

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 860**

51 Int. Cl.:

A61K 31/225	(2006.01)	C07C 327/28	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)	C07C 327/30	(2006.01)
C07C 323/25	(2006.01)	C07C 327/32	(2006.01)
C07D 281/18	(2006.01)	C07C 327/34	(2006.01)
C07D 417/04	(2006.01)	C07D 211/76	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)		
A61K 31/155	(2006.01)		
A61K 31/22	(2006.01)		
A61K 31/265	(2006.01)		
C07D 309/30	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2015 PCT/EP2015/057606**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2015 WO15155231**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2015 E 15714820 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 3129016**

54 Título: **Compuestos de succinato con permeabilidad celular novedosos**

30 Prioridad:

08.04.2014 DK 201470190

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

28.09.2018

73 Titular/es:

**NEUROVIVE PHARMACEUTICAL AB (100.0%)
Medicon Village Scheelevägen 2
223 81 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**ELMÉR, ESKIL;
HANSSON, MAGNUS JOAKIM;
EHINGER, KARL HENRIK JOHANNES y
MOSS, STEVEN**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 683 860 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

Compuestos de succinato con permeabilidad celular novedosos

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona succinatos con permeabilidad celular novedosos y precursores de succinato con permeabilidad celular que tienen como objetivo aumentar la producción de ATP en las mitocondrias. La parte principal del ATP producido y utilizado en la célula eucariota se origina a partir de la fosforilación oxidativa mitocondrial, un proceso al que el ciclo de Krebs proporciona electrones de alta energía. No todos los productos intermedios de ciclo de Krebs presentan una inmediata permeabilidad a través de la membrana celular, siendo uno de ellos el succinato. La provisión de los succinatos con permeabilidad celular novedosos se prevé para permitir el paso por la membrana celular y, por tanto, los succinatos con permeabilidad celular pueden usarse para potenciar la producción de ATP mitocondrial.

Además, la presente invención también proporciona succinatos con permeabilidad celular o equivalentes a los succinatos que además de presentar permeabilidad celular y liberar succinato en el citosol también son capaces potencialmente de proporcionar energía al organismo mediante los productos hidrolíticos que resultan de la hidrólisis o bien química o bien enzimática de los derivados de succinato.

La presente invención también proporciona métodos para preparar compuestos de la invención que tienen propiedades mejoradas para su uso en medicina y/o en cosméticos. Particularmente, los compuestos de la invención son útiles en la prevención o el tratamiento de los trastornos relacionados con las mitocondrias, en el mantenimiento de la función mitocondrial normal, la potenciación de la función mitocondrial, es decir producir más ATP que normalmente, o en la restauración de defectos en el sistema respiratorio mitocondrial.

Antecedentes de la invención

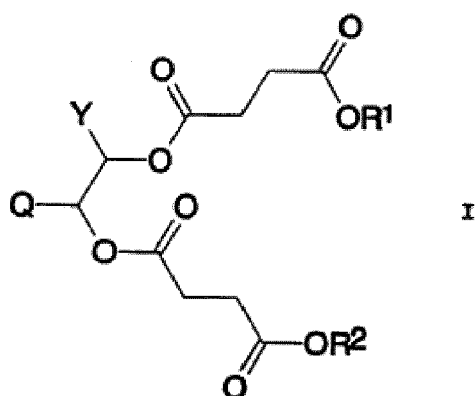
Las mitocondrias son orgánulos de las células eucariotas. Generan la mayor parte del suministro de adenosina trifosfato (ATP) de la célula, que se usa como fuente de energía. Por tanto, las mitocondrias son indispensables para la producción de energía, para la supervivencia de células eucariotas y para la función celular correcta. Además de suministrar energía, las mitocondrias están implicadas en otros procesos varios tales como señalización celular, diferenciación celular, muerte celular así como el control del ciclo celular y crecimiento celular. En particular, las mitocondrias son reguladores cruciales de la apoptosis celular y también desempeñan un importante papel en múltiples formas de muerte celular no apoptótica tal como necrosis.

En los últimos años se han publicado muchos artículos que describen las contribuciones mitocondriales a una variedad de enfermedades. Algunas enfermedades pueden estar provocadas por mutaciones o deleciones en el genoma mitocondrial o nuclear, mientras que otras pueden estar provocadas por una afectación primaria o secundaria del sistema respiratorio mitocondrial u otros mecanismos relacionados con la disfunción mitocondrial. En la actualidad, no se dispone de ningún tratamiento que pueda curar las enfermedades mitocondriales.

En vista de la importancia reconocida del mantenimiento o la restauración de una función mitocondrial normal o de la potenciación de la producción de energía (ATP) de la célula, existe la necesidad de desarrollar compuestos que tengan las siguientes propiedades: permeabilidad celular del compuesto original, la capacidad para liberar succinato o un precursor de succinato intracelular, baja toxicidad del compuesto original y los productos liberados, y propiedades fisicoquímicas acordes con la administración a un paciente.

Se han preparado compuestos de succinato como profármacos de otros agentes activos, por ejemplo el documento WO 2002/28345 describe éster bis(2,2-dimetilpropioniloximetílico) del ácido succínico, éster dibutiriloximetílico del ácido succínico y éster bis-(1-butiloxietílico) del ácido succínico. Estos compuestos se preparan como agentes para suministrar formaldehído, y tienen como objetivo diferentes usos médicos para los presentes compuestos. El formaldehído puede formar aductos con ADN, que pueden detectarse tanto por el ADN nuclear como por el mitocondrial en células expuestas a los compuestos del documento WO 2002/28345. Esto documenta un suministro del compuesto a las mitocondrias.

Los compuestos de la técnica anterior incluyen los del documento WO9747584, que describe una gama de succinatos de poliol.



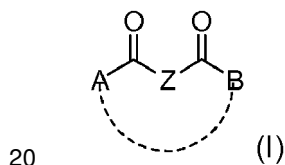
5 En el ejemplo facilitado en ese documento, Y es H o un grupo alquilo. Cada compuesto de succinato contiene múltiples restos succinato unidos por un grupo de estructura C(Y)-C(Q), y cada éster-ácido se une por tanto directamente a un resto que contiene al menos dos átomos de carbono en forma de un grupo etilo O-C-C. Cada compuesto dado a conocer contiene más de un resto succinato, y el resto succinato no está protegido mediante un resto del tipo O-C-X en el que X es un heteroátomo.

10 Se conocen en la técnica diversos compuestos de éster de succinato. Se muestra que el succinato de dietilo, succinato de monometilo y succinato de dimetilo son inactivos en los ensayos ejemplificados a continuación, y se encuentran fuera de alcance de la invención.

15 Además, el documento US 5.871.755 se refiere a derivados de deshidroalanina de succinamidas para su uso como agentes contra el estrés oxidativo y para fines cosméticos.

Descripción de la invención

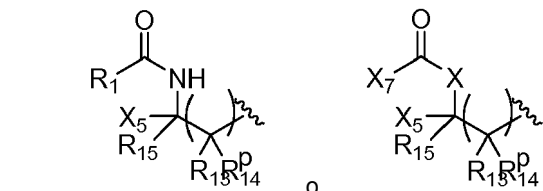
Un compuesto según la invención viene dado por la fórmula (I)



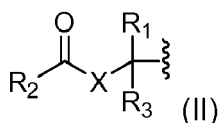
20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el enlace discontinuo entre A y B indica un enlace opcional para formar una estructura cerrada de anillo, y en el que

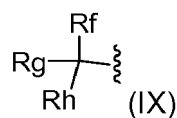
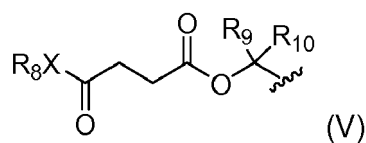
25 Z se selecciona de -CH₂-CH₂- o >CH(CH₃),

A se selecciona de -SR, -OR y NHR, y R es

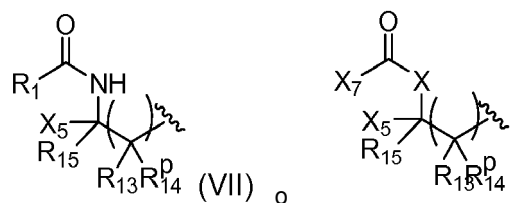


30 B se selecciona de -O-R', -NHR'', -SR''' u -OH; y R' se selecciona de las fórmulas (II) a (IX) a continuación:





5 R', R'' y R''' son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de las fórmulas (IV-VIII) a continuación:



10 R₁ y R₃ son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de H, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, O-acilo, O-alquilo, N-acilo, N-alquilo, X-acilo, CH₂X-alquilo, CH₂X-acilo, F, CH₂COOH, CH₂CO₂-alquilo,

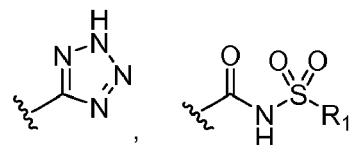
15 X se selecciona de O, NH, NR₆, S,

R₂ se selecciona de Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, C(O)CH₃, C(O)CH₂C(O)CH₃, C(O)CH₂CH(OH)CH₃,

20 p es un número entero y es 1 ó 2

R₆ se selecciona de H, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, acetilo, acilo, propionilo, benzoílo, o la fórmula (II), o la fórmula (VIII)

25 X₅ se selecciona de -H, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, -COOH, -C(=O)XR₆, CONR₁R₃ o es la fórmula



30 X₇ se selecciona de R₁, -NR₁R₃,

R₉ se selecciona de H, Me, Et u O₂CCH₂CH₂COXR₈

R₁₀ se selecciona de O-acilo, NH-alquilo, NH-acilo u O₂CCH₂CH₂COX₆R₈

35 X₆ se selecciona de O, NR₈, NR₆R₈, en los que R₆ y R₈ son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de H, alquilo, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, acetilo, acilo, propionilo, benzoílo, o la fórmula (II), o la fórmula (VIII),

40 R₁₁ y R₁₂ son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de H, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, acetilo, propionilo, benzoílo, -CH₂X-alquilo, -CH₂X-acilo, en los que X es O, NR₆ o S,

R_c y R_d son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de CH₂X-alquilo, CH₂X-acilo, en los que X = O, NR₆ o S,

R₁₃, R₁₄ y R₁₅ son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de H, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, -COOH, O-acilo, O-alquilo, N-acilo, N-alquilo, X-acilo, CH₂X-alquilo;

5 los sustituyentes en R₁₃ y R₁₄ o R₁₃ y R₁₅ pueden unirse en puente para formar un sistema cíclico para formar cicloalquilo, heterocicloalquilo, lactona o lactamas.

R_f, R_g y R_h son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de X-acilo, -CH₂X-alquilo, -CH₂X-acilo y R₉,

10

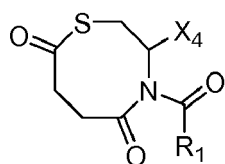
alquilo se selecciona de Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo,

acilo se selecciona de formilo, acetilo, propionilo, isopropionilo, butirilo, terc-butirilo, pentanoilo, benzoilo, succinilo.

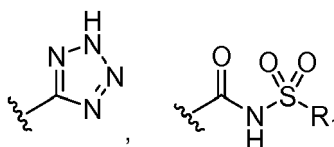
15

acilo y/o alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos, y

cuando está presente el enlace discontinuo entre A y B, el compuesto según la fórmula (I) es



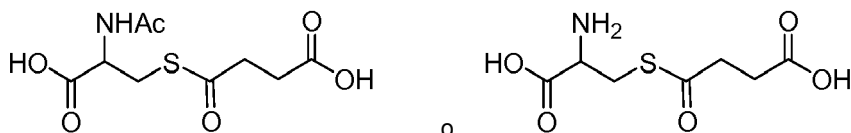
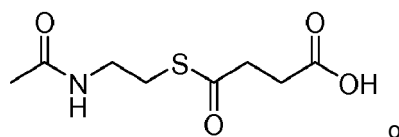
20



en la que X₄ se selecciona de -COOH, -C(=O)XR₆,

con la condición de que el compuesto no es

25



30

Los compuestos de fórmula (I) (y cualquier sal farmacéuticamente aceptable de los mismos) se denominan a continuación en el presente documento "compuesto de la invención", "compuestos de la invención" o "los compuestos de la invención".

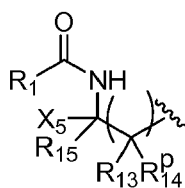
Compuestos de la invención de particular interés son aquellos compuestos en los que Z es -CH₂CH₂- y A es -SR.

35

Compuestos de la invención de particular interés son aquellos compuestos en los que Z es -CH₂CH₂-, A es SR y B es OH o B es SR".

Compuestos de la invención de particular interés son aquellos compuestos en los que Z es -CH₂CH₂-, A es SR, B es OH o B es SR", en los que R" es

40

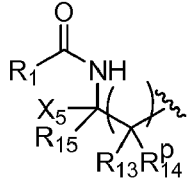


Compuestos de la invención de particular interés son aquellos compuestos en los que Z es -CH₂CH₂- y A es SR y B

es OH.

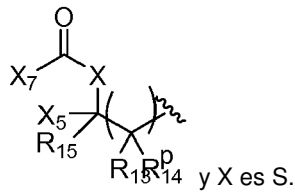
Compuestos de la invención de particular interés son aquellos compuestos en los que Z es -CH₂CH₂-, A es SR, B es OH o B es SR, en los que R es

5



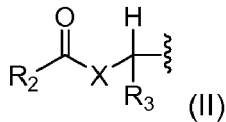
Compuestos de la invención de particular interés son aquellos compuestos en los que Z es -CH₂CH₂-, A es NR, B es OH y R es

10



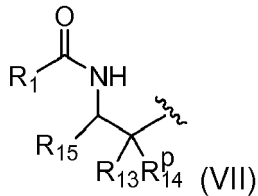
Preferiblemente, y con respecto a la fórmula (II), al menos uno de R₁ y R₃ es -H, de tal manera que la fórmula II es:

15

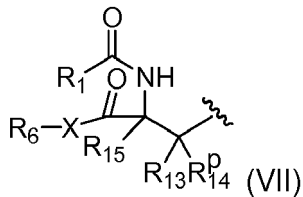


Preferiblemente, y con respecto a la fórmula (VII), p=1 y X₅ es -H de tal manera que la fórmula (VII) es

20

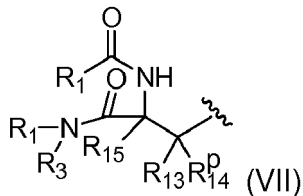


Preferiblemente, y con respecto a la fórmula (VII), p=1 y X₅ es COXR₆ de tal manera que la fórmula (VII) es



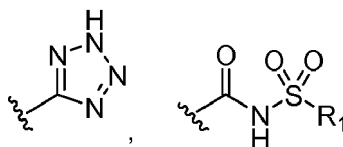
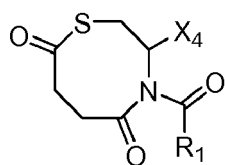
25

Preferiblemente, y con respecto a la fórmula (VII), p=1 y X₅ es CONR₁R₃ de tal manera que la fórmula (VII) es



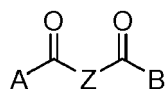
30

Un compuesto según la fórmula (I) puede ser



en el que X₄ se selecciona de -COOH, -C(=O)XR₆,

5 Particularmente, un compuesto según la invención viene dado por la fórmula (IA)

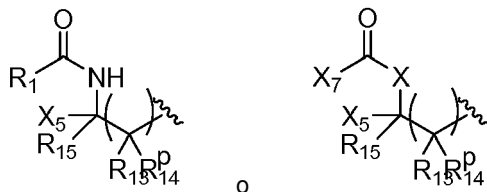


(IA)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

10 Z es -CH₂-CH₂-,

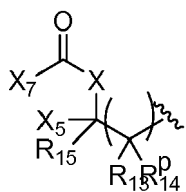
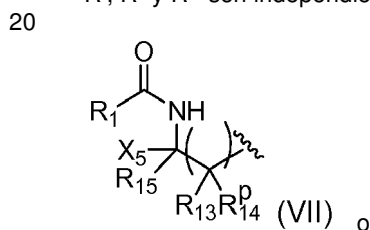
A se selecciona de -SR, -OR y NHR, y R es



15 o

B se selecciona de -O-R', -NHR'', -SR''' u -OH; y

R', R'' y R''' son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de una de las fórmulas a continuación:



R₁ y R₃ son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de H, Me, Et, propilo, O-Me, O-Et, O-propilo,

25 X se selecciona de O, NH, S,

p es un número entero y es 1,

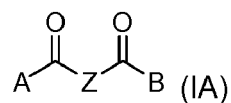
R₆ se selecciona de H, Me, Et,

30 X₅ se selecciona de -H, Me, Et, -COOH, -C(=O)XR₆, CONR₁R₃

X₇ se selecciona de R₁, -NR₁R₃,

35 R₁₃, R₁₄ y R₁₅ son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de H, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, -COOH, O-acilo, O-alquilo, N-acilo, N-alquilo, X-acilo, CH₂X-alquilo, en el que alquilo y acilo son tal como se definieron anteriormente en el presente documento.

Un compuesto de particular interés viene dado por la fórmula (IA)

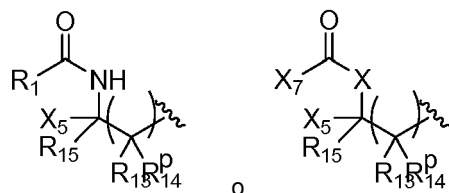


5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

Z es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$,

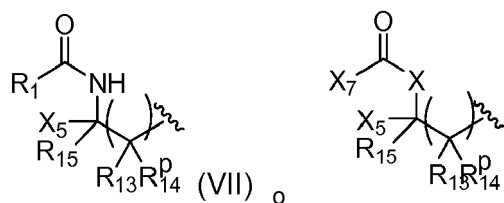
A se selecciona de $-\text{SR}$, $-\text{OR}$ y NHR , y R es

10



B se selecciona de $-\text{O}-\text{R}'$, $-\text{NHR}''$, $-\text{SR}'''$ u $-\text{OH}$; y

15 R' , R'' y R''' son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de una de las fórmulas a continuación:



20 R_1 y R_3 son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de H, Me, Et, propilo, O-Me, O-Et, O-propilo,

X se selecciona de O, NH, S,

p es un número entero y es 1,

25 R_6 se selecciona de H, Me, Et,

X_5 se selecciona de $-\text{H}$, Me, Et, $-\text{COOH}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}_6$, CONR_1R_3 ,

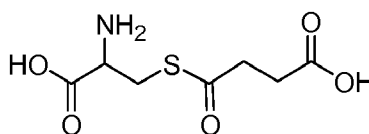
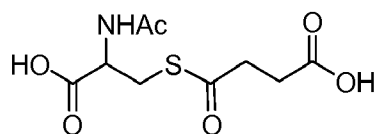
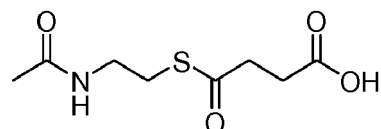
X_7 se selecciona de R_1 , $-\text{NR}_1\text{R}_3$,

30

R_{13} , R_{14} y R_{15} son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de H, Me, Et, $-\text{COOH}$.

El siguiente compuesto se conoce a partir de Moore et al. J. Biol. Chem., 1982, 257, págs. 10882-10892

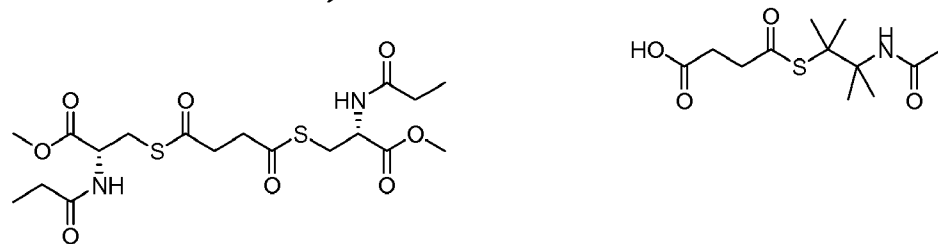
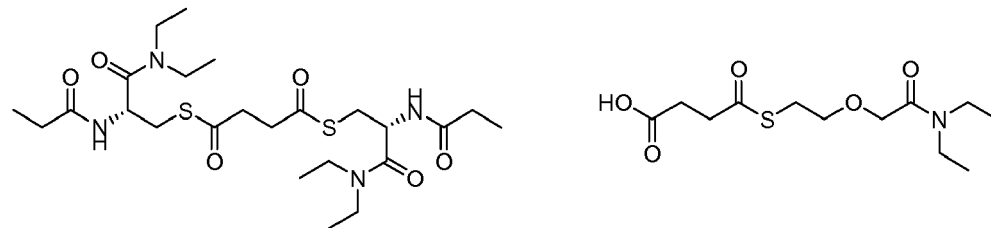
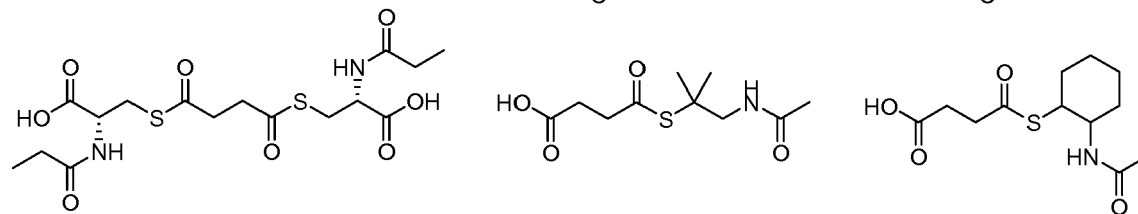
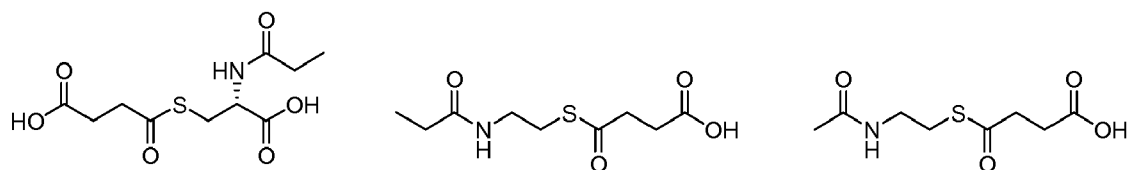
35



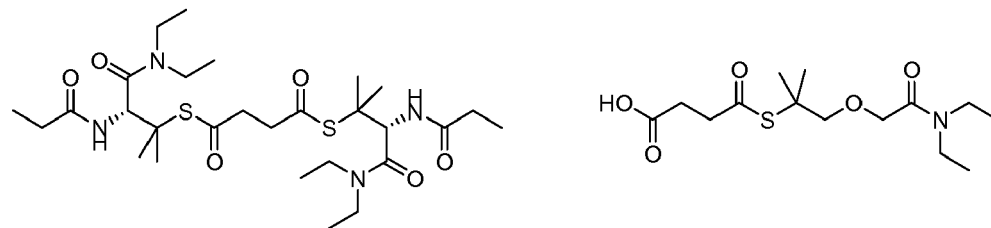
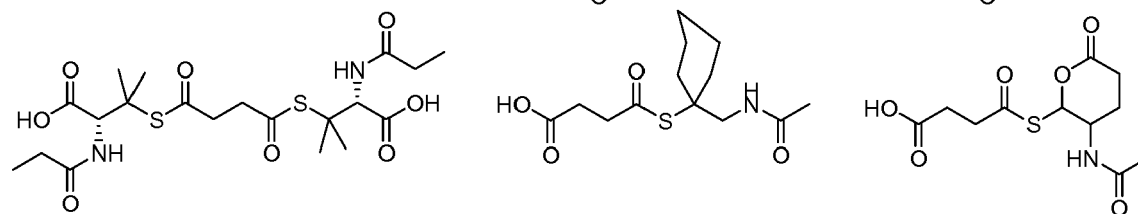
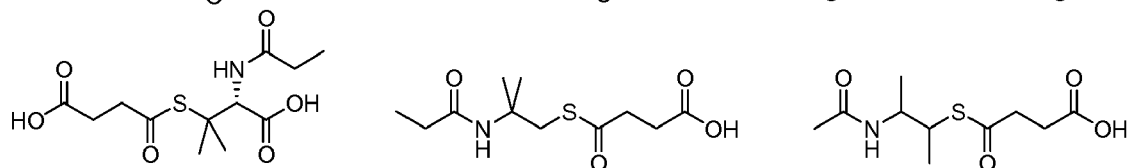
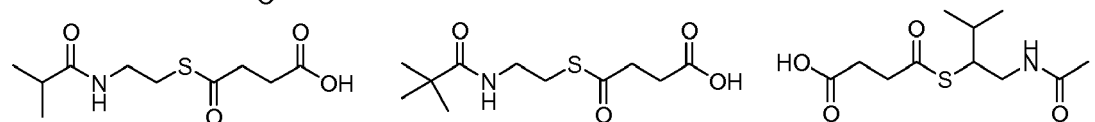
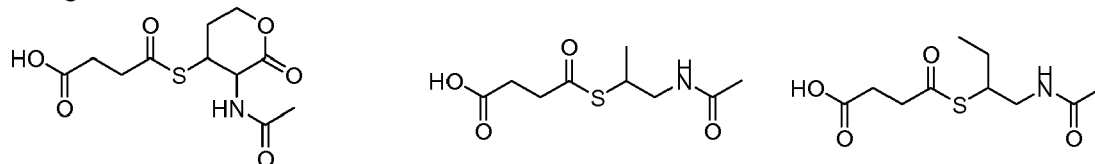
40

Sin embargo, la invención puede incluir o no estos compuestos para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con las mitocondrias tal como se comenta en el presente documento o para la fabricación de un medicamento para/en el tratamiento de enfermedades relacionadas con las mitocondrias tal como se comenta en el presente documento.

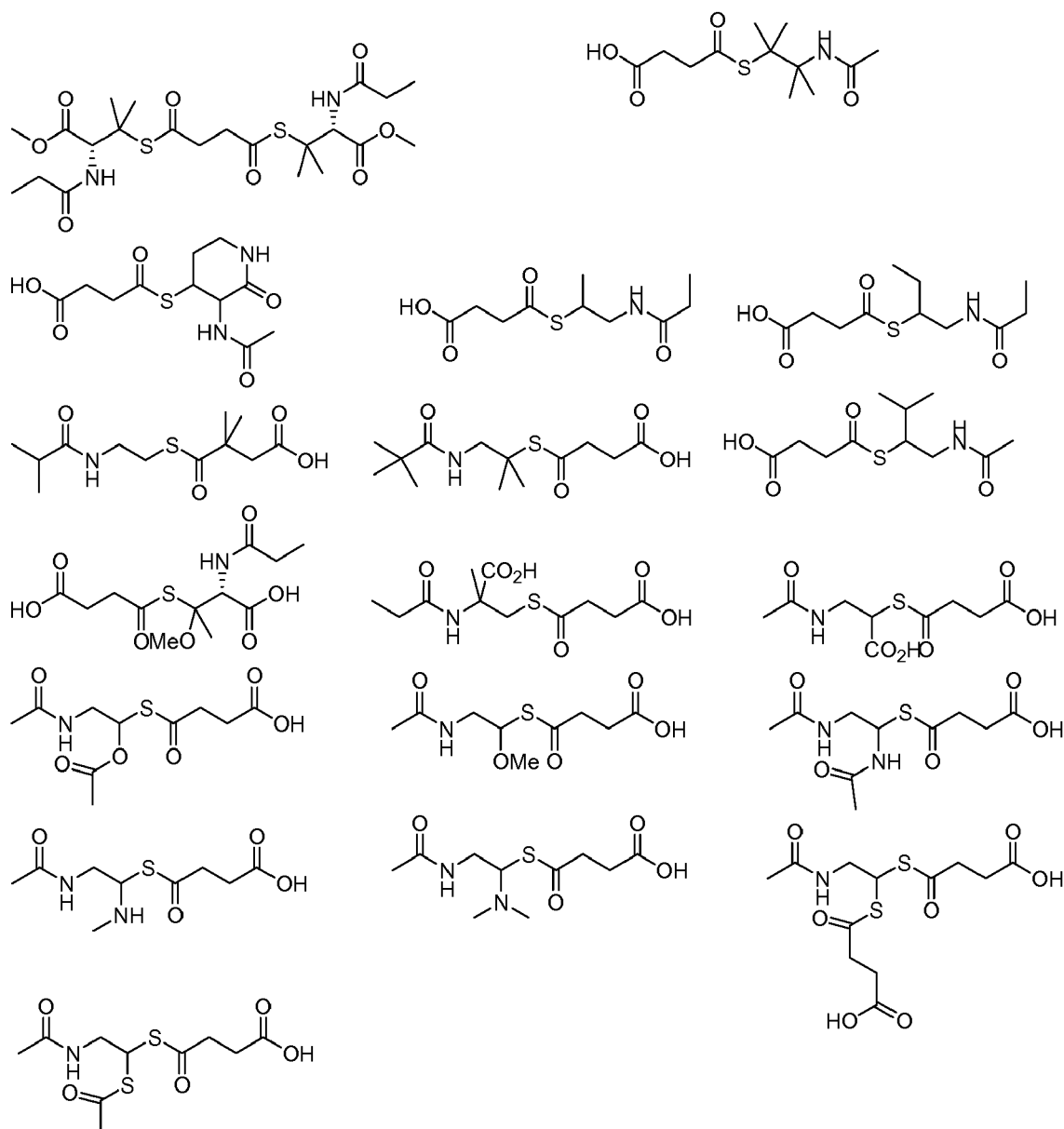
Compuestos específicos según la invención son:



5



10



5

Métodos de química generales

10 El experto reconocerá que los compuestos de la invención pueden prepararse, de manera conocida, en una variedad de modos. Las rutas a continuación son meramente ilustrativas de algunos métodos que pueden emplearse para la síntesis de compuestos de fórmula (I). Pueden producirse compuestos de la invención partiendo de ácido succínico, un ácido succínico monoprotegido, un ácido metilmalónico monoactivado, un ácido metilmalónico monoprotegido o un ácido metilmalónico monoactivado.

15 Los grupos protectores incluyen, pero no se limitan a, bencilo y terc-butilo. Se detallan otros grupos protectores para carbonilos y su eliminación en "Greene's Protective Groups in Organic Synthesis" (Wuts and Greene, Wiley, 2006). Los grupos protectores pueden eliminarse mediante métodos que conoce un experto en la técnica incluyendo hidrogenación en presencia de un catalizador heterogéneo para ésteres bencilicos y tratamiento con ácidos orgánicos o minerales, preferiblemente ácido trifluoroacético o HCl diluido, para ésteres terc-butílicos.

20 Los grupos activantes incluyen, pero no se limitan a cloruros de acilo y anhídridos mixtos.

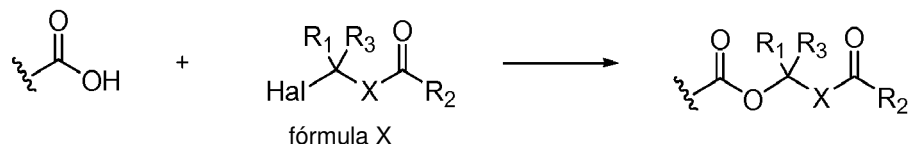
25 Por tanto, cuando los compuestos de fórmula (I) son simétricos, entonces se selecciona un material de partida simétrico. Se selecciona o bien un ácido dicarboxílico simétrico o bien un ácido carboxílico diactivado. Preferiblemente, el compuesto seleccionado es ácido succínico o cloruro de succinilo.

Cuando el compuesto de fórmula (I) es asimétrico, entonces el material de partida seleccionado es asimétrico. Eso

incluye "ácido protegido con ácido", "ácido activado con ácido", y "ácido activado con ácido protegido". Preferiblemente, esto incluye éster monobencílico del ácido succínico, éster mono-terc-butílico del ácido succínico, ácido 4-cloro-4-oxobutírico.

5 Alternativamente para un compuesto de fórmula (I) asimétrico, se selecciona un material de partida simétrico, preferiblemente ácido succínico, y se emplea menos material de partida de derivatización. Los siguientes métodos generales no son exhaustivos y resultará evidente para un experto en la técnica que pueden usarse otros métodos para generar compuestos de la invención. Los métodos pueden usarse conjuntamente o por separado.

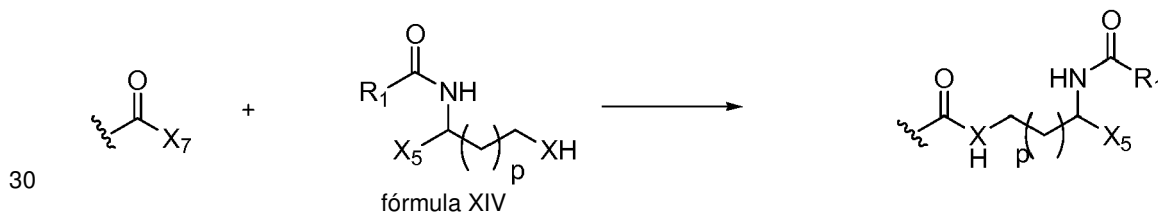
10 Pueden producirse compuestos de fórmula (I) que contienen la fórmula (II) haciendo reaccionar un ácido carboxílico con un haluro de alquilo adecuado (fórmula (X)). Por ejemplo



15 en la que Hal representa un halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br o I) y R₁, R₂ y R₃ son tal como se definen en la fórmula (II). La reacción puede llevarse a cabo convenientemente en un disolvente tal como diclorometano, acetona, acetonitrilo o N,N-dimetilformamida con una base adecuada tal como trietilamina, diisopropilamina o carbonato de cesio a una temperatura, por ejemplo, en el intervalo de desde -10°C hasta 80°C, particularmente a temperatura ambiente. La reacción puede realizarse con aditivos opcionales tales como yoduro de sodio o haluros de tetraalquilamonio (por ejemplo, yoduro de tetrabutilamonio).

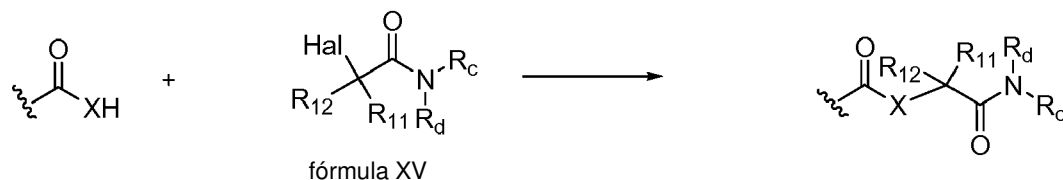
25 Los compuestos de fórmula X o bien están disponibles comercialmente o bien pueden prepararse convenientemente mediante métodos de la bibliografía tales como los expuestos en Journal of the American Chemical Society, 43, 660-7; 1921 o Journal of medicinal chemistry (1992), 35(4), 687-94.

Pueden producirse compuestos de fórmula (I) que contienen la fórmula (VII) haciendo reaccionar un ácido carboxílico activado con un compuesto de fórmula XIV, opcionalmente en presencia de una especie activante.



35 en la que X₅ y R₁ son tal como se definen en la fórmula (VII) y X₇ es Hal (Cl, F, Br) o anhídrido mixto. Preferiblemente X₇ = Cl. La reacción puede llevarse a cabo convenientemente en un disolvente tal como diclorometano, acetona, THF, acetonitrilo o N,N-dimetilformamida, con una base adecuada tal como trietilamina, diisopropilamina o carbonato de cesio a una temperatura, por ejemplo, en el intervalo de desde -10°C hasta 80°C, particularmente a temperatura ambiente.

40 Pueden producirse compuestos de fórmula (I) que contienen la fórmula (VIII) haciendo reaccionar un ácido carboxílico activado con un compuesto de fórmula XIV, opcionalmente en presencia de una especie activante



45 en la que Hal representa un halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br o I) y R₁₁, R₁₂ y R_c y R_d son tal como se definen en la fórmula (VIII). La reacción puede llevarse a cabo convenientemente en un disolvente tal como diclorometano, acetona, acetonitrilo o N,N-dimetilformamida con una base adecuada tal como trietilamina, diisopropilamina o carbonato de cesio a una temperatura, por ejemplo, en el intervalo de desde -10°C hasta 80°C, particularmente a 80°C. La reacción puede realizarse con aditivos opcionales tales como yoduro de sodio o haluros de tetraalquilamonio (por ejemplo, yoduro de tetrabutilamonio).

Los compuestos de fórmula X o bien están disponibles comercialmente o bien pueden prepararse convenientemente mediante métodos de la bibliografía mediante los cuales se hace reaccionar una amina con un cloruro de acilo.

Pueden producirse compuestos de fórmula (I) que contienen la fórmula (IX) combinando los métodos descritos anteriormente y mediante otros métodos que conoce un experto en la técnica.

5 *Uso general de los compuestos de la invención*

Pueden usarse los compuestos descritos en el presente documento en medicina o en cosméticos, o en la fabricación de una composición para tal uso. El medicamento puede usarse en cualquier situación en la que se desee una producción de energía (ATP) potenciada o restaurada, tal como en el tratamiento de enfermedades metabólicas, o en el tratamiento de enfermedades o estados de disfunción mitocondrial, el tratamiento o la supresión de trastornos mitocondriales. Los compuestos pueden usarse en la estimulación de la producción de energía mitocondrial y en la restauración de una disfunción mitocondrial inducida por fármacos tal como, por ejemplo, pérdida auditiva neurosensitiva o acúfenos (efecto secundario de determinados antibióticos debido a toxicidad mitocondrial) o acidosis láctica. Los compuestos pueden usarse en el tratamiento de cáncer, diabetes, inanición aguda, endotoxemia, septicemia, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, síndrome de disfunción multiorgánica y tras hipoxia, isquemia, ictus, infarto de miocardio, angina aguda, una lesión renal aguda, oclusión coronaria y fibrilación auricular, o para evitar o contrarrestar lesiones por reperfusión. Además, se prevé que los compuestos de la invención puedan ser beneficiosos en el tratamiento de la esterilidad masculina.

20 Se prevé que los compuestos de la invención proporcionarán precursores con permeabilidad celular de componentes del ciclo de Krebs y opcionalmente las rutas de glicólisis. Se prevé que tras la entrada en la célula, una hidrólisis enzimática o química liberará succinato o malonato de metilo opcionalmente junto con otros materiales de provisión de energía, tales como acetato y glucosa.

25 Los compuestos de la invención pueden usarse para potenciar o restaurar la producción de energía en las mitocondrias. Particularmente los compuestos pueden usarse en medicina o en cosméticos. Los compuestos pueden usarse en la prevención o el tratamiento de trastornos o enfermedades que tienen una componente relacionada con disfunción mitocondrial y/o para una componente de la deficiencia de energía (ATP).

30 La potenciación de la producción de energía es relevante, por ejemplo, en sujetos que padecen un defecto, trastorno o una enfermedad mitocondrial. Las enfermedades mitocondriales resultan de la disfunción de las mitocondrias, que son compartimentos especializados presentes en todas las células del cuerpo excepto los glóbulos rojos. Cuando disminuye la función mitocondrial, se reduce la energía generada dentro de la célula y seguirá una lesión celular o muerte celular. Si se repite este proceso en todo el cuerpo, se pone en grave riesgo la vida del sujeto.

35 Las enfermedades de las mitocondrias aparecen con la mayor frecuencia en órganos que requieren mucha energía tales como la retina, la cóclea, el cerebro, corazón, hígado, los músculos esqueléticos, el riñón y los sistemas endocrino y respiratorio.

40 Los síntomas de una enfermedad mitocondrial pueden incluir pérdida de control motor, debilidad y dolor muscular, convulsiones, problemas visuales/auditivos, enfermedades cardíacas, enfermedades hepáticas, trastornos gastrointestinales, dificultades para tragar y más.

45 Una enfermedad mitocondrial puede ser hereditaria o puede deberse a mutaciones espontáneas, que conducen a una alteración de las funciones de las proteínas o moléculas de ARN que residen normalmente en las mitocondrias.

50 Se ha encontrado que muchas enfermedades implican una deficiencia mitocondrial tal como una deficiencia de complejo I, II, III o IV o una deficiencia enzimática como, por ejemplo, deficiencia de piruvato deshidrogenasa. Sin embargo, el panorama es complejo y pueden estar implicados muchos factores en las enfermedades.

55 Hasta ahora no se dispone de tratamientos curativos. Los únicos tratamientos disponibles son tales que pueden aliviar los síntomas y retrasar la progresión de la enfermedad. Por consiguiente, los hallazgos de los presentes inventores y descritos en el presente documento son muy importantes ya que demuestran el efecto beneficioso de los compuestos de ácido succínico con permeabilidad celular sobre la producción de energía en las mitocondrias.

60 Además, en comparación con profármacos de succinato conocidos (tales como, por ejemplo, los mencionados en el documento WO 97/47584), muestran propiedades mejoradas para el tratamiento de estas enfermedades y relacionadas, incluyendo mejor permeabilidad celular, semivida plasmática más prolongada, toxicidad reducida, liberación aumentada de energía a las mitocondrias y formulación mejorada (debido a propiedades mejoradas incluyendo solubilidad aumentada). En algunos casos, los compuestos también están biodisponibles por vía oral, lo que permite una administración más fácil.

Por tanto, las propiedades ventajosas del compuesto de la invención pueden incluir una o más de las siguientes:

65 - Permeabilidad celular aumentada

- Semivida más prolongada en plasma

- Toxicidad reducida

5 - Liberación aumentada de energía a las mitocondrias

- Formulación mejorada

- Solubilidad aumentada

10

- Biodisponibilidad oral aumentada

La presente invención proporciona el compuesto de la invención para su uso como producto farmacéutico, en particular en el tratamiento de deficiencia de energía celular (ATP).

15

Un compuesto de la invención puede usarse en el tratamiento de alteración del complejo I, o bien disfunción del propio complejo o bien cualquier estado o enfermedad que limita el suministro de NADH al complejo I, por ejemplo disfunción del ciclo de Krebs, glicólisis, beta-oxidación, metabolismo de piruvato e incluso el transporte de glucosa u otros sustratos relacionados con el complejo I).

20

Los compuestos de la presente invención pueden usarse en el tratamiento de trastornos relacionados con el complejo mitocondrial I tales como pero sin limitarse a, síndrome de Leigh, neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL), MELAS (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares a ictus) y MERRF (epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas), que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz del compuesto de la invención.

25

La presente invención también proporciona el uso del compuesto de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de acidosis láctica inducida por fármacos.

30

Un compuesto de la invención también puede ser útil en cualquier estado en el que la producción extra de energía sería potencialmente beneficiosa tal como, pero sin limitarse a, cirugía y cuidados intensivos prolongados.

Mitocondrias

35

Las mitocondrias son orgánulos de las células eucariotas, denominadas popularmente la "fuente de energía" de la célula. Una de sus funciones primarias es la fosforilación oxidativa. La molécula adenosina trifosfato (ATP) funciona como "moneda" de energía o portador de energía en la célula, y las células eucariotas derivan la mayoría de su ATP de procesos bioquímicos llevados a cabo por las mitocondrias. Estos procesos bioquímicos incluyen el ciclo del ácido cítrico (el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, o ciclo de Krebs), que genera dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH) a partir de dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado (NAD⁺) y dinucleótido de flavina y adenina reducido (FADH₂) a partir de dinucleótido de flavina y adenina oxidado (FAD), así como la fosforilación oxidativa, durante la cual se oxidan NADH y FADH₂ de vuelta a NAD⁺ y FAD.

40

45

Los electrones liberados por la oxidación de NADH se trasladan por una serie de complejos de proteína (complejo I, complejo II, complejo III y complejo IV) conocidos como la cadena respiratoria. La oxidación de succinato se produce en el complejo II (complejo succinato deshidrogenasa) y FAD es un grupo prostético en el complejo enzimático succinato deshidrogenasa (complejo II). Los complejos respiratorios están incluidos en la membrana interna de la mitocondria. El complejo IV, al final de la cadena, transfiere los electrones a oxígeno, que se reduce para dar agua. La energía liberada a medida que estos electrones atraviesan los complejos se usa para generar un gradiente protónico a través de la membrana interna de la mitocondria, que crea un potencial electroquímico a través de la membrana interna. Otro complejo de proteína, el complejo V (que no está asociado directamente con los complejos I, II, III y IV) usa la energía almacenada por el gradiente electroquímico para convertir ADP en ATP.

50

55

El ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa están precedidos por glicólisis, en la que se descompone una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato, con la generación neta de dos moléculas de ATP por molécula de glucosa. Las moléculas de piruvato entran entonces en las mitocondrias, en las que se oxidan completamente a CO₂ y H₂O mediante fosforilación oxidativa (el proceso global se conoce como respiración aerobia). La oxidación completa de las dos moléculas de piruvato para dar dióxido de carbono y agua produce aproximadamente al menos 28-29 moléculas de ATP, además de las 2 moléculas de ATP generadas por la transformación de glucosa en dos moléculas de piruvato. Si no está disponible oxígeno, la molécula de piruvato no entra en las mitocondrias, sino que se convierte en su lugar en lactato, en el proceso de respiración anaerobia.

60

65

Por tanto, el rendimiento neto global por molécula de glucosa es aproximadamente de al menos 30-31 moléculas de ATP. Se usa ATP para alimentar, directa o indirectamente, casi cualquier otra reacción bioquímica en la célula. Por tanto, las al menos 28 ó 29 moléculas de ATP extra (aproximadamente) con las que contribuye la fosforilación oxidativa durante la respiración aerobia son críticas para el funcionamiento apropiado de la célula. La falta de

oxígeno impide la respiración aerobia y dará como resultado la muerte en última instancia de casi todos los organismos aerobios; algunos organismos, tales como las levaduras, pueden sobrevivir usando respiración aerobia o anaerobia.

5 Cuando las células en un organismo se privan temporalmente de oxígeno, se utiliza la respiración anaerobia hasta que vuelve a estar disponible oxígeno o la célula muere. El piruvato generado durante la glicólisis se convierte en lactato durante la respiración anaerobia. Se cree que la acumulación de ácido láctico es responsable de la fatiga muscular después de intensos periodos de actividad, cuando no puede suministrarse oxígeno a las células musculares. Cuando vuelve a estar disponible oxígeno de nuevo, el lactato se convierte de vuelta en piruvato para su uso en la fosforilación oxidativa.

15 La disfunción mitocondrial contribuye a varios estados patológicos. Algunas enfermedades mitocondriales se deben a mutaciones o deleciones en el genoma mitocondrial o nuclear. Si una proporción umbral de las mitocondrias en la célula son defectuosas, y si una proporción umbral de tales células dentro de un tejido tienen mitocondrias defectuosas, pueden resultar síntomas de disfunción tisular u orgánica. Prácticamente cualquier tejido puede verse afectado, y una gran variedad de síntomas pueden estar presentes, dependiendo del grado en que estén implicados los diferentes tejidos.

20 *Uso de los compuestos de la invención*

Los compuestos de la invención pueden usarse en cualquier situación en la que se desee una producción de energía (ATP) potenciada o restaurada. Ejemplos son, por ejemplo, en todos los estados clínicos en los que existe un beneficio potencial de la producción aumentada de ATP mitocondrial o una restauración de la función mitocondrial, tal como en la restauración de una disfunción mitocondrial o acidosis láctica inducida por fármacos y el tratamiento de cáncer, diabetes, inanición aguda, endotoxemia, septicemia, agudeza auditiva/visual reducida, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y síndrome de disfunción multiorgánica. Los compuestos también pueden ser útiles tras hipoxia, isquemia, ictus, infarto de miocardio, angina aguda, una lesión renal aguda, oclusión coronaria, fibrilación auricular y en la prevención o la limitación de lesiones por reperusión.

30 En particular, los compuestos de la invención pueden usarse en medicina, particularmente en el tratamiento o la prevención de un estado, una enfermedad o un trastorno relacionado con las mitocondrias o en cosméticos.

35 La disfunción de las mitocondrias también se describe en relación con acidosis tubular renal; enfermedades de neuronas motoras; otras enfermedades neurológicas; epilepsia; enfermedades genéticas; enfermedad de Huntington; trastornos del estado de ánimo; esquizofrenia; trastorno bipolar; enfermedades asociadas con la edad; accidentes cerebrovasculares, degeneración macular; diabetes; y cáncer.

Compuestos de la invención para su uso en enfermedades o trastornos relacionados con las mitocondrias

40 Los compuestos según la invención pueden usarse en la prevención o el tratamiento de una enfermedad relacionada con las mitocondrias seleccionada de las siguientes:

- Enfermedad de Alpers (poliodistrofia infantil progresiva)
- 45 • Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)
- Autismo
- Síndrome de Barth (miocardiopatía infantil mortal)
- 50 • Defectos de la beta-oxidación
- Deficiencia del metabolismo bioenergético
- 55 • Deficiencia de carnitina-acil-carnitina
- Deficiencia de carnitina
- 60 • Síndromes de deficiencia de creatina (síndromes de deficiencia de creatina cerebral (SDCC) incluyen: deficiencia de guanidinoacetato metiltransferasa (deficiencia de GAMT), deficiencia de L-arginina:glicina amidinotransferasa (deficiencia de AGAT) y deficiencia de transportador de creatina relacionado con SLC6A8 (deficiencia de SLC6A8).
- Deficiencia de coenzima Q10
- 65 • Deficiencia de complejo I (deficiencia de NADH deshidrogenasa (NADH-CoQ reductasa))

- Deficiencia de complejo II (deficiencia de succinato deshidrogenasa)
- Deficiencia de complejo III (deficiencia de ubiquinona-citocromo c oxidorreductasa)
- 5 • Deficiencia de complejo IV / deficiencia de COX (la deficiencia de citocromo c oxidasa está provocada por un defecto en el complejo IV de la cadena respiratoria)
- Deficiencia de complejo V (deficiencia de ATP sintasa)
- 10 • Deficiencia de COX
- OEPC (síndrome de oftalmoplejia externa progresiva crónica)
- Deficiencia de CPT I
- 15 • Deficiencia de CPT II
- Ataxia de Friedreich (AFRD o AF)
- 20 • Aciduria glutárica tipo II
- SKS (síndrome de Kearns-Sayre)
- Acidosis láctica
- 25 • ADCL (deficiencia de acil-CoA de cadena larga deshidrogenasa)
- HADCL
- 30 • Enfermedad o síndrome de Leigh (encefalomielopatía necrotizante subaguda)
- NOHL (neuropatía óptica hereditaria de Leber)
- Enfermedad de Luft
- 35 • ADCM (deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media)
- MELAS (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares a un ictus)
- 40 • MERRF (epilepsia mioclónica y enfermedad asociada a fibras rojas rasgadas)
- MIRAS (Síndrome de ataxia mitocondrial recesiva)
- Citopatía mitocondrial
- 45 • Reducción de ADN mitocondrial
- Encefalopatía mitocondrial incluye: encefalomiopatía, encefalomielopatía
- 50 • Miopatía mitocondrial
- EMNGI (trastorno y encefalopatía mioneurogastrointestinal)
- NARP (neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa)
- 55 • Trastornos neurodegenerativos asociados con enfermedad de Parkinson, de Alzheimer o de Huntington
- Síndrome de Pearson
- 60 • Deficiencia de piruvato carboxilasa
- Deficiencia de piruvato deshidrogenasa
- Mutaciones POLG
- 65 • Deficiencias de la cadena respiratoria

- ADCC (deficiencia de acil-CoA de cadena corta deshidrogenasa)
- 5 • HADCC (deficiencia de L-3-hidroxiacil-CoA de cadena corta deshidrogenasa (HADCC), también denominada deficiencia de 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa HADH)
- ADCML (deficiencia de acil-CoA de cadena muy larga deshidrogenasa)
- 10 • Diabetes
- Inanición aguda
- Endotoxemia
- 15 • Septicemia
- Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS)
- 20 • Fallo multiorgánico

Con referencia a la información de la página web de la Fundación Americana de Enfermedades Mitocondriales (www.umdf.org), algunas de las enfermedades mencionadas anteriormente se comentan con mayor detalle en lo que sigue:

25 *Deficiencia de complejo I:* En el interior de la mitocondria hay un grupo de proteínas que portan electrones a lo largo de cuatro reacciones en cadena (complejos I-IV), que dan como resultado la producción de energía. Esta cadena se conoce como la cadena de transporte de electrones. Un quinto grupo (complejo V) genera el ATP. En conjunto, la cadena de transporte de electrones y la ATP sintasa forman la cadena respiratoria y todo el proceso se conoce como fosforilación oxidativa o FOSOX.

30 El complejo I, la primera etapa en esta cadena, es el sitio más habitual para anomalías mitocondriales, representando hasta un tercio de las deficiencias de la cadena respiratoria. Presentándose a menudo al nacer o en la primera infancia, la deficiencia de complejo I es habitualmente un trastorno neurodegenerativo progresivo y es responsable de una variedad de síntomas clínicos, particularmente en órganos y tejidos que requieren altos niveles de energía, tales como cerebro, corazón, hígado y músculos esqueléticos. Varios trastornos mitocondriales específicos se han asociado con deficiencia de complejo I incluyendo: neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL), MELAS, MERRF y síndrome de Leigh (SL). MELAS significa (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares a ictus) y MERRF significa epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas.

40 NOHL se caracteriza por ceguera que aparece en promedio entre los 27 y los 34 años de edad; puede desarrollarse ceguera en ambos ojos simultáneamente, o de manera secuencial (un ojo desarrollará ceguera, seguido por el otro ojo dos meses después en promedio). También pueden aparecer otros síntomas, tales como anomalías cardíacas y complicaciones neurológicas.

45 Existen tres formas principales de deficiencia de complejo I:

- i) Trastorno multisistémico infantil letal, caracterizado por hipotonía, retraso en el desarrollo, cardiopatía, acidosis láctica e insuficiencia respiratoria.
- 50 ii) Miopatía (enfermedad muscular), que comienza en la lactancia o en la edad adulta, y caracterizada por debilidad o intolerancia al ejercicio.
- iii) Encefalomiopatía mitocondrial (enfermedad cerebral y muscular), que comienza en la lactancia o en la edad adulta y que implica combinaciones de síntomas variables que pueden incluir: parálisis oculomotoras, retinopatía pigmentaria (cambios del color de la retina con pérdida de visión), pérdida de audición, neuropatía sensitiva (daño neurológico que implica los órganos de los sentidos), convulsiones, demencia, ataxia (coordinación muscular anómala) y movimientos involuntarios. Esta forma de deficiencia de complejo I puede provocar síndrome de Leigh y MELAS.
- 55

60 La mayoría de los casos de deficiencia de complejo I resultan de la herencia autosómica recesiva (combinación de genes nucleares defectuosos tanto de la madre como del padre). Con menor frecuencia, el trastorno es heredado de la madre o es esporádico y el defecto genético está en el ADN mitocondrial.

65 Tratamiento: como con todas las enfermedades mitocondriales, actualmente no existe cura para la deficiencia de complejo I. Una variedad de tratamientos, que pueden ser eficaces o no, pueden incluir terapias metabólicas tales como: riboflavina, tiamina, biotina, coenzima Q10, carnitina y dieta cetógena. Las terapias para la forma

multisistémica infantil han resultado insatisfactorias.

La evolución clínica y el pronóstico para los pacientes con deficiencia de complejo I son altamente variables y pueden depender del defecto genético, la edad de aparición, los órganos afectados y otros factores específicos.

Deficiencia de complejo III: Los síntomas incluyen cuatro formas principales:

- i) Encefalomiopatía infantil letal, acidosis láctica congénita, hipotonía, postura distrófica, convulsiones y coma. Las fibras rojas rasgadas en tejido muscular son habituales.
- ii) Encefalomiopatías de aparición tardía (de la infancia a la edad adulta): diversas combinaciones de debilidad, talla baja, ataxia, demencia, pérdida de audición, neuropatía sensitiva, retinopatía pigmentaria y signos piramidales. Las fibras rojas rasgadas son habituales. Posible acidosis láctica.
- iii) Miopatía, con intolerancia al ejercicio que evoluciona a debilidad fija. Son habituales las fibras rojas rasgadas. Posible acidosis láctica.
- iv) Miocardiopatía histiocitoide infantil.

Deficiencia de complejo IV / deficiencia de COX: Los síntomas incluyen dos formas principales:

1. Encefalomiopatía: Habitualmente normal durante los primeros 6 a 12 meses de vida y luego muestra retraso en el desarrollo, ataxia, acidosis láctica, atrofia óptica, oftalmoplejia, nistagmo, distonía, signos piramidales y problemas respiratorios. Frecuentes convulsiones. Puede provocar síndrome de Leigh.

2. Miopatía: Dos variantes principales:

1. Miopatía infantil letal: puede comenzar junto después del nacimiento y está acompañada de hipotonía, debilidad, acidosis láctica, fibras rojas rasgadas, insuficiencia respiratoria y problemas renales.
2. Miopatía infantil benigna: puede comenzar junto después del nacimiento y está acompañada de hipotonía, debilidad, acidosis láctica, fibras rojas rasgadas, problemas respiratorios, pero (si el bebé sobrevive) va seguido por una mejoría espontánea.

SKS (síndrome de Kearns-Sayre): SKS es una enfermedad mitocondrial multisistémica de lenta progresión que a menudo comienza con caída de párpados (ptosis). Otros músculos oculares pueden verse implicados eventualmente, lo que da como resultado la parálisis del movimiento ocular. La degeneración de la retina provoca habitualmente dificultad para ver en entornos con iluminación tenue.

SKS se caracteriza por tres características principales:

- aparición típica antes de los 20 años de edad aunque puede producirse en la lactancia o la edad adulta
- parálisis de músculos oculares específicos (denominada oftalmoplejia externa progresiva crónica, OEPC)
- degeneración de la retina que provoca una acumulación anómala de material pigmentado (coloreado) (retinopatía pigmentaria).

Además, está presente uno o más de los siguientes estados:

- bloqueo de señales eléctricas del corazón (defectos de conducción cardíaca)
- proteína de líquido cefalorraquídeo elevada
- descoordinación de movimientos (ataxia).

Los pacientes con SKS también pueden tener problemas tales como sordera, demencia, disfunción renal y debilidad muscular. También pueden resultar evidentes anomalías endocrinas incluyendo retraso en el crecimiento, talla baja o diabetes. SKS es un trastorno raro. Está provocado habitualmente por una única delección (pérdida) grande de material genético dentro del ADN de las mitocondrias (ADNmt), en vez de en el ADN del núcleo celular. Estas delecciones, de las que hay más de 150 especies, normalmente surgen espontáneamente. Con menor frecuencia, la mutación la transmite la madre.

Como con todas las enfermedades mitocondriales, no hay cura para SKS.

Los tratamientos se basan en los tipos de síntomas y órganos implicados, y pueden incluir: coenzima Q10, insulina

para diabetes, fármacos cardiacos y un marcapasos que pueden salvar la vida. Puede considerarse una intervención quirúrgica para la caída de párpados pero debe realizarla un especialista en centros de cirugía quirúrgica.

5 SKS es de lenta progresión y el pronóstico varía dependiendo de la gravedad. Es habitual que se produzca el fallecimiento del paciente en la tercera o cuarta década de vida y puede deberse a fallos multiorgánicos.

Enfermedad o síndrome de Leigh (encefalomiopatía necrotizante subaguda): síntomas: convulsiones, hipotonía, fatiga, nistagmo, escasos reflejos, dificultades para comer y tragar, problemas para respirar, escasa función motora, ataxia.

10 Causas: deficiencia de piruvato deshidrogenasa, deficiencia de complejo I, deficiencia de complejo II, deficiencia de complejo IV / COX, NARP.

15 La enfermedad de Leigh es un trastorno neurometabólico progresivo con aparición general en la lactancia o infancia, a menudo después de una infección vírica, pero también puede producirse en adolescentes y adultos. Se caracteriza en IRM por lesiones necrotizantes (tejido muerto o moribundo) visibles en el cerebro, particularmente en el mesencéfalo y el tallo encefálico.

20 El niño a menudo parece normal al nacer pero normalmente comienza a presentar síntomas en el plazo de unos pocos meses a los dos años de edad, aunque el momento puede ser muy anterior o posterior. Los síntomas iniciales pueden incluir la pérdida de habilidades básicas tales como mamar, control de la cabeza, caminar y hablar. Estos pueden estar acompañados de otros problemas tales como irritabilidad, pérdida de apetito, vómitos y convulsiones. Puede haber periodos de brusco deterioro o restauración temporal de algunas funciones. Eventualmente, el niño también puede tener complicaciones cardiacas, renales, de visión y respiratorias.

25 Existe más de un defecto que provoca la enfermedad de Leigh. Estos incluyen una deficiencia de piruvato deshidrogenasa (PDHC), y defectos enzimáticos de la cadena respiratoria, los complejos I, II, IV y V. Dependiendo del defecto, el modo de herencia puede ser dominante ligada al cromosoma X (defecto en el cromosoma X y habitualmente se produce enfermedad solamente en hombres), autosómica recesiva (heredada de genes tanto de la madre como del padre) y materna (solamente de la madre). También puede haber casos espontáneos que no se heredan en absoluto.

30 No existe cura para la enfermedad de Leigh. Los tratamientos implican generalmente variaciones de terapias con vitaminas y complementos, a menudo en una combinación en "cóctel", y solo son parcialmente eficaces. Diversos sitios de recursos incluyen el posible uso de: tiamina, coenzima Q10, riboflavina, biotina, creatina, succinato e idebenona. También están probándose fármacos experimentales, tales como dicloroacetato (DCA) en algunas clínicas. En algunos casos, puede prescribirse una dieta especial y debe monitorizarla un dietista con conocimientos en trastornos metabólicos.

40 El pronóstico para la enfermedad de Leigh es malo. Dependiendo del defecto, los individuos viven normalmente una edad comprendida entre unos pocos años y la mitad de la adolescencia. Los pacientes a los que se les diagnostica el síndrome similar a Leigh o que no presentan síntomas hasta la edad adulta tienden a vivir más tiempo.

45 *MELAS* (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares a ictus): síntomas: Talla baja, convulsiones, episodios similares a ictus con déficits neurológicos enfocados, cefaleas recurrentes, regresión cognitiva, progresión de la enfermedad, fibras rojas rasgadas.

Causa: mutaciones puntuales de ADN mitocondrial: A3243G (más habitual)

50 MELAS, miopatía mitocondrial (debilidad muscular), encefalopatía (enfermedad cerebral y del sistema nervioso central), acidosis láctica (acumulación de un producto de la respiración anaerobia) y episodios similares a ictus (parálisis parcial, pérdida de visión parcial u otras anomalías neurológicas).

55 MELAS es un trastorno neurodegenerativo progresivo con aparición típica entre los 2 y 15 años de edad, aunque puede aparecer en la lactancia o hasta la edad adulta. Los síntomas iniciales pueden incluir episodios similares a ictus, convulsiones, migrañas y vómitos recurrentes.

60 Habitualmente, el paciente parece normal durante la lactancia, aunque es habitual la talla baja. Son menos habituales los síntomas al principio de la lactancia que pueden incluir retraso en el desarrollo, dificultades de aprendizaje o trastorno por déficit de atención. Intolerancia al ejercicio, debilidad en las extremidades, pérdida de audición y diabetes también pueden preceder a la aparición de los episodios similares a ictus.

65 Los episodios similares a ictus, a menudo acompañados de convulsiones, son el síntoma distintivo de MELAS y provocan parálisis parcial, pérdida de visión y defectos neurológicos focales. Los efectos acumulativos graduales de estos episodios dan como resultado a menudo combinaciones variables de pérdida de motricidad (habla, movimiento y alimentación), sensibilidad alterada (pérdida de visión y pérdida de sensaciones corporales) y deterioro mental

(demencia). Los pacientes con MELAS también pueden padecer síntomas adicionales incluyendo: debilidad muscular, disfunción de nervios periféricos, diabetes, pérdida de audición, problemas cardiacos y renales y anomalías digestivas. Habitualmente se acumula ácido láctico a altos niveles en sangre, líquido cefalorraquídeo, o ambos.

5 MELAS se hereda de la madre debido a un defecto en el ADN dentro de las mitocondrias. Existen al menos 17 mutaciones diferentes que pueden provocar MELAS. De lejos, la más prevalente es la mutación A3243G, que es responsable de aproximadamente el 80% de los casos.

10 No existe cura ni tratamiento específico para MELAS. Aunque los ensayos clínicos no han demostrado su eficacia, los tratamientos generales pueden incluir terapias metabólicas tales como: CoQ10, creatina, filloquinona, y otras vitaminas y complementos. Pueden requerirse fármacos tales como medicamentos para convulsiones e insulina para el tratamiento de síntomas adicionales. Algunos pacientes con disfunción muscular pueden beneficiarse del ejercicio supervisado moderado. En casos seleccionados, otras terapias que pueden prescribirse incluyen dicloroacetato (DCA) y menadiona, aunque estos no se usan de manera rutinaria debido a su potencial de tener efectos secundarios perjudiciales.

20 El pronóstico para MELAS es malo. Normalmente, la edad del fallecimiento es entre los 10 y 35 años, aunque algunos pacientes pueden vivir más tiempo. El fallecimiento puede suceder como resultado de emaciación corporal general debida a demencia progresiva y debilidad muscular, o complicaciones de otros órganos afectados tales como corazón o riñones.

25 *MERRF* es un síndrome multisistémico progresivo que comienza habitualmente en la infancia, pero su aparición puede producirse en la edad adulta. La tasa de progresión varía ampliamente. La aparición y extensión de los síntomas pueden diferir entre los hermanos afectados.

Las características clásicas de *MERRF* incluyen:

- 30 • Mioclonía (espasmos musculares contráctiles breves y repentinos), el síntoma más característico
- Convulsiones epilépticas
- Ataxia (falta de coordinación)
- 35 • Fibras rojas rasgadas (una anomalía microscópica característica observada en biopsia de músculo de pacientes con *MERRF* y otros trastornos mitocondriales) Los síntomas adicionales pueden incluir: pérdida de audición, acidosis láctica (nivel elevado de ácido láctico en sangre), talla baja, intolerancia al ejercicio, demencia, defectos cardiacos, anomalías oculares y afectación del habla.

40 Aunque algunos casos de *MERRF* son esporádicos, la mayoría de los casos se heredan de la madre debido a una mutación dentro de las mitocondrias. La mutación de *MERRF* más habitual es A8344G, que representa más del 80% de los casos. Se ha notificado que otras cuatro mutaciones de ADN mitocondrial provocan *MERRF*. Aunque una madre transmitirá su mutación de *MERRF* a toda su descendencia, algunos nunca presentarán síntomas.

45 Como con todos los trastornos mitocondriales, no existe cura para *MERRF*. Las terapias pueden incluir coenzima Q10, L-carnitina y diversas vitaminas, a menudo en una combinación en "cóctel". El tratamiento de convulsiones requiere habitualmente fármacos anticonvulsivos. También pueden ser necesarios medicamentos para el control de otros síntomas.

50 El pronóstico para *MERRF* varía ampliamente dependiendo de la edad de aparición, el tipo y la gravedad de los síntomas, los órganos implicados, y otros factores.

Reducción de ADN mitocondrial: Los síntomas incluyen tres formas principales:

55 1. Miopatía congénita: Debilidad neonatal, hipotonía que requiere ventilación asistida, posible disfunción renal. Acidosis láctica intensa. Fibras rojas rasgadas prominentes. Habitualmente se produce el fallecimiento debido a insuficiencia respiratoria antes del año de edad.

60 2. Miopatía infantil: Tras el desarrollo temprano normal hasta un año de edad, aparece debilidad y empeora rápidamente, provocando insuficiencia respiratoria y el fallecimiento normalmente en un plazo de pocos años.

3. Hepatopatía: Hepatomegalia e insuficiencia hepática intratable, miopatía. Acidosis láctica intensa. Es típico que se produzca el fallecimiento en el plazo del primer año.

65 *Ataxia de Friedreich*

Ataxia de Friedreich (AFRD o AF) un trastorno neurodegenerativo y cardiodegenerativo autosómico recesivo provocado por niveles disminuidos de la proteína frataxina. La frataxina es importante para el ensamblaje de agrupaciones de hierro-azufre en complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Las estimaciones de la prevalencia de AFRD en los Estados Unidos oscilan entre 1 de cada 22.000-29.000 personas (véase www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/001411.htm) y 1 de cada 50.000 personas. La enfermedad provoca la pérdida progresiva de la coordinación motora voluntaria (ataxia) y complicaciones cardíacas. Los síntomas comienzan normalmente en la infancia, y la enfermedad empeora progresivamente a medida que el paciente se hace mayor; los pacientes eventualmente se ven confinados a una silla de ruedas debido a las discapacidades motoras.

Además de trastornos congénitos que implican mitocondrias defectuosas heredadas, se ha sugerido que la disfunción mitocondrial adquirida contribuye a enfermedades, particularmente trastornos neurodegenerativos asociados al envejecimiento como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington. La incidencia de mutaciones somáticas en ADN mitocondrial se eleva exponencialmente con la edad; se encuentra una actividad de la cadena respiratoria disminuida de manera universal en personas de edad avanzada. La disfunción mitocondrial también está implicada en excitotoxicidad, lesión neuronal, accidentes cerebrovasculares tales como los asociados con convulsiones, ictus e isquemia.

Composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención junto con uno o más diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.

El compuesto de la invención o una formulación del mismo pueden administrarse mediante cualquier método convencional, por ejemplo, pero sin limitación puede administrarse por vía parenteral, por vía oral, de manera tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), mediante un dispositivo médico (por ejemplo, una endoprótesis), mediante inhalación o mediante inyección (subcutánea o intramuscular). El tratamiento puede consistir en una única dosis o una pluralidad de dosis a lo largo de un periodo de tiempo.

El tratamiento puede ser mediante administración una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día etc. El tratamiento también puede ser mediante administración continua tal como, por ejemplo, administración intravenosa mediante goteo.

Aunque es posible que el compuesto de la invención se administre solo, es preferible presentarlo como una formulación farmacéutica, junto con uno o más portadores aceptables. El/los portador(es) debe(n) ser "aceptable(s)" en el sentido de ser compatibles con el compuesto de la invención y no perjudiciales para los receptores de los mismos. Se describen ejemplos de portadores adecuados con más detalle a continuación.

Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Tales métodos incluyen la etapa de poner en asociación el principio activo (compuesto de la invención) con el portador que constituye uno o más componentes auxiliares. En general las formulaciones se preparan poniendo en asociación de manera uniforme e íntima el principio activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y, entonces, si es necesario, conformando el producto.

El compuesto de la invención se administrará normalmente por vía intravenosa, por vía oral o por cualquier vía parenteral, en forma de una formulación farmacéutica que comprende el principio activo, opcionalmente en forma de un ácido, o una base, inorgánico u orgánico no tóxico, sal de adición, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Dependiendo del trastorno y paciente que vaya a tratarse, así como de la vía de administración, las composiciones pueden administrarse a dosis variables.

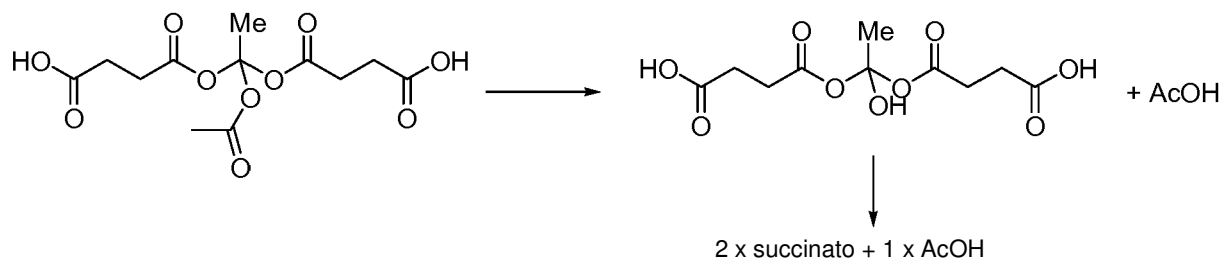
Las composiciones farmacéuticas deben ser estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento; por tanto, preferiblemente deben preservarse frente a la acción contaminante de los microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), aceites vegetales, y mezclas adecuadas de los mismos.

Por ejemplo, el compuesto de la invención también puede administrarse por vía oral, por vía bucal o por vía sublingual en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, disoluciones o suspensiones, que pueden contener agentes aromatizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada o controlada.

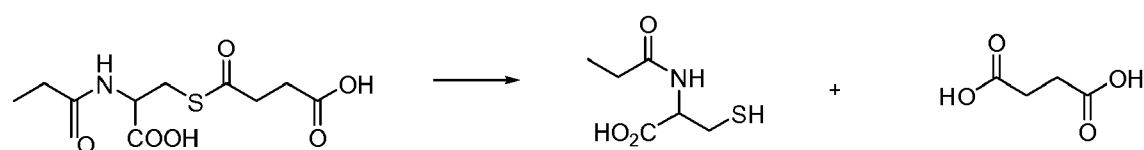
Pueden presentarse formulaciones según la presente invención adecuadas para administración oral como unidades diferenciadas tales como cápsulas, sellos o comprimidos, que contienen cada uno una cantidad predeterminada del principio activo; como polvo o gránulos; como una disolución o una suspensión en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

- Las disoluciones o suspensiones del compuesto de la invención adecuadas para administración oral también pueden contener excipientes, por ejemplo, N,N-dimetilacetamida, dispersantes por ejemplo polisorbato 80, surfactantes y solubilizantes, por ejemplo polietilenglicol, Phosal 50 PG (que consiste en fosfatidilcolina, ácidos grasos de soja, etanol, mono/diglicéridos, propilenglicol y palmitato de ascorbilo). Las formulaciones según la presente invención también pueden estar en forma de emulsiones, en las que un compuesto según la fórmula (I) puede estar presente en una emulsión acuosa-oleosa. El aceite puede ser cualquier sustancia de tipo oleoso tal como, por ejemplo, aceite de soja o aceite de cártamo, triglicérido de cadena media (TCM-aceite) tal como, por ejemplo, aceite de coco, aceite de palma, etc. o combinaciones de los mismos.
- Los comprimidos pueden contener excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa (por ejemplo, lactosa monohidratada o lactosa anhidra), citrato de sodio, carbonato de sodio, fosfato de calcio dibásico y glicina, hidroxitolueno butilado (E321), crospovidona, hipromelosa, disgregantes tales como almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa sódica, y determinados silicatos complejos, y aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), macrogol 8000, sacarosa, gelatina y goma arábiga. Adicionalmente, puede incluirse agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.
- Puede producirse un comprimido mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes auxiliares. Los comprimidos sometidos a compresión pueden prepararse mediante compresión en una máquina adecuada, el principio activo en una forma fluida tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante (por ejemplo, povidona, gelatina, hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón, povidona reticulada, carboximetilcelulosa sódica reticulada), agente tensioactivo o dispersante. Pueden producirse comprimidos moldeados mediante moldeo en una máquina adecuada de una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden recubrirse o ranurarse opcionalmente y pueden formularse de modo que proporcionen la liberación retardada o controlada del principio activo en los mismos usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado.
- Composiciones sólidas de un tipo similar también pueden emplearse como cargas en cápsulas de gelatina. Excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, almidón, una celulosa, lactosa o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para suspensiones y/o elixires acuosos, los compuestos de la invención pueden combinarse con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, tintes o materia colorante, con agentes emulsionantes y/o de suspensión y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.
- Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden el principio activo en una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábiga o goma tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tales como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga; y colutorios que comprenden el principio activo en un portador líquido adecuado.
- Pueden formularse composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, disoluciones, pastas, geles, apósitos impregnados, pulverizaciones, aerosoles o aceites, dispositivos transdérmicos, polvos para espolvoreo, y similares. Estas composiciones pueden prepararse mediante métodos convencionales que contienen el agente activo. Por tanto, también pueden comprender portadores y aditivos convencionales compatibles, tales como conservantes, disolventes para ayudar a la penetración del fármaco, emoliente en cremas o pomadas y etanol o alcohol oleílico para lociones. Tales portadores pueden estar presentes como desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 98% de la composición. Más habitualmente formarán hasta aproximadamente el 80% de la composición. Como ilustración únicamente, se prepara una crema o pomada mezclando cantidades suficientes de material hidrófilo y agua, que contiene desde aproximadamente el 5-10% en peso del compuesto, en cantidades suficientes para producir una crema o pomada que tiene la consistencia deseada.
- Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración transdérmica pueden presentarse como parches diferenciados destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo prolongado de tiempo. Por ejemplo, el agente activo puede suministrarse desde el parche mediante iontoforesis.
- Para aplicaciones a tejidos externos, por ejemplo la boca y la piel, las composiciones se aplican preferiblemente como pomada o crema tópica. Cuando se formula en una pomada, el agente activo puede emplearse con una base de pomada o bien parafínica o bien miscible en agua.
- Alternativamente, el agente activo puede formularse en una crema con una base de crema de aceite en agua o una base de crema de agua en aceite.
- Para administración parenteral, se preparan formas de dosificación unitarias fluidas utilizando el principio activo y un vehículo estéril, por ejemplo pero sin limitación agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, prefiriéndose el agua. El principio activo, dependiendo del vehículo y la concentración usados, puede o bien ser coloidal, o bien suspenderse o bien disolverse en el vehículo. En la preparación de disoluciones, el principio activo puede disolverse

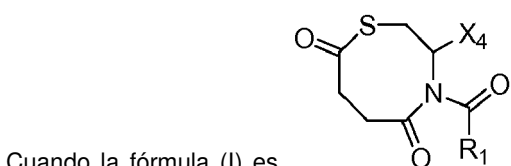
acción de una enzima adecuada o mediante hidrólisis química *in vivo*. A modo de ejemplo en la fórmula (I) en la que A es OR' siendo R' la fórmula (V) y B es H y Z es -CH₂CH₂-, X es O y R₈ es H, R₉ es Me y R₁₀ es O-acetilo.



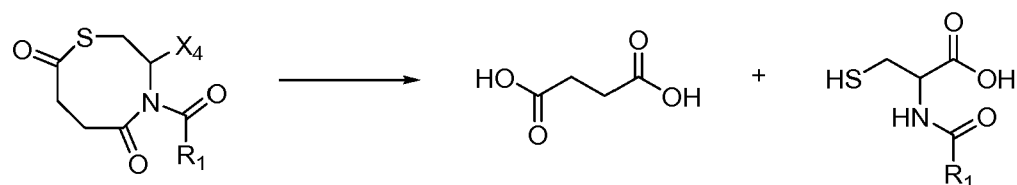
10 Cuando R', R'' o R''' es un compuesto de fórmula (VII) puede eliminarse el grupo mediante la acción de una enzima adecuada o mediante hidrólisis química *in vivo* para liberar ácido succínico. A modo de ejemplo en la fórmula (I) en la que A es SR siendo R la fórmula (VII) y B es OH y Z es -CH₂CH₂-, X₅ es CO₂H y R₁ es Et:



15 Alternativamente para compuestos de fórmula VII, la propia entidad puede llevarse directamente al ciclo de Krebs en lugar de succinil-CoA.



20 Cuando la fórmula (I) es el compuesto puede hidrolizarse para dar un compuesto según el esquema a continuación y cuando X₄ es -COOH.



Otros aspectos de la invención

25 La presente invención también proporciona una combinación (por ejemplo, para el tratamiento de disfunción mitocondrial) de un compuesto de fórmula (I) o una forma farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se definió anteriormente en el presente documento y uno o más agentes seleccionados independientemente de:

- Derivados de quinona, por ejemplo ubiquinona, idebenona, mitoQ
- Vitaminas por ejemplo tocoferoles, tocotrienoles y Trolox (vitamina E), ascorbato (C), tiamina (B1), riboflavina (B2), nicotinamida (B3), menadiona (K3),
- Antioxidantes además de vitaminas por ejemplo compuestos de TPP (mitoQ), compuestos de Sk, epicatequina, catequina, ácido lipoico, ácido úrico, melatonina
- Dicloroacetato
- Azul de metileno
- l-arginina
- Péptidos de Szeto-Schiller
- Creatina

- Benzodiazepinas
- Moduladores de PGC-1 α

5 • Dieta cetógena

Otro aspecto de la invención es que cualquiera de los compuestos dados a conocer en el presente documento puede administrarse junto con cualquier otro compuesto tal como, por ejemplo, bicarbonato de sodio (como bolo (por ejemplo, 1 mEq/kg) seguido por una infusión continua) como medicación concomitante a los compuestos dados a conocer en el presente documento.

Acidosis láctica o efectos secundarios inducidos por fármacos debido a alteración relacionada con el complejo I de la fosforilación oxidativa mitocondrial

15 La presente invención también se refiere a la prevención o el tratamiento de acidosis láctica y de efectos secundarios inducidos por fármacos relacionados con las mitocondrias. En particular los compuestos según la invención se usan en la prevención o el tratamiento de unos efectos secundarios inducidos por fármacos relacionados con las mitocondrias en o anterior al complejo I, o expresado de otro modo, la invención proporciona según la invención para la prevención o el tratamiento de inhibición directa inducida por fármacos de complejo I o de cualquier efecto inducido por fármacos que limita el suministro de NADH al complejo I (tal como, pero sin limitarse a, efectos sobre el ciclo de Krebs, glicólisis, beta-oxidación, metabolismo de piruvato e incluso fármacos que afectan al transporte o los niveles de glucosa u otros sustratos relacionados con el complejo I).

25 La toxicidad mitocondrial inducida por fármacos puede formar parte del efecto terapéutico deseado (por ejemplo, la toxicidad mitocondrial inducida por fármacos contra el cáncer), pero en la mayoría de casos, la toxicidad mitocondrial inducida por fármacos es un efecto adverso. La toxicidad mitocondrial puede aumentar notablemente la glicólisis para compensar la pérdida celular de formación de ATP mitocondrial mediante la fosforilación oxidativa. Esto puede dar como resultado niveles plasmáticos aumentados de lactato, que si son excesivos dan como resultado acidosis láctica, que pueden ser letales. La acidosis láctica tipo A se asocia principalmente con hipoxia tisular, mientras que la acidosis láctica aerobia tipo B se asocia con fármacos, toxina o trastornos sistémicos tales como enfermedades hepáticas, diabetes, cáncer y errores congénitos del metabolismo (por ejemplo, defectos genéticos mitocondriales).

35 Muchas sustancias farmacológicas conocidas influyen negativamente en la respiración mitocondrial (por ejemplo, antipsicóticos, anestésicos locales y antidiabéticos) y, por consiguiente, existe la necesidad de identificar o desarrollar medios que puedan usarse o bien para sortear o bien para aliviar los efectos mitocondriales negativos inducidos por el uso de una sustancia farmacológica de este tipo.

40 La presente invención proporciona compuestos para su uso en la prevención o el tratamiento de acidosis láctica y de efectos secundarios inducidos por fármacos relacionados con las mitocondrias. En particular, los profármacos de succinato se usan en la prevención o el tratamiento de unos efectos secundarios inducidos por fármacos relacionados con las mitocondrias en o anterior al complejo I, o expresado de otro modo, la invención proporciona profármacos de succinato para la prevención o el tratamiento de la inhibición directa inducida por fármacos del complejo I o de cualquier efecto inducido por fármacos que limite el suministro de NADH al complejo I (tal como, pero sin limitarse a, efectos sobre el ciclo de Krebs, glicólisis, beta-oxidación, metabolismo de piruvato e incluso fármacos que afectan al transporte o los niveles de glucosa u otro sustrato relacionado con el complejo I).

50 Tal como se mencionó anteriormente, a menudo se observan niveles plasmáticos aumentados de lactato en pacientes tratados con fármacos que pueden tener efectos secundarios relacionados con las mitocondrias. La presente invención se basa en resultados experimentales que muestran que la metformina (tratamiento de primera línea para diabetes tipo 2 y que se ha asociado con acidosis láctica como efecto secundario raro) inhibe la función mitocondrial de células de sangre periférica humana en el complejo I de manera dependiente del tiempo y de la dosis a concentraciones relevantes para la intoxicación de metformina. La metformina provoca además un aumento significativo de la producción de lactato por plaquetas intactas a lo largo del tiempo. El uso de los compuestos según la invención redujo significativamente la producción de lactato en plaquetas intactas expuestas a metformina. El succinato aplicado de manera exógena, el propio sustrato, no redujo la producción de lactato inducida por metformina.

60 En otro estudio, se observó la producción de lactato a lo largo de varias horas en plaquetas inhibidas por rotenona (es decir, un estado en el que está afectada la función del complejo I). El uso de los compuestos según la invención (pero no de succinato) atenuó la producción de lactato inducida por rotenona de plaquetas humanas intactas. Se repitieron experimentos respirométricos en fibroblastos humanos y fibras de músculo cardíaco humanas, y se confirmaron los hallazgos observados en células sanguíneas.

65 Por consiguiente, la invención proporciona compuestos según la fórmula (I) para su uso en la prevención o el tratamiento de acidosis láctica. Sin embargo, como los resultados notificados en el presente documento se basan en acidosis láctica relacionada con la inhibición directa del complejo I o están asociados con un defecto en o anterior al

complejo I, se contempla que los compuestos según la invención son adecuados para su uso en la prevención o el tratamiento de unos efectos secundarios inducidos por fármacos relacionados con las mitocondrias en o anterior al complejo I. Los compuestos según la invención también contrarrestarán los efectos farmacológicos que alteran el metabolismo de manera anterior al complejo I (inhibición indirecta del complejo I, que englobará cualquier efecto farmacológico que limite el suministro de NADH al complejo I, por ejemplo efectos sobre el ciclo de Krebs, glicólisis, beta-oxidación, metabolismo de piruvato e incluso fármacos que afectan a los niveles de glucosa u otro sustrato relacionado con el complejo I).

Se contempla que los compuestos según la invención también pueden usarse en aplicaciones industriales, por ejemplo *in vitro* para reducir o inhibir la formación de lactato o para aumentar la disponibilidad de ATP de líneas celulares comerciales o industriales. Los ejemplos incluyen el uso en cultivo celular, en preservación de órganos, etc.

Los compuestos según la invención se usan en el tratamiento o la prevención de efectos secundarios inducidos por fármacos relacionados con las mitocondrias o para aumentar o restaurar los niveles celulares de energía (ATP), en el tratamiento. Especialmente, se usan en el tratamiento o la prevención de efectos secundarios relacionados con las mitocondrias de complejo I inducidos por fármacos directos o indirectos. En particular, se usan en el tratamiento o la prevención de acidosis láctica, tal como acidosis láctica inducida por una sustancia farmacológica.

La invención también se refiere a una combinación de un compuesto de fórmula (I) y una sustancia farmacológica que puede inducir un efecto secundario relacionado con las mitocondrias, en particular un efecto secundario que está provocado por la alteración directa o indirecta del complejo I por la sustancia farmacológica. Tal combinación puede usarse como prevención profiláctica de un efecto secundario relacionado con las mitocondrias o, en caso de que aparezca el efecto secundario, en el alivio y/o tratamiento del efecto secundario relacionado con las mitocondrias.

Se contempla que los compuestos descritos a continuación serán eficaces en el tratamiento o la prevención de efectos secundarios inducidos por fármacos, en particular en efectos secundarios relacionados con la inhibición directa o indirecta del complejo I.

Se sabe que las sustancias farmacológicas que se conoce que dan lugar a defectos, malfuncionamiento o alteración del complejo I y/o que se conoce que tienen acidosis láctica como efecto secundario son:

Analgésicos incluyendo paracetamol, capsaicina

Antianginosos incluyendo amiodarona, perhexilina

Antibióticos incluyendo linezolid, trovafloxacin, gentamicina

Fármacos anticancerosos incluyendo quinonas incluyendo mitomicina C, adriamicina

Fármacos anticonvulsivos incluyendo ácido valproico

Antidiabéticos incluyendo metformina, fenformina, butilbiguanida, troglitazona y rosiglitazona, pioglitazona

Agentes contra la hepatitis B incluyendo fialuridina

Antihistamínicos

Agentes antiparkinsonianos incluyendo tolcapona

Antipsicóticos, risperidona,

Agentes contra la esquizofrenia, zotepina, clozapina

Antisépticos, compuestos de amonio cuaternario (CAC)

Agentes contra la tuberculosis incluyendo isoniazida

Fibratos incluyendo clofibrato, ciprofibrato, simvastatina

Hipnóticos incluyendo propofol

Fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (FARME) inmunosupresores, leflunomida

Anestésicos locales incluyendo bupivacaína, diclofenaco, indometacina y lidocaína

Relajante muscular incluyendo dantroleno

Agentes neurolépticos incluyendo neurolépticos antipsicóticos como clorpromazina, flufenazina y haloperidol

INTI (inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa) incluyendo efavirenz, tenofovir, emtricitabina, zidovudina, lamivudina, rilpivirina, abacavir, didanosina

AINE incluyendo nimesulfida, ácido mefenámico, sulindaco

Ácidos barbitúricos.

Otras sustancias farmacológicas que se conoce que tienen acidosis láctica como efectos secundarios incluyen beta2-agonistas, epinefrina, teofilina u otros herbicidas. Los alcoholes y la cocaína también dan como resultado acidosis láctica.

Además, se contempla que los compuestos de la invención también pueden ser eficaces en el tratamiento o la prevención de acidosis láctica aunque no estén relacionados con un defecto del complejo I.

Combinación de fármacos y compuestos de la invención

La presente invención también se refiere a una combinación de una sustancia farmacológica y un compuesto de la invención para su uso en el tratamiento y/o la prevención de un efecto secundario inducido por fármacos seleccionado de acidosis láctica y un efecto secundario relacionado con un defecto, inhibición o malfuncionamiento del complejo I, en la que

i) la sustancia farmacológica se usa para el tratamiento de una enfermedad para la que está indicada la sustancia farmacológica, y

ii) el compuesto de la invención se usa para la prevención o el alivio de los efectos secundarios inducidos o inducibles por la sustancia farmacológica, en el que los efectos secundarios se seleccionan de acidosis láctica y efectos secundarios relacionados con un defecto, inhibición o malfuncionamiento del complejo I.

Cualquier combinación de una sustancia farmacológica de este tipo con cualquier compuesto de la invención está dentro del alcance de la presente invención. Por consiguiente, basándose en la divulgación en el presente documento un experto en la técnica entenderá que la esencia de la invención son los hallazgos de las propiedades valiosas de compuestos de la invención para evitar o reducir los efectos secundarios descritos en el presente documento. Por tanto, el uso potencial de compuestos de la invención que pueden entrar en las células y el suministro de succinato y posiblemente otros restos activos en combinación con cualquier sustancia farmacológica que tiene o potencialmente tiene los efectos secundarios descritos en el presente documento resulta evidente a partir de la presente divulgación.

La invención se refiere además a

i) una composición que comprende una sustancia farmacológica y un compuesto de la invención, en la que la sustancia farmacológica tiene un efecto secundario potencial inducido por fármacos seleccionado de acidosis láctica y efectos secundarios relacionados con un defecto, inhibición o malfuncionamiento del complejo I,

ii) una composición tal como se describió anteriormente en el punto i), en la que el compuesto de la invención se usa para la prevención o el alivio de efectos secundarios inducidos o inducibles por la sustancia farmacológica, en la que los efectos secundarios se seleccionan de acidosis láctica y efectos secundarios relacionados con un defecto, inhibición o malfuncionamiento del complejo I.

La composición puede estar en forma de dos envases independientes:

un primer envase que contiene la sustancia farmacológica o una composición que comprende la sustancia farmacológica y

un segundo envase que contiene el compuesto de la invención o una composición que comprende el compuesto de la invención. La composición también puede ser una única composición que comprende tanto la sustancia farmacológica como el compuesto de la invención.

En el caso de que la composición comprenda dos envases independientes, la sustancia farmacológica y el compuesto de la invención pueden administrarse por diferentes vías de administración (por ejemplo, sustancia farmacológica mediante administración oral y compuesto de la invención mediante administración parenteral o mucosa) y/o pueden administrarse esencialmente al mismo tiempo o la sustancia farmacológica puede administrarse

antes que el compuesto de la invención o viceversa.

Kits

5 La invención también proporciona un kit que comprende

i) un primer recipiente que comprende una sustancia farmacológica, que tiene un efecto secundario potencial inducido por fármacos seleccionado de acidosis láctica y efectos secundarios relacionados con un defecto, inhibición o malfuncionamiento del complejo I, y

10 ii) un segundo recipiente que comprende un compuesto de la invención, que tiene el potencial para la prevención o el alivio de los efectos secundarios inducidos o inducibles por la sustancia farmacológica, en el que los efectos secundarios se seleccionan de acidosis láctica y efectos secundarios relacionados con un defecto, inhibición o malfuncionamiento del complejo I.

15 *Método para el tratamiento / la prevención de efectos secundarios*

La invención también se refiere a un método para tratar un sujeto que padece un efecto secundario inducido por fármacos seleccionado de acidosis láctica y un efecto secundario relacionado con un defecto, inhibición o malfuncionamiento del complejo I, el método comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la invención al sujeto, y a un método para prevenir o aliviar un efecto secundario inducido por fármacos seleccionado de acidosis láctica y un efecto secundario relacionado con un defecto, inhibición o malfuncionamiento del complejo I en un sujeto, que padece una enfermedad que se trata con una sustancia farmacológica, que induce potencialmente un efecto secundario seleccionado de acidosis láctica y un efecto secundario relacionado con un defecto, inhibición o malfuncionamiento del complejo I, el método comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la invención al sujeto antes, durante o después del tratamiento con dicha sustancia farmacológica.

Metformina

30 La metformina es un fármaco antidiabético que pertenece a la clase de las biguanidas. Es el tratamiento de primera línea para diabetes tipo 2, que representa aproximadamente el 90% de los casos de diabetes en los EE.UU. El efecto antidiabético se ha atribuido a la disminución de la producción de glucosa hepática, que aumenta el efecto biológico de insulina a través de una captación aumentada de glucosa en tejidos periféricos y que disminuye la captación de glucosa en el intestino, pero no se han dilucidado completamente los mecanismos de acción exactos. A pesar de sus ventajas con respecto a otros antidiabéticos, se ha relacionado con casos raros de acidosis láctica (AL) como efecto secundario. AL se define como brecha aniónica aumentada, un nivel de lactato en sangre arterial por encima de 5 mM y un pH $\leq 7,35$. Aunque todavía no se ha revelado por completo la patogenia precisa de AL asociada con metformina, se han sugerido una inhibición de la gluconeogénesis y acumulación resultante de precursores gluconeogénicos, tales como alanina, piruvato y lactato. Otros, sin embargo, proponen que una interferencia del fármaco en la función mitocondrial es el factor clave tanto para el efecto hipoglucemiante, terapéutico primario así como para el desarrollo de AL asociada con metformina. Como consecuencia de la inhibición mitocondrial, la célula pasará parcialmente del metabolismo aerobio a anaerobio, fomentando la glicólisis con niveles de lactato elevados resultantes. La fenformina, otro agente antidiabético de la misma clase farmacológica que la metformina, se ha retirado del mercado en la mayoría de países debido a una alta incidencia de AL (4 casos por cada 10000 años-tratamiento). En comparación, la incidencia de AL para metformina es de aproximadamente una décima parte que para la fenformina y, por tanto, se considera un agente terapéutico bastante seguro. AL asociada con metformina se observa principalmente en pacientes que tienen estados predisponentes adicionales que afectan al sistema cardiovascular, el hígado o los riñones. En estos estados, el aclaramiento del fármaco del cuerpo se ve afectado lo que, si no se detecta a tiempo, da como resultado concentraciones en sangre crecientes de metformina. Puesto que se espera que el uso de metformina se eleve debido a la prevalencia creciente de diabetes tipo 2, la investigación sobre toxicidad mitocondrial inducida por metformina y AL se convierte en un asunto actual y urgente. La investigación sobre la toxicidad mitocondrial de metformina notifica resultados incoherentes. Kane *et al.* (2010) no detectaron la inhibición de la respiración basal y capacidades respiratorias máximas por metformina *in vivo* en músculo esquelético de ratas y ni lo hicieron en biopsias de músculo de pacientes con diabetes tipo 2 tratados con metformina. En cambio, otros han descrito efectos tóxicos de metformina y fenformina sobre las mitocondrias y su asociación con AL en tejidos animales. Los datos sobre tejido humano son escasos, especialmente *ex vivo* o *in vivo*. La mayoría de datos sobre seres humanos de metformina y AL se basan en estudios retrospectivos debido a la dificultad de obtener muestras de tejido humano. Protti *et al.* (2010), sin embargo, notificaron el consumo disminuido de oxígeno sistémico en pacientes con AL asociada con biguanida y tanto Protti *et al.* (2012b) como Larsen *et al.* (2012) describieron disfunción mitocondrial *in vitro* en respuesta a la exposición a metformina a ≤ 10 mM en músculo esquelético y plaquetas humanas, respectivamente. Protti *et al.* (2012b) notificaron además la liberación aumentada de lactato en plaquetas humanas en respuesta a la exposición a metformina a 1 mM. Aunque la metformina no se encuentra a esta concentración en condiciones terapéuticas, se ha mostrado que se aproxima a estos niveles en sangre durante una intoxicación y se sabe que se acumula de 7 a 10 veces en el tracto gastrointestinal, riñón, hígado, glándulas salivales, pulmón, bazo y músculo en comparación con plasma.

En el estudio notificado en el presente documento el objetivo era evaluar la toxicidad mitocondrial de la metformina y la fenformina en células sanguíneas humanas usando respirometría de alta resolución. La fenformina se incluyó para comparar la actividad de los dos fármacos de estructura similar y para estudiar la relación entre toxicidad mitocondrial e incidencia de AL descrita en pacientes humanos. Para investigar la permeabilidad de membrana y la diana específica de la toxicidad de estas biguanidas, se aplicó un modelo para someter a prueba la toxicidad farmacológica usando células sanguíneas tanto intactas como permeabilizadas con adiciones secuenciales de sustratos e inhibidores específicos de complejo respiratorio.

Otros aspectos aparecen de las reivindicaciones adjuntas. Todos los detalles y aspectos particulares se aplican, cambiando lo que se deba cambiar, a estos aspectos.

Definiciones

Los artículos “un(o)” y “una” se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo “un análogo” significa un análogo o más de un análogo.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “succinatos con permeabilidad celular”, “compuesto(s) de la invención”, “derivados de succinato con permeabilidad celular” y “precursores de succinato con permeabilidad celular” se usan indistintamente y se refieren a compuestos de fórmula (I).

Tal como se usa en el presente documento, el término “biodisponibilidad” se refiere al grado en el que o la tasa a la que se absorbe o se pone a disposición un fármaco u otra sustancia en el sitio de actividad biológica después de la administración. Esta propiedad depende de varios factores incluyendo la solubilidad del compuesto, la tasa de absorción en el intestino, la extensión de metabolismo y unión a proteínas, etc. Diversas pruebas para determinar la biodisponibilidad con las que estará familiarizado un experto en la técnica se describen en el presente documento (véanse también Trepanier *et al*, 1998, Gallant-Haidner *et al*, 2000).

Tal como se usan en el presente documento, los términos “alteración”, “inhibición”, “defecto” usados en relación con el complejo I de la cadena respiratoria pretenden indicar que una sustancia farmacológica dada tiene un efecto negativo sobre el complejo I o sobre el metabolismo mitocondrial de manera anterior al complejo I, lo que podría englobar cualquier efecto farmacológico que limite el suministro de NADH al complejo I, por ejemplo efectos sobre el ciclo de Krebs, glicólisis, beta-oxidación, metabolismo de piruvato e incluso fármacos que afectan al transporte o niveles de glucosa u otros sustratos relacionados con el complejo I. Tal como se describe en el presente documento, un exceso de lactato en un sujeto es a menudo una indicación de un efecto negativo sobre la respiración aerobia incluyendo el complejo I.

Tal como se usa en el presente documento, el término “efecto secundario” usado en relación con la función del complejo I de la cadena respiratoria puede ser un efecto secundario relacionado con acidosis láctica o puede ser un efecto secundario relacionado con toxicidad de órganos farmacológica idiosincrásica, por ejemplo hepatotoxicidad, neurotoxicidad, cardiotoxicidad, nefrotoxicidad y toxicidad muscular que engloba, pero no se limita a, por ejemplo oftalmoplejía, miopatía, deterioro auditivo neurosensitivo, convulsiones, ictus, acontecimientos similares a ictus, ataxia, ptosis, deterioro cognitivo, estados de consciencia alterados, dolor neuropático, polineuropatía, problemas gastrointestinales neuropáticos (reflujo gastroesofágico, estreñimiento, pseudoobstrucción intestinal), disfunción tubular proximal renal, defectos de conducción cardíaca (bloqueos cardíacos), miocardiopatía, hipoglucemia, defectos gluconeogénicos, insuficiencia hepática no alcohólica, neuropatía óptica, pérdida de visión, diabetes e insuficiencia pancreática exocrina, fatiga, problemas respiratorios incluyendo disnea intermitente.

Tal como se usa en el presente documento, el término “inducido por fármacos” en relación con el término “efecto secundario” ha de entenderse en un sentido amplio. Por tanto, no incluye únicamente sustancias farmacológicas, sino también otras sustancias que pueden conducir a la presencia no deseada de lactato. Ejemplos son herbicidas, setas venenosas, bayas, etc.

Las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de la invención incluyen sales convencionales formadas a partir de bases o ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables así como de sales de adición de ácido de amonio cuaternario. Ejemplos más específicos de sales de ácido adecuadas incluyen de clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, perclórico, fumárico, acético, propiónico, succínico, glicólico, fórmico, láctico, maleico, tartárico, cítrico, palmoico, malónico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, naftaleno-2-sulfónico, bencenosulfónico hidroxinaftoico, yodhídrico, málico, esteroico, tánico y similares. Otros ácidos tales como oxálico, aunque no son farmacéuticamente aceptables en sí mismos, pueden ser útiles en la preparación de sales útiles como productos intermedios en la obtención de los compuestos de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables. Ejemplos más específicos de sales básicas adecuadas incluyen sales de sodio, litio, potasio, magnesio, aluminio, calcio, zinc, N,N'-dibenciletildiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, N-metilglucamina y procaína.

Tal como se usa en el presente documento, el término “alquilo” se refiere a cualquier cadena lineal o ramificada que se compone únicamente de átomos de carbono sp^3 , totalmente saturada con átomos de hidrógeno tales como, por ejemplo, $-C_nH_{2n+1}$ para alquilos de cadena lineal, en los que n puede estar en el intervalo de 1 y 10 tal como, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, *n*-pentilo, neopentilo, isopentilo, hexilo, isohexilo, heptilo, octilo, nonilo o decilo. El alquilo tal como se usa en el presente documento puede estar sustituido adicionalmente.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cicloalquilo” se refiere a una cadena de carbonos con estructura cíclica/de anillo que tiene la fórmula general de $-C_nH_{2n-1}$ en la que n está entre 3-10, tal como, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo o ciclooctilo, biciclo[3.2.1]octilo, espiro[4,5]decilo, norpinilo, norbonilo, norcaprilo, adamantilo y similares.

Tal como se usa en el presente documento, el término “alqueno” se refiere a una cadena lineal o ramificada que se compone de carbono y átomos de hidrógeno en la que al menos dos átomos de carbono se conectan mediante un doble enlace tal como, por ejemplo, cadena hidrocarbonada insaturada de alqueno C_{2-10} que tiene desde dos hasta diez átomos de carbono y al menos un doble enlace. Los grupos alqueno C_{2-6} incluyen, pero no se limitan a, vinilo, 1-propenilo, alilo, iso-propenilo, *n*-butenilo, *n*-pentenilo, *n*-hexenilo y similares.

El término “alcoxilo C_{1-10} ” en el presente contexto designa un grupo -O-alquilo C_{1-6} usado solo o en combinación, en el que alquilo C_{1-10} es tal como se definió anteriormente. Ejemplos de grupos alcoxilo lineales son metoxilo, etoxilo, propoxilo, butoxilo, pentoxilo y hexoxilo. Ejemplos de alcoxilo ramificado son iso-propoxilo, sec-butoxilo, terc-butoxilo, iso-pentoxilo e iso-hexoxilo. Ejemplos de alcoxilo cíclico son ciclopropiloxilo, ciclobutiloxilo, ciclopentiloxilo y ciclohexiloxilo.

El término “heterocicloalquilo C_{3-7} ” tal como se usa en el presente documento indica un radical de un heterociclo totalmente saturado como un hidrocarburo cíclico que contiene uno o más heteroátomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre independientemente en el ciclo. Los ejemplos de heterociclos incluyen, pero no se limitan a, pirrolidina (1-pirrolidina, 2-pirrolidina, 3-pirrolidina, 4-pirrolidina, 5-pirrolidina), pirazolidina (1-pirazolidina, 2-pirazolidina, 3-pirazolidina, 4-pirazolidina, 5-pirazolidina), imidazolidina (1-imidazolidina, 2-imidazolidina, 3-imidazolidina, 4-imidazolidina, 5-imidazolidina), tiazolidina (2-tiazolidina, 3-tiazolidina, 4-tiazolidina, 5-tiazolidina), piperidina (1-piperidina, 2-piperidina, 3-piperidina, 4-piperidina, 5-piperidina, 6-piperidina), piperazina (1-piperazina, 2-piperazina, 3-piperazina, 4-piperazina, 5-piperazina, 6-piperazina), morfolina (2-morfolina, 3-morfolina, 4-morfolina, 5-morfolina, 6-morfolina), tiomorfolina (2-tiomorfolina, 3-tiomorfolina, 4-tiomorfolina, 5-tiomorfolina, 6-tiomorfolina), 1,2-oxatolano (3-(1,2-oxatolano), 4-(1,2-oxatolano), 5-(1,2-oxatolano)), 1,3-dioxolano (2-(1,3-dioxolano), 3-(1,3-dioxolano), 4-(1,3-dioxolano)), tetrahidropirano (2-tetrahidropirano, 3-tetrahidropirano, 4-tetrahidropirano, 5-tetrahidropirano, 6-tetrahidropirano), hexahidropiradizina, (1-(hexahidropiradizina), 2-(hexahidropiradizina), 3-(hexahidropiradizina), 4-(hexahidropiradizina), 5-(hexahidropiradizina), 6-(hexahidropiradizina)).

El término “alquil C_{1-10} -cicloalquilo C_{3-10} ” tal como se usa en el presente documento se refiere a un grupo cicloalquilo tal como se definió anteriormente unido a través de un grupo alquilo tal como se definió anteriormente que tiene el número alquilo indicado de átomos de carbono.

El término “alquil C_{1-10} -heterocicloalquilo C_{3-7} ” tal como se usa en el presente documento se refiere a un grupo heterocicloalquilo tal como se definió anteriormente unido a través de un grupo alquilo tal como se definió anteriormente que tiene el número indicado de átomos de carbono.

El término “arilo” tal como se usa en el presente documento pretende incluir sistemas de anillos aromáticos carbocíclicos. Arilo también pretende incluir los derivados parcialmente hidrogenados de los sistemas carbocíclicos enumerados a continuación.

El término “heteroarilo” tal como se usa en el presente documento incluye sistemas de anillos insaturados heterocíclicos que contienen uno o más heteroátomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre, tales como furilo, tienilo, pirrolilo, y también pretende incluir los derivados parcialmente hidrogenados de los sistemas heterocíclicos enumerados a continuación.

Los términos “arilo” y “heteroarilo” tal como se usan en el presente documento se refieren a un arilo, que puede estar opcionalmente no sustituido o mono, di o trisustituido, o un heteroarilo, que puede estar opcionalmente no sustituido o mono, di o trisustituido. Los ejemplos de “arilo” y “heteroarilo” incluyen, pero no se limitan a, fenilo, bifenilo, indenilo, naftilo (1-naftilo, 2-naftilo), *N*-hidroxitetrazolilo, *N*-hidroxitriazolilo, *N*-hidroxiimidazolilo, antraceno (1-antraceno, 2-antraceno, 3-antraceno), fenantrenilo, fluorenilo, pentalenilo, azuleno, bifenileno, tiofeno (1-tiofeno, 2-tiofeno), furilo (1-furilo, 2-furilo), furanilo, tiofeno, isoxazolilo, isotiazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, piranilo, piridazinilo, pirazinilo, 1,2,3-triazinilo, 1,2,4-triazinilo, 1,3,5-triazinilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, 1,2,5-tiadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, tetrazolilo, tiadiazinilo, indolilo, isoindolilo, benzofuranilo, benzotiofeno (tianafteno), indolilo, oxadiazolilo, isoxazolilo, quinazolinilo, fluorenilo, xantenilo, isoindanilo, benzhidrilo, acridinilo, bencisoxazolilo, purinilo, quinazolinilo, quinolizínilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo, fteridinilo, azepinilo, diazepinilo, pirrolilo (2-pirrolilo),

pirazolilo (3-pirazolilo), 5-tiofen-2-il-2H-pirazol-3-ilo, imidazolilo (1-imidazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, 5-imidazolilo), triazolilo (1,2,3-triazol-1-ilo, 1,2,3-triazol-2-ilo, 1,2,3-triazol-4-ilo, 1,2,4-triazol-3-ilo), oxazolilo (2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 5-oxazolilo), tiazolilo (2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo), piridilo (2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo), pirimidinilo (2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, 6-pirimidinilo), pirazinilo, piridazinilo (3-piridazinilo, 4-piridazinilo, 5-piridazinilo), isoquinolilo (1-isoquinolilo, 3-isoquinolilo, 4-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 6-isoquinolilo, 7-isoquinolilo, 8-isoquinolilo), quinolilo (2-quinolilo, 3-quinolilo, 4-quinolilo, 5-quinolilo, 6-quinolilo, 7-quinolilo, 8-quinolilo), benzo[b]furanilo (2-benzo[b]furanilo, 3-benzo[b]furanilo, 4-benzo[b]furanilo, 5-benzo[b]furanilo, 6-benzo[b]furanilo, 7-benzo[b]furanilo), 2,3-dihidro-benzo[b]furanilo (2-(2,3-dihidro-benzo[b]furanilo), 3-(2,3-dihidro-benzo[b]furanilo), 4-(2,3-dihidro-benzo[b]furanilo), 5-(2,3-dihidro-benzo[b]furanilo), 6-(2,3-dihidro-benzo[b]furanilo), 7-(2,3-dihidro-benzo[b]furanilo)), benzo[b]tiofenilo (2-benzo[b]tiofenilo, 3-benzo[b]tiofenilo, 4-benzo[b]tiofenilo, 5-benzo[b]tiofenilo, 6-benzo[b]tiofenilo, 7-benzo[b]tiofenilo)), 2,3-dihidro-benzo[b]tiofenilo (2-(2,3-dihidro-benzo[b]tiofenilo), 3-(2,3-dihidro-benzo[b]tiofenilo), 4-(2,3-dihidro-benzo[b]tiofenilo), 5-(2,3-dihidro-benzo[b]tiofenilo), 6-(2,3-dihidro-benzo[b]tiofenilo), 7-(2,3-dihidro-benzo[b]tiofenilo)), indolilo (1-indolilo, 2-indolilo, 3-indolilo, 4-indolilo, 5-indolilo, 6-indolilo, 7-indolilo), indazolilo (1-indazolilo, 2-indazolilo, 3-indazolilo, 4-indazolilo, 5-indazolilo, 6-indazolilo, 7-indazolilo), bencimidazolilo, (1-bencimidazolilo, 2-bencimidazolilo, 4-bencimidazolilo, 5-bencimidazolilo, 6-bencimidazolilo, 7-bencimidazolilo, 8-bencimidazolilo), benzoxazolilo (1-benzoxazolilo, 2-benzoxazolilo), benzotiazolilo (1-benzotiazolilo, 2-benzotiazolilo, 4-benzotiazolilo, 5-benzotiazolilo, 6-benzotiazolilo, 7-benzotiazolilo), carbazolilo (1-carbazolilo, 2-carbazolilo, 3-carbazolilo, 4-carbazolilo). Ejemplos no limitativos de derivados parcialmente hidrogenados son 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, 1,4-dihidronaftilo, pirrolinilo, pirazolinilo, indolinilo, oxazolidinilo, oxazolinilo, oxazepinilo y similares.

Tal como se usa en el presente documento, el término "acilo" se refiere a un grupo carbonilo -C(=O)R en el que el grupo R es cualquiera de los grupos definidos anteriormente. Ejemplos específicos son formilo, acetilo, propionilo, butirilo, pentanoilo, hexanoilo, heptanoilo, octanoilo, nonanoilo, decanoilo, benzoilo y similares.

"Opcionalmente sustituido" tal como se aplica a cualquier grupo significa que el grupo mencionado puede estar, si se desea, sustituido con uno o más sustituyentes, que pueden ser iguales o diferentes. "Alquilo opcionalmente sustituido" incluye tanto "alquilo" como "alquilo sustituido".

Los ejemplos de sustituyentes adecuados para restos "sustituidos" y "opcionalmente sustituidos" incluyen halo (fluoro, cloro, bromo o yodo), alquilo, cicloalquilo C₃₋₆, hidroxilo, alcoxilo C₁₋₆, ciano, amino, nitro, alquilamino C₁₋₆, alquenilamino C₂₋₆, di-alquilamino C₁₋₆, acilamino C₁₋₆, di-acilamino C₁₋₆, arilo C₁₋₆, arilamino C₁₋₆, aroilamino C₁₋₆, bencilamino, arilamido C₁₋₆, carboxilo, alcocarbonilo C₁₋₆ o (aril C₁₋₆)(alcoxi C₁₋₁₀)carbonilo, carbamoilo, mono-carbamoilo C₁₋₆, di-carbamoilo C₁₋₆ o cualquiera de los anteriores en el que un propio resto hidrocarbilo está sustituido con halo, ciano, hidroxilo, alcoxilo C₁₋₂, amino, nitro, carbamoilo, carboxilo o alcocarbonilo C₁₋₂. En grupos que contienen un átomo de oxígeno tal como hidroxilo y alcoxilo, el átomo de oxígeno puede reemplazarse por azufre para producir grupos tales como tio (SH) y tio-alquilo (S-alquilo). Por tanto, los sustituyentes opcionales incluyen grupos tales como S-metilo. En grupos tio-alquilo, el átomo de azufre puede oxidarse adicionalmente para producir un sulfóxido o una sulfona, y por tanto sustituyentes opcionales incluyen, por tanto, grupos tales como S(O)-alquilo y S(O)₂-alquilo.

La sustitución puede adoptar la forma de dobles enlaces, y puede incluir heteroátomos. Por tanto, un grupo alquilo con un carbonilo (C=O) en vez de un CH₂ puede considerarse un grupo alquilo sustituido.

Por tanto, los grupos sustituidos incluyen, por ejemplo, CFH₂, CF₂H, CF₃, CH₂NH₂, CH₂OH, CH₂CN, CH₂SCH₃, CH₂OCH₃, OMe, OEt, Me, Et, -OCH₂O-, CO₂Me, C(O)Me, *i*-Pr, SCF₃, SO₂Me, NMe₂, CONH₂, CONMe₂, etc. En el caso de grupos arilo, las sustituciones pueden ser en forma de anillos de átomos de carbono adyacentes en el anillo de arilo, por ejemplo acetales cíclicos tales como O-CH₂-O.

La invención se ilustra en las siguientes figuras:

Figura 1. Figura esquemática del ensayo de evaluación para determinar la potenciación de la función de producción de energía mitocondrial en células con inhibición del complejo I. Protocolo para evaluar los compuestos según la invención. En el ensayo, se reprime la función mitocondrial en células intactas con el inhibidor del complejo respiratorio I, rotenona. Se comparan candidatos a fármaco con sustratos endógenos (sin permeabilidad celular) antes y después de permeabilización de la membrana plasmática para evaluar la potenciación o inhibición bioenergética.

Figura 2. Figura esquemática del ensayo para determinar la potenciación e inhibición de la función de producción de energía mitocondrial en células intactas. Protocolo para evaluar la potencia de compuestos según la invención. En el ensayo, se estimula la actividad mitocondrial mediante el desacoplamiento de las mitocondrias con el protonóforo, FCCP. Se titulan los candidatos a fármaco para obtener el nivel de respiración convergente máxima (derivada del complejo I y el complejo II). Después de la adición de rotenona, se obtiene estimulación dependiente del complejo II. Se añade el inhibidor del complejo III, antimicina para evaluar el consumo de oxígeno no mitocondrial.

Figura 3. Figura esquemática del ensayo para determinar la prevención de acumulación de lactato en células expuestas a un inhibidor del complejo mitocondrial I. Protocolo para evaluar la potencia de compuestos según la

invencción. En el ensayo, se reprime la función mitocondrial en células intactas con el inhibidor del complejo respiratorio I, rotenona. A medida que las células pasan a glicólisis, se acumula lactato en el medio. Se comparan candidatos a fármaco con sustratos endógenos (sin permeabilidad celular) y una tasa disminuida de acumulación de lactato indica restauración de la producción de ATP mitocondrial.

5
 10
 15
 20
 25
 30

Figura 4. Figura de acumulación de lactato en un modelo de crisis metabólica aguda en cerdos. Acumulación de lactato en un modelo de crisis metabólica aguda en cerdos. En el modelo animal, se reprime la función mitocondrial mediante infusión del inhibidor del complejo respiratorio I, rotenona. A medida que las células pasan a glicólisis, se acumula lactato en el cuerpo. Se demuestran concentraciones de lactato arteriales medias para animales tratados con rotenona y vehículo a las tasas de infusión indicadas. Se evalúan candidatos a fármaco en animales tratados con rotenona y una tasa disminuida de acumulación de lactato indica restauración de la producción de ATP mitocondrial.

15
 20
 25
 30

Figura 5 Efecto de metformina sobre la respiración mitocondrial en plaquetas y células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas permeabilizadas. (a) Perfiles representativos de consumo de O_2 medido simultáneamente de PBMC permeabilizadas tratadas con metformina (1 mM, perfil negro) o vehículo (H_2O , perfil gris) evaluadas mediante la aplicación de adiciones secuenciales de sustratos e inhibidores específicos de complejo respiratorio. La fase de estabilización de los perfiles, perturbaciones debidas a la reoxigenación de la cámara y la administración del sustrato de complejo IV se han omitido (líneas discontinuas). Los recuadros por debajo de los periles establecen los complejos respiratorios utilizados para la respiración durante la oxidación de los sustratos dados, el complejo I (CI), el complejo II (CII) o ambos (CI + II), así como los estados respiratorios en las partes indicadas del protocolo. Se ilustran las tasas respiratorias en tres combinaciones diferentes de estados respiratorios y sustrato para las PBMC (b) y plaquetas (c) para las concentraciones del control (H_2O) y de metformina indicadas: la capacidad de fosforilación oxidativa soportada por los sustratos de complejo I (FOSOX_{CI}), el flujo máximo dependiente del complejo II a través del sistema de transporte de electrones (STE_{CII}) tras titulación del protonóforo, FCCP, y capacidad del complejo IV (CIV). Se representan los valores como la media \pm E.E.M. * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ y *** = $P < 0,001$ usando ANOVA de un factor con el método de comparaciones múltiples de Holm-Sidak, $n = 5$. FOSOX = fosforilación oxidativa. STE = sistema de transporte de electrones. ROX = concentración de oxígeno residual.

35
 40

Figura 6 Comparación de dosis-respuesta de la toxicidad presentada por metformina y fenformina sobre la capacidad respiratoria mitocondrial durante la fosforilación oxidativa soportada por sustratos vinculados al complejo I (FOSOX_{CI}) en plaquetas humanas permeabilizadas. Se presentan las tasas respiratorias como la media \pm E.E.M. y se aplicó un ajuste de curvas no lineal convencional para obtener los valores de concentración inhibitoria mitad de la máxima (CI₅₀) para metformina y fenformina. * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ y *** = $P < 0,001$ en comparación con el control usando ANOVA de un factor con el método de comparaciones múltiples de Holm-Sidak, $n = 5$.

45
 50

Figura 7 Efectos dependientes del tiempo y de la dosis de metformina sobre la respiración mitocondrial en plaquetas humanas intactas. (a) Se monitorizó la respiración rutinaria de plaquetas, es decir respiración de las células con suministro de su sustrato endógeno y demanda de ATP, durante 60 min de incubación de las concentraciones indicadas de metformina o vehículo (H_2O), que estuvo seguido por (b) la capacidad respiratoria máxima inducida mediante titulación del protonóforo, FCCP para determinar el flujo máximo a través del sistema de transporte de electrones (STE) de las células intactas. Se expresan los datos como la media \pm E.E.M., $n = 5$. * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ y *** = $P < 0,001$ usando ANOVA de un factor (b) y ANOVA de dos factores (a) con una prueba post-hoc de Holm-Sidak.

55
 60

Figura 8 Efecto de metformina y fenformina sobre la producción de lactato y el pH en suspensiones de plaquetas humanas intactas. Se incubaron plaquetas en solución salina tamponada con fosfato que contenía glucosa (10 mM) durante 8 h con cualquiera de metformina (10 mM, 1 mM), fenformina (0,5 mM), el inhibidor del complejo I, rotenona (2 μ M) o vehículo (DMSO, control). (a) Se determinaron los niveles de lactato cada 2 h ($n = 5$), y (b) se midió el pH cada 4 h ($n = 4$). Se expresan los datos como la media \pm E.E.M. * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ y *** = $P < 0,001$ usando ANOVA de dos factores con una prueba post-hoc de Holm-Sidak.

65

Figura 9 Se trataron trombocitos intactos humanos ($200 \cdot 10^6$ /ml) incubados en PBS que contenía glucosa 10 mM. (A) Se trataron células incubadas con metformina 10 mM con o bien succinato o bien NV118 en adiciones consecutivas de 250 μ M cada 30 minutos. Antes de la adición de NV118 a tiempo 0 h, se han incubado las células sólo con metformina o vehículo durante 1 h para establecer niveles de lactato iniciales iguales (datos no mostrados). Se tomaron muestras de las concentraciones de lactato cada 30 minutos. (B) Se calculó la producción de lactato con una regresión de ajuste no lineal y se calcularon los intervalos de confianza del 95% para las curvas de lactato en el tiempo. Las células incubadas con metformina tuvieron una producción de lactato significativamente mayor que el control, y las adiciones de succinato no cambiaron esto. La producción de lactato disminuyó significativamente cuando se añadió NV118 a las células incubadas con metformina. (C) La producción de lactato inducida por rotenona pudo atenuarse de manera similar mediante adiciones repetidas de NV118.

Figura 10 Se trataron trombocitos intactos humanos ($200 \cdot 10^6$ /ml) incubados en PBS que contenía glucosa 10 mM.

(A) Se trataron células incubadas con metformina 10 mM con o bien succinato o bien NV189 en adiciones consecutivas de 250 μ M cada 30 minutos. Antes de la adición de NV189 a tiempo 0 h, se han incubado las células sólo con metformina o vehículo durante 1 h para establecer niveles de lactato iniciales iguales (datos no mostrados). Se tomaron muestras de las concentraciones de lactato cada 30 minutos. (B) Se calculó la producción de lactato con una regresión de ajuste no lineal y se calcularon los intervalos de confianza del 95% para las curvas de lactato en el tiempo. Las células incubadas con metformina tuvieron una producción de lactato significativamente mayor que el control, y las adiciones de succinato no cambiaron esto. La producción de lactato disminuyó significativamente cuando se añadió NV189 a las células incubadas con metformina. (C) La producción de lactato inducida por rotenona pudo atenuarse de manera similar mediante adiciones repetidas de NV189. Cuando también se añadió antimicina, se suprimió el efecto de NV189 sobre el complejo 2 mediante el efecto inhibitor de antimicina sobre el complejo III.

Figura 11 Se trataron trombocitos intactos humanos ($200 \cdot 10^6$ /ml) incubados en PBS que contenía glucosa 10 mM. (A) Se trataron células incubadas con metformina 10 mM con o bien succinato o bien NV241 en adiciones consecutivas de 250 μ M cada 30 minutos. Antes de la adición de NV241 a tiempo 0 h, se han incubado las células sólo con metformina o vehículo durante 1 h para establecer niveles de lactato iniciales iguales (datos no mostrados). Se tomaron muestras de las concentraciones de lactato cada 30 minutos. (B) Se calculó la producción de lactato con una regresión de ajuste no lineal y se calcularon los intervalos de confianza del 95% para las curvas de lactato en el tiempo. Las células incubadas con metformina tuvieron una producción de lactato significativamente mayor que el control, y las adiciones de succinato no cambiaron esto. La producción de lactato disminuyó significativamente cuando se añadió NV241 a las células incubadas con metformina. (C) La producción de lactato inducida por rotenona pudo atenuarse de manera similar mediante adiciones repetidas de NV241.

Figura 12 Trombocitos ($200 \cdot 10^6$ /ml) incubados en PBS que contenía 10 mM de glucosa con toma de muestras de las concentraciones de lactato cada 30 minutos. (A) Durante 3 horas de incubación, se monitorizan las células tratadas o bien con rotenona (2 μ M) o bien con su vehículo para determinar un cambio en la concentración de lactato en medios a lo largo del tiempo. Además, se incubaron células con rotenona junto con NV189 y se monitorizaron células con rotenona, NV189 y el inhibidor del complejo III, antimicina (1 μ g/ml). Antes de la adición de NV189 a tiempo 0 h, se han incubado las células sólo con rotenona o vehículo durante 1 h para establecer niveles de lactato iniciales iguales (datos no mostrados). La rotenona aumenta la producción de lactato de las células, pero esto se devuelve a lo normal (misma pendiente de la curva) mediante coincubación con NV189 (en adiciones consecutivas de 250 μ M cada 30 minutos). Cuando también está presente antimicina, NV189 no puede funcionar a nivel del complejo II, y la producción de lactato aumenta de nuevo hasta el mismo nivel que únicamente con rotenona presente. (B) Puede inducirse una tasa de producción de lactato similar que con rotenona mediante incubación con metformina a una concentración de 10 mM.

Parte experimental

Métodos de biología generales

Un experto en la técnica podrá determinar la farmacocinética y biodisponibilidad del compuesto de la invención usando métodos *in vivo* e *in vitro* que conoce un experto en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a los descritos a continuación y en Gallant-Haidner *et al*, 2000 y Trepanier *et al*, 1998 y referencias en esos documentos. La biodisponibilidad de un compuesto está determinada por varios factores, (por ejemplo, solubilidad en agua, permeabilidad de membrana celular, la extensión de la unión a proteínas y metabolismo y estabilidad) cada uno de los cuales puede determinarse mediante pruebas *in vitro* tal como se describe en los ejemplos en el presente documento, un experto en la técnica apreciará que una mejora en uno o más de estos factores conducirá a una mejora en la biodisponibilidad de un compuesto. Alternativamente, la biodisponibilidad del compuesto de la invención puede medirse usando métodos *in vivo* tal como se describen con más detalle a continuación, o en los ejemplos en el presente documento.

Para medir la biodisponibilidad *in vivo*, puede administrarse un compuesto a un animal de prueba (por ejemplo, ratón o rata) tanto por vía intraperitoneal (i.p.) o por vía intravenosa (i.v.) como por vía oral (v.o.) y se extraen muestras de sangre a intervalos regulares para examinar cómo varía la concentración plasmática del fármaco a lo largo del tiempo. El transcurso temporal de la concentración plasmática a lo largo del tiempo puede usarse para calcular la biodisponibilidad absoluta del compuesto como porcentaje usando modelos convencionales. Un ejemplo de un protocolo típico se describe a continuación.

Por ejemplo, se les dosifica a ratones o ratas 1 ó 3 mg/kg del compuesto de la invención por vía i.v. o 1, 5 ó 10 mg/kg del compuesto de la invención por v.o. Se extraen muestras de sangre a intervalos de 5 min, 15 min, 1 h, 4 h y 24 h, y se determina la concentración del compuesto de la invención en la muestra mediante CL/EM-EM. El transcurso temporal de las concentraciones plasmáticas o en sangre completa puede usarse entonces para derivar parámetros clave tales como el área bajo la curva de concentración plasmática o en sangre-tiempo (AUC, que es directamente proporcional a la cantidad total de fármaco inalterado que alcanza la circulación sistémica), la concentración de fármaco en plasma o sangre máxima (pico), el tiempo en el que se produce la concentración de

fármaco en plasma o sangre máxima (tiempo pico), factores adicionales que se usan en la determinación precisa de la biodisponibilidad incluyen: la semivida terminal del compuesto, el aclaramiento corporal total, volumen de distribución en estado estacionario y % de F. Estos parámetros se analizan entonces mediante métodos no compartimentales o compartimentales para proporcionar una biodisponibilidad en porcentaje calculada, para un ejemplo de este tipo de método véanse Gallant-Haidner *et al*, 2000 y Trepanier *et al*, 1998, y referencias en esos documentos.

Puede someterse a prueba la eficacia del compuesto de la invención usando uno o más de los métodos descritos a continuación:

I. Ensayos para evaluar la potenciación e inhibición de la función de producción de energía mitocondrial en células intactas

Respirometría de alta resolución, A - método general

Se realiza la medición de respiración mitocondrial en un oxígrafo de alta resolución (Oxigraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) a una temperatura constante de 37°C. Se suspenden plaquetas humanas aisladas, glóbulos blancos, fibroblastos, fibras de músculo cardíaco humanas u otros tipos de célula que contienen mitocondrias vivas en una cámara de vidrio de 2 ml a una concentración suficiente para producir un consumo de oxígeno en el medio de $\geq 10 \text{ pmol O}_2 \text{ s}^{-1} \text{ ml}^{-1}$.

Respirometría de alta resolución - B (usada en estudios de lactato)

Se realizaron mediciones respirométricas en tiempo real usando oxígrafos de alta resolución (Oxigraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Las condiciones experimentales durante las mediciones fueron las siguientes: 37°C, 2 ml de volumen de cámara activa y 750 rpm de velocidad de agitador. Se mantuvieron las concentraciones de O_2 de cámara entre 200-50 μM con reoxigenación de la cámara durante los experimentos según fue apropiado (Sjövall *et al.*, 2013a). Para el registro de datos, se usaron las versiones 4 y 5 del software DatLab (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Los ajustes, calibración al día y correcciones de fondo instrumental se realizaron según las instrucciones del fabricante. Se realizaron mediciones respiratorias o bien en un tampón que contenía EGTA 0,5 mM, MgCl_2 3 mM, K-lactobionato 60 mM, taurina 20 mM, KH_2PO_4 10 mM, HEPES 20 mM, sacarosa 110 mM y albúmina sérica bovina 1 g/l (MiR05) o solución salina tamponada con fosfato (PBS) con glucosa (5 mM) y EGTA (5 mM), tal como se indica en las secciones correspondientes. Se corrigieron los valores respiratorios para el factor de solubilidad de oxígeno para ambos medios (0,92) (Pesta y Gnaiger, 2012). Se determinó la producción de lactato de plaquetas humanas intactas en PBS que contenía glucosa 10 mM. Se realizaron todas las mediciones a una concentración de plaquetas de 200×10^6 células por ml o una concentración de PBMC de 5×10^6 células por ml.

Evaluación de compuestos

Se utilizan cuatro protocolos de evaluación típicos en células intactas.

(1) Ensayo para determinar la potenciación de la función de producción de energía mitocondrial en células con inhibición del complejo respiratorio I

Se ponen las células en un tampón que contiene sacarosa 110 mM, HEPES 20 mM, taurina 20 mM, K-lactobionato 60 mM, MgCl_2 3 mM, KH_2PO_4 10 mM, EGTA 0,5 mM, BSA 1 g/l, pH 7,1. Después de establecerse la respiración inicial con sustratos endógenos, se inhibe el complejo I con rotenona 2 μM . Los compuestos disueltos en DMSO se titulan en un intervalo de 10 μM a 10 mM de concentración final. Posteriormente, se permeabilizan las membranas celulares con digitonina (1 $\text{mg}/1 \times 10^6$ plaq.) para permitir la entrada de sustrato energético liberado de manera extracelular o sustratos energéticos con impermeabilidad celular. Después de una respiración estabilizada, se añade succinato 10 mM como referencia para permitir la respiración de manera posterior al complejo I. Después de la respiración estabilizada, se termina el experimento mediante adición de antimicina a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se mide cualquier consumo de oxígeno no mitocondrial residual. Un aumento de la tasa respiratoria en el protocolo descrito está acoplado estrechamente a la síntesis de ATP mediante fosforilación oxidativa a menos que se desacoplen las células (es decir, fuga de protones sin producción de ATP). Se somete a prueba el desacoplamiento mediante adición del inhibidor de ATP sintasa, oligomicina (1-2 $\mu\text{g ml}^{-1}$) en un protocolo 3 en los que la extensión del desacoplamiento corresponde a la tasa respiratoria tras la adición de oligomicina.

(2) Ensayo para determinar la potenciación e inhibición de la función de producción de energía mitocondrial en células intactas

En el segundo protocolo, se usa el mismo tampón tal como se describió anteriormente. Después de establecerse la respiración basal, se añade el desacoplador mitocondrial, FCCP a una concentración de 2 nM para aumentar la demanda metabólica. Los compuestos disueltos en DMSO se titulan en varias etapas desde 10 μM hasta 10 mM de concentración final para evaluar el intervalo de concentración de la potenciación y/o inhibición de la respiración. Se

termina el experimento mediante adición de rotenona 2 μM para inhibir el complejo I, revelando utilización de sustrato restante de manera posterior a este complejo respiratorio, y 1 $\mu\text{g/ml}$ del inhibidor del complejo III, antimicina para medir el consumo de oxígeno no mitocondrial.

5 (3) *Ensayo para evaluar el desacoplamiento en células intactas*

En el tercer protocolo, se usa el mismo tampón tal como se describió anteriormente. Después de establecerse la respiración basal, se añade 1 mM de compuesto disuelto en DMSO. Posteriormente, se añade el inhibidor de ATP-sintasa, oligomicina. Una reducción de la respiración es una medida de qué cantidad del consumo de oxígeno está acoplado a la síntesis de ATP. Ninguna reducción, o únicamente una ligera, indica que el compuesto induce una fuga de protones a lo largo de la membrana mitocondrial interna. Entonces se titula el desacoplador FCCP para inducir una respiración desacoplada máxima. Entonces se añade rotenona (2 μM) para inhibir el complejo I, revelando utilización de sustrato restante de manera posterior a este complejo respiratorio. Se termina el experimento mediante adición de 1 $\mu\text{g/ml}$ del inhibidor del complejo III, antimicina para medir el consumo de oxígeno no mitocondrial.

(4) *Ensayo para determinar la potenciación de la función de producción de energía mitocondrial en células con inhibición del complejo respiratorio I en plasma humano*

20 Se incuban células intactas sanguíneas humanas en plasma del mismo donante. Después de establecerse la respiración inicial con sustratos endógenos, se inhibe el complejo I con rotenona 2 μM . Los compuestos disueltos en DMSO se titulan en un intervalo de 10 μM a 10 mM de concentración final. Se termina el experimento mediante adición de antimicina a una concentración final 1 $\mu\text{g/ml}$ y se mide cualquier consumo de oxígeno no mitocondrial residual.

25 *Propiedades del compuesto deseado en ensayos de respiración*

El compuesto ideal estimula la respiración en los protocolos descritos en células intactas a baja concentración sin efecto inhibitorio sobre o bien la respiración estimulada por succinato después de la permeabilización en el protocolo 1 o bien la respiración endógena en el protocolo 2. El intervalo de concentración entre el efecto estimulador máximo y la inhibición debe ser tan amplio como sea posible. Después de la inhibición de la respiración con toxinas mitocondriales en o de manera anterior al complejo III, debe detenerse la respiración. Remítase a la figura 1 y el listado a continuación.

35 Propiedades deseadas de los compuestos:

• valor máximo de a alcanzó una baja concentración de fármaco.

40 • a sustancialmente mayor que a'

• a se aproxima b'

• c se aproxima c'

45 • d se aproxima d'

Se identifican compuestos impermeables para la membrana celular en el ensayo como:

50 • a se aproxima a'

El consumo de oxígeno no mitocondrial inducido por el candidato a fármaco se identifica cuando

• d mayor que d'

55 *II. Ensayo para determinar la prevención de acumulación de lactato en células expuestas a un inhibidor del complejo mitocondrial I*

Se incuban plaquetas humanas intactas, glóbulos blancos, fibroblastos, u otros tipos de célula que contienen mitocondrias vivas en solución salina tamponada con fosfato que contiene glucosa 10 mM durante 8 h con cualquiera de los fármacos inhibidores del complejo I, metformina (10 mM), fenformina (0,5 mM) o rotenona (2 μM). La inhibición de la producción de ATP mitocondrial a través de la fosforilación oxidativa mediante estos compuestos aumenta la acumulación de lactato mediante glicólisis. Se determinan los niveles de lactato cada 2 h (o de manera más frecuente, por ejemplo, cada 30 min) usando el medidor de prueba de lactato en sangre Lactate Pro™ 2 (Arkray, Alere AB, Lidköping, Suecia) o tipos similares de mediciones. Se realiza la incubación a 37°C. Se mide el pH al inicio, después de 4 y después de 8 h (o más frecuentemente) de incubación usando un pHmetro convencional, por

ejemplo PHM210 (Radiometer, Copenhagen, Dinamarca). Se añaden candidatos a fármaco al ensayo desde el inicio o tras 30-60 min a concentraciones dentro del intervalo 10 μ M - 5 mM. Se compara la prevención de acumulación de lactato con experimentos paralelos únicamente con vehículo de compuesto, normalmente DMSO. Para evaluar la especificidad del candidato a fármaco, también se somete a prueba en combinación con un inhibidor de la respiración posterior tal como el inhibidor del complejo III, antimicina a 1 μ g/ml, que debe suprimir el efecto del candidato a fármaco y restaurar la producción de lactato. Por tanto, el uso de antimicina también es un control para efectos indebidos de los candidatos a fármaco sobre la capacidad de producción de lactato de las células usadas en el ensayo. (Véanse, por ejemplo, las figuras 9, 10 y 11).

10 *Análisis de datos*

Se realizó un análisis estadístico usando software Graph Pad PRISM (software GraphPad versión 6.03, La Jolla, California, EE.UU.). Todos los datos respiratorios, de lactato y pH se expresan como la media \pm E.E.M. Se representan gráficamente las razones como datos individuales y medias. Se usó ANOVA de un factor para la comparación unifactorial de tres o más grupos (concentración de fármacos) y se usó ANOVA de modelo mixto de dos factores para la comparación bifactorial (tiempo y concentración de fármacos/tratamiento) de tres o más grupos. Se realizaron pruebas *post-hoc* para compensar las comparaciones múltiples según Holm-Sidak. Se expresaron las correlaciones como valores de r^2 y P. Se aplicó ajuste de curvas no lineal convencional para calcular los valores de concentración inhibidora mitad de la máxima (CI₅₀). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos para P < 0,05.

Propiedades del compuesto deseado en el ensayo de acumulación celular de lactato

(1) El compuesto ideal impide la acumulación de lactato inducida por la inhibición del complejo I, es decir la acumulación de lactato se aproxima a una tasa similar que en las células sin inhibición del complejo I. (2) La prevención de acumulación de lactato se suprime por un inhibidor respiratorio posterior tal como antimicina.

30 *III. Ensayo para determinar la prevención de acumulación de lactato e inhibición energética en un modelo de crisis metabólica aguda en cerdos*

Los candidatos a fármaco principales se someterán a prueba en un modelo de prueba de concepto *in vivo* de crisis metabólica debida a disfunción mitocondrial en el complejo I. El modelo imita graves estados que pueden aparecer en niños con mutaciones genéticas en el complejo mitocondrial I o pacientes tratados y con sobredosis de medicamentos usados clínicamente tales como metformina, que inhibe el complejo I cuando se acumula en células y tejidos.

Se usan cerdos de raza Landrace hembra en el estudio. Se anestesian, se llevan a cirugía en la que se colocan catéteres para las infusiones y actividades de monitorización. Se induce una crisis metabólica mediante infusión del inhibidor del complejo mitocondrial I, rotenona a una tasa de 0,25 mg/kg/h durante 3 h seguido por 0,5 mg/kg/h infundido durante una hora (vehículo que consiste en el 25% de NMP/ el 4% de polisorbato 80/ el 71% de agua). Se miden parámetros cardiovasculares tales como presión sanguínea arterial de manera continua a través de un catéter colocado en la arteria femoral. Se mide el gasto cardíaco (GC) y se registra cada 15 minutos mediante termodilución, y se registra la presión de la arteria pulmonar (AP, sistólica y diastólica), presión venosa central (PVC) y SvO₂ cada 15 min y la presión capilar pulmonar (PCP) cada 30 min desde un catéter de Swan-Ganz. Se realiza calorimetría indirecta, por ejemplo, por medio de una opción de equipo Quark RMR ICU (Cosmed, Roma, Italia). Se determinan los electrolitos y la gasometría en sangre tanto arterial como venosa extraída de la arteria femoral y catéteres de Swan-Ganz y se analizan con el uso de un analizador para gasometría ABL725 (Radiometer Medical Aps, Brønshøj, Dinamarca). Los análisis incluyen pH, BE, hemoglobina, HCO₃ pO₂, pCO₂, K⁺, Na⁺, glucosa y lactato.

Propiedades del compuesto deseado en un modelo de prueba de concepto in vivo de crisis metabólica

El compuesto ideal debe reducir la acumulación de lactato y disminución de pH en cerdos con crisis metabólica inducida mediante inhibición del complejo I. La disminución del gasto de energía tras la inhibición del complejo I debe atenuarse. El compuesto no debe inducir ningún efecto negativo manifiesto tal como se mide mediante análisis de sangre y hemodinámicos.

Método de metabolómica

Se extraen glóbulos blancos o plaquetas mediante métodos convencionales y se suspenden en un MiR05, un tampón que contiene sacarosa 110 mM, HEPES 20 mM, taurina 20 mM, K-lactobionato 60 mM, MgCl₂ 3 mM, KH₂PO₄ 10 mM, EGTA 0,5 mM, BSA 1 g/l, con o sin glucosa 5 mM, pH 7,1. Se incubaba la muestra con agitación en un oxígrafo de alta resolución (Oxigraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) a una temperatura constante de 37°C.

Después de 10 minutos, se añade rotenona en DMSO (2 μ M) y se continúa con la incubación. Tras unos 5 minutos

más, se añade el compuesto de prueba en DMSO, opcionalmente con compuesto de prueba adicional después y un periodo de incubación adicional. Durante la incubación, se mide el consumo de O₂ en tiempo real.

5 Al final de la incubación, se recogen las células mediante centrifugación y se lavan en disolución de manitol al 5% y se extraen en metanol. Se añade una disolución acuosa que contiene patrón interno y se trata la disolución resultante mediante centrifugación en un tubo de microcentrífuga adecuado con un filtro.

10 Se seca al vacío el filtrado resultante antes del análisis mediante CE-MS para cuantificar diversos metabolitos primarios mediante el método de Ooga *et al* (2011) y Ohashi *et al* (2008).

15 En particular, se evalúan los niveles de metabolito en el ciclo de TCA y glicólisis para determinar el impacto de los compuestos de la invención.

Ooga *et al*, *Metabolomic anatomy of an animal model revealing homeostatic imbalances in dislipidaemia*, *Molecular Biosystems*, 2011, 7, 1217-1223

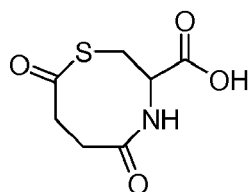
Ohashi *et al*, *Molecular Biosystems*, 2008, 4, 135-147

20 Materiales

A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos usados en los ejemplos a continuación se obtienen de fuentes comerciales.

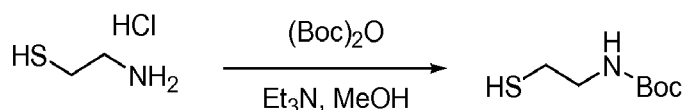
25 Ejemplos

Ejemplo 1

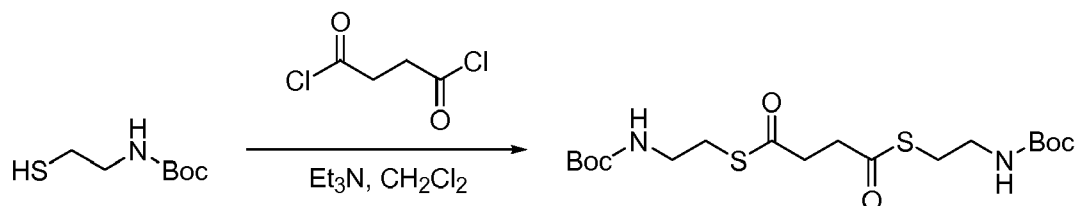


30 Se disuelven cloruro de succinilo (0,1 mol) y trietilamina (0,4 mol) en DCM y se añade cisteína. Se agita la reacción a temperatura ambiente. Se añade la reacción a ácido clorhídrico diluido acuoso y, entonces se lava con agua y salmuera. Se secan las fases orgánicas sobre sulfato de magnesio y se reducen al vacío. El compuesto objetivo se purifica mediante cromatografía en gel de sílice.

35 Ejemplo 2 - Síntesis de S,S-butanobis(tioato) de bis(2-propionamidoetilo) (NV038. 01-038)

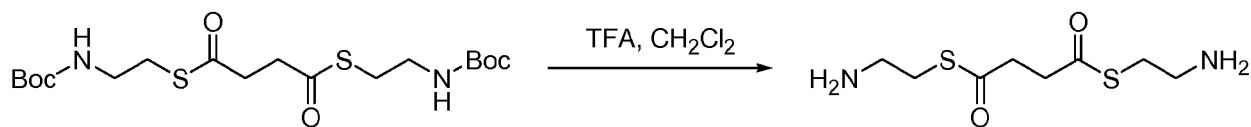


40 A una disolución de clorhidrato de cisteamina (5,0 g, 44 mmol) en CH₃OH (50 ml) se le añadió Et₃N (4,4 g, 44 mmol), seguido por (Boc)₂O (10,5 g, 48,4 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h. Se concentró al vacío la mezcla de reacción. Se disolvió el residuo obtenido en CH₂Cl₂, se lavó con disolución acuosa de HCl 2 M y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó produciendo 2-mercaptoetilcarbamato de terc-butilo como un aceite incoloro que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

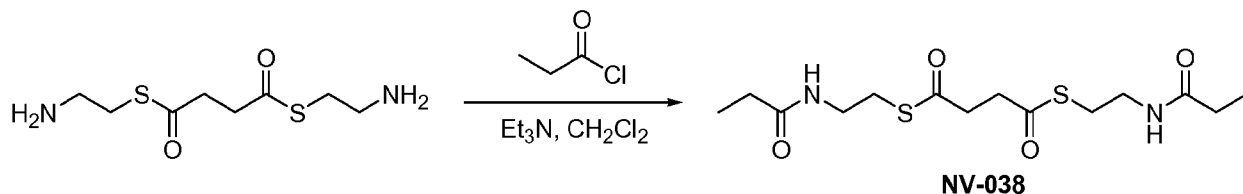


45 Se disolvieron 2-mercaptoetilcarbamato de terc-butilo (9,8 g, 55,0 mmol) y Et₃N (5,6 g, 55,0 mmol) en CH₂Cl₂ (100 ml), se enfrió la mezcla hasta 0°C, se añadió gota a gota cloruro de succinilo (2,1 g, 13,8 mmol), entonces se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (éter de petróleo/EtOAc = de 1/10 a 1/1). Se obtuvo S,S-butanobis(tioato) de bis(2-(terc-butoxicarbonilamino)etilo) como un sólido blanco.

50

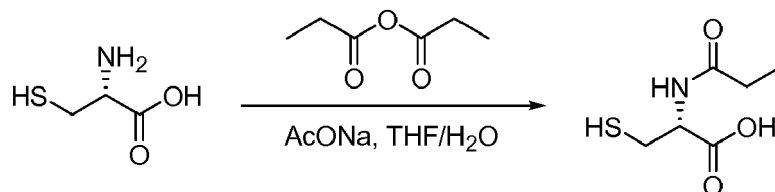


5 Se agitó una mezcla de S,S-butanobis(tioato) de bis(2-(terc-butoxicarbonilamino)etilo) (2,0 g, 4,58 mmol) y TFA (10 ml) en CH₂Cl₂ (10 ml) a temperatura ambiente durante 4 horas. Se concentró la mezcla de reacción produciendo S,S-butanobis(tioato) de bis(2-aminoetilo) como un aceite amarillo que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.



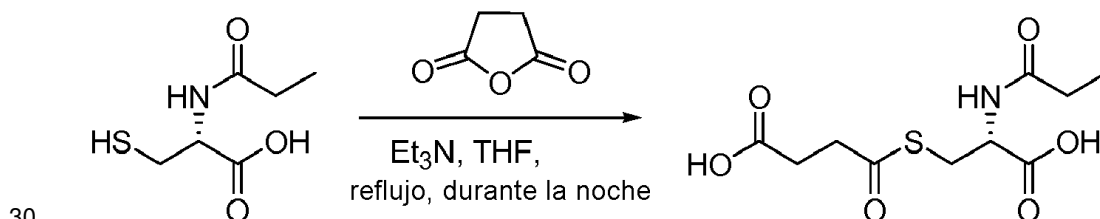
10 Se disolvieron S,S-butanobis(tioato) de bis(2-aminoetilo) (1,1 g, 4,58 mmol) y Et₃N (1,4 g, 13,74 mmol) en CH₂Cl₂ (15 ml), se enfrió la mezcla hasta 0°C, se añadió gota a gota cloruro de propionilo (0,9 g, 10,07 mmol). Entonces se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 3 horas. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó el residuo mediante CCF preparativa (CH₂Cl₂/MeOH=15/1). Se obtuvo S,S-butanobis(tioato) de bis(2-propionamidoetilo) como un sólido blanco.

15 Ejemplo 3 - Síntesis de ácido (R)-4-(2-carboxi-2-propionamidoetiltilio)-4-oxobutanoico (NV-041, 01-041)



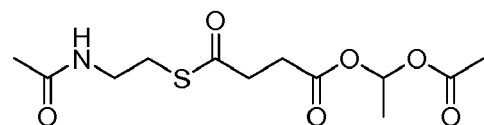
20 L-cisteína

A una mezcla de L-cisteína (2,00 g, 16,5 mmol) en THF/H₂O (8 ml/2 ml) se le añadió NaOAc (2,70 g, 33,0 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 20 min. Se enfrió la reacción hasta 5°C antes de añadirse gota a gota anhídrido propiónico (2,30 g, 17,6 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche y, entonces se calentó a reflujo durante 4 horas. Se enfrió la mezcla de reacción y se acidificó hasta pH 5 mediante adición de HCl 4 N. Se evaporó la disolución resultante a presión reducida para eliminar THF. Se purificó el residuo mediante HPLC prep. (eluyendo con H₂O (TFA al 0,05%) y CH₃CN) dando 1,00 g de ácido (R)-3-mercapto-2-propionamidopropanoico como un aceite incoloro.



30 Se calentó una disolución de ácido (R)-3-mercapto-2-propionamidopropanoico (1,00 g, 5,65 mmol), anhídrido succínico (565 mg, 5,65 mmol) y Et₃N (572 mg, 5,65 mmol) en 10 ml de THF a reflujo durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó el residuo mediante HPLC preparativa (eluyendo con H₂O (TFA al 0,05%) y CH₃CN) produciendo ácido (R)-4-(2-carboxi-2-propionamidoetiltilio)-4-oxobutanoico como un aceite incoloro.

35 Ejemplo 4



40

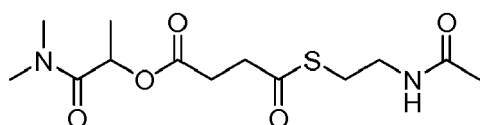
Etapa 1

Se añade trietilamina (0,24 mol) a una disolución de N-acetilcisteamina (0,2 mol) en DCM. Se añade gota a gota ácido 4-cloro-4-oxobutanoico (0,1 mol), y se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Se añade la mezcla a ácido clorhídrico diluido acuoso y se extrae con acetato de etilo, y, entonces se lava con agua y salmuera. Se secan las fases orgánicas sobre sulfato de magnesio y se reducen al vacío.

Etapa 2

Se suspenden el producto de la etapa 3 (0,1 mol), éster 1-bromoetilico del ácido acético (0,1 mol) y carbonato de cesio (0,12 mol) en DMF y se agitan a 60°C bajo una atmósfera inerte. Se permite que se enfríe la suspensión hasta temperatura ambiente y se añade acetato de etilo y se lava sucesivamente con ácido clorhídrico diluido acuoso y agua. Se secan las fases orgánicas sobre sulfato de magnesio y se reducen al vacío. Se purifica el residuo mediante cromatografía en columna.

Ejemplo 5



Etapa 1

Se añade trietilamina (0,24 mol) a una disolución de N-acetilcisteamina (0,2 mol) en DCM. Se añade gota a gota ácido 4-cloro-4-oxobutanoico (0,1 mol), y se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Se añade la mezcla a ácido clorhídrico diluido acuoso y se extrae con acetato de etilo, y, entonces se lava con agua y salmuera. Se secan las fases orgánicas sobre sulfato de magnesio y se reducen al vacío.

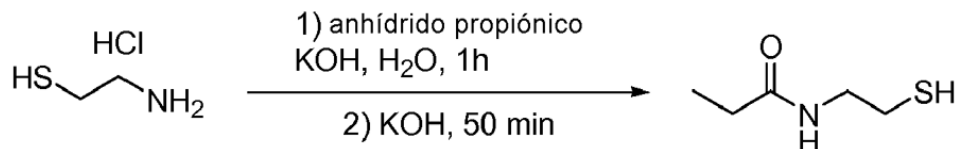
Etapa 2

Se diluyen dimetilamina (0,1 mol) y trietilamina (0,1 mol) en diclorometano, se enfría la disolución hasta 0°C y se añade 2-cloruro de cloropropionilo (0,1 mol) en DCM y se permite que se caliente la disolución hasta temperatura ambiente y se deja agitar bajo una atmósfera inerte. Se lava la disolución con agua. Se combinan las fases orgánicas y se eliminan los componentes volátiles al vacío. Se purifica el residuo mediante cromatografía en gel de sílice.

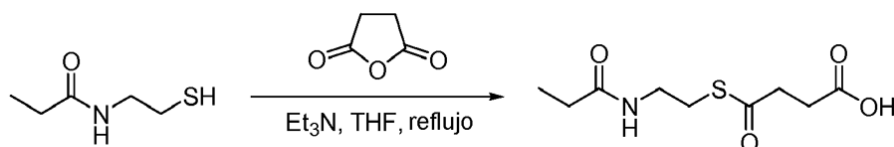
Etapa 3

Se suspenden 2-cloro-N,N-dimetil-propionamida (0,1 mol), el producto de la etapa 1 (0,1 mol), carbonato de cesio (0,1 mol) y yoduro de sodio (0,01 mol) en DMF y se agita la suspensión a 80°C bajo una atmósfera inerte. Se enfría la suspensión hasta temperatura ambiente, se diluye con acetato de etilo y se lava con agua. Se reducen las fases orgánicas al vacío. Se purifica el residuo mediante cromatografía en gel de sílice produciendo el compuesto objetivo.

Ejemplo 6 - Síntesis de ácido 4-oxo-4-(2-propionamidoetil)butanoico (NV114, 01-114)



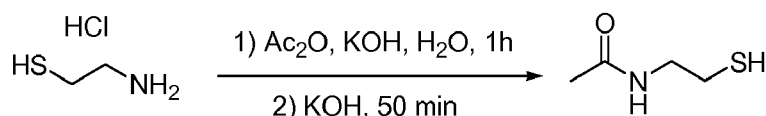
Se añadieron gota a gota anhídrido propiónico (11,7 g, 89,7 mmol) y KOH acuoso (8 M, para mantener un pH=8) a una disolución con agitación de clorhidrato de cisteamina (3,40 g, 30,0 mmol) en 24 ml de agua. Se neutralizó la mezcla mediante adición de HCl 2 N y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se enfrió la disolución con un baño de hielo y se añadió lentamente KOH sólido (6,00 g, 105 mmol). Se agitó la mezcla durante 50 minutos a temperatura ambiente. Después de saturarse con NaCl y neutralizarse con HCl 6 N, se extrajo la mezcla con CH₂Cl₂ (4 x 30 ml). Se secaron (Na₂SO₄) los extractos de CH₂Cl₂ combinados y se concentraron al vacío dando N-(2-mercaptoetil)propionamida como un aceite incoloro, que se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.



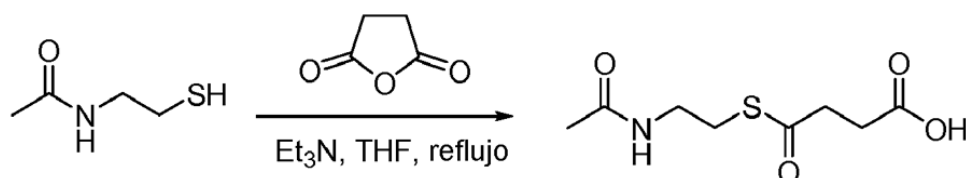
Se calentó a reflujo una disolución de N-(2-mercaptoetil)propionamida (2,00 g, 15,0 mmol), anhídrido succínico (1,50 g, 15,0 mmol) y Et₃N (1,50 g, 15,0 mmol) en 20 ml de THF durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó el residuo mediante HPLC preparativa (eluyendo con H₂O (TFA al 0,05%) y CH₃CN) produciendo ácido 4-oxo-4-(2-propionamidoetil)butanoico como un aceite incoloro.

Ejemplo 7 - Síntesis de ácido 4-(2-acetamidoetil)tiol-4-oxobutanoico (NV108, 01-108)

Este ejemplo no es según la invención.

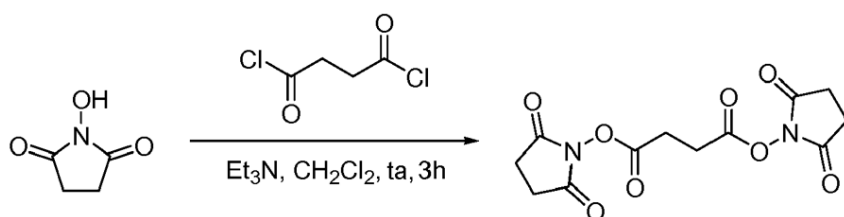


Se añadieron gota a gota anhídrido acético (8,48 ml, 90,0 mmol) y KOH acuoso (8 M, para mantener un pH=8) a una disolución con agitación de clorhidrato de cisteamina (3,40 g, 30,0 mmol) en 24 ml de agua. Entonces se ajustó el pH a 7 con adición de HCl 2 N. Se agitó la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente, y entonces se enfrió la disolución con un baño de hielo. A la disolución anterior, se le añadió lentamente KOH sólido (6,0 g, 105 mmol), y se agitó la mezcla resultante durante 50 minutos a temperatura ambiente. Después de saturarse con NaCl y neutralizarse con HCl 6 N, se extrajo la mezcla con CH₂Cl₂ (4 x 30 ml). Se secaron (Na₂SO₄) los extractos de CH₂Cl₂ combinados y se concentraron al vacío dando N-(2-mercaptoetil)acetamida como un aceite incoloro, que se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

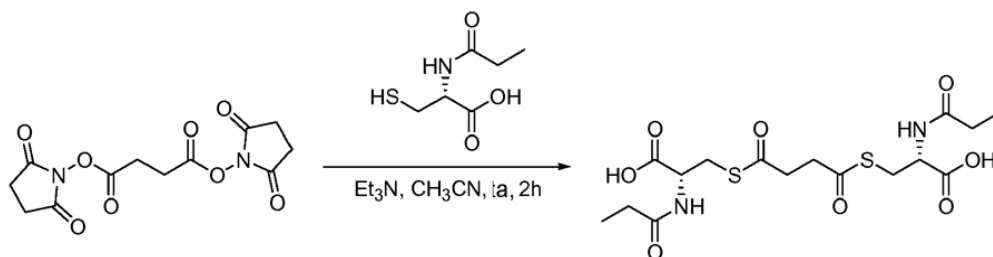


Se calentó a reflujo una disolución de N-(2-mercaptoetil)acetamida (1,50 g, 12,7 mmol), anhídrido succínico (1,3 g, 12,7 mmol) y Et₃N (1,3 g, 12,7 mmol) en 20 ml de THF durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó el residuo mediante HPLC preparativa (eluyendo con H₂O (TFA al 0,05%) y CH₃CN) produciendo ácido 4-(2-acetamidoetil)tiol-4-oxobutanoico como un aceite incoloro.

Ejemplo 8 - La síntesis de ácido (R)-3-(4-((R)-2-carboxi-2-propionamidoetil)tiol)-4-oxobutanil)tiol-2-propionamidopropanoico (NV099, 01-099)



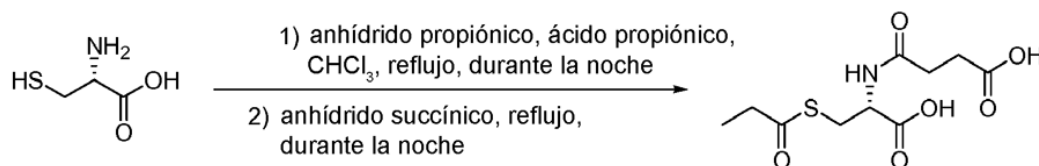
A una mezcla de N-hidroxisuccinimida (3,00 g, 26,1 mmol) y Et₃N (3,20 g, 31,3 mmol) en CH₂Cl₂ (60 ml) se le añadió gota a gota cloruro de succinilo (2,00 g, 13,0 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 3 horas antes de diluirse con agua (60 ml). Se filtró la suspensión resultante, se lavó con agua y CH₂Cl₂. Se recogió la torta y se secó dando succinato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) como un sólido gris.



Se agitó una mezcla de N-(2-mercaptoetil)propionamida (400 mg, 2,26 mmol), succinato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (353 mg, 1,13 mmol) y TEA (286 mg, 2,83 mmol) en 3,0 ml de CH₃CN a temperatura ambiente durante 2 horas.

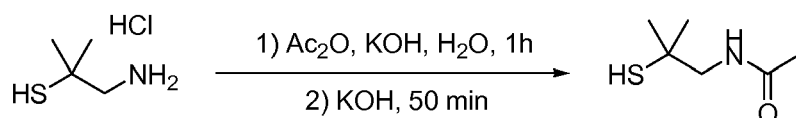
Se purificó la disolución de reacción transparente mediante HPLC preparativa (eluyendo con H₂O (TFA al 0,05%) y CH₃CN) produciendo directamente ácido (R)-3-(4-((R)-2-carboxi-2-propionamidoetilto)-4-oxobutanoylto)-2-propionamidopropanoico como un aceite incoloro.

5 Ejemplo 9 - Síntesis de ácido (R)-4-(1-carboxi-2-(propioniltio)etilamino)-4-oxobutanoico (NV122, 01-122)

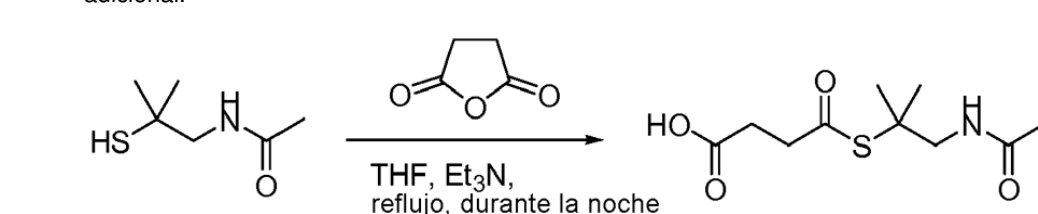


10 A una mezcla de ácido (R)-3-mercapto-2-propionamidopropanoico (1,00 g, 8,25 mmol) y ácido propiónico (1,0 ml) en CHCl₃ (10 ml) se le añadió anhídrido propiónico (1,13 g, 8,67 mmol) gota a gota. Se calentó la mezcla de reacción hasta reflujo durante la noche. Se enfrió la mezcla de reacción y se añadió anhídrido succínico (1,00 g, 9,99 mmol). Se mantuvo la mezcla a reflujo durante la noche antes de concentrarse a presión reducida. Se purificó el residuo mediante HPLC prep. (eluyendo con H₂O (TFA al 0,05%) y CH₃CN) produciendo ácido (R)-4-(1-carboxi-2-(propioniltio)etilamino)-4-oxobutanoico como un sólido blanquecino.

15 Ejemplo 10 - La síntesis de ácido 4-(1-acetamido-2-metilpropan-2-iltio)-4-oxobutanoico (NV188, 01-188)

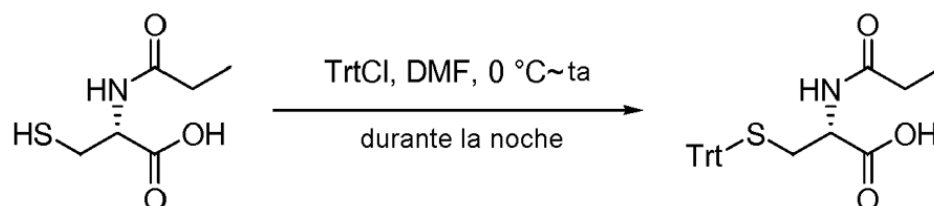


20 A una disolución con agitación de clorhidrato de cisteamina (2,00 g, 14,1 mmol) en 15 ml de agua se le añadió gota a gota anhídrido acético (4,30 g, 42,4 mmol) y KOH acuoso (8 M, para mantener un pH=8). Entonces se neutralizó la mezcla mediante adición de HCl 2 N y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. A la disolución enfriada con un baño de hielo se le añadió lentamente KOH sólido (2,80 g, 49,4 mmol) y se agitó la mezcla durante 50 minutos a temperatura ambiente. Después de saturarse con NaCl y neutralizarse con HCl 6 N, se extrajo la mezcla con CH₂Cl₂ dos veces. Se secaron (Na₂SO₄) los extractos de CH₂Cl₂ combinados y se concentraron al vacío produciendo N-(2-mercapto-2-metilpropil)acetamida como un sólido blanco que se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.



30 Se calentó a reflujo una disolución de N-(2-mercapto-2-metilpropil)acetamida (400 mg, 2,72 mmol), anhídrido succínico (326 mg, 3,26 mmol) y Et₃N (330 mg, 3,26 mmol) en 6 ml de THF durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó el residuo mediante HPLC preparativa (eluyendo con H₂O (TFA al 0,05%) y CH₃CN) produciendo ácido 4-(1-acetamido-2-metilpropan-2-iltio)-4-oxobutanoico como un aceite amarillo.

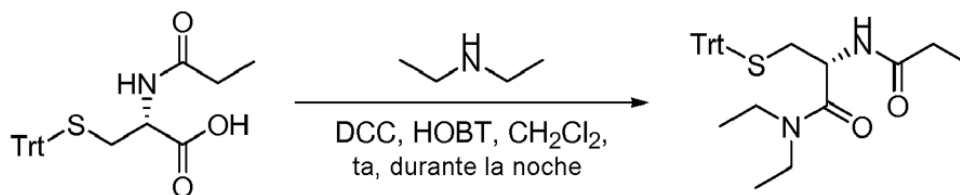
35 Ejemplo 11 - La síntesis de S,S-butanobis(tioato) de bis((R)-3-(dietilamino)-3-oxo-2-propionamidopropilo) (NV185, 01-185)



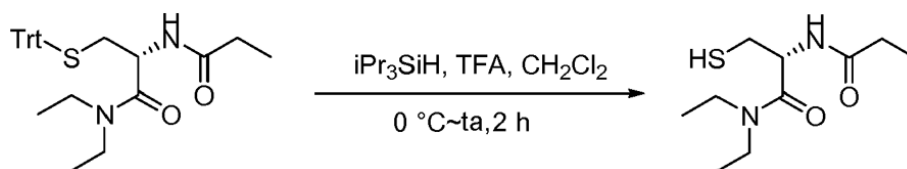
40 A una disolución de ácido (R)-3-mercapto-2-propionamidopropanoico (5,00 g, 28,0 mmol) en DMF (50 ml) se le añadió cloruro de trifenilmetilo (8,70 g, 31,0 mmol) a 0°C. Se agitó la mezcla a 0°C durante 30 min y, entonces se calentó hasta temperatura ambiente durante la noche. Se trató la mezcla con agua y se extrajo con EtOAc dos veces. Se lavaron con salmuera las fases orgánicas combinadas, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂ / MeOH =

45

80/1~50/1) produciendo ácido (*R*)-2-propionamido-3-(trilitio)propanoico como un sólido blanco.

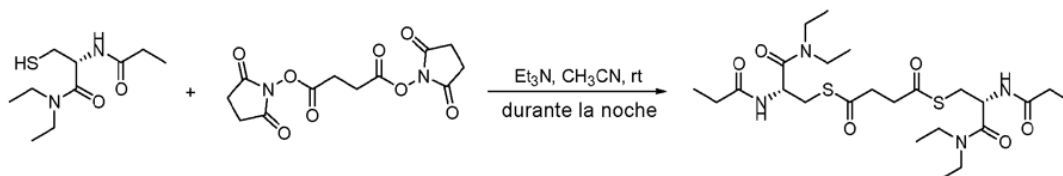


5 A una disolución con agitación de ácido (*R*)-2-propionamido-3-(trilitio)propanoico (1,7 g, 4,0 mmol) en CH₂Cl₂ (50 ml) se le añadió DCC (1,7 g, 8,0 mmol) y HOBT (0,50 g, 4,0 mmol) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h y, entonces se añadió dietilamina (0,80 g, 8,0 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se lavó la mezcla con agua, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida dando el producto en bruto que se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc / éter de petróleo = 1/6~1/1) produciendo (*R*)-*N,N*-dietil-3-mercapto-2-propionamidopropanamida como un aceite amarillo.



15 A una disolución de (*R*)-*N,N*-dietil-3-mercapto-2-propionamidopropanamida (400 mg, 0,800 mmol) en CH₂Cl₂ (10 ml) a 0°C se le añadió TFA (1 ml) e i-Pr₃SiH (253 mg, 1,60 mmol). Se calentó la mezcla hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. Se evaporó la disolución a presión reducida. Se purificó el residuo mediante HPLC preparativa (eluyendo con H₂O (TFA al 0,5%) y CH₃CN) produciendo (*R*)-*N,N*-dietil-3-mercapto-2-propionamidopropanamida como un aceite amarillo.

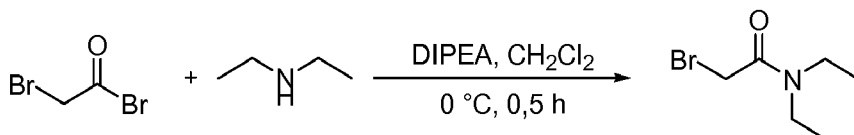
20



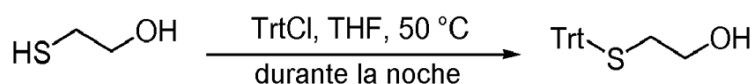
25 Se agitó una mezcla de (*R*)-*N,N*-dietil-3-mercapto-2-propionamidopropanamida (150 mg, 0,600 mmol), Et₃N (242 mg, 2,40 mmol) y succinato de bis(2,5-dioxopiperidin-1-ilo) (94 mg, 0,30 mmol) en CH₃CN (100 ml) a temperatura ambiente durante la noche. Se evaporó la mezcla a presión reducida. Se purificó el residuo mediante HPLC preparativa (eluyendo con H₂O (TFA al 0,5%) y CH₃CN) produciendo *S,S*-butanobis(tioato) de bis((*R*)-3-(dietilamino)-3-oxo-2-propionamidopropilo) (rendimiento del 36%) como un sólido amarillo.

30 Ejemplo 12 - La síntesis de ácido 4-(2-(2-(dietilamino)-2-oxoetoxi)etilthio)-4-oxobutanoico (NV193, 01-193).

35



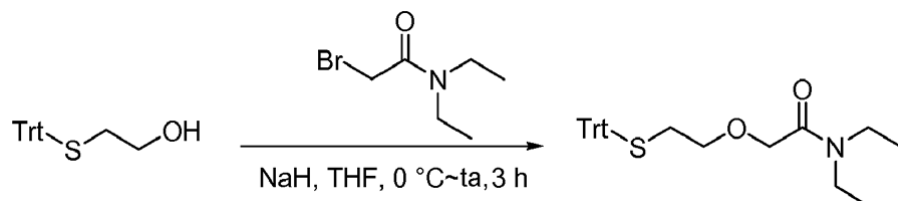
A una disolución de bromuro de 2-bromoacetilo (4,00 g, 20,0 mmol) y DIPEA (2,60 g, 20 mmol) en CH₂Cl₂ (50 ml) se añadió gota a gota dietilamina (1,60 g, 20,0 mmol) a 0°C. Se agitó la mezcla a 0°C durante 30 min. Se evaporó la disolución a presión reducida para eliminar CH₂Cl₂. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc/éter de petróleo = 1/5~1/2) produciendo 2-bromo-*N,N*-dietilacetamida como un aceite amarillo.



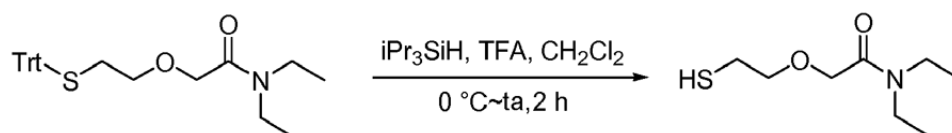
2-mercaptoetanol

40 Se calentó a reflujo una disolución de 2-mercaptoetanol (2,50 g, 32,0 mmol), cloruro de trifetilmetilo (10,7 g, 38,4 mmol) en 100 ml de THF durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc / éter de petróleo = 1/5~1/1) produciendo 2-(2,2,2-

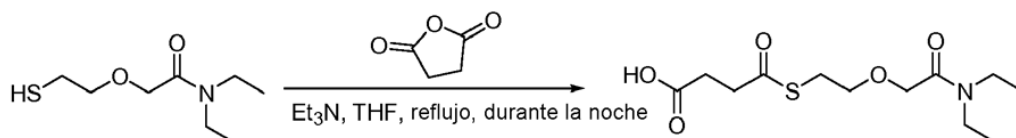
trifeniletilitio)etanol como un sólido blanco.



- 5 A una disolución de 2-(2,2,2-trifeniletilitio)etanol (3,50 g, 10,9 mmol) en THF (30 ml) se le añadió NaH (0,500 g, 13,0 mmol, al 60% en aceite) en porciones a 0°C. Se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 1 hora. Entonces se añadió gota a gota una disolución de 2-bromo-*N,N*-dietilacetamida (2,1 g, 10,9 mmol) en THF (5 ml). Se calentó la mezcla resultante hasta temperatura ambiente a lo largo de 2 horas. Se extinguió la mezcla con agua y se extrajo con EtOAc dos veces. Se lavaron con salmuera las fases orgánicas combinadas, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc/éter de petróleo = 1/5~1/2) produciendo *N,N*-dietil-2-(2-(trifluoromethylthio)eto)acetamida como un sólido blanco.

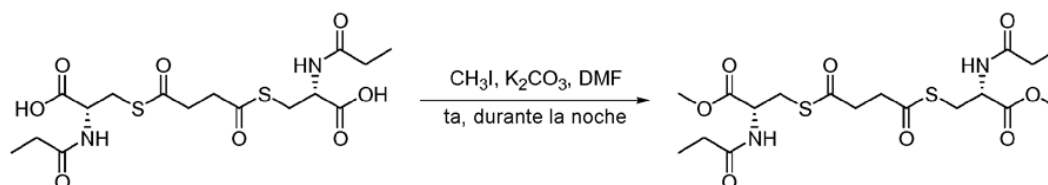


- 15 A una disolución de *N,N*-dietil-2-(2-(trifluoromethylthio)eto)acetamida (2,70 g, 6,30 mmol) en CH₂Cl₂ (20 ml) se le añadió TFA (2 ml) e *i*-Pr₃SiH (2,00 g, 12,6 mmol) a 0°C. Se calentó la mezcla hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. Se evaporó la disolución a presión reducida para eliminar CH₂Cl₂. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc / éter de petróleo = 1/5~1/1) produciendo *N,N*-dietil-2-(2-mercaptoeto)acetamida como un aceite incoloro.



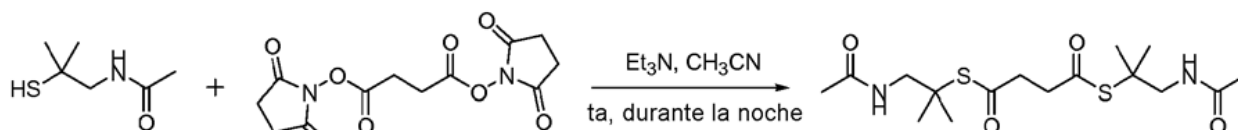
- 25 Se agitó a reflujo una disolución de *N,N*-dietil-2-(2-mercaptoeto)acetamida (356 mg, 1,90 mmol), anhídrido succínico (200 mg, 2,10 mmol) y Et₃N (300 mg, 2,90 mmol) en 10 ml de THF durante la noche. Se concentró al vacío la mezcla de reacción y se purificó el residuo mediante HPLC preparativa (eluyendo con H₂O (TFA al 0,5%) y CH₃CN) produciendo ácido 4-(2-(2-(diethylamino)-2-oxoeto)etil)-4-oxobutanoico como un aceite incoloro.

Ejemplo 13 - La síntesis de (R)-metilo 3-(4-((R)-3-metoxi-3-oxo-2-propionamidopropiltio)-4-oxobutanoiltio)-2-propionamidopropanoato (NV205, 01-205)



- 35 Se agitó una mezcla de ácido (R)-3-(4-((R)-2-carboxi-2-propionamidoetil)-4-oxobutanoiltio)-2-propionamidopropanoico (300 mg, 0,69 mmol), CH₃I (293 mg, 2,06 mmol) y K₂CO₃ (475 mg, 3,44 mmol) en 4,0 ml de DMF a temperatura ambiente durante la noche. Se filtró la mezcla de reacción y se purificó el filtrado mediante HPLC preparativa (eluyendo con H₂O (TFA al 0,05%) y CH₃CN) produciendo directamente 3-(4-((R)-3-metoxi-3-oxo-2-propionamidopropiltio)-4-oxobutanoiltio)-2-propionamidopropanoato de (R)-metilo como un sólido blanquecino.

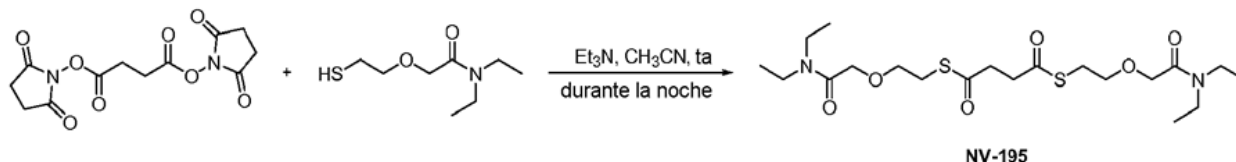
Ejemplo 14 - Síntesis de NV189



NV-189

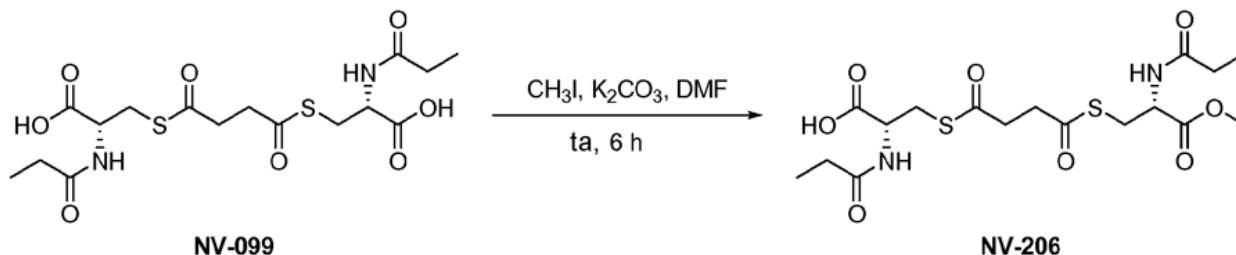
Se agitó una mezcla de N-(2-mercapto-2-metilpropil)acetamida (400 mg, 2,72 mmol), succinato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (339 mg, 1,09 mmol) y Et₃N (550 mg, 5,44 mmol) en 6 ml de CH₃CN a temperatura ambiente durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó el residuo mediante HPLC preparativa (eluyendo con H₂O (TFA al 0,05%) y CH₃CN) produciendo NV189 como un sólido blanquecino.

Ejemplo 15- Síntesis de S,S-butanobis(tioato) de bis(2-(2-(dietilamino)-2-oxoetoxi)etilo) (NV195, 01-195)



A una disolución de N,N-dietil-2-(2-mercaptoetoxi)acetamida (438 mg, 2,3 mmol) en CH₃CN (10 ml) se le añadió succinato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (374 mg, 1,2 mmol) y Et₃N (232 mg, 2,3 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se concentró al vacío la mezcla de reacción y se purificó el residuo mediante HPLC preparativa (eluyendo con H₂O (TFA al 0,5%) y CH₃CN) produciendo S,S-butanobis(tioato) de bis(2-(2-(dietilamino)-2-oxoetoxi)etilo) como un aceite incoloro.

Ejemplo 16- Síntesis de NV206



Se agitó una mezcla de ácido (R)-3-(4-((R)-2-carboxi-2-propionamidoetilitio)-4-oxobutanoilitio)-2-propionamidopropanoico (400 mg, 0,916 mmol), CH₃I (156 mg, 1,1 mmol) y K₂CO₃ (190 mg, 1,37 mmol) en 4 ml de DMF a temperatura ambiente durante 6 horas. Se filtró la mezcla de reacción y se purificó el filtrado mediante HPLC prep. (eluyendo con H₂O (TFA al 0,05%) y CH₃CN) produciendo directamente NV206 como una goma incolora.

Ejemplo 17

Resultados de los experimentos biológicos

Los compuestos facilitados en la siguiente tabla se sometieron a los ensayos (1)-(4) mencionados bajo el encabezado I. Ensayo para evaluar la potenciación e inhibición de la función de producción de energía mitocondrial en células intactas. En la siguiente tabla, se muestra los resultados que indican que todos los compuestos sometidos a prueba tienen propiedades adecuadas. De manera importante, todos los compuestos muestran un efecto específico sobre la respiración vinculada con CII tal como se observa a partir de los protocolos de examen 1 y 4, así como un efecto convergente, con los sustratos de CI disponibles, tal como se observa en el ensayo 2.

Resultados de los protocolos de examen 1-4

Números de compuesto expuestos en los ejemplos 1-16.

Compuesto NV	Convergente (rutina)	Convergente (FCCP)	CII (plasma)	CII	Desacoplamiento	Toxicidad
01-193	(++)	+	(+)	+	+	5 mM
01-188	+++	+++	+	+	(+)	5 mM
01-185	(+)	+	+	+	(+)	2 mM
01-205	+++	++	+	++	(+)	5 mM
01-114	+++	++	+	++	(+)	10 mM
01-041	+	+++	+	++	(+)	5 mM
01-108	++	++	(+)	(++)	+	10 mM

Leyenda: Convergente (rutina), el aumento del consumo de oxígeno mitocondrial inducido por el compuesto en las condiciones descritas en el ensayo de examen 3; Convergente (FCCP), el aumento del consumo de oxígeno mitocondrial inducido por el compuesto en las condiciones descritas en el ensayo de examen 2 (condiciones

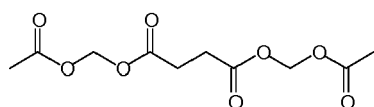
desacopladas); Convergente (plasma), el aumento del consumo de oxígeno mitocondrial inducido por el compuesto en células con inhibición del complejo I incubadas en plasma humano, tal como se describe en el ensayo de examen 4; CII, el aumento del consumo de oxígeno mitocondrial inducido por el compuesto en células con inhibición del complejo I tal como se describe en el ensayo de examen 1; Desacoplamiento, el nivel del consumo de oxígeno después de la adición de oligomicina tal como se describe en el ensayo de examen 3. Se califica la respuesta en cada parámetro como o bien +, o bien ++ o bien +++ en orden creciente de potencia. Los paréntesis [()] indican un efecto intermedio, es decir (+++) está entre ++ y +. Toxicidad, la menor concentración durante la titulación de compuesto a la que se observa una disminución del consumo de oxígeno tal como se describe en el ensayo de examen 2.

10

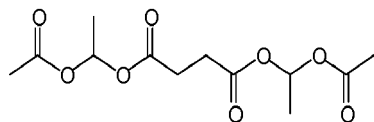
Ejemplos 18-20

Estudios con metformina

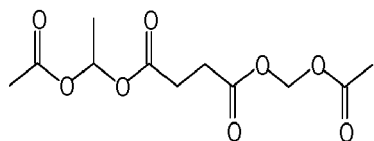
15 En el estudio con metformina, se usaron los siguientes compuestos (y a los que se hace referencia en las figuras). Los compuestos se describen en el documento WO 2014/053857.



(NV118)



(NV189)



(NV241)

20

Adquisición y preparación de muestras

25 Se realizó el estudio con la aprobación de la junta de revisión ética regional de la Universidad de Lund, Suecia (n.º de permiso de la junta de revisión ética 2013/181). Se extrajo sangre venosa de 18 adultos sanos (11 hombres y 7 mujeres) en tubos con K₂EDTA (tubo de la marca BD Vacutainer® con EDTA de dipotasio, BD, Plymouth, R.U.) según el procedimiento clínico convencional después de adquirirse el consentimiento informado por escrito. Para el aislamiento de plaquetas, se centrifugó (centrífuga Multifuge 1 S-R Heraeus, Thermo Fisher Scientifics, Waltham, EE.UU.) la sangre completa a 500 g a temperatura ambiente (TA) durante 10 min. Se recogió plasma rico en plaquetas en tubos Falcon de 15 ml y se centrifugó a 4600 g a TA durante 8 min. Se resuspendió el sedimento resultante en 1-2 ml del plasma del propio donante. Se aislaron las PBMC usando centrifugación en gradiente de Ficol (Boyum, 1968). Se lavó la sangre que quedaba después del aislamiento de las plaquetas con un volumen igual de solución salina fisiológica y se dispuso en una capa sobre 3 ml de Lymphoprep™. Después de centrifugación a 800 g a TA (temperatura ambiente) durante 30 min, se recogió la capa de PBMC y se lavó con solución salina fisiológica. Tras una centrifugación a 250 g a TA durante 10 min, se resuspendió el sedimento de las PBMC en dos partes de solución salina fisiológica y una parte del plasma del propio donante. Se realizó un recuento celular tanto para las PBMC como para las plaquetas usando un hemocitómetro automatizado (Swelab Alfa, Boule Medical AB, Estocolmo, Suecia).

Propósito del estudio notificado en los ejemplos 18-19

La metformina induce la producción de lactato en células mononucleares de sangre periférica y plaquetas a través de la inhibición del complejo mitocondrial I específico

45 La metformina es un fármaco antidiabético ampliamente usado asociado con el efecto secundario raro de acidosis láctica, que se ha propuesto que está vinculado con una disfunción mitocondrial inducida por fármacos. Usando respirometría, el propósito del estudio notificado en los ejemplos 1-2 a continuación era evaluar la toxicidad mitocondrial de metformina para células sanguíneas humanas en relación con la de fenformina, un análogo de biguanida retirado en la mayoría de países debido a una alta incidencia de acidosis láctica.

50

Propósito del estudio notificado en el ejemplo 20

El propósito es investigar la capacidad de profármacos de succinato para aliviar o eludir efectos no deseados de

metformina y fenformina.

Ejemplo 18^a

5 Efectos de metformina y fenformina sobre la respiración mitocondrial en plaquetas humanas permeabilizadas

Para investigar el objetivo específico de la toxicidad de biguanida, se aplicó un protocolo usando permeabilización con digitonina de las células sanguíneas y adiciones secuenciales de sustratos e inhibidores específicos de complejo respiratorio en medio MiR₀₅. Después de la estabilización de la respiración de rutina, es decir respiración de las células con suministro de su sustrato endógeno y demanda de ATP, se añadieron metformina, fenformina o su vehículo (agua doblemente desionizada). Se aplicó un amplio intervalo de concentración de los fármacos; metformina 0,1, 0,5, 1 y 10 mM y fenformina 25, 100 y 500 μ M. Después de incubación con los fármacos durante 10 min a 37°C, se permeabilizaron las plaquetas con digitonina a una concentración de digitonina óptima determinada previamente (1 μ g, 10⁻⁶ plaquetas) para inducir una permeabilización de membrana celular máxima sin perturbación de la función mitocondrial y permitiendo mediciones de capacidades respiratorias máximas (Sjövall *et al.* (2013a). Para la evaluación de la capacidad de fosforilación oxidativa dependiente del complejo I (FOSOX_{CI}) se añadieron de manera secuencial en primer lugar, los sustratos vinculados con NADH, piruvato y malato (5 mM), luego ADP (1 mM) y, por último, el sustrato del complejo I adicional, glutamato (5 mM). Posteriormente, se administró el sustrato vinculado con FADH₂, succinato (10 mM) para determinar la capacidad de FOSOX dependiente de complejo I y II convergente (FOSOX_{CI+II}). Se evaluó el estado LEAK_{I+II}, un estado respiratorio en el que se compensa el consumo de oxígeno para el retroflujo de protones a través de la membrana mitocondrial (Gnaiger, 2008), mediante adición del inhibidor de ATP-sintasa, oligomicina (1 μ g ml⁻¹). Se evaluó la capacidad del sistema de transporte de electrones respiratoria desacoplada máxima soportada mediante la entrada convergente a través de los complejos I y II (STE_{CI+II}) mediante titulación posterior con el protonóforo, carbonilcianuro-p-(trifluorometoxi)fenilhidrazona (FCCP). La adición del inhibidor del complejo I, rotenona (2 μ M) reveló la respiración desacoplada máxima dependiente del complejo II (STE_{CII}). Entonces se administró el inhibidor del complejo III, antimicina (1 μ g ml⁻¹) para revelar el consumo de oxígeno residual (ROX). Finalmente, se añadió el sustrato de complejo IV artificial, diclorhidrato de N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD, 0,5 mM) y se administró el inhibidor del complejo IV, azida de sodio (10 mM) para medir la actividad del complejo IV y el fondo químico, respectivamente. Se calculó la actividad del complejo IV restando el valor de azida de sodio del valor de TMPD. Con excepción de la actividad del complejo IV, se midieron todos los estados respiratorios en estado estacionario y se corrigieron para ROX. Se midió la actividad del complejo IV después de la determinación de ROX y no en estado estacionario. Se examinó la integridad de la membrana mitocondrial externa mediante adición de citocromo c (8 μ M) durante FOSOX_{CI+II} en presencia de vehículo, metformina 100 mM o fenformina 500 μ M.

Ejemplo 18B

Efecto de metformina sobre la respiración mitocondrial en células mononucleares de sangre periférica humanas permeabilizadas y sobre la respiración mitocondrial en plaquetas humanas intactas

Para el análisis de la respiración de PBMC permeabilizadas en respuesta a metformina (0,1, 1 y 10 mM) se usó el mismo protocolo que para plaquetas permeabilizadas, excepto porque se ajustó la concentración de digitonina a 6 μ g 10⁻⁶ PBMC (Sjövall *et al.*, 2013b).

45 *Resultados*

Se inhibió de manera dependiente de la dosis por metformina la respiración usando sustratos de complejo I tanto en plaquetas como en PBMC humanas permeabilizadas (figura 1). La capacidad FOSOX_{CI} disminuyó con concentraciones crecientes de metformina en comparación con controles con inhibición casi completa a 10 mM (-81,47%, P < 0,001 en PBMC y -92,04%, P < 0,001 en plaquetas), lo que da como resultado una CI₅₀ de 0,45 mM para PBMC y 1,2 mM para plaquetas. Las capacidades respiratorias usando sustratos vinculados tanto con complejo I como con complejo II, FOSOX_{CI+II} y STE_{CI+II}, disminuyeron de manera similar a FOSOX_{CI} por metformina tal como se ilustra mediante los perfiles representativos del consumo de O₂ medido simultáneamente de PBMC permeabilizadas tratadas con vehículo y tratadas con metformina 1 mM (figura 5a). En cambio, la capacidad STE_{CII} y la actividad del complejo IV no cambiaron significativamente en presencia de metformina en comparación con controles en cualquier tipo celular (figuras 5b, c) y tampoco la respiración LEAK_{I+II} (el estado respiratorio en el que el consumo de oxígeno se compensa para el retroflujo de protones a través de la membrana mitocondrial, tradicionalmente indicado como estado 4 en las mitocondrias aisladas, datos no mostrados). La inhibición mitocondrial del complejo I inducida por metformina no pareció ser reversible tras la retirada extra e intracelular del fármaco mediante lavado y permeabilización de las células, respectivamente. Aunque la intensidad del ataque de inhibición del complejo I se atenuó mediante la retirada (atribuido probablemente a un tiempo de exposición del fármaco más corto) las plaquetas no recuperaron una función mitocondrial de rutina y máxima comparable al control (datos no mostrados). La fenformina inhibió asimismo FOSOX_{CI} (figura 6), FOSOX_{CI+II} y STE_{CI+II} pero no STE_{CII} o respiración específica para el complejo IV (datos no mostrados). La fenformina demostró una inhibición 20 veces más potente de FOSOX_{CI} en plaquetas permeabilizadas que la metformina (CI₅₀ de 0,058 mM y 1,2 mM,

respectivamente) (figura 2). La metformina y la fenformina no indujeron una respiración aumentada tras la administración de citocromo c y, así, no perturbaron la integridad de la membrana mitocondrial externa.

Después de estabilización de la respiración de rutina en medio MiR₀₅, se añadió o bien vehículo (agua doblemente ionizada) o bien metformina 1, 10 y 100 mM. Se hizo un seguimiento de la respiración de rutina durante 60 min a 37°C antes de añadirse el inhibidor de ATP-sintasa, oligomicina (1 µg ml⁻¹) para evaluar la respiración LEAK. Se alcanzó la capacidad del sistema de transporte de electrones respiratoria desacoplada máxima soportada mediante sustratos endógenos (STE) mediante titulación de FCCP. Se bloqueó de manera secuencial la respiración mediante el inhibidor del complejo I, rotenona (2 µM), el inhibidor del complejo III, antimicina (1 µg ml⁻¹) y el inhibidor del complejo IV, azida de sodio (10 mM) para evaluar ROX, para lo que se corrigieron todos los valores de respiración. En un experimento adicional, se incubó sangre completa en tubos con K₂EDTA con diferentes concentraciones de metformina (0,1, 0,5 y 1 mM) a lo largo de un periodo de 18 h antes del aislamiento de plaquetas y los análisis de respiración.

Resultados

En plaquetas humanas intactas, la metformina disminuyó la respiración de rutina de manera dependiente de la dosis y del tiempo (figura 7a). Cuando se expusieron o bien a metformina o bien a vehículo, las plaquetas mostraron una disminución continua de la respiración de rutina a lo largo del tiempo. Después de 60 min, la respiración de rutina se redujo en el -14,1% en el control (P < 0,05), en el -17,27% a 1 mM (P < 0,01), en el -28,61% a 10 mM (P < 0,001), y en el -81,78% a 100 mM de metformina (P < 0,001) en comparación con la primera medición después de la adición. La metformina a 100 mM disminuyó la respiración de rutina significativamente en comparación con el control ya después de 15 min de exposición (-39,77%, P < 0,01). La respiración desacoplada máxima de las plaquetas (la capacidad de STE titulada con protonóforo) después de 60 min de incubación, se inhibió significativamente mediante 10 mM (-23,86%, P < 0,05) y 100 mM (-56,86%, P < 0,001) de metformina (figura 3b). La respiración LEAK en células intactas no se alteró significativamente mediante incubación con metformina (datos no mostrados). Cuando se incubó sangre completa a concentraciones de metformina de 1 mM a lo largo de 18 h, la respiración de rutina de plaquetas humanas intactas se redujo en el 30,49 % (P < 0,05).

Ejemplo 19

Efecto de metformina y fenformina sobre la producción de lactato y el pH de plaquetas humanas intactas

Se incubaron plaquetas durante 8 h con cualquiera de metformina (1 mM, 10 mM), fenformina (0,5 mM), rotenona (2 µM), o el vehículo para rotenona (DMSO). Se determinaron los niveles de lactato cada 2 h (n = 5) usando el medidor de prueba de lactato en sangre Lactate Pro™ 2 (Arkray, Alere AB, Lidingö, Suecia) (Tanner *et al.*, 2010). Se realizó la incubación a 37°C a una velocidad de agitador de 750 rpm, y se midió el pH al inicio, después de 4 y después de 8 h de incubación (n = 4) usando un pHmetro convencional PHM210 (Radiometer, Copenhague, Dinamarca).

Resultados

Producción de lactato aumentada de manera dependiente del tiempo y de la dosis en respuesta a incubación con metformina y fenformina en plaquetas humanas (figura 8a). En comparación con el control, todas las plaquetas tratadas con metformina (1 y 10 mM), fenformina (0,5 mM) y rotenona (2 µM) produjeron significativamente más lactato a lo largo de 8 h de tratamiento. A metformina 1 mM, el lactato aumentó desde 0,30 ± 0,1 hasta 3,34 ± 0,2 a lo largo de 8 h y a metformina 10 mM, el lactato aumentó desde 0,22 ± 0,1 hasta 5,76 ± 0,7 mM. El pH correspondiente disminuyó desde 7,4 ± 0,01 en ambos grupos hasta 7,16 ± 0,03 y 7,00 ± 0,04 para metformina 1 mM y 10 mM, respectivamente. Las plaquetas tratadas con fenformina (0,5 mM) produjeron niveles de lactato similares a los de las muestras tratadas con metformina 10 mM. El aumento del nivel de lactato se correlacionó con la disminución del pH para todos los grupos de tratamiento. Los niveles de lactato aumentados en plaquetas intactas tratadas con metformina también se correlacionaron con los valores respiratorios de FOSOX_{C1} absolutos disminuidos observados en plaquetas permeabilizadas tratadas con metformina (r² = 0,60, P < 0,001). Un conjunto limitado de experimentos demostró además que las PBMC intactas también muestran una liberación de lactato aumentada tras la exposición a metformina 10 mM (datos no mostrados).

Discusión de los resultados de los ejemplos 18-19

Este estudio demuestra un efecto tóxico no reversible de metformina sobre las mitocondrias específicas para el complejo I en PBMC y plaquetas humanas a concentraciones relevantes para el estado clínico de intoxicación con metformina. En plaquetas, se ha mostrado una correlación entre respiración de complejo I disminuida y producción de lactato aumentada. La toxicidad mitocondrial que se observó para metformina se desarrolló a lo largo del tiempo en células intactas. La fenformina, un compuesto relacionado estructuralmente ahora retirado en la mayoría de países debido a una alta incidencia de AL, indujo liberación de lactato y disminución del pH en plaquetas a través de un efecto específico del complejo I a una concentración sustancialmente menor.

En el presente estudio, usando un modelo que aplica respirometría de alta resolución para evaluar la función mitocondrial integrada de plaquetas humanas, se ha demostrado que la toxicidad mitocondrial tanto de metformina como de fenformina es específica para el complejo respiratorio I y que también está presente una inhibición similar específica en PBMC. La respiración de complejo I de PBMC permeabilizadas era 2,6 veces más sensible a metformina que la de plaquetas permeabilizadas. Sin embargo, debido a la toxicidad dependiente del tiempo de metformina (véase a continuación), la CI_{50} es posiblemente una subestimación y podría ser menor si se determina después de un tiempo de exposición más largo. Estos hallazgos refuerzan adicionalmente que la toxicidad mitocondrial de metformina no se limita a tejidos específicos, tal como se mostró previamente por otros, sino que es más bien un efecto generalizado a nivel subcelular. La inhibición de complejo IV inducida por metformina en plaquetas notificada por (Protti *et al.*, 2012a, Protti *et al.*, 2012b) no se ha confirmado en este estudio ni en un estudio anterior de Dykens *et al.* (2008) usando mitocondrias bovinas aisladas. Además, la metformina y la fenformina no indujeron inhibición respiratoria a través de ningún cambio de permeabilidad inespecífico de las membranas mitocondriales internas o externas ya que no hubo evidencias de desacoplamiento o respuesta estimuladora tras la adición de citocromo c en presencia de los fármacos. La respirometría de alta resolución es un método de alta sensibilidad y permite mediciones de O_2 en el rango picomolar. Cuando se aplica a células sanguíneas humanas *ex vivo*, permite la evaluación de la respiración en el estado totalmente integrado en células intactas, y permite el suministro exógeno y control de sustratos para mitocondrias intactas en células permeabilizadas. Este contrasta con ensayos espectrofotométricos enzimáticos que se han usado predominantemente en la investigación sobre toxicidad mitocondrial de metformina, por ejemplo de Dykens *et al.* (2008) y Owen *et al.* (2000). Estos ensayos miden la función independiente, no integrada de los complejos individuales y así, son menos fisiológicos, lo que puede contribuir a las diferencias en los resultados entre estos estudios.

Los resultados del estudio demostraron una inhibición respiratoria significativa, aumento de lactato y disminución de pH en suspensiones de plaquetas intactas provocados por metformina a concentraciones relevantes para la intoxicación ya después de 8-18 h. La inhibición dependiente del tiempo de la respiración mitocondrial en combinación con la falta de reversión tras el intercambio del tampón extracelular y siendo la dilución del contenido intracelular de metformina soluble mediante permeabilización del punto celular hacia la acumulación intramitocondrial un factor clave en el desarrollo de una AL relacionada con disfunción mitocondrial inducida por fármacos, tal como han propuesto otros (Chan *et al.*, 2005, Lalau, 2010).

La toxicidad mitocondrial de fenformina se ha mostrado previamente, por ejemplo en células HepG2, una línea celular de carcinoma de hígado, y mitocondrias aisladas de rata y vaca. En el presente documento, se ha demostrado toxicidad mitocondrial específica también usando células sanguíneas humanas. En comparación con la metformina, la fenformina tuvo una potencia tóxica mitocondrial más fuerte en plaquetas humanas (CI_{50} de 1,2 mM y 0,058 mM, respectivamente). La fenformina y metformina muestran una diferencia de 10 a 15 veces en la dosificación clínica y una diferencia de 3 a 10 veces en la concentración plasmática terapéutica. En este estudio, se ha observado una diferencia de 20 veces entre la fenformina y metformina en el potencial para inhibir el complejo I. Si se traslada a pacientes, esta diferencia en toxicidad mitocondrial en relación con la dosificación clínica podría explicar potencialmente la mayor incidencia documentada de fenformina de AL asociada con fenformina.

Las concentraciones plasmáticas terapéuticas convencionales de metformina están en el intervalo de 0,6 y 6,0 μM y las concentraciones tóxicas se encuentran entre 60 μM y 1 mM. En un caso clínico de intoxicación involuntaria con metformina, antes de hemodiálisis, se notificó un nivel sérico de metformina superior a 2 mM (Al-Abri *et al.*, 2013). Estudios de distribución tisular han demostrado además que la concentración de metformina en estado estacionario es menor en plasma/suero que en otros órganos. Se ha mostrado que se acumula en concentraciones de 7 a 10 veces mayores en el tracto gastrointestinal, con cantidades menores pero todavía significativamente mayores en el riñón, hígado, glándulas salivales, pulmón, bazo y músculo en comparación con los niveles plasmáticos. En circunstancias en las que el aclaramiento de metformina se ve alterado, tal como estados predisponentes que afectan al sistema cardiovascular, hígado o riñones, pueden alcanzarse eventualmente niveles tóxicos. Por tanto, la concentración tóxica de metformina observada en el presente estudio (1 mM) es comparable a la que se encuentra en la sangre de pacientes intoxicados con metformina. Aunque la metformina es tóxica para las células sanguíneas, tal como se muestra en este estudio, es improbable que las plaquetas y PBMC sean agentes contribuyentes importantes al desarrollo de AL. Como la metformina se acumula en otros órganos y adicionalmente estos órganos son más metabólicamente activos, es probable que se observe una producción de lactato aumentada en primer lugar en otros tejidos. Los presentes resultados refuerzan, por tanto, lo que han sugerido otros (Brunmair *et al.*, 2004, Protti *et al.*, 2012b, Dykens *et al.*, 2008), de que la inhibición mitocondrial sistémica es la causa de AL inducida por metformina.

Basándose en los estudios iniciales y los presentes hallazgos, resulta intrigante especular con la posibilidad de que el efecto antidiabético de metformina pueda estar relacionado con la inhibición de la respiración aerobia. Los niveles de glucosa disminuidos en el hígado y la captación disminuida de glucosa a la sangre en el intestino delgado en pacientes diabéticos tratados con metformina podrían deberse a una inhibición parcial del complejo I. La inhibición del complejo I provoca una producción de ATP reducida, cantidades aumentadas de AMP, activación de la proteína cinasa activada por la enzima AMP (AMPK) y recambio acelerado de glucosa mediante glicólisis aumentada, que

trata de compensar la producción de ATP reducida.

Hasta ahora, las medidas de tratamiento para AL asociada con metformina consisten en hemodiálisis y hemofiltración para eliminar la toxina, corregir la acidosis y aumentar el flujo sanguíneo renal.

5 Ejemplo 20 Intervención sobre el aumento inducido por metformina de producción de lactato con profármacos de succinato con permeabilidad celular

10 Se realizó intervención del aumento inducido por metformina de la producción de lactato en plaquetas humanas intactas con profármacos de succinato con permeabilidad celular recientemente desarrollados y sintetizados, en PBS que contenía glucosa 10 mM. Se expusieron las plaquetas a cualquiera de rotenona sola (2 μ M), rotenona (2 μ M) y antimicina (1 μ g/ml, únicamente para células tratadas con NV 189), o metformina 10 mM y después de 60 min o vehículo (DMSO, control), se añadieron o bien los profármacos de succinato con permeabilidad celular (NV118, NV189 y NV241) o bien succinato a una concentración de 250 μ M cada 30 minutos. Se midieron los niveles de lactato en intervalos de 30 min con el comienzo del experimento. Adicionalmente, se midió el pH antes de la primera adición de vehículo (DMSO, control), los diferentes profármacos de succinato con permeabilidad celular (NV118, NV189, NV241) o succinato y al final del experimento. Se calculó la tasa de producción de lactato con un ajuste no lineal con un intervalo de confianza (IC) del 95% de la pendiente de la curva lactato-tiempo (figuras 9, 10, 11 y 12).

20 Los resultados relacionados con el ejemplo 20 se basan en los ensayos descritos en el presente documento.

La producción de lactato debida a incubación con rotenona y metformina en trombocitos se atenúa mediante la adición de profármacos de succinato con permeabilidad celular

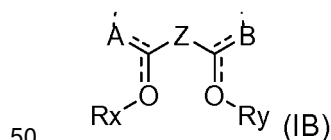
25 La tasa de producción de lactato en trombocitos incubados con rotenona 2 μ M fue de 0,86 mmol de lactato ($200 \cdot 10^6 \text{trc} \cdot \text{h}^{-1}$) (intervalo de confianza [IC] del 95% de 0,76-0,96) que se atenúa mediante NV118 (0,25 mmol [IC del 95% de 0,18-0,33]), NV189 (0,42 mmol [IC del 95% de 0,34-0,51]) y NV241 (0,34 mmol [IC del 95% de 0,17-0,52]), que no fue diferente significativamente de células que no recibieron rotenona (0,35 [IC del 95% de 0,14-0,55]) (figuras 9, 10 y 11). Las células incubadas con antimicina además de rotenona y NV189 tuvieron una producción de lactato comparable a las células tratadas con rotenona (0,89 mmol [0,81-0,97]), lo que demuestra el efecto mitocondrial específico de los profármacos de succinato con permeabilidad celular (figura 10).

30 Las células incubadas con metformina 10 mM producen lactato a una tasa de 0,86 mmol de lactato ($200 \cdot 10^9 \text{trc} \cdot \text{h}^{-1}$) (IC del 95% de 0,69-1,04) en comparación con 0,22 mmol (IC del 95% de 0,14-0,30) en células tratadas con vehículo (agua) (figura 12). La coincubación con cualquiera de los tres profármacos de succinato atenúa el efecto de metformina, lo que da como resultado una producción de 0,43 mmol (IC del 95% de 0,33-0,54) para NV118 (figura 9), 0,55 mmol (IC del 95% de 0,44-0,65) para NV189 (figura 10) y 0,43 mmol (IC del 95% de 0,31-0,54) para NV241 (figura 11).

40 En la totalidad de la memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, el término "comprenden" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un número entero, etapa, grupo de número enteros o grupo de etapas establecido pero no la exclusión de cualquier otro número entero, etapa, grupo de número enteros o grupo de etapas. El término "comprenden" incluye "contienen" y "consisten en".

45 Descripción general de la clase de compuestos a la que pertenecen los compuestos según la invención

La clase de compuestos puede definirse por la fórmula (IB) a continuación,

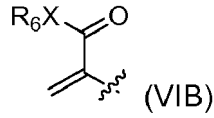
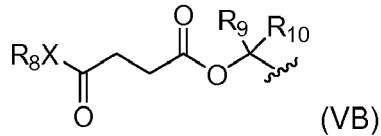
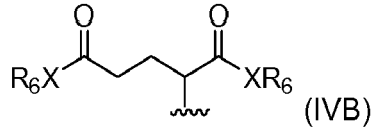
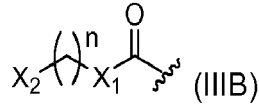
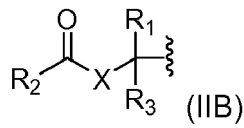


o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. Cuando el enlace discontinuo entre A y B indica un enlace opcional para formar una estructura cerrada de anillo, en la que

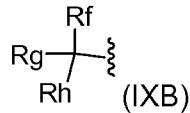
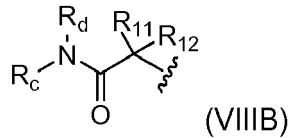
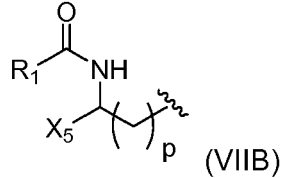
55 Z se selecciona de $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $>\text{CH}(\text{CH}_3)$, -O, S,

A y B son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de $-\text{O}-\text{R}'$, $-\text{NHR}''$, $-\text{SR}'''$ u $-\text{OH}$, con la condición de que tanto A como B no pueden ser H,

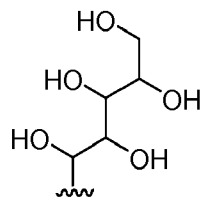
60 R' , R'' y R''' son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de las fórmulas (IIB) a (IXB) a continuación:



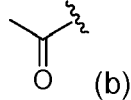
5



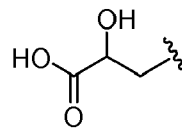
10 R₁ = H, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, O-acilo, O-alquilo, N-acilo, N-alquilo, X-acilo, CH₂X-alquilo, CH₂X-acilo, F, CH₂COOH, CH₂CO₂-alquilo o cualquiera de las formulas (a)-(f) a continuación



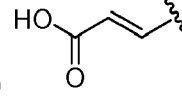
(a)



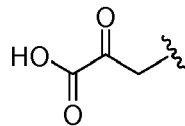
(b)



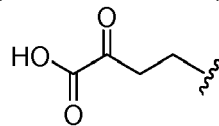
(c)



(d)



(e)



(f)

15

En estructuras preferidas, R₁ = H, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, O-acilo, O-alquilo, N-acilo, N-alquilo, X-acilo, CH₂X-alquilo, CH₂X-acilo, F, CH₂COOH.

X = O, NH, NR₆, S

20

R₂ = Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, -C(O)CH₃, -C(O)CH₂C(O)CH₃, -C(O)CH₂CH(OH)CH₃,

R₃ = R₁, es decir es los mismos grupos o diferentes mencionados para R₁

25

X₁ = CR'₃R'₃, NR₄

n = 1-4,

p = 1-2

5 $X_2 = OR_5, NR_1R'_2$

$R'_3 = H, Me, Et, F$

$R_4 = H, Me, Et, i-Pr$

10

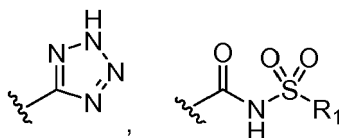
$R_5 =$ acetilo, propionilo, benzoílo, bencilcarbonilo

$R'_2 = H.HX_3,$ acilo, acetilo, propionilo, benzoílo, bencilcarbonilo

15 $X_3 = F, Cl, Br$ y I

$R_6 = H,$ o alquilo tal como, por ejemplo, Me, Et, n-propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo o acetilo, tal como, por ejemplo, acilo, propionilo, benzoílo, o la fórmula (IIB), la fórmula (IIBI) o la fórmula (VIIIB)

20 $X_5 = -H, -COOH, -C(=O)XR_6,$



X_5 también pueden ser $CONR_1R_3.$

$R_9 = H, Me, Et$ o $O_2CCH_2CH_2COXR_8$

25

$R_{10} = O$ -acilo, NH-alquilo, NH-acilo u $O_2CCH_2CH_2COX_6R_8$

$X_6 = O, NR_8$

30 $R_8 = H,$ alquilo, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, acetilo, acilo, propionilo, benzoílo o la fórmula (IIB),

R_{11} y R_{12} son independientemente H, alquilo, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, acetilo, acilo, propionilo, benzoílo, acilo, $-CH_2X$ -alquilo, $-CH_2X$ -acilo, en los que $X = O, NR_6$ o S,

35 R_c y R_d son independientemente CH_2X -alquilo, CH_2X -acilo, en los que $X = O, NR_6$ o S,

R_f, R_g y R_h se seleccionan independientemente de X-acilo, $-CH_2X$ -alquilo, $-CH_2X$ -acilo y $R_9,$

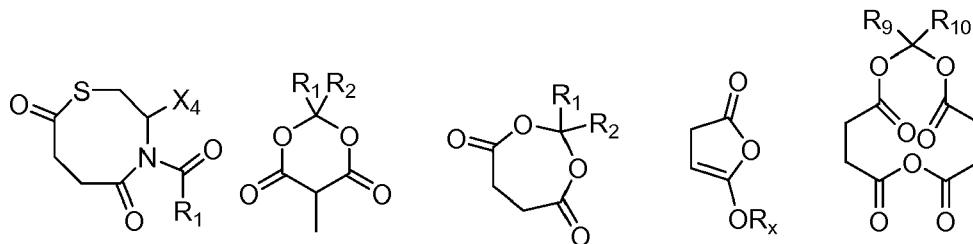
40 en la que alquilo es, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, neopentilo, isopentilo, hexilo, isohexilo, heptilo, octilo, nonilo o decilo y

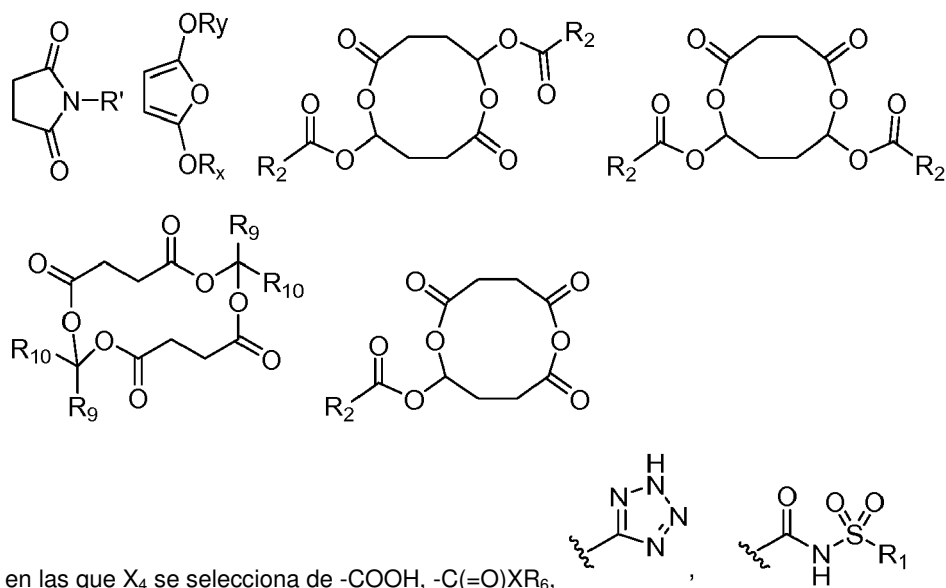
acilo es, por ejemplo, formilo, acetilo, propionilo, butirilo, pentanoílo, benzoílo y similares, y

en la que los acilos y alquilos pueden estar opcionalmente sustituidos,

45

el enlace discontinuo entre A y B indica un enlace opcional para formar una estructura cíclica de fórmula (I) y con la condición de que cuando está presente tal enlace cíclico, el compuesto según la fórmula (I) se selecciona de

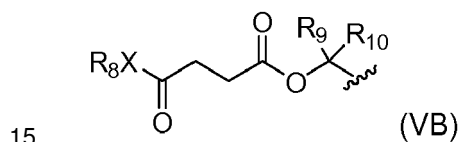
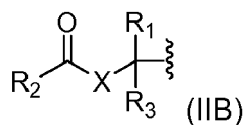




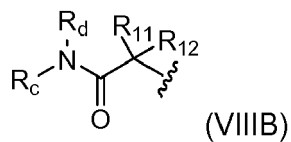
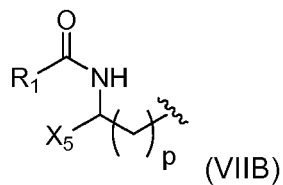
5 en las que X_4 se selecciona de $-\text{COOH}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{XR}_6$,

y en las que R_x y R_y se seleccionan independientemente de R_1 , R_2 , R_6 o R' , R'' o R''' con la condición de que R_x y R_y no pueden ser ambos $-\text{H}$.

10 En un aspecto preferido, R' , R'' y R''' son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de las fórmulas (IIB), (VB), (VIIB) o (VIIIB) a continuación:

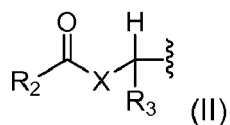


15

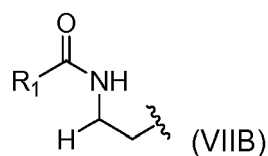


20

Preferiblemente, y con respecto a la fórmula (IIB), al menos uno de R_1 y R_3 es $-\text{H}$, de tal manera que la fórmula II es:

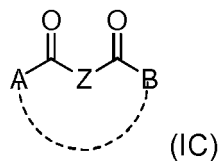


25 Preferiblemente, y con respecto a la fórmula (VII), p es 1 ó 2, preferiblemente p es 1 y X_5 es $-\text{H}$ de tal manera que la fórmula (VIIB) es



5 Preferiblemente, y con respecto a la fórmula (IXB), al menos uno de R_f , R_g , R_h es -H o alquilo, siendo alquilo tal como se define en el presente documento. Además, también se prefiere con respecto a la fórmula (IXB) que al menos uno de R_f , R_g , R_h sea -CH₂X-acilo, siendo acilo tal como se define en el presente documento.

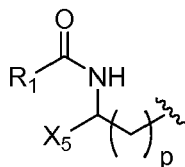
Una subclase interesante de la clase mencionada anteriormente se refiere a los compuestos de fórmula (I)



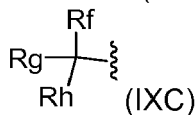
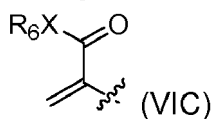
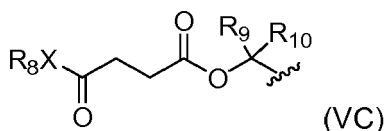
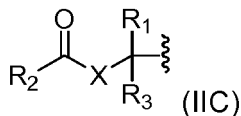
10 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. El enlace discontinuo entre A y B indica un enlace opcional para formar una estructura cerrada de anillo.

15 En la fórmula (IC), Z se selecciona de -CH₂-CH₂- o >CH(CH₃),

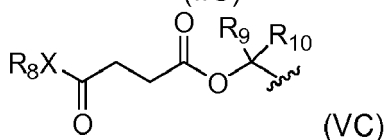
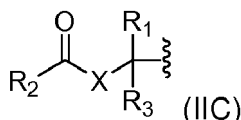
A se selecciona de -SR-, -OR y NHR, y en la que R es

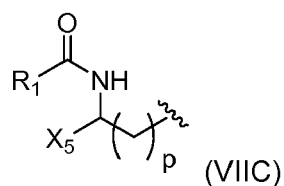


20 B se selecciona de -O-R', -NHR'', -SR''' u -OH; R' se selecciona de las fórmulas (IIC) a (IXC) a continuación:



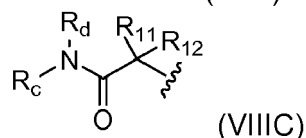
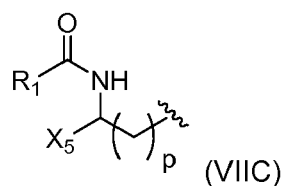
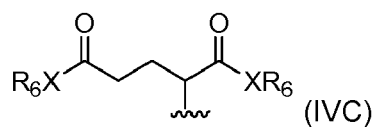
25 Preferiblemente, R' se selecciona de las fórmulas (IIC), (VC) a (IXC) a continuación:



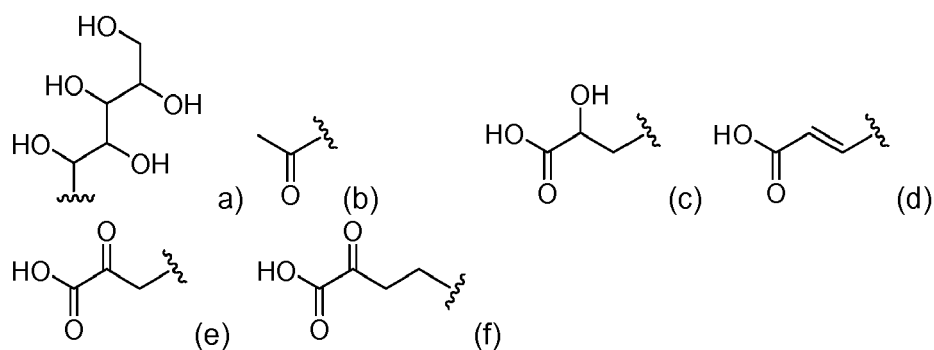


R', R'' y R''' son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de las fórmulas (IVC-VIIIC) a continuación:

5



10 R₁ = H, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, O-acilo, O-alquilo, N-acilo, N-alquilo, X-acilo, CH₂X-alquilo, CH₂X-acilo, F, CH₂COOH, CH₂CO₂-alquilo o cualquiera de las fórmulas (a)-(f)



15

Preferiblemente, R₁ = H, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, O-acilo, O-alquilo, N-acilo, N-alquilo, X-acilo, CH₂X-alquilo, CH₂X-acilo, F, CH₂COOH, CH₂CO₂-alquilo,

X = O, NH, NR₆, S

20

R₂ = Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, C(O)CH₃, C(O)CH₂C(O)CH₃, C(O)CH₂CH(OH)CH₃,

R₃ = R₁, es decir puede ser un grupo igual o diferente tal como se define para R₁,

25

X₁ = CR'₃R'₃, NR₄

n = 1-4,

p = 1-2

30

X₂ = OR₅, NR₁R'₂

R'₃ = H, Me, Et, F

35

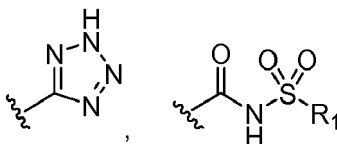
R₄ = H, Me, Et, i-Pr

R₅ = acetilo, propionilo, benzoílo, bencilcarbonilo

R₂ = H, HX₃, acilo, acetilo, propionilo, benzoílo, bencilcarbonilo

X₃ = F, Cl, Br y I

5 R₆ = H, alquilo, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, acetilo, acilo, propionilo, benzoílo, o la fórmula (IIC), la fórmula (IIIC) o la fórmula (VIIC)



10 X₅ = -H, -COOH, -C(=O)XR₆,

X₅ también puede ser CONR₁R₃

R₉ = H, Me, Et o O₂CCH₂CH₂COXR₈

15 R₁₀ = O-acilo, NH-alquilo, NH-acilo u O₂CCH₂CH₂COX₆R₈

X₆ = O, NR₈

20 R₈ = H, alquilo, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, acetilo, acilo, propionilo, benzoílo, o la fórmula (IIC), la fórmula (IIIC) o la fórmula (VIIC)

R₁₁ y R₁₂ son independientemente H, alquilo, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, acetilo, acilo, propionilo, benzoílo, acilo, -CH₂X-alquilo, -CH₂X-acilo, en los que X = O, NR₆ o S

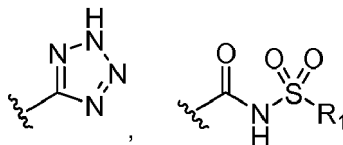
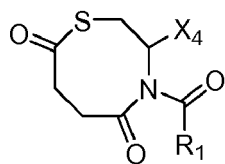
25 R_c y R_d son independientemente CH₂X-alquilo, CH₂X-acilo, en los que X = O, NR₆ o S,

R_f, R_g y R_h se seleccionan independientemente de X-acilo, -CH₂X-alquilo, -CH₂X-acilo y R₉

30 alquilo es por ejemplo Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo y acilo es por ejemplo formilo, acetilo, propionilo, isopropionilo, butirilo, terc-butirilo, pentanoílo, benzoílo y similares

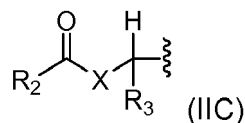
y en las que los acilos y alquilos pueden estar opcionalmente sustituidos, y

35 cuando está presente el enlace discontinuo entre A y B, el compuesto según la fórmula (I) es

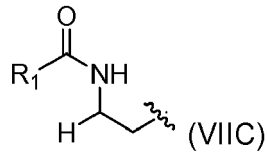


en la que X₄ se selecciona de -COOH, -C(=O)XR₆,

40 Preferiblemente, y con respecto a la fórmula (IIC), al menos uno de R₁ y R₃ es -H, de tal manera que la fórmula II es:

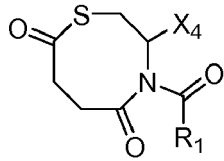


45 Preferiblemente, y con respecto a la fórmula (VIIC), p es 1 ó 2, preferiblemente p es 1 y X₅ es -H de tal manera que la fórmula (VIIC) es

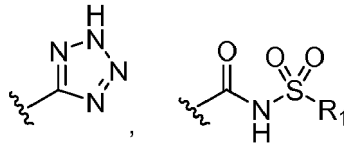


5 Preferiblemente, y con respecto a la fórmula (IXC), al menos uno de R_f , R_g , R_h es -H o alquilo, siendo alquilo tal como se define en el presente documento. Además, también se prefiere con respecto a la fórmula (IXC) que al menos uno de R_f , R_g , R_h sea $-CH_2X$ -acilo, siendo acilo tal como se define en el presente documento.

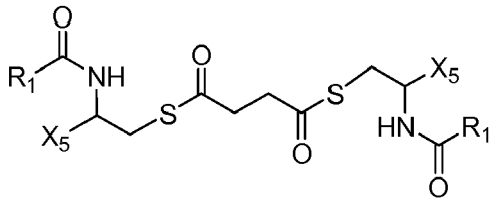
Compuestos interesantes según la fórmula (IC) son:



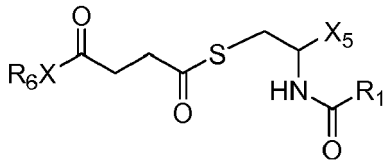
10



en la que X_4 se selecciona de $-COOH$, $-C(=O)XR_6$,

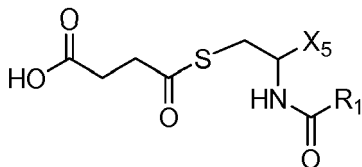


15 en las que R_1 y X_5 son tal como se definen en el presente documento. Preferiblemente X_5 es -H.



20

en la que R_6 , X_5 y R_1 son tal como se definen en el presente documento. Preferiblemente X_5 es -H.

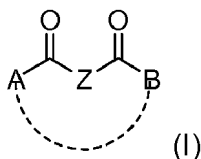


en la que X_5 y R_1 son tal como se definen en el presente documento.

25 Preferiblemente X_5 es -H.

REIVINDICACIONES

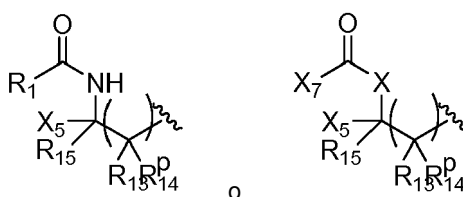
1. Compuesto según la invención que viene dado por la fórmula (I)



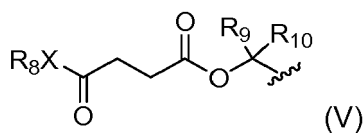
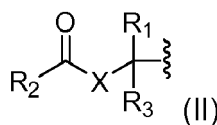
5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el enlace discontinuo entre A y B indica un enlace opcional para formar una estructura cerrada de anillo, y en el que

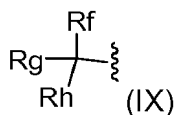
10 Z se selecciona de $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $>\text{CH}(\text{CH}_3)$,
 A se selecciona de $-\text{SR}$, $-\text{OR}$ y NHR , y R es



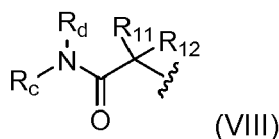
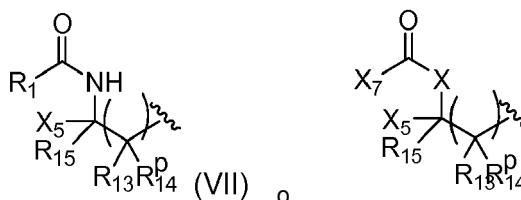
15 B se selecciona de $-\text{O-R}'$, $-\text{NHR}''$, $-\text{SR}'''$ u $-\text{OH}$; y R' se selecciona de las fórmulas (II) a (IX) a continuación:



20



25 R', R'' y R''' son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de las fórmulas (IV-VIII) a continuación:



30

R₁ y R₃ son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de H, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, O-acilo, O-alquilo, N-acilo, N-alquilo, X-acilo, CH₂X-alquilo, CH₂X-acilo, F, CH₂COOH, CH₂CO₂-alquilo,

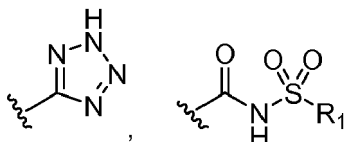
35 X se selecciona de O, NH, NR₆, S,

R₂ se selecciona de Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, C(O)CH₃, C(O)CH₂C(O)CH₃, C(O)CH₂CH(OH)CH₃,

p es un número entero y es 1 ó 2

R₆ se selecciona de H, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, acetilo, acilo, propionilo, benzoílo, o la fórmula (II), o la fórmula (VIII)

X₅ se selecciona de -H, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, -COOH, -C(=O)XR₆, CONR₁R₃ o es la fórmula



X₇ se selecciona de R₁, -NR₁R₃,

R₉ se selecciona de H, Me, Et u O₂CCH₂CH₂COXR₈

R₁₀ se selecciona de O-acilo, NH-alquilo, NH-acilo u O₂CCH₂CH₂COX₆R₈

X₆ se selecciona de O, NR₈, NR₆R₈, en los que R₆ y R₈ son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de H, alquilo, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, acetilo, acilo, propionilo, benzoílo, o la fórmula (II), o la fórmula (VIII),

R₁₁ y R₁₂ son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de H, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, acetilo, propionilo, benzoílo, -CH₂X-alquilo, -CH₂X-acilo, en los que X es O, NR₆ o S,

R_c y R_d son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de CH₂X-alquilo, CH₂X-acilo, en los que X = O, NR₆ o S,

R₁₃, R₁₄ y R₁₅ son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de H, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, -COOH, O-acilo, O-alquilo, N-acilo, N-alquilo, X-acilo, CH₂X-alquilo;

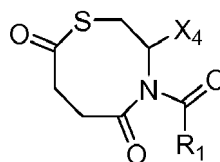
los sustituyentes en R₁₃ y R₁₄ o R₁₃ y R₁₅ pueden unirse en puente para formar un sistema cíclico, R_f, R_g y R_h son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de X-acilo, -CH₂X-alquilo, -CH₂X-acilo y R₉,

alquilo se selecciona de Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo,

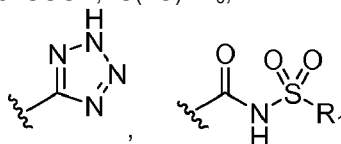
acilo se selecciona de formilo, acetilo, propionilo, isopropionilo, butirilo, terc-butirilo, pentanoílo, benzoílo,

acilo y/o alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos, y

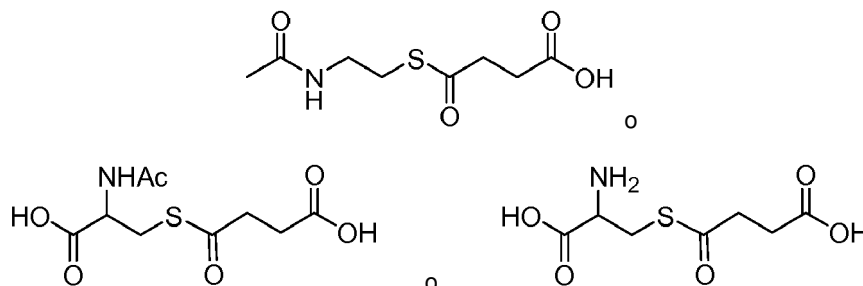
cuando está presente el enlace discontinuo entre A y B, el compuesto según la fórmula (I) es



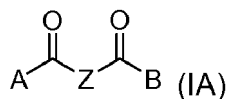
en la que X₄ se selecciona de -COOH, -C(=O)XR₆,



con la condición de que el compuesto no es



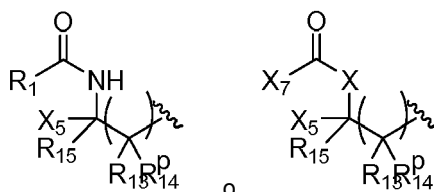
2. Compuesto según la reivindicación 1, que tiene la fórmula (IA)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que del mismo, en el que

5

Z es -CH₂-CH₂-,
A se selecciona de -SR, -OR y NHR, y R es

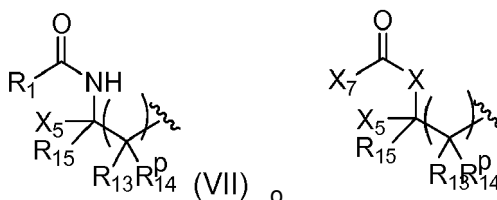


10

B se selecciona de -O-R', -NHR'', -SR''' u -OH; y

R', R'' y R''' son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de una de las fórmulas a continuación:

15



R₁ y R₃ son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de H, Me, Et, propilo, O-Me, O-Et, O-propilo,

20

X se selecciona de O, NH, S,
p es un número entero y es 1,

R₆ se selecciona de H, Me, Et,

X₅ se selecciona de -H, Me, Et, -COOH, -C(=O)XR₆, CONR₁R₃

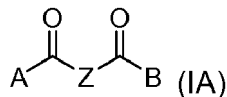
25

X₇ se selecciona de R₁, -NR₁R₃,

R₁₃, R₁₄ y R₁₅ son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de H, Me, Et, propilo, i-propilo, butilo, iso-butilo, t-butilo, -COOH, O-acilo, O-alquilo, N-acilo, N-alquilo, X-acilo, CH₂X-alquilo, en el que alquilo y acilo son tal como se definieron anteriormente en el presente documento.

30

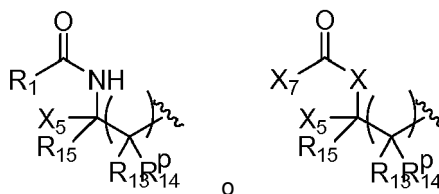
3. Compuesto según la reivindicación 1 ó 2, que tiene la fórmula (IA)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

35

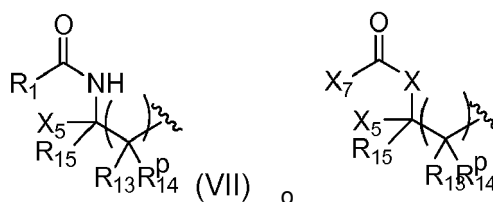
Z es -CH₂-CH₂-,
A se selecciona de -SR, -OR y NHR, y R es



40

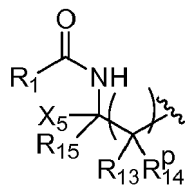
B se selecciona de -O-R', -NHR'', -SR''' u -OH; y

R', R'' y R''' son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de una de las fórmulas a continuación:

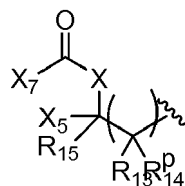


- 5
- R₁ y R₃ son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de H, Me, Et, propilo, O-Me, O-Et, O-propilo,
 X se selecciona de O, NH, S,
 p es un número entero y es 1,
 R₆ se selecciona de H, Me, Et,
 X₅ se selecciona de -H, Me, Et, -COOH, -C(=O)OR₆, CONR₁R₃,
 X₇ se selecciona de R₁, -NR₁R₃,
 R₁₃, R₁₄ y R₁₅ son independientemente diferentes o idénticos y se seleccionan de H, Me, Et, -COOH.

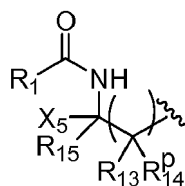
- 10
- 15
4. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que Z es -CH₂CH₂- y A es -SR.
5. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que Z es -CH₂CH₂-, A es -SR, y B es OH o SR'''.
- 20
6. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que Z es -CH₂CH₂-, A es -SR, B es OH o SR''', en el que R''' es



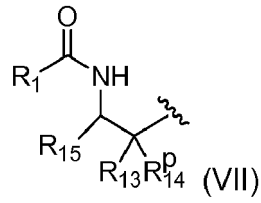
- 25
7. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que Z es -CH₂CH₂- y A es SR y B es OH.
- 30
8. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que Z es -CH₂CH₂-, A es NR, B es OH y R es



- 35
- y X es S.
9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R y/o R''' es

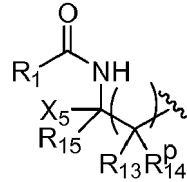


- 40
- y p=1 y X₅ es -H de tal manera que la fórmula (VII) es

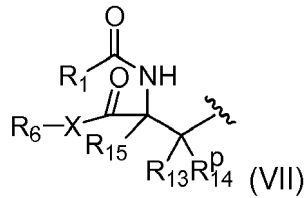


10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que R y/o R''' es

5

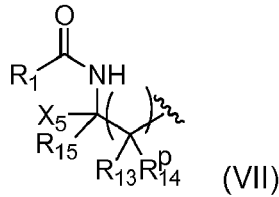


y p=1 y X₅ es COXR₆ de tal manera que la fórmula (VII) es



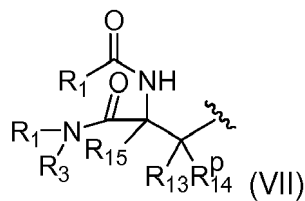
10

11. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que R y/o R''' es



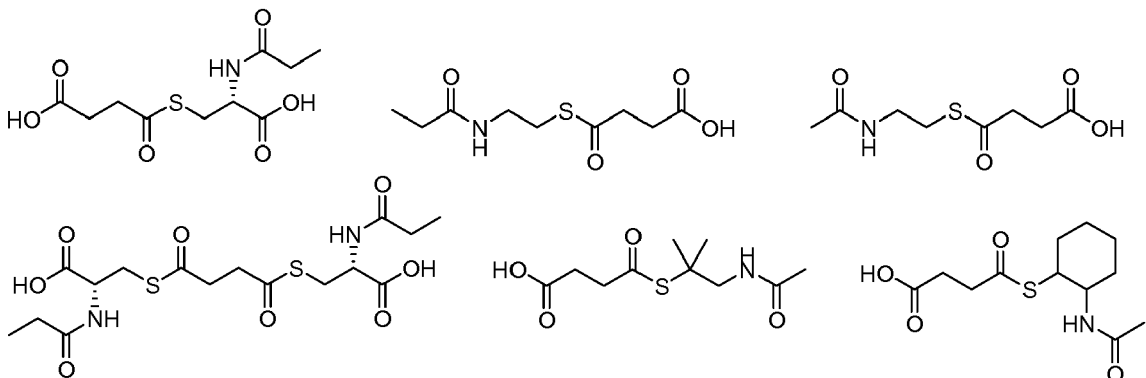
15

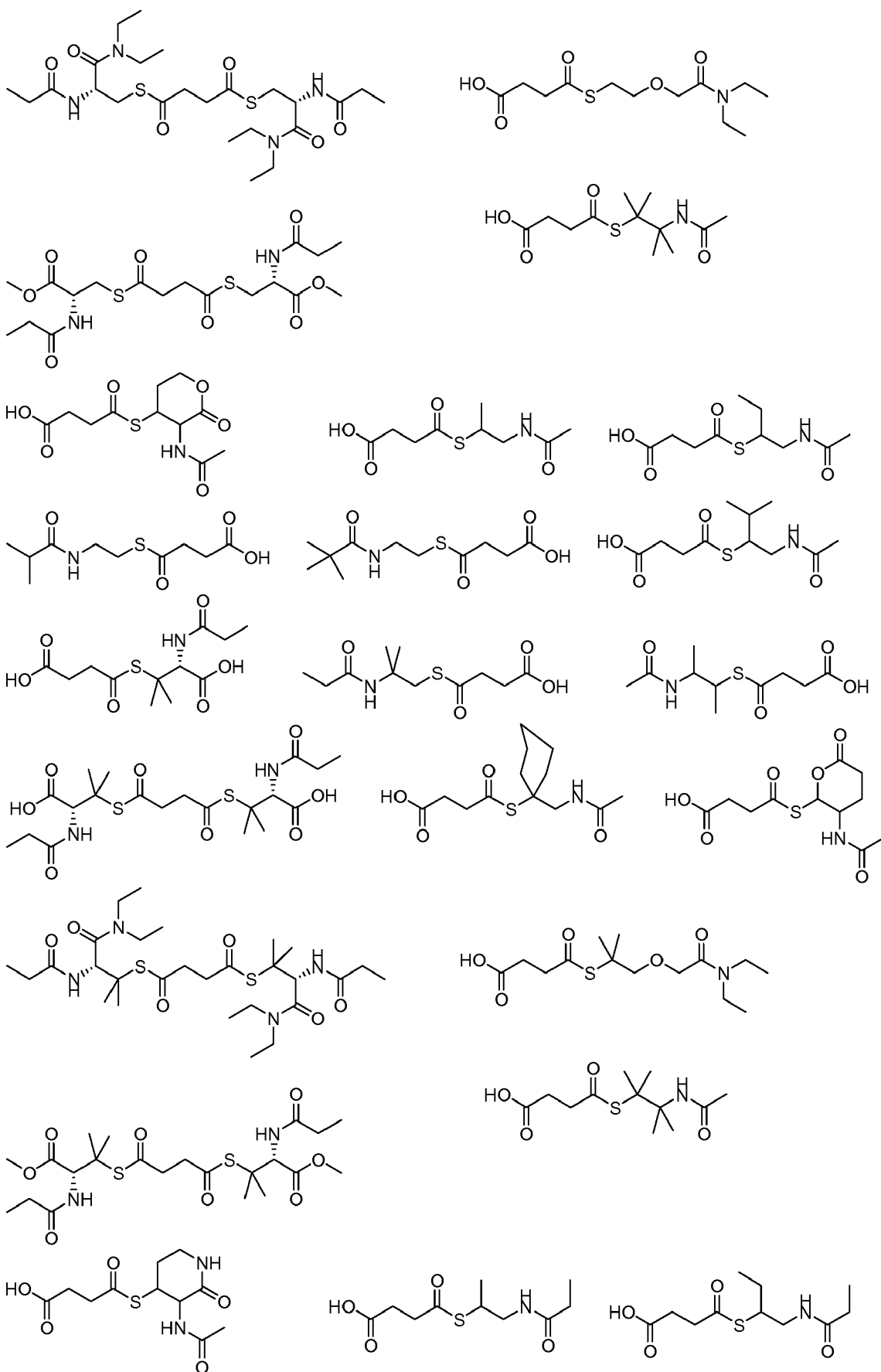
y p=1 y X₅ es CONR₁R₃ de tal manera que la fórmula (VII) es



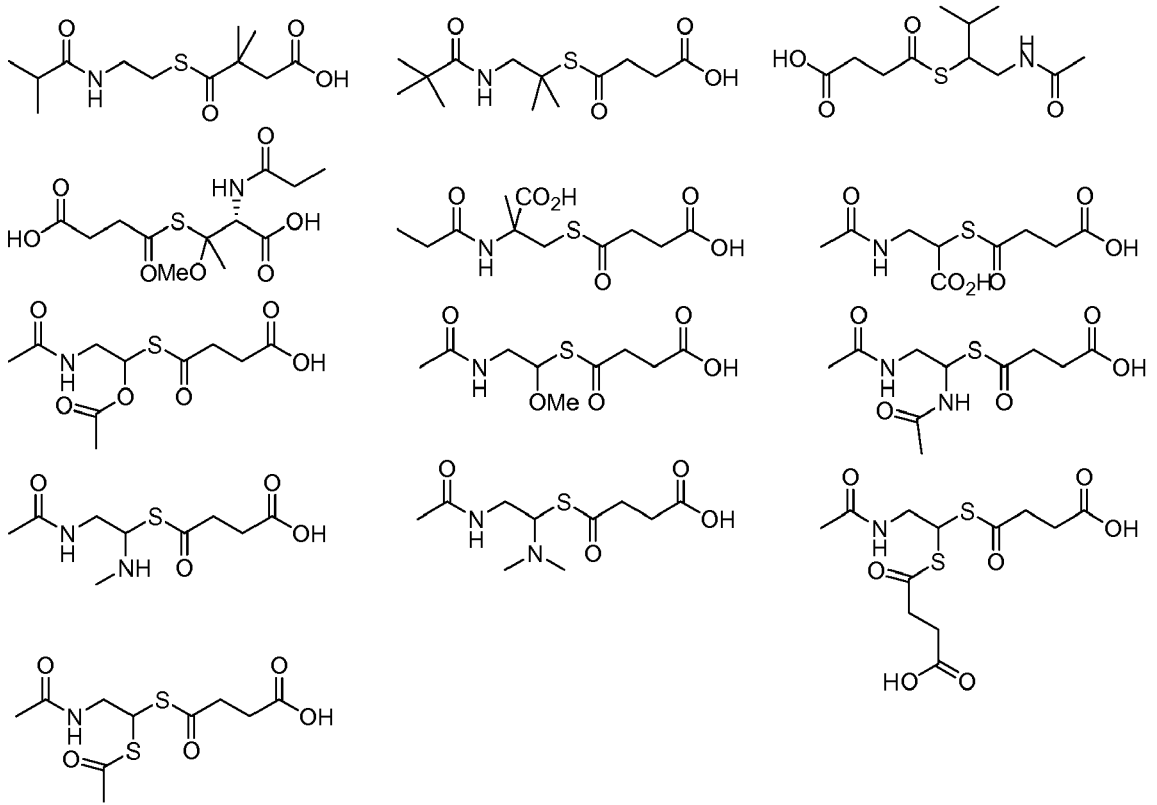
20

12. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto se selecciona de:





5



- 5
13. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para su uso en medicina.
14. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para su uso en cosméticos.
- 10 15. Composición que comprende un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y uno o más excipientes farmacéutica o cosméticamente aceptables.

Figura 1

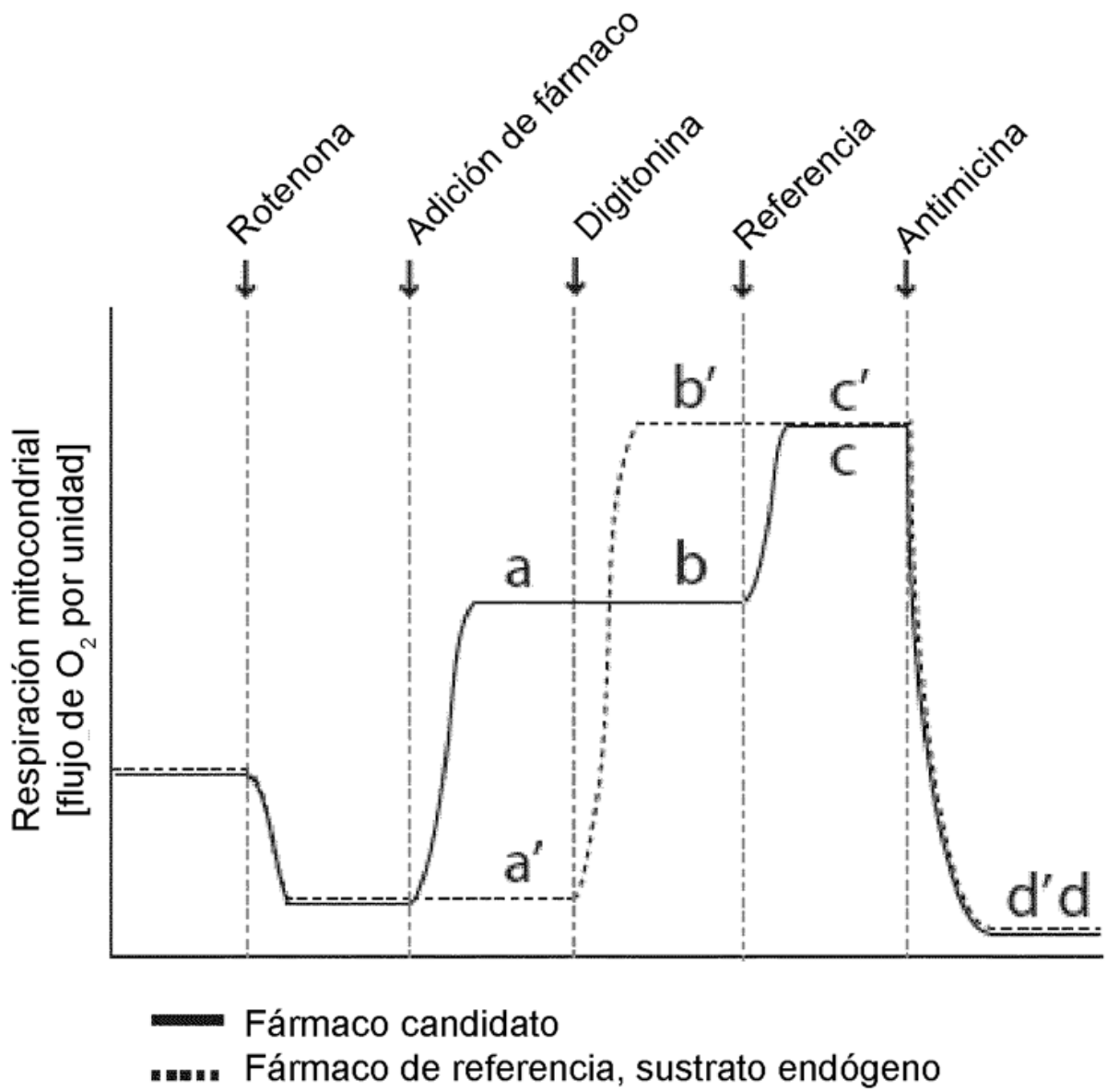


Figura 2

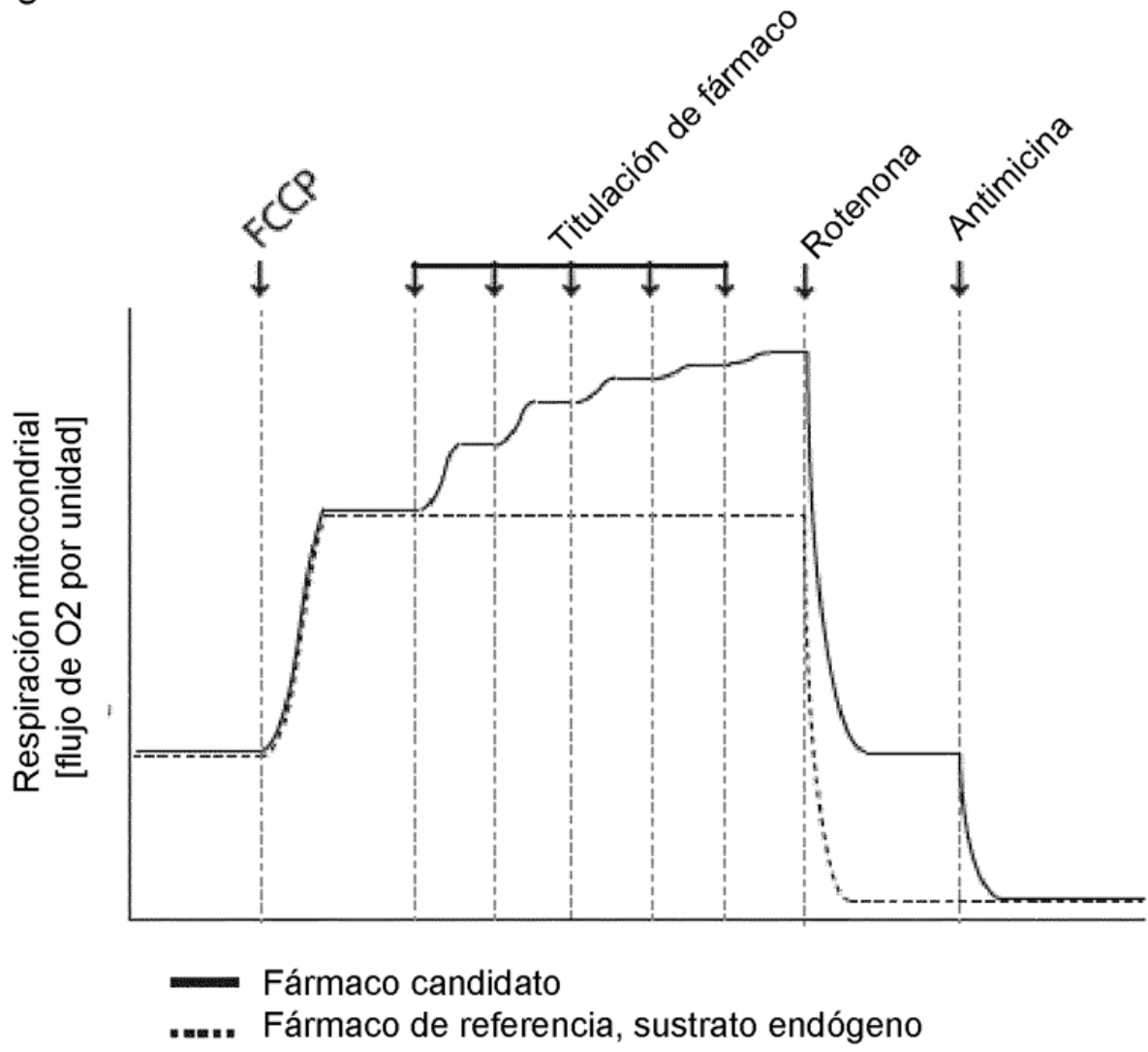


Figura 3

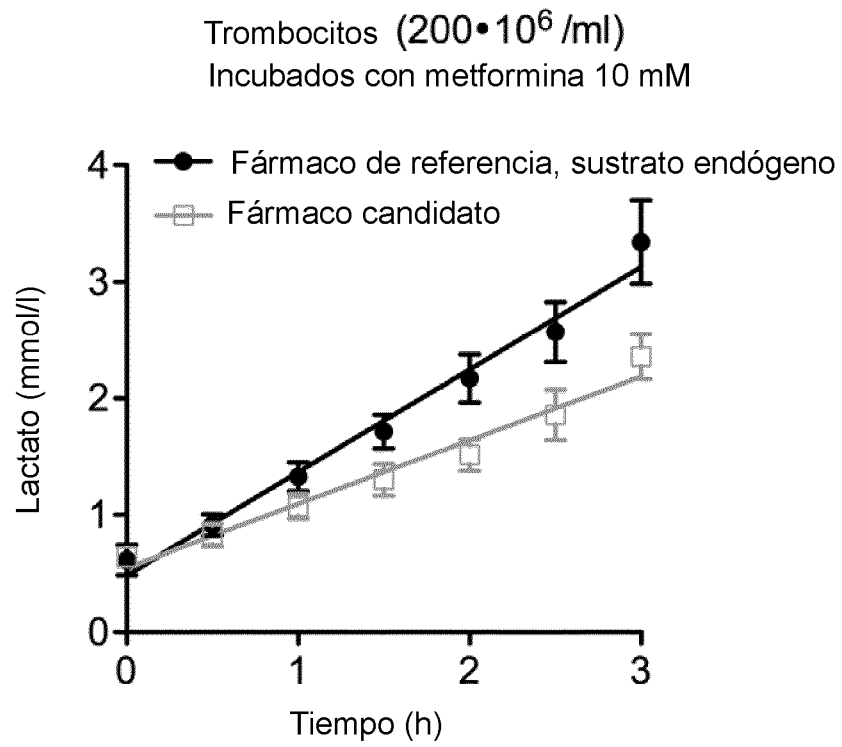


Figura 4

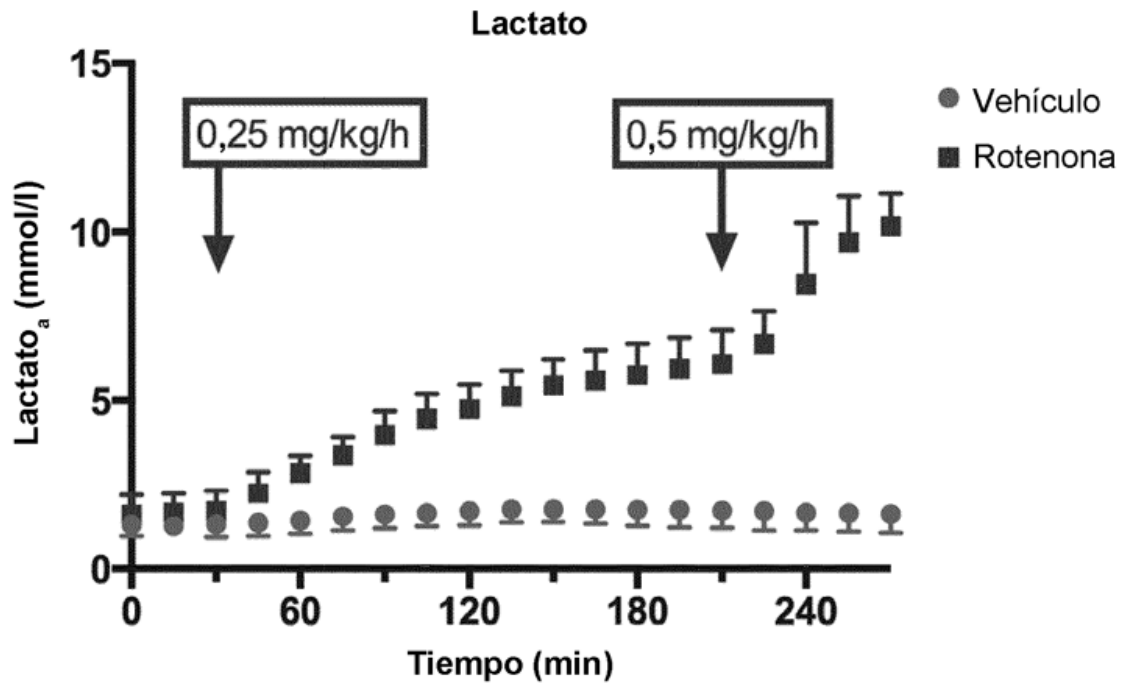


Figura 5

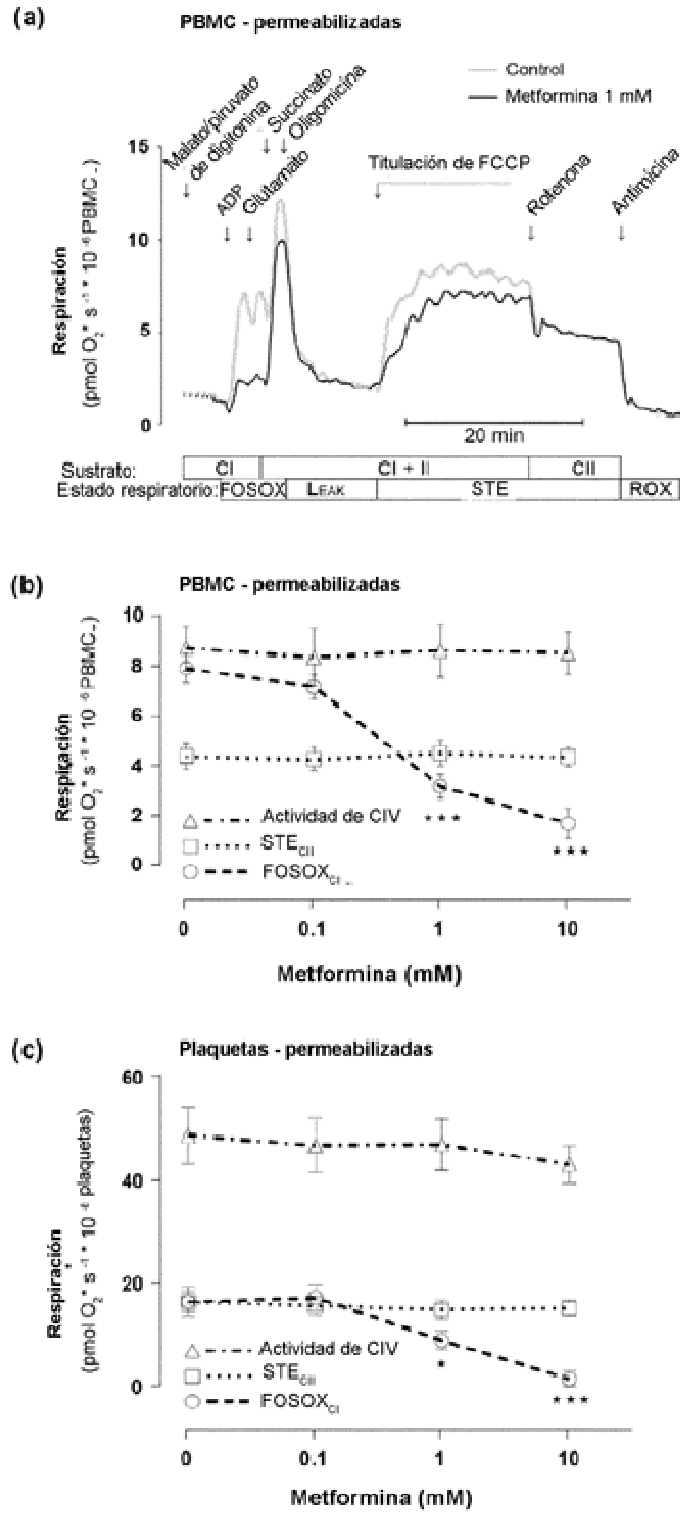


Figura 6

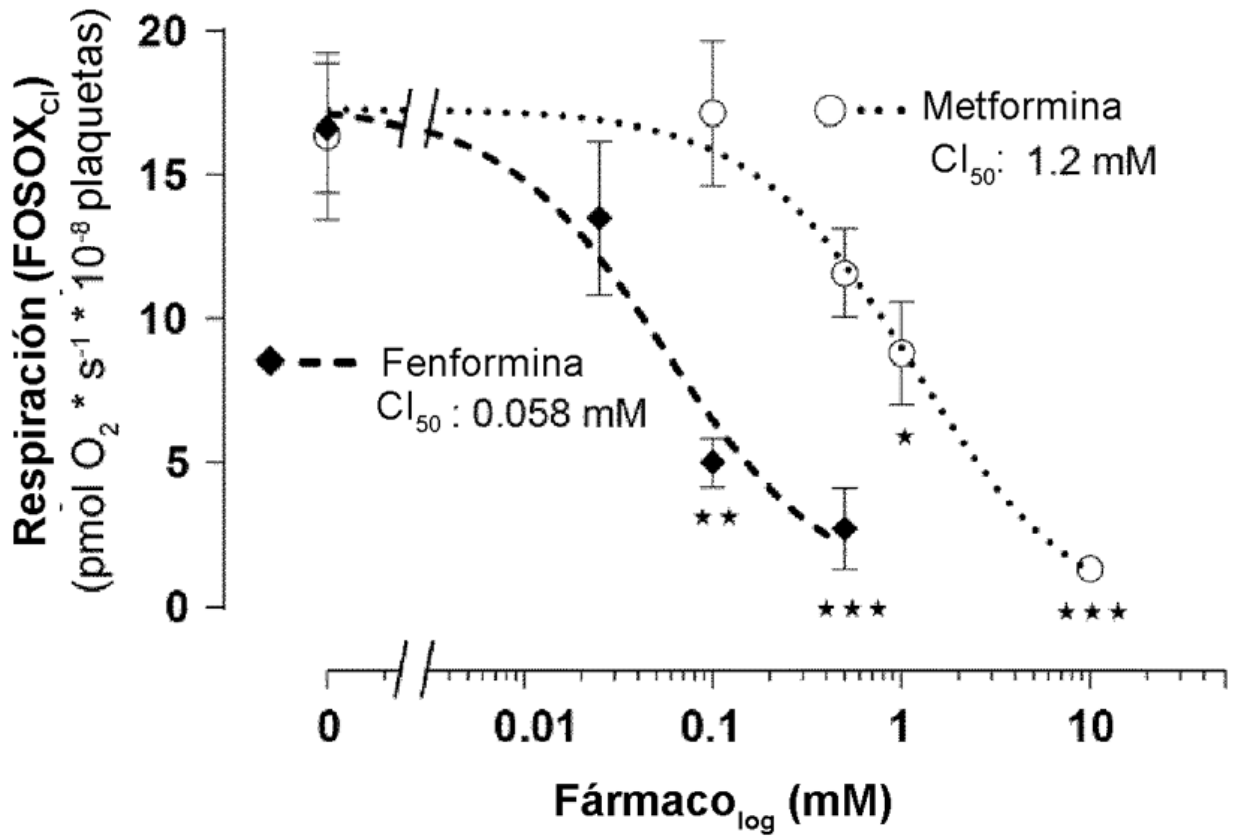


Figura 7

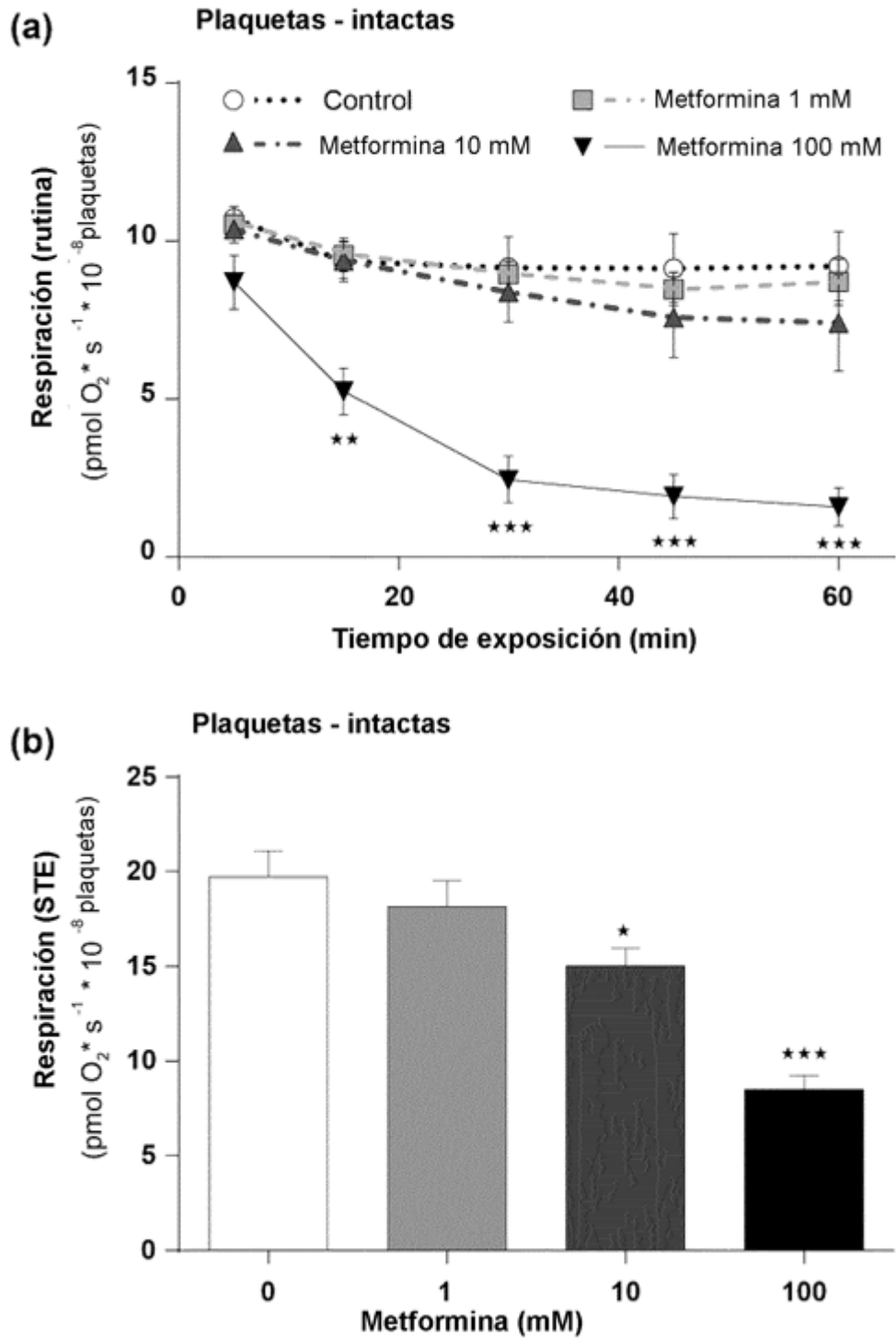


Figura 8

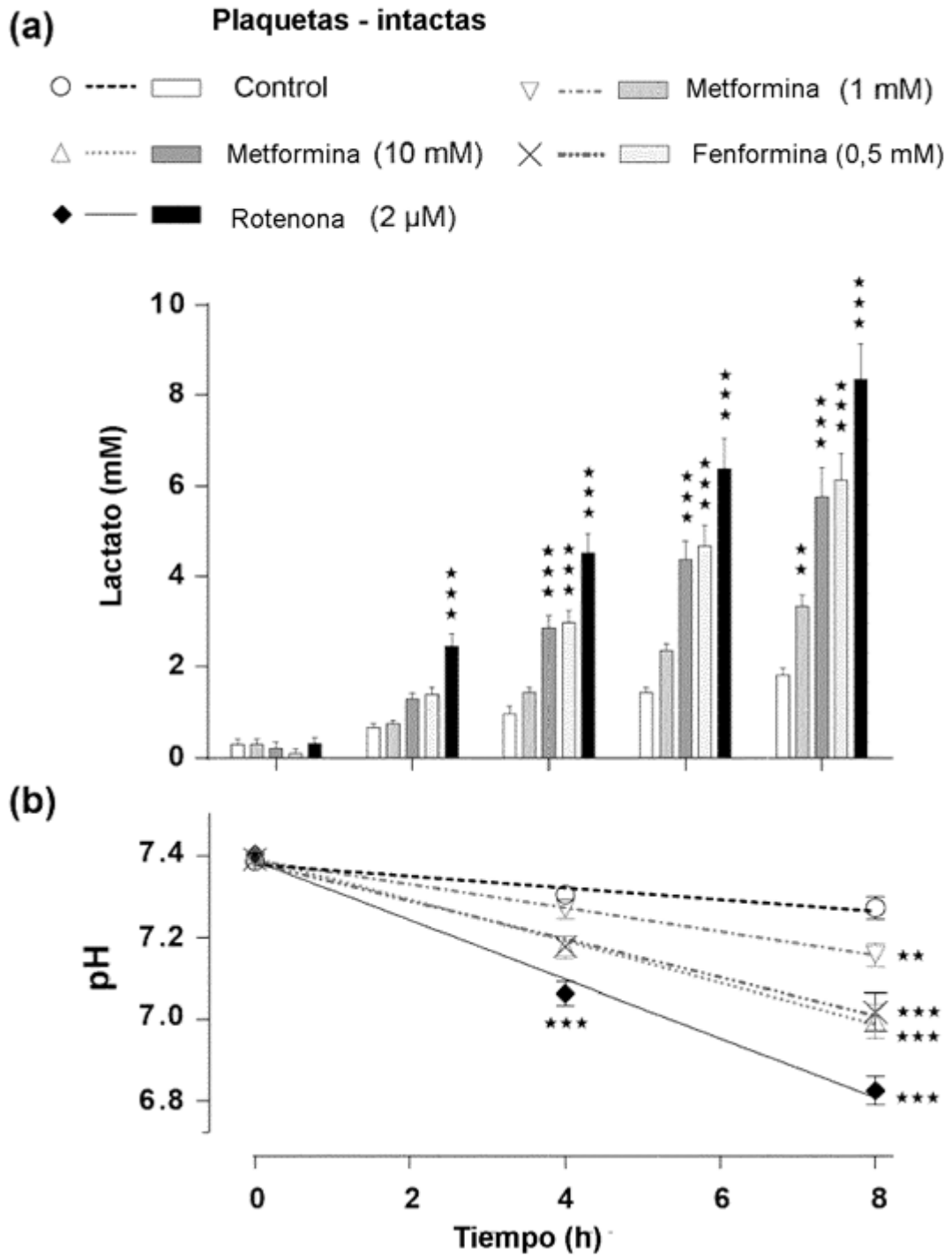


Figura 9

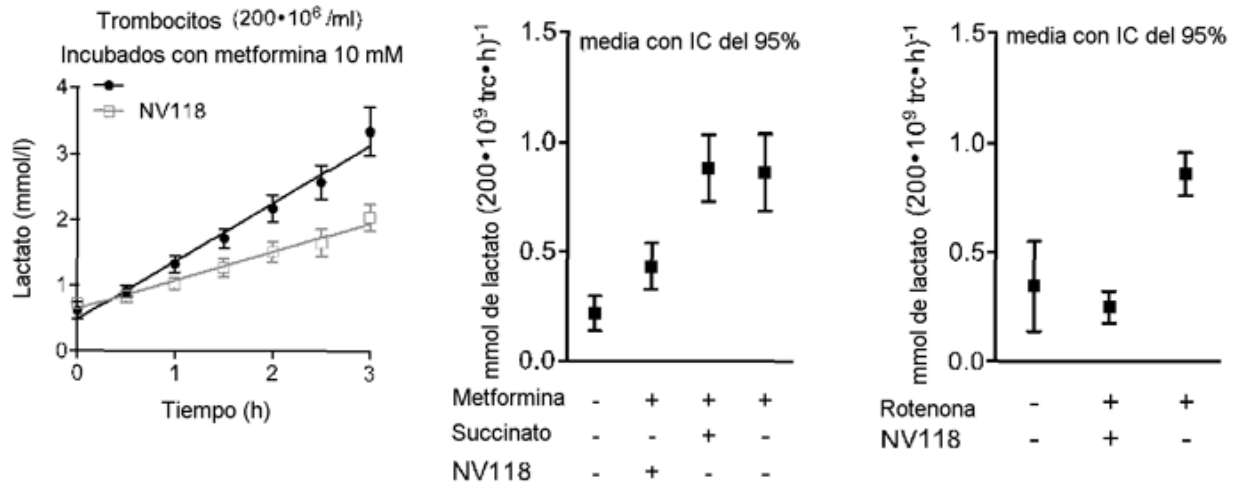


Figura 10

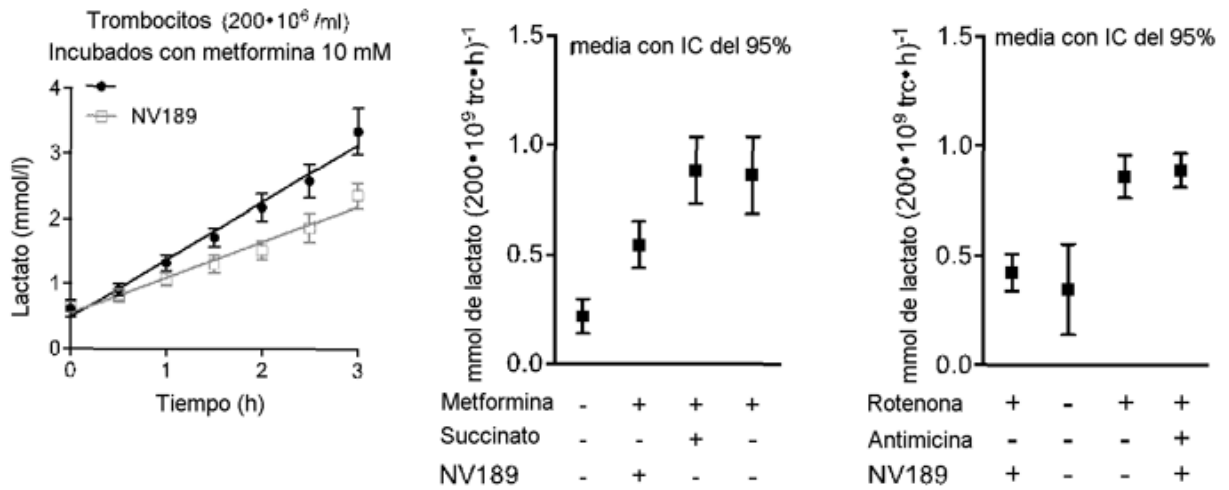


Figura 11

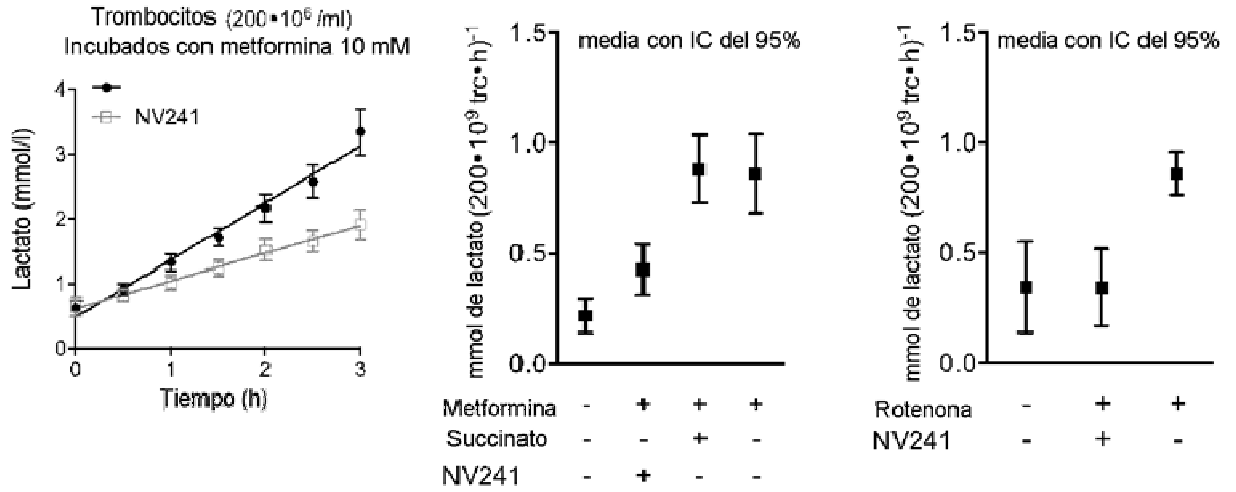


Figura 12

