epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas (MERRF); neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL); neuropatía, ataxia y retinosis pigmentaria (NARP); miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica, accidente cerebrovascular (MELAS); síndrome de Leigh; 5 síndrome similar a Leigh; atrofia óptica dominante (AOD); síndrome de Kearns-Sayre (KSS); diabetes y sordera de herencia materna (MIDD); síndrome de Alpers-Huttenlocher; espectro ataxia-neuropatía; oftalmoplejía externa progresiva crónica (OEPC); síndrome de Pearson; encefalopatía neuro-gastro-intestinal mitocondrial (MNGIE); síndrome de Sengers; aciduria 3-metilglutacónica, sordera neurosensorial, encefalopatía y hallazgos neurorradiológicos del síndrome similar a Leigh (MEGDEL); miopatía; miopatía mitocondrial; cardiomiopatía; y 10 encefalomiopatía, SURFS1 (síndrome de Leigh con deficiencia de COX debido a deficiencia de proteína del complejo IV asociada al gen surfeit) y deficiencias de OXPHOS aisladas o combinadas con defectos genéticos hasta ahora sin resolver, que incluyen oxidación de piruvato y tasas de producción de ATP más PCr alteradas.

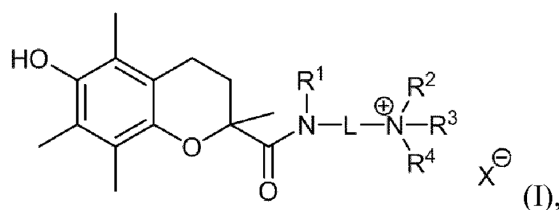
13. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, para el uso en el tratamiento, la prevención, o la inhibición de los síntomas asociados a una afección asociada a la disfunción mitocondrial, en el que preferiblemente 15 el compuesto es un compuesto según la reivindicación 5.

14. Un compuesto para el uso según la reivindicación 13, en el que la afección asociada a disfunción mitocondrial es una afección seleccionada del grupo que consiste en: Ataxia de Friedreich (FRDA); acidosis tubular renal; enfermedad de Parkinson; enfermedad de Alzheimer; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); enfermedad de Huntington; trastornos generalizados del desarrollo; pérdida auditiva; sordera; diabetes; envejecimiento; y efectos 20 farmacológicos adversos que dificultan la función mitocondrial.

15. Un compuesto para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 - 14, en el que se usa un marcador clínico medible para determinar la eficacia de la terapia que usa los compuestos de la invención.

16. Un compuesto para el uso según la reivindicación 15, en el que el marcador clínico es uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en los niveles de ácido láctico (lactato), en sangre completa, plasma, líquido cefalorraquídeo, o líquido ventricular cerebral; niveles de ácido pirúvico (piruvato), en sangre completa, plasma, líquido cefalorraquídeo, o líquido ventricular cerebral; proporciones lactato/piruvato, en sangre completa, plasma, líquido cefalorraquídeo, o líquido ventricular cerebral; aminoácidos, en particular alanina, citrulina y prolina en sangre completa, plasma o líquido cefalorraquídeo, ácidos orgánicos en fluidos corporales; FGF21 en suero y músculo esquelético; niveles de fosfocreatina, niveles de NADH (NADH + H<sup>+</sup>) o NADPH (NADPH + H<sup>+</sup>); niveles de NAD o 25 NADP; niveles de ATP; umbral anaeróbico; niveles de coenzima Q reducida (CoQ<sup>red</sup>); niveles coenzima Q oxidada (CoQ<sup>ox</sup>); niveles totales de coenzima Q (CoQ<sup>tot</sup>); niveles de citocromo C oxidado; niveles de citocromo C reducido; proporción citocromo C oxidado/citocromo C reducido; niveles de acetoacetato, niveles de beta-hidroxi butirato, proporción acetoacetato/betahidroxi butirato, niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG); niveles de especies reactivas de oxígeno; y niveles de consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>), niveles de producción de dióxido de carbono (VCO<sub>2</sub>), y cociente respiratorio (VCO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>). 35

17. Un compuesto para el uso en el tratamiento, la prevención o la inhibición de los síntomas asociados a una enfermedad neoplásica, en el que el compuesto es un compuesto de fórmula general (I):



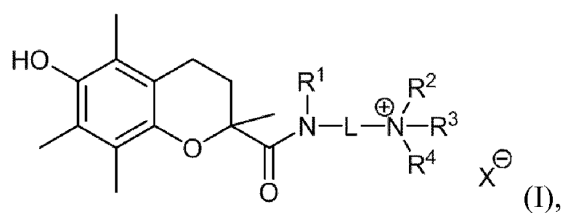
en la que

- 40
- L = -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-(L<sup>3</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Me, R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = Me; X = I; o
  - L = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(L<sup>1</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Me, R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = Me; X = I.

18. Un compuesto para el uso según la reivindicación 17, en el que la enfermedad neoplásica es cáncer, preferiblemente un cáncer seleccionado del grupo que comprende carcinoma de células basales, cáncer de hueso, 45 cáncer intestinal, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, melanoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata o cáncer de tiroides.

19. Un método cosmético para el tratamiento o el retraso del envejecimiento adicional de la piel en un sujeto, y el método comprende la etapa de administrar en la piel del sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto de fórmula general (I):

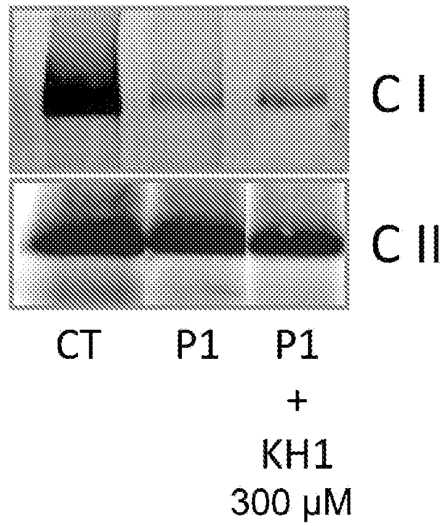




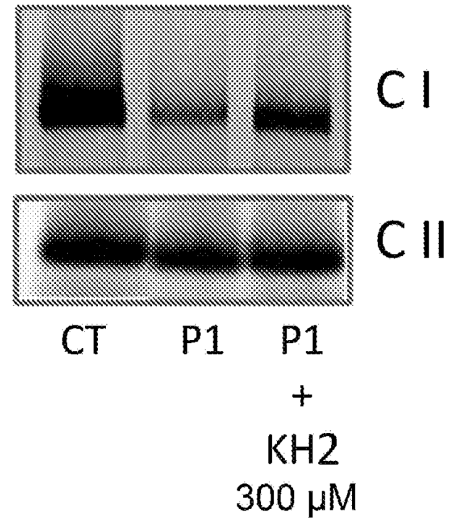
en la que

- L es un ligador que comprende de 1 a 10 átomos de esqueleto sustituidos opcionalmente, seleccionados de carbono, nitrógeno y oxígeno; y
- 5 - R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> están unidos entre sí para formar un segundo ligador entre el átomo de nitrógeno de amida y el átomo de nitrógeno catiónico, o R<sup>1</sup> está unido a un átomo de esqueleto del ligador L en una estructura cíclica y/o R<sup>2</sup> está unido a un átomo de esqueleto del ligador L en una estructura cíclica; y
- 10 - R<sup>3</sup> se selecciona de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, en el que el resto alquilo puede estar sustituido con uno o más átomos de halógeno o restos (halo)alcoxi, o R<sup>3</sup> está ausente cuando el átomo de nitrógeno catiónico es parte de un resto imina; y
- R<sup>4</sup> se selecciona de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, en el que el resto alquilo puede estar sustituido con uno o más átomos de halógeno o restos (halo)alcoxi; y
- X<sup>-</sup> es un anión farmacéuticamente aceptable.
- 15 20. Un método según la reivindicación 19, en el que
  - L = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHC(O)CH<sub>2</sub>NHC(NH<sub>2</sub>)=(L<sup>5</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = ausente, R<sup>4</sup> = H; X = TFA; o
  - L = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHC(O)CH<sub>2</sub>NHC(Me)=(L<sup>8</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = ausente, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
  - L = -C(CO<sub>2</sub>H)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-(L<sup>11</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
  - L = -C(CO<sub>2</sub>H)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(NH<sub>2</sub>)=(L<sup>12</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = ausente, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
  - 20 - L = -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-(L<sup>17</sup>) R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
  - L = -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-(L<sup>16</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Me, R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
  - L = -CHR<sup>2</sup>CH<sub>2</sub>-(L<sup>19</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup>-R<sup>2'</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-(L<sup>3</sup>), R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
  - L = -CHR<sup>2</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(L<sup>21</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup>-R<sup>2'</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(L<sup>1</sup>), R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
  - L = -CHR<sup>5</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CHR<sup>5'</sup>-(L<sup>26</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>5</sup>-R<sup>5'</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(L<sup>1</sup>), R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
  - 25 - L = -CHR<sup>2</sup>CH<sub>2</sub>-(L<sup>19</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup>-R<sup>2'</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-(L<sup>3</sup>), R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = H; X = Cl; o
  - L = -CHR<sup>2</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(L<sup>21</sup>), R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup>-R<sup>2'</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(L<sup>1</sup>), R<sup>3</sup> = Me, R<sup>4</sup> = H; X = Cl.

*Fig. 1a*



*Fig. 1b*



*Fig. 1c*

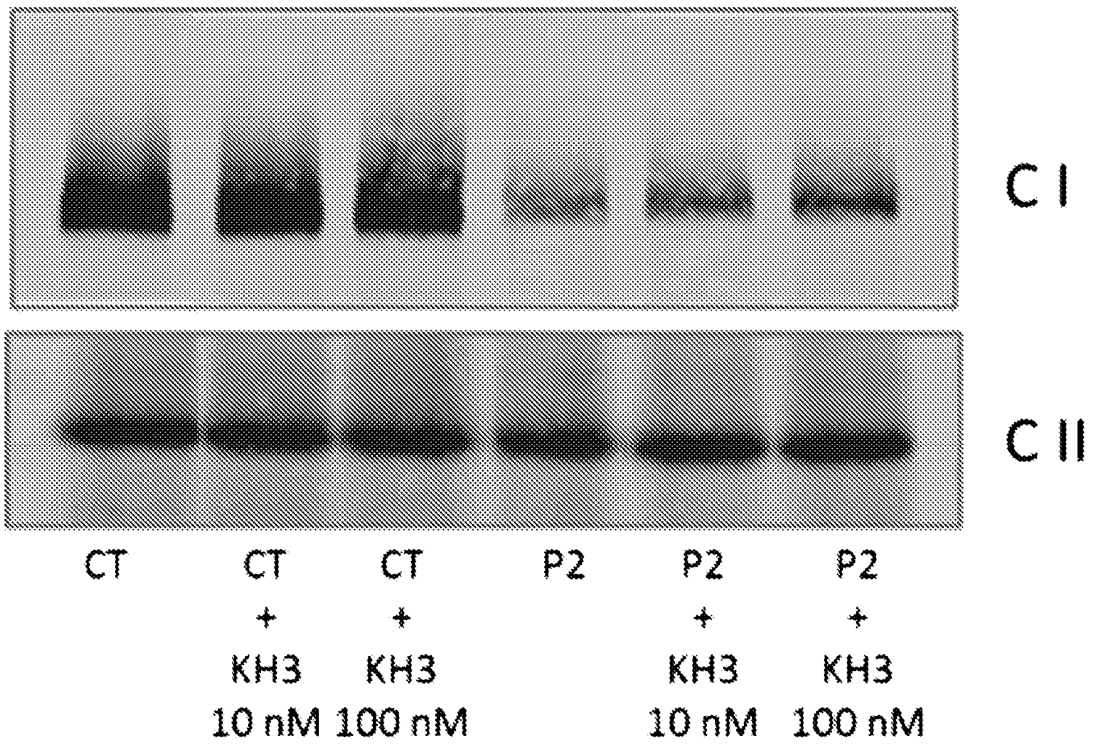


Fig. 2a

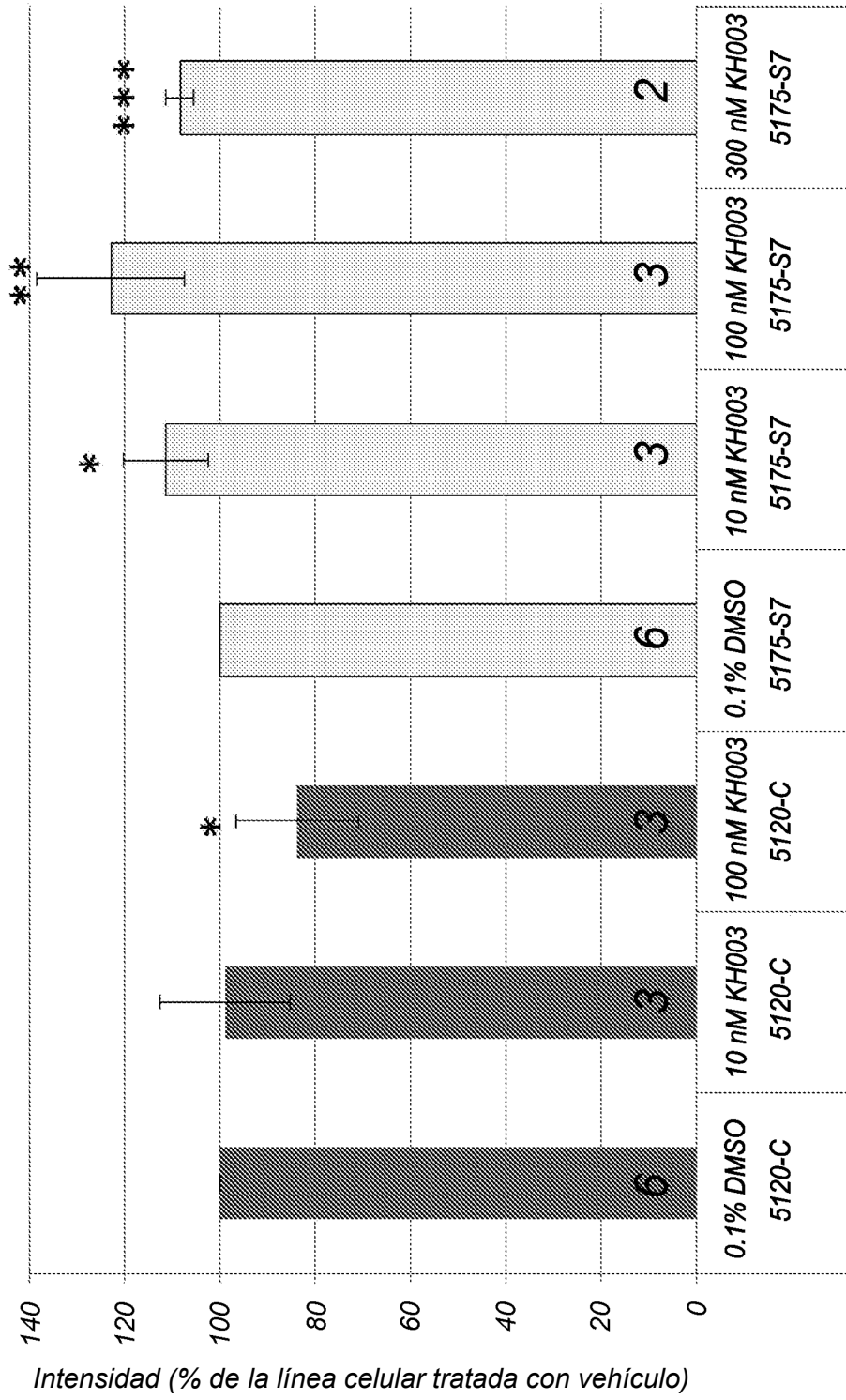


Fig. 2b

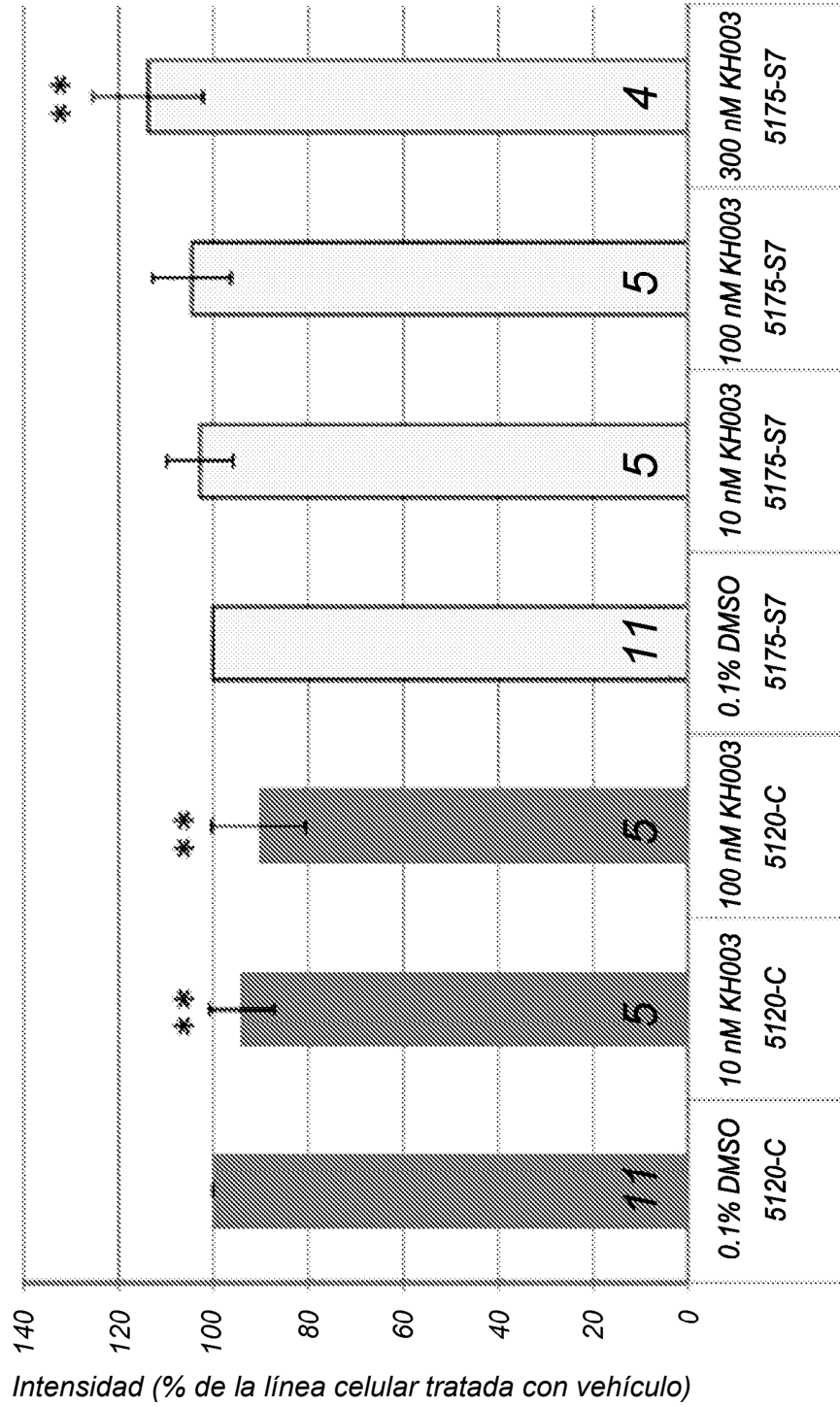


Fig. 3a

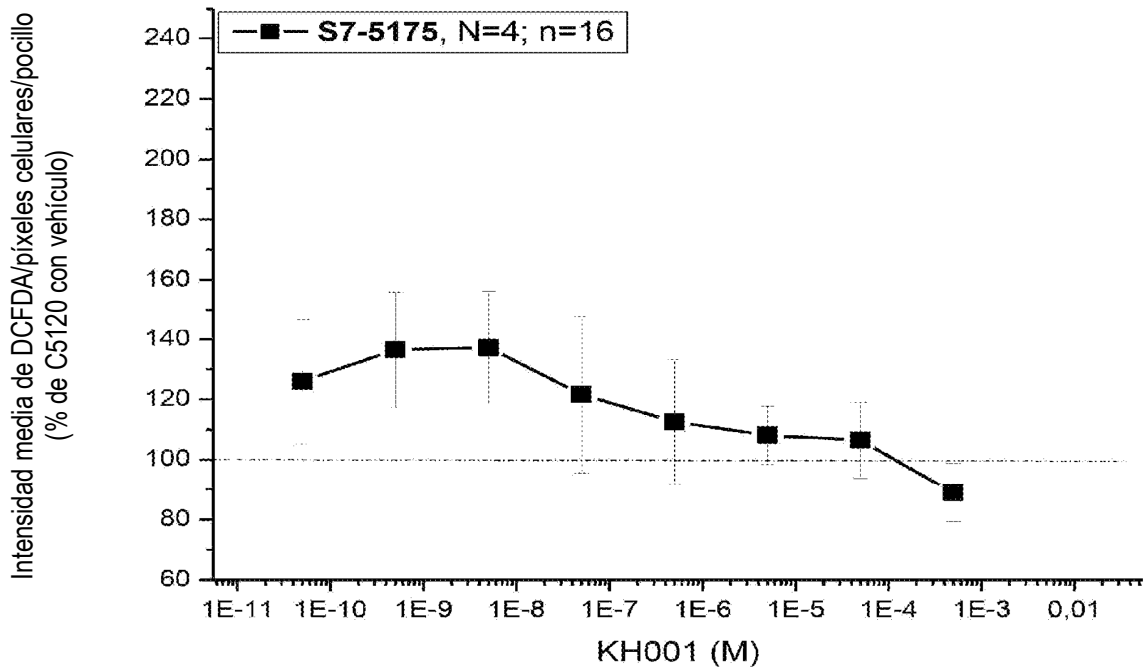


Fig. 3b

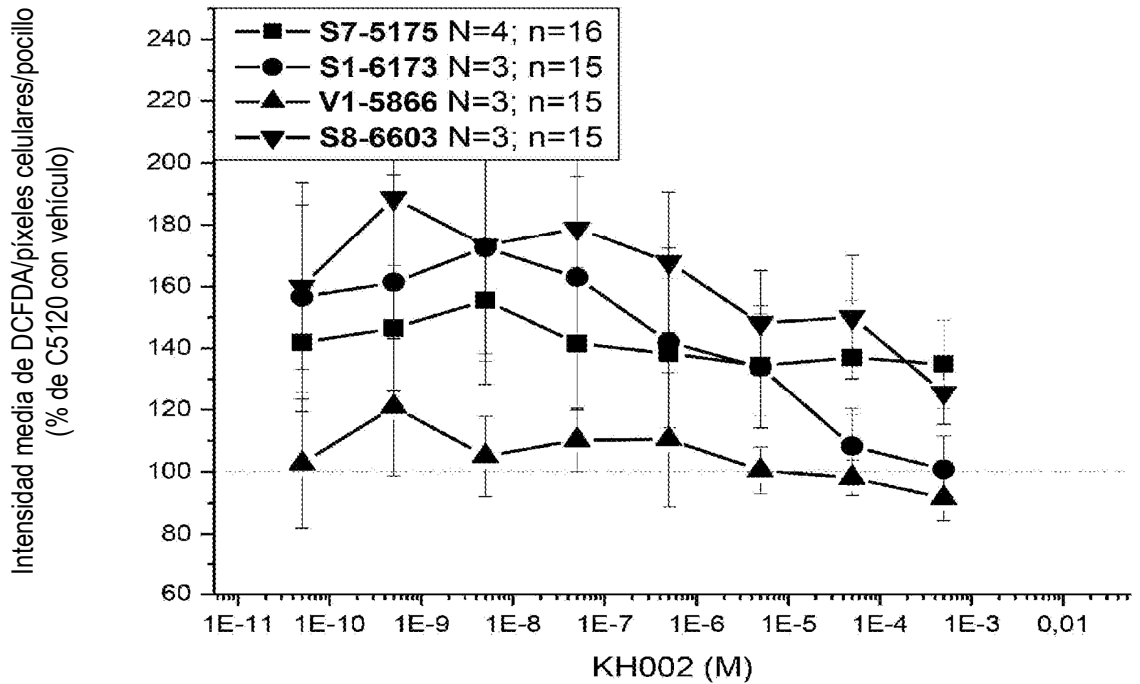


Fig. 3c

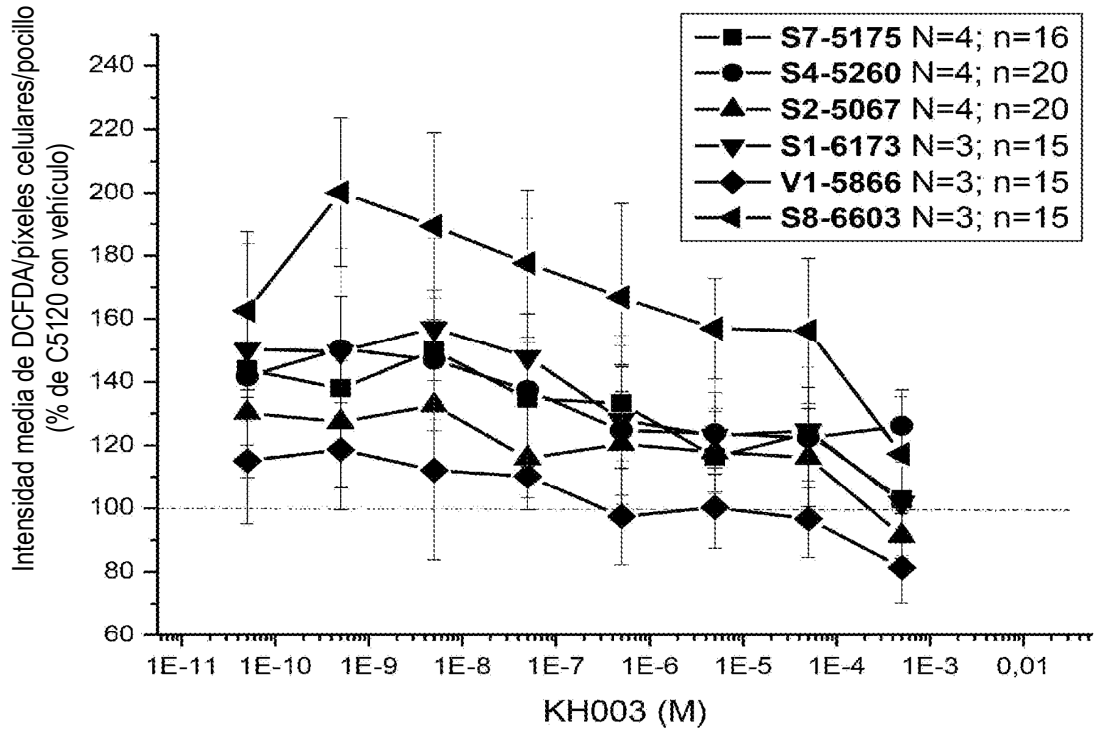


Fig. 4

Fuerza de Agarre

