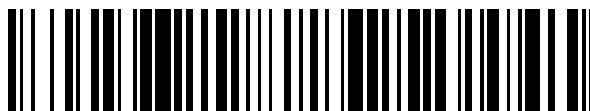


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 064**

51 Int. Cl.:

A61K 47/14	(2007.01)	A61K 31/66	(2006.01)
A61K 31/047	(2006.01)	C07F 9/54	(2006.01)
A61K 47/54	(2007.01)	A61K 31/122	(2006.01)
A61K 47/10	(2007.01)		
A61K 47/12	(2006.01)		
A61K 9/00	(2006.01)		
A61K 47/26	(2006.01)		
A61K 47/36	(2006.01)		
A61K 31/352	(2006.01)		
A61K 31/4375	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2012 PCT/US2012/040711**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12167236**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2012 E 12792111 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2714024**

54 Título: **Formulaciones orales de antioxidantes dirigidos mitocondrialmente y su preparación y uso**

30 Prioridad:

03.06.2011 US 201161492940 P

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

14.03.2019

73 Titular/es:

**MITOTECH SA (100.0%)
42 rue de la Vallee
2661 Luxembourg, LU**

72 Inventor/es:

**SKULACHEV, MAXIM V.;
SKULACHEV, VLADIMIR P.;
ZAMYATNIN, ANDREY A.;
EFREMOV, EUGENY S.;
TASHLITSKY, VADIM N.;
ZINOVKIN, ROMAN A.;
EGOROV, MAXIM V.;
FRIEDHOFF, LAWRENCE T.;
PLETUSHKINA, OLGA Y.;
ANDREEV-ANDRIEVSKY, ALEXANDER A. y
ZINEVICH, TATIANA V.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 704 064 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

Formulaciones orales de antioxidantes dirigidos mitocondrialmente y su preparación y uso

Campo de la invención

5 Esta divulgación se encuentra en los campos de la biología celular, la farmacología y la medicina y, en particular, la inflamación, la diabetes, el choque séptico, la cicatrización de heridas y la cardiopatía coronaria.

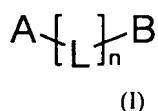
Antecedentes

10 Se han descrito propiedades terapéuticas alentadoras de los antioxidantes dirigidos a las mitocondrias (MTA en inglés) (véase, por ejemplo, el documento US2008176929; Skulachev y col. (2009), Biochim. Biophys. Acta, 1787:437-61). Los experimentos realizados que revelaron estas propiedades se realizaron con soluciones recién preparadas de MTA y se realizaron mediante la disolución de soluciones madre de etanol conservadas a -80 °C poco antes de la administración de la preparación a los animales. Tal procedimiento de preparación y administración no es adecuado o realista para la preparación de productos farmacéuticos, ya que es extremadamente inconveniente, si no imposible, para la fabricación industrial, la logística y el uso por parte de los pacientes. El documento CA 2 764 481 A1 desvela composiciones estabilizadas de bromuro de SkQ1 para el tratamiento de los ojos. Los componentes, como el glicerol y el propilen glicol, se pueden seleccionar como agentes de isotización. Los intentos de desarrollar una composición farmacéutica (para su administración oral o inyección) con una estabilidad aceptable revelaron que los MTA no son estables en la mayoría de los tipos de composiciones orales o inyectables. Hasta ahora, no se han descrito composiciones farmacéuticas estables que contengan MTA que posean una estabilidad aceptable. Por consiguiente, todavía se necesitan formulaciones líquidas mejoradas con estabilidad.

Sumario

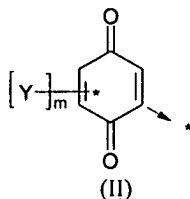
20 La presente divulgación proporciona formulaciones líquidas y sólidas estabilizadas que comprenden MTA adecuadas para su administración oral, nasal e intravenosa e inyectable y procedimientos de preparación de tales formulaciones. La invención también proporciona procedimientos de tratamiento y profilaxis de enfermedades y afecciones relacionadas con las mitocondrias que usan tales formulaciones. El ámbito de la invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a procedimientos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

25 En un aspecto, la divulgación proporciona un producto farmacéutico estabilizado, tal como se define en las reivindicaciones, que comprende un compuesto de Fórmula I en forma oxidada y/o reducida. El compuesto de Fórmula I es:

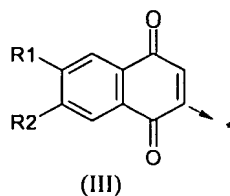


en el que:

A es un antioxidante de Fórmula II:



35 y/o la forma reducida del mismo, en el que m comprende un número entero de 1 a 3; Y se selecciona independientemente del grupo que consiste en: alquilo inferior, alcoxi inferior, o dos grupos Y adyacentes, junto con los átomos de carbono a los que se unen, forman la siguiente estructura de Fórmula III:



y/o la forma reducida del mismo, en el que:

R1 y R2 son iguales o diferentes y son, cada uno, independientemente, alquilo inferior o alcoxi inferior;
 L es un grupo enlazador, que comprende: a) una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada opcionalmente
 5 sustituida con uno o más enlaces dobles o triples, o enlaces de éter, o enlaces de éster o C-S, o S-S o
 enlaces de péptido; y que se sustituye opcionalmente con uno o más sustituyentes seleccionados
 preferentemente de alquilo, alcoxi, halógeno, grupo ceto, grupo amino; o b) una cadena de isopreno natural;
 n es un número entero de 1 a 20; y
 B es un grupo diana que comprende: a) un ion de Skulachev Sk (Sk + Z⁻) en el que: Sk es un catión lipófilo o
 10 una metaloporfirina lipófila y Z es un anión farmacéuticamente aceptable; o b) un zwitterión anfífilo,
 con la condición de que, en el compuesto de Fórmula I, A no sea ubiquinona (por ejemplo, 2-metil-4,5-
 dimetoxi-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadienilo) o tocoferol o un compuesto mimético de superóxido de dismutasa o
 ebseleno; cuando L es un radical decilo divalente, pentilo divalente o propilo divalente; y cuando B es un
 catión de trifenilfosfonio.

15 En una realización particular, la composición se reduce o se oxida. En algunas realizaciones, la formulación está en
 forma líquida y, en otras realizaciones, la formulación está en forma sólida.

La formulación comprende un compuesto de Fórmula I en glicerol a entre el 10 % y el 30 % o 1,2-propilen glicol al
 20-100 %. En una realización particular, la composición de Fórmula I está en 1,2-propilen glicol a aproximadamente
 el 50 %.

20 La divulgación también proporciona formulaciones farmacéuticas sólidas estabilizadas que comprenden un
 compuesto de Fórmula I en forma oxidada o reducida, con la condición de que, en el compuesto de Fórmula I, A no
 sea ubiquinona (por ejemplo, 2-metil-4,5-dimetoxi-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadienilo) o tocoferol o un compuesto
 mimético de superóxido de dismutasa o ebseleno; cuando L es un radical decilo divalente, pentilo divalente o propilo
 divalente; y cuando B es un catión de trifenilfosfonio.

25 En una realización, la formulación también comprende de 1 equivalente molar a 200 equivalentes molares de un
 agente de antioxidación que reduce la forma oxidada del compuesto de Fórmula I y un vehículo farmacéuticamente
 aceptable.

En algunas realizaciones, el agente de antioxidación es ácido ascórbico.

En algunas realizaciones, el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende sorbitol, glucosa y/o estearato de
 magnesio.

30 En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica es SkQ1 o SkQ1H₂. En otras realizaciones, el
 compuesto es SkQR1 o SkQR1H₂. Aún en otras realizaciones, el compuesto es SkQ3 o SkQ3H₂. En otras
 realizaciones más, el compuesto es SkQRB o SkQRBH₂. En otras realizaciones, el compuesto es SkQB1 o
 SkQB1H₂. Aún en otras realizaciones, el compuesto es SkQBP1 o SkQBP1H₂.

35 En otros aspectos, la divulgación proporciona procedimientos de tratamiento y prevención de la diabetes tipo I y II, la
 inflamación, el choque séptico, la artritis y la cardiopatía coronaria y procedimientos de ayuda en la cicatrización de
 heridas. En estos procedimientos, se administra a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una
 formulación que comprende un compuesto estabilizado de Fórmula I en forma líquida o sólida, con la condición de
 40 que, en el compuesto de Fórmula I, A no sea ubiquinona (por ejemplo, 2-metil-4,5-dimetoxi-3,6-dioxo-1,4-
 ciclohexadienilo) o tocoferol o un compuesto mimético de superóxido de dismutasa o ebseleno; cuando L es un
 radical decilo divalente, pentilo divalente o propilo divalente y cuando B es un catión de trifenilfosfonio.

En algunas realizaciones del procedimiento, la formulación comprende glicerol, glicol y/o etanol. En algunas
 realizaciones, la formulación comprende SkQ1, SkQ1H₂, SkQR1, SkQR1H₂, SkQ3, SkQ3H₂, SkQBP1, SkQBP1H₂,
 SkQRB o SkQRBH₂.

45 En algunas realizaciones, la formulación líquida se administra por vía oral o mediante inyección. En otras
 realizaciones, la formulación sólida se administra por vía oral, anal o vaginal. En algunas realizaciones, la
 formulación es un sólido y comprende ácido ascórbico. En realizaciones particulares, la formulación también
 comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, la diabetes tipo I o II se trata con SkQ1 o SkQ1H₂ en glicerol al 20 %.

50 En determinadas realizaciones, la artritis se trata con una formulación que comprende SkQ1 o SkQ1H₂ en glicerol al
 20 %. Aún en otras realizaciones, la artritis se trata con una formulación que comprende SkQ1 y ácido ascórbico.

Breve descripción de los dibujos

Los objetos anteriores y otros de la presente divulgación, las diversas características de la misma, así como la propia
 invención, pueden entenderse más completamente a partir de la siguiente descripción, cuando se leen junto con los
 dibujos adjuntos.

La Figura 1 es una representación gráfica del efecto de SkQ1 sobre el nivel de glucosa en sangre del modelo de animal diabético (ratones tratados con aloxano);

la Figura 2 es una representación gráfica del efecto de SkQ1 sobre el daño hepático de ratones diabéticos db/db;

5 la Figura 3a es una representación gráfica que ilustra el efecto de SkQ1 sobre la epitelización de heridas diabéticas;

la Figura 3b es una representación gráfica que ilustra el efecto de SkQ1 sobre la cantidad de neutrófilos en las heridas diabéticas; la Figura 3c es una representación gráfica que ilustra el efecto de SkQ1 sobre la densidad de vasos en las heridas diabéticas;

10 la Figura 4 es una representación gráfica del efecto de SkQ1 sobre la supervivencia de ratones sometidos a choque séptico;

la Figura 5 es una representación gráfica que demuestra el efecto antiinflamatorio de SkQ1 en la artritis inducida por colágeno en ratas;

la Figura 6 es una representación gráfica que demuestra el efecto antiinflamatorio de SkQ1 y SkQR1 al rescatar las células endoteliales de la muerte inducida por la citocina proinflamatoria TNF-alfa;

15 la Figura 7a es una representación gráfica que demuestra la capacidad de SkQ1 para inhibir la inflamación *in vitro* mediante la disminución de la expresión de citocinas proinflamatorias; y

la Figura 7b es una representación gráfica que demuestra la capacidad de SkQ1 para inhibir la inflamación *in vivo* mediante la disminución de la expresión de citocinas proinflamatorias, tal como se mide mediante la expresión relativa de ARNm de ICAM-1 en ratones.

20 Descripción

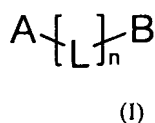
Antes de la descripción detallada de la invención que sigue, se debe entender que la invención no está limitada a la metodología, los protocolos y los reactivos particulares descritos en el presente documento, ya que están sujetos a cambios. Además, se debe entender que, en la presente invención, la terminología se usa para describir solo realizaciones particulares y no limita el ámbito de la presente invención, que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se especifique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que pueden entender aquellos expertos en la materia.

25 De manera inesperada, se halló que muchos MTA eficaces no son lo suficientemente estables en las formulaciones farmacéuticas líquidas y sólidas habituales adecuadas para su administración mediante inyección o mediante administración oral, IV; nasal, tópica o entérica. Esta característica limitada la aplicación clínica de los productos farmacéuticos basados en MTA como compuestos activos.

I. Formulaciones estabilizadas

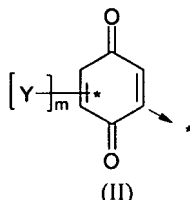
La presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas basadas en MTA líquidas estables aplicables en la práctica clínica. Un MTA útil es un compuesto de Fórmula I en forma oxidada y/o reducida.

35 El compuesto de Fórmula I es:



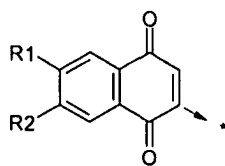
en el que:

A es un antioxidante de Fórmula II:



40 y/o la forma reducida del mismo, en el que m comprende un número entero de 1 a 3;

Y se selecciona independientemente del grupo que consiste en: alquilo inferior, alcoxi inferior, o dos grupos Y adyacentes, junto con los átomos de carbono a los que se unen, forman la siguiente estructura de Fórmula III:



(III)

y/o la forma reducida del mismo, en el que:

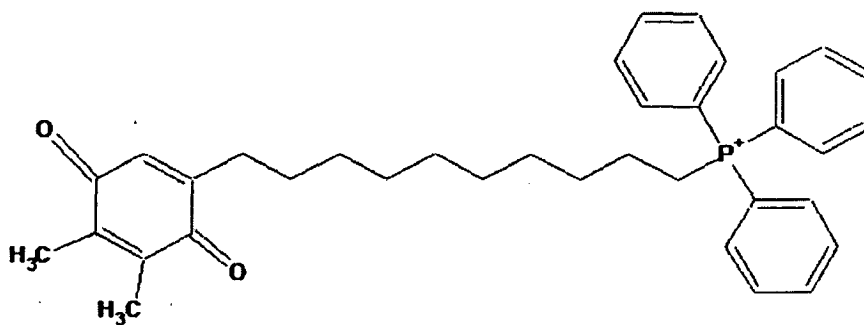
R1 y R2 son iguales o diferentes y son, cada uno, independientemente, alquilo inferior o alcoxi inferior;

5 L es un grupo enlazador, que comprende: a) una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada opcionalmente sustituida con uno o más enlaces dobles o triples, o enlaces de éter, o enlaces de éster o C-S, o S-S o enlaces de péptido; y que se sustituye opcionalmente con uno o más sustituyentes seleccionados preferentemente de alquilo, alcoxi, halógeno, grupo ceto, grupo amino; o b) una cadena de isopreno natural;

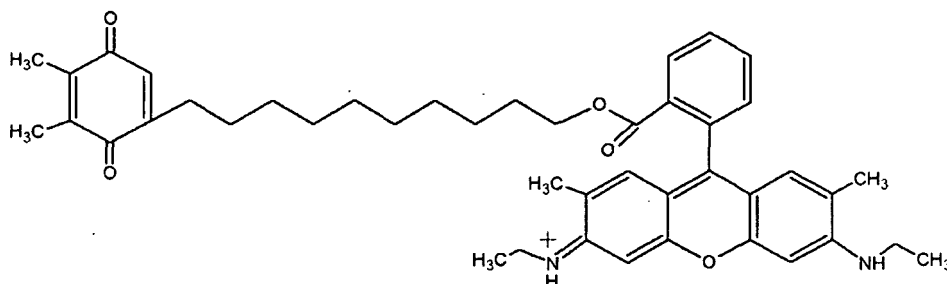
n es un número entero de 1 a 20; y

10 B es un grupo diana que comprende: a) un ion de Skulachev Sk: (Sk+ Z⁻), en el que: Sk es un catión lipófilo o una metaloporfirina lipófila y Z es un anión farmacéuticamente aceptable; o b) un zwitterión anfífilo, con la condición de que, en el compuesto de Fórmula I, A no sea ubiquinona (por ejemplo, 2-metil-4,5-dimetoxi-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadienilo) o tocoferol o un compuesto mimético de superóxido de dismutasa o ebseleno; cuando L es un radical decilo divalente, pentilo divalente o propilo divalente; y cuando B es un catión de trifenilfosfonio, con la condición de que, en el compuesto de Fórmula I, A no sea ubiquinona (por ejemplo, 2-metil-4,5-dimetoxi-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadienilo) o tocoferol o un compuesto mimético de superóxido de dismutasa o ebseleno; cuando L es un radical decilo divalente, pentilo divalente o propilo divalente; y cuando B es un catión de trifenilfosfonio.

Los MTA útiles específicos incluyen, pero sin limitación, el SkQ1 y SkQR1:



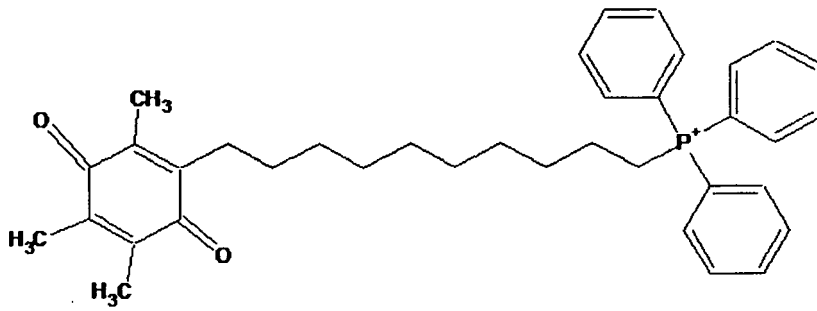
SkQ1



SkQR1

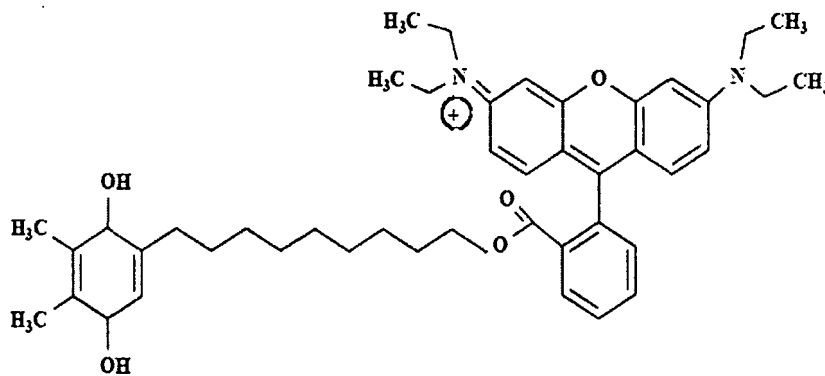
20 y sus formas reducidas (quinol) SkQ1H₂ y SkQR1H₂, respectivamente. Estos MTA se han descrito en el documento PCT/RU2006/000394.

Otras variantes de MTA útiles incluyen, pero sin limitación, SkQ3:



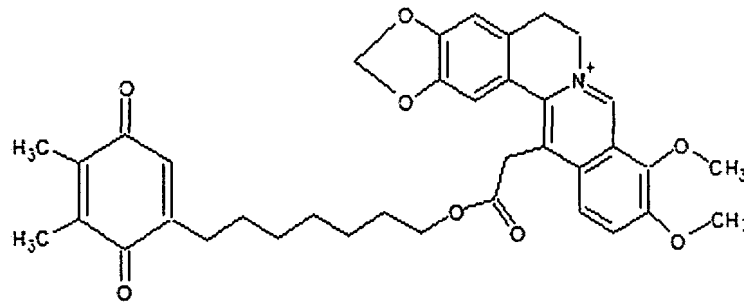
SkQ3

y su forma reducida (quinol) SkQ3H₂;
para SkQRB:



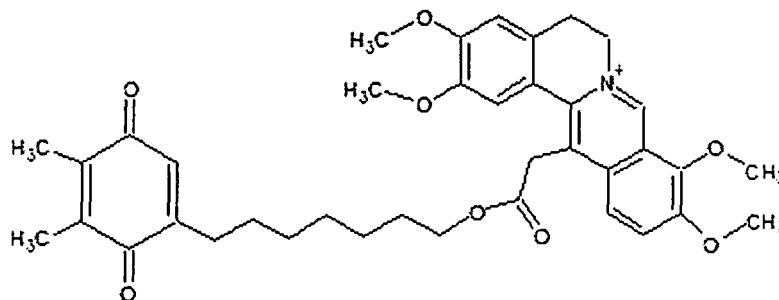
SkQRBH₂

5 y su forma oxidada (quinona) SkQRB;
para SkQB1:



SkQB1

y su forma reducida (quinol), SkQB1H₂; y
para SkQBP1:



SkQBP1

10

y su forma reducida (quinol) SkQBP1H₂.

ES 2 704 064 T3

Estos MTA se formulan para su administración oral como soluciones líquidas y como formulaciones sólidas.

Las soluciones líquidas también son útiles para la administración de aerosol mediante inyección, para la administración IV, administración nasal, administración tópica o administración entérica.

5 Tales formulaciones líquidas adecuadas incluyen uno o más disolventes o componentes solubles en los que se colocan los MTA. Los disolventes incluyen glicerol o 1,2-propilen glicol, tal como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, las formulaciones estables útiles contienen al menos glicerol al 10 % o mezclas del mismo, que también pueden incluir agua, glicerol, etanol y/o 1,2-propileno para compensar la diferencia. Por ejemplo, las soluciones estabilizantes representativas de SkQ1H₂, SkQR1, SkQR1H₂, SKQ3, SkQ3H₂, SKQRB, SkQRBH₂, SKQB1, SkQB1H₂, SKQBP1, SkQBP1H₂ y/o SkQ1 de 1 nM a 1 mM contienen 1,2-propilen glicol a entre el 20 % y el 100 % o glicerol al 10-30 %. Otros vehículos farmacéuticamente aceptables también pueden ser componentes de tales formulaciones.

Debido a que los MTA no son productos de larga conservación durante períodos de tiempo largos, se sometieron a ensayo diversos compuestos para determinar su capacidad para estabilizar SkQ1 y SkQR1 como MTA representativos en forma seca.

15 La beta-ciclodextrina, la goma arábiga, las fibras de frutas y el cloruro de sodio no proporcionaron niveles de estabilización adecuados (la velocidad de degradación, %/día, fue de 0,8 a 8,1).

Los disolventes líquidos también se sometieron a ensayo para determinar su capacidad para estabilizar los MTA representativos SkQ1 y SkQR1. Los disolventes sometidos a ensayo fueron soluciones de agua de glicerol (del 10 % al 100 %), lactulosa al 50 % y 1,2-propilen glicol (del 10 % al 100 %, a 60 °C). Algunos resultados representativos se muestran a continuación (Tabla 1).

Tabla 1

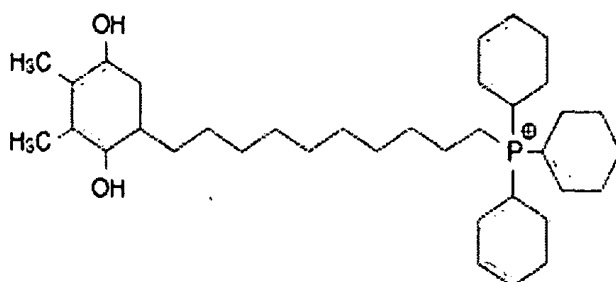
MTA	Concentración, mkM	Disolvente estabilizante	Velocidad de degradación, porcentaje por día
SkQ1	400	Lactulosa al 50 %	9,01
SkQ1	400	1,2-propilen glicol al 10 %	0,47
SkQ1	400	1,2-propilen glicol al 50 %	0,06
SkQ1	400	1,2-propilen glicol al 100 %	0,18
SkQ1	400	Glicerol al 10 %	0,61
SkQ1	400	Glicerol al 20 %	0,51
SkQ1	400	Glicerol al 30 %	0,53
SkQ1	400	Glicerol al 40 %	0,91
SkQ1	400	Glicerol al 50 %	1,54
SkQ1	400	Glicerol al 60 %	1,92
SkQ1	400	Glicerol al 70 %	2,4
SkQ1	400	Glicerol al 80 %	3,2
SkQ1	400	Glicerol al 90 %	4,18
SkQRB	200	Glicerol al 50 %	0,4
SkQR1	140	Glicerol al 50 %	0,7
SkQBP1	400	Glicerol al 50 %	0,08
SkQR1	100	1,2-propilen glicol al 10 %	6,19
SkQR1	100	1,2-propilen glicol al 20 %	0,34
SkQR1	100	1,2-propilen glicol al 30 %	0,32
SkQR1	100	1,2-propilen glicol al 40 %	0,06
SkQR1	100	1,2-propilen glicol al 50 %	< 0,01
SkQR1	100	1,2-propilen glicol al 60 %	< 0,01
SkQR1	100	1,2-propilen glicol al 70 %	0,05
SkQR1	100	1,2-propilen glicol al 80 %	0,23
SkQR1	100	1,2-propilen glicol al 90 %	0,30
SkQR1	100	1,2-propilen glicol al 100 %	0,23

Estos resultados ilustran la alta estabilidad de los MTA en una composición farmacéutica para su administración en forma de solución en glicerol (de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 100 % de glicerol) y solución de 1,2-propilen glicol a aproximadamente el 50 %.

Además, la estabilidad de SkQ1 y SkQR1 aumentó de manera significativa en los viales de plástico o vidrio de color oscuro, lo que indicaba que estos compuestos eran sensibles a la luz. Por consiguiente, una de las formas de mejorar o aumentar adicionalmente la estabilidad de las composiciones líquidas de SkQ durante el almacenamiento y el transporte es mediante su protección de la luz.

- 5 Cuando los compuestos de SkQ de Fórmula I según la divulgación están en forma sólida, estos se pueden estabilizar, por ejemplo, con un agente de antioxidación. Tal agente puede ser ácido ascórbico. Las cantidades útiles de ácido ascórbico varían de aproximadamente 1 equivalente molar a aproximadamente 200 equivalentes molares. Tal como se usa en el presente documento, el término "equivalente molar" se refiere al índice de partículas disueltas o esa cantidad que reacciona con o suministra un mol de H⁺ en una reacción de ácido-base o que reacciona o
- 10 suministra un mol de electrones en una reacción de reducción-oxidación. Otros componentes útiles de las formulaciones de MTA estabilizadas representativas se muestran en la Tabla 2. Tales formulaciones pueden comprender también vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como, pero sin limitación, sorbitol, glucosa y estearato de magnesio.

- 15 Otro enfoque para estabilizar un compuesto de SkQ en una formulación farmacéutica es el uso de su forma reducida (quinol). Por ejemplo, la forma reducida de SkQ1 es el SkQ1H₂ quinol:

Z⁻SkQ1H₂ (forma quinol),

en el que Z⁻ es un anión farmacéuticamente aceptable, tal como, pero sin limitación, bromuro, cloruro o ascorbato. En una composición farmacéutica seca o soluble, SkQ1H₂ se puede estabilizar y proteger de la oxidación mediante un agente de reducción, tal como, pero sin limitación, ascorbato.

- 20 Otro enfoque aún para mejorar la estabilidad es la colocación del MTA, en forma reducida u oxidada, en una formulación de "cápsula blanda", que es una cápsula basada en gelatina con un relleno líquido. Las formulaciones de cápsula blanda de MTA proporcionan una buena biodisponibilidad, ya que la cápsula blanda se disuelve en vehículos líquidos, oleosos y miscibles en agua, tales como mono y diglicéridos de ácido cáprico/caprílico (Capmul MCM), aceite Miglyol 8122 (triglicéridos de cadena media). Cuando la cápsula blanda se libera en el cuerpo,
- 25 consigue emulsionarse y proporciona una dispersión del fármaco en un área superficial alta.

- Se pueden usar los mono y diglicéridos de ácido cáprico/caprílico (Capmul MCM), aceite Miglyol 8122 (triglicéridos de cadena media). Tales vehículos oleosos a medida que pasan a formar parte de un sistema autoemulsionante. Otros componentes estabilizantes ejemplares son el succinato de polietilén glicol/vitamina E, el monooleato de sorbitán, el labrasol y las combinaciones de los mismos. De manera adicional, basándose en su potencial de oxidación, el tocoferol, el hidroxitolueno butilado y/o el anisol de hidroxil butilado se pueden incluir en la composición como antioxidante.
- 30

Otro enfoque para el aumento de la estabilización de los MTA en la solución es la creación de una nanosuspensión de MTA (< 1000 nm) estabilizada con, por ejemplo, succinato de polietilén glicol/vitamina E. Se puede usar la molienda en húmedo de Netzsch (<http://www.netzsch-grinding.com>) para lograr esta nanosuspensión.

- 35 De manera adicional, las soluciones de etanol de MTA reducido (tal como SkQ1H₂) se pueden mezclar con el ácido ascórbico y secar con ácido para crear un polvo o sólido resultante que es estable durante varios meses.

- Las formulaciones estables en forma de comprimidos orales se pueden preparar mediante extrusión por fundición en caliente. Esta técnica de granulación por fundición mantiene la estabilidad polimórfica de los fármacos y mejora de manera significativa su biodisponibilidad oral. Se puede lograr mediante el mezclado en conjunto de los MTA con
- 40 macrogales (por ejemplo, polietilén glicoles 3350, 6000, polivinil pirrolidona, hidroxil propil celulosa y vitamina E TPSG) a través de una extrusora de fundición en caliente y la compresión de la granulación resultante en comprimidos o la encapsulación en cápsulas de gelatina dura.

Las formulaciones de SkQ1 orales líquidas y sólidas estables representativas se muestran a continuación (Tabla 2):

Tabla 2

SkQ1 oxidado**Soluciones:**

SkQ1 en glicerol al 20 % (% en peso), preparado con tampón de fosfato

SkQ1 en 1,2-propilen glicol al 50 % (% en peso) con ácido pirúvico

SkQ1 en 1,2-propilen glicol al 50 % (% en peso) con ácido láctico

Composiciones sólidas:

SkQ1 con PEG-4000

SkQ1 con dextrano

SkQ1 con ácido p-aminobenzoico (p-ABA)

SkQ1 con dextrano y p-ABA

SkQ1 con mioinosita

SkQ1 con ácido pirúvico y Pearlitol 200

SkQ1 con ácido pirúvico y celulosa microcristalina

SkQ1 con ácido pirúvico y F-Melt C

SkQ1 con ácido pirúvico y Syloid FP

SkQ1 con ácido cítrico (o ácido tartárico, o ácido láctico o glicina) y Pearlitol 200

SkQ1 con ácido cítrico (o ácido tartárico, o ácido láctico o glicina) y celulosa microcristalina

SkQ1 con ácido cítrico (o ácido tartárico, o ácido láctico o glicina) y F-Melt C

SkQ1 con ácido cítrico (o ácido tartárico, o ácido láctico o glicina) y Syloid FP

SkQ1H₂ (forma reducida)**Soluciones:**

SkQ1H₂ (0,11 M) con ácido ascórbico (10 eq) en EtOH al 55 %

SkQ1H₂ (7,4 mM) con ácido ascórbico (5 eq) y sorbitol (20 partes en peso) en 1,2-propilen glicol al 30 %

Composiciones sólidas:

SkQ1H₂ (1 eq) con ácido ascórbico (> 2 eq molares) con PEG-4000

SkQ1H₂ (1 eq) con ácido ascórbico (> 2 eq molares) con dextrano

SkQ1H₂ (1 eq) con ácido ascórbico (> 10 eq molares) con PEG-4000

SkQ1H₂ (1 eq) con ácido ascórbico (> 10 eq molares) con dextrano

SkQ1H₂ (1 eq) con sorbitol (30 partes en peso)

SkQ1H₂ (1 eq) con ácido ascórbico (0-5 eq) y sorbitol (30 partes en peso)

SkQ1H₂ (1 eq) con ácido ascórbico (0-5 eq) y glucosa (10 partes en peso)

SkQ1 H₂ (1 eq) con ácido ascórbico (0-5 eq) y monohidrato de lactosa (10 partes en peso)

SkQ1H₂ (1 eq) con ácido ascórbico (0-5 eq) y Pearlitol 200 (30 partes en peso)

SkQ1 H₂ (1 eq) con ácido ascórbico (0-5 eq) y celulosa microcristalina (30 partes en peso)

SkQ1 H₂ (1 eq) con ácido ascórbico (0-5 eq) y F-Melt C (30 partes en peso)

SkQ1H₂ (1 eq) con ácido ascórbico (0-5 eq) y Syloid FP (30 partes en peso)

Se preparó SkQ1H₂ en polvo ligero a un rendimiento de casi el 100 % mediante la reducción de SkQ1 con ácido ascórbico o cualquier otro agente de reducción adecuado en la mezcla de alcohol/agua, seguida del aislamiento mediante la extracción con cloroformo o cualquier otro disolvente adecuado, o mediante precipitación a partir de agua, seguida de separación centrífuga, o mediante cromatografía en columna (gel de sílice) o mediante el procedimiento HPLC RP. El material aislado estaba caracterizado por la RMN 1H, CL/CM y los datos de análisis elemental.

5

Se comprobó que la muestra tenía una excelente estabilidad durante 1 mes a TA o varios meses a 4 °C en la oscuridad en una atmósfera inerte sin ningún acceso a la humedad (Tabla 17). La muestra también se puede estabilizar mediante su disolución en cualquier disolvente aprótico y anhidro desoxigenado. La forma reducida de

10

SkQ1H₂ se oxida rápidamente hasta la forma original de SkQ1 cuando se expone al aire o una atmósfera húmeda o se disuelve en agua o cualquier disolvente protónico (Tabla 18).

5 La estabilidad de SkQ1H₂ en las composiciones sólidas depende en gran medida de la sequedad de la composición, así como de la sequedad de los excipientes y otros componentes. La humedad de la atmósfera ambiente y la presencia de aire también desempeñan una función esencial en la oxidación de SkQ1H₂ en SkQ1, seguida de la degradación de este último.

II. Tratamientos

10 Los experimentos *in vivo* e *in vitro* demuestran la capacidad de los MTA, incluyendo, pero sin limitación, SkQ1 y SkQR1, para prevenir y tratar la diabetes y trastornos relacionados con la diabetes (Ejemplo 2). Tales experimentos *in vivo* e *in vitro* también demuestran que las soluciones líquidas de MTA, incluyendo, pero sin limitación, SkQ1 y SkQR1, se pueden usar para la prevención y el tratamiento de enfermedades inflamatorias y afecciones relacionadas, tales como choque séptico y/o sistémico. Por ejemplo, estas formulaciones líquidas basadas en MTA con una estabilidad aceptable se combinaron con los resultados que mostraban la eficacia en los modelos de diabetes, inflamación, choque séptico y trastornos relacionados (Ejemplos 2-7).

15 El tratamiento con SkQ1 también impidió la desunión de los contactos intracelulares y la reorganización del citoesqueleto causada por el TNF α (datos obtenidos mediante estudios de microscopía de VE-cadherina, beta-catenina y F-actina). Por tanto, se mostró que SkQ1 era eficaz en la protección de las células endoteliales contra la disfunción de la barrera endotelial causada por las citocinas y, por tanto, se puede usar para la prevención y el tratamiento de muchas afecciones patológicas, incluyendo la diabetes, la aterosclerosis, el envejecimiento y las enfermedades inflamatorias crónicas.

20 De manera adicional, el SkQ1 disminuye la fosforilación y la degradación de I κ B α causada por TNF α . Se sabe que el NF κ B está permanentemente activo en muchas enfermedades inflamatorias, tales como enfermedad intestinal inflamatoria, artritis, sepsis, gastritis, asma y aterosclerosis (Monaco y col. (2004) PNAS., 101:5634-9). Se mostró que el SkQ1 prevenía la activación del NF κ B, un inhibidor fundamental de la actividad de NF κ B asociada a una mortalidad elevada, especialmente de enfermedades cardiovasculares (Venuraju y col. (2010) J. Am. Coll. Cardiol., 55:2049-61). Además, se mostró que el SkQ1 prevenía la translocación del factor de transcripción p65 (RelA) del citoplasma al núcleo, disminuyendo de este modo de manera potencial las consecuencias patológicas.

Ejemplos

Ejemplo 1

30 Formulaciones estables de la forma reducida de SkQ1 (SkQ1H₂)

35 El SkQ1H₂, una forma quinol reducida de SkQ, se preparó de la siguiente manera: se mezclaron por completo 10 ml de solución de SkQ1H₂ (con una concentración de 1 mg/ml) en etanol con 200 mg de ácido ascórbico y, después, se secaron al vacío. El polvo resultante contenía ácido ascórbico al 95 % y SkQ1H₂ al 5 % y demostró una estabilidad aceptable a varias temperaturas de almacenamiento. Por ejemplo, en el experimento de descomposición acelerada, la pureza de SkQ1 se redujo del 98,7 % inicial al 95,1 % después del almacenamiento durante 12 días a 60 °C. A partir de estos resultados, se puede calcular que el almacenamiento durante 1 año a 4 °C dará como resultado una pérdida de aproximadamente el 3,5 % de la concentración inicial del compuesto activo SkQ1 que tiene una estabilidad aceptable.

40 Como alternativa, se preparó una mezcla seca de SkQ1H₂ y ácido ascórbico mediante la disolución de 10 mg de SkQ1H₂ en 10 ml de solución de ácido ascórbico (20 mg/ml) y se secó al vacío.

Otra forma más de preparar una mezcla de SkQ1-ácido ascórbico es el mezclado de 5 ml de solución de SkQ1H₂ en etanol (2 mg/ml) con 5 ml de solución de ácido ascórbico en agua (40 mg/ml) y el secado al vacío. La forma reducida de SkQH₂ se estabiliza en solución de ácido ascórbico, eliminando la etapa de secado y, por tanto, la formulación líquida correspondiente.

45 **Ejemplo 2**

Efecto de las formulaciones de MTA líquidas en la diabetes

A. Estudios de animales con aloxano

El aloxano es un agente diabetogénico bien conocido usado ampliamente para inducir la diabetes tipo 2 en los animales (Viana y col. (2004) BMC Pharmacol., 8:4-9).

50 La inducción de la diabetes con aloxano se realizó de la siguiente manera: dos grupos de ratas de laboratorio (20 animales en cada grupo) con acceso libre a comida y agua se alimentaron con una solución 250 nM de SkQ1 durante 10 días. El consumo diario por rata fue de 60 ml de solución acuosa (que contenía 15 nmoles de SkQ1). El peso promedio de las ratas fue de 300 g. Por tanto, las ratas consumieron aproximadamente 50 nmol/kg de peso

corporal por día. Otros dos grupos de animales no recibieron SkQ1. Después de 10 días, las ratas se inyectaron por vía subcutánea (en el área del muslo) con aloxano disuelto en una solución de sal isotónica del 0,9 % p/v de NaCl (100 mg/kg de peso corporal; los grupos "Aloxano + SkQ1" y "Aloxano". Los animales de control se inyectaron con una solución de sal sin aloxano (los grupos "Control + SkQ1" y "Control"). Después de la inyección, las ratas continuaron bebiendo agua que contenía SkQ1 (250 nM) durante 14 días (el grupo "Aloxano + SkQ1") o se mantuvieron sin SkQ1 (el grupo "Aloxano").

Los datos sobre el nivel de glucosa en sangre se midieron mediante el procedimiento de la glucosa oxidasa (Saifer y col. (1958) J. Lab. Clin. Med., 51:445-460) después de 2 semanas de inyección de aloxano. Los resultados se presentan en la Figura 1. Todos los datos se presentan como la media +/-SE.

Los animales que consumieron SkQ1 después de la inyección de aloxano tuvieron aproximadamente 2 veces menos de glucosa en sangre, en comparación con los ratones sin tratamiento con SkQ1.

Estos resultados demuestran que los MTA estabilizados, *por ejemplo*, SkQ1, son útiles para la prevención y el tratamiento de la diabetes mellitus y sus complicaciones.

En otro experimento, se dividieron las ratas Wistar macho de 200 g a 250 g (de 7 a 8 semanas) en 3 grupos, de 12 a 15 animales cada uno, y se inyectaron con 125 mg/kg de aloxano por vía intraperitoneal (i.p.) después de ayuno durante una noche. Los animales de control se inyectaron con solución salina (NaCl al 0,9 %). La formulación estabilizada (etanol al 1 %, 5 ml/kg) y SkQ1H₂ (5 eq de ácido ascórbico, 30 partes en peso de sorbitol) en una dosificación de 1250 mmol/kg se administraron por vía intragástrica (i.g.) mediante sonda una vez al día durante 2 semanas antes y 1 semana después de la administración de aloxano. Se recogieron muestras de sangre de la vena de la cola después del ayuno durante una noche y se midieron los niveles de glucosa antes de la administración de aloxano y 1 día, 2 días, 3 días y 7 días después mediante el procedimiento convencional de la glucosa-oxidasa. Siete días después de la administración de aloxano, las ratas se sometieron a un ensayo de tolerancia a la glucosa. Las ratas recibieron 3 g/kg de glucosa i.g. Se midieron los niveles de glucosa en sangre antes de la inyección de glucosa y 15 min, 30 min, 60 min y 90 min después.

Se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 3):

Tabla 3

	Solución salina + vehículo	Aloxano + vehículo	Aloxano + formulación de SkQ1H ₂
Conc. de glucosa máxima en sangre, mM	6,7	17,6	13,9
Conc. de glucosa integrada en sangre (área debajo de la curva, a.u = mM x min)	500	1194	947

B. Estudios de ratones diabéticos

Se sabe que los ratones portadores de la mutación en el gen del receptor de leptina (ratones C57BLKS-Leprdb/J o ratones db/db) están afectados por trastornos metabólicos de la glucosa. Estos ratones se usan como modelo de diabetes tipo II con muchas de las características de las enfermedades humanas, incluyendo la hiperfagia, la hiperglicemia, la resistencia a la insulina, la obesidad progresiva (Hummel y col. (1966) *Scienza*, 153:1127-1128).

El SkQ1 en glicerol al 20 %, tal como se describe más adelante en el Ejemplo 8, se administró por vía oral (250 nmol/kg por día) a ratones db/db (n = 8) homocigotos de 10 a 12 semanas, al tiempo que a ratones db/db (n = 8) de vehículo y db/++ (n = 5) heterocigotos de control no diabéticos durante 12 semanas. El contenido de sustancia reactiva a TBA hepática (MDA en inglés) se determinó mediante un ensayo según el procedimiento de Mihara y col. ((1978) *Anal. Biochem.*, 86:271-278).

Tal como se muestra en la Figura 2, los niveles elevados de glucosa inducen estrés oxidativo reflejado por el aumento de los niveles de MDA en el hígado de ratones db/db. El aumento del nivel de MDA refleja la estimulación de la peroxidación de lípidos que, a su vez, se considera responsable del deterioro de las células endoteliales, la permeabilidad de los capilares y el metabolismo de los fibroblastos y el colágeno, los principales factores de las patologías asociadas a la diabetes. La solución estabilizada de SkQ1 disminuyó de manera significativa los niveles de MDA en el hígado de ratones db/db diabéticos, lo que indicaba una disminución de la tasa de peroxidación de lípidos y una disminución de los daños del hígado.

Ejemplo 3

Efecto de los MTA estabilizados sobre la cicatrización de heridas

La cicatrización de heridas se estudió en dos series usando ratones (db/db) C57BLKS-Leprdb/J homocigotos y ratones (db/+) C57BLKS-Leprdb/J heterocigotos de 6 meses. Estos ratones se usan como modelo de diabetes tipo II con alteración de la cicatrización de heridas (Michaels, y col. (2007) *Wound Repair and Regeneration*, 15:665-670).

A los ratones se les administró diariamente 250 nmol/kg de peso corporal por día de la forma farmacéutica de SkQ1 en glicerol al 20 % (tal como se describe en el Ejemplo 8) durante un período de tiempo de 10 semanas a 12 semanas. Los grupos de control de ratones db/db y db/+ no se sometieron a tratamiento con SkQ1. Las heridas dérmicas de espesor completo se hicieron con anestesia de ketamina (80 mg/kg). Los animales se mantuvieron en jaulas de plástico en regímenes convencionales de temperatura, luz y alimentación. 7 días después de las heridas, se sacrificaron los animales mediante decapitación. Las heridas se extirparon, se fijaron en formalina al 10 % en un tampón de PBS convencional, se procesaron histológicamente y se embebieron en parafina. Las secciones histológicas de la parte central de las heridas se cortaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las secciones se tiñeron inmunohistoquímicamente para los marcadores de células endoteliales (CD31), macrófagos (f4/80) y miofibroblastos (α -actina del músculo liso). Se usó el software ImageJ (National Institutes of Health (NIH) <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para calcular la cantidad total de células, el índice de los neutrófilos, los macrófagos y la densidad de vasos (área del vaso/área de tejido de granulación * 100) en las microfotografías de secciones de heridas. En cada animal se analizaron 100 mm² de área de sección. La tasa de epitelización de las heridas se evaluó en % como la relación del área de herida epitelizada respecto al área de herida total en la sección de tejido * 100. En el análisis estadístico se usó el ensayo U de Mann-Whitney no paramétrico. Los datos se muestran como medias \pm S.E.M.

Tal como se muestra en las Figuras 3a, 3b y 3c, la forma farmacéutica estabilizada de SkQ1 es capaz de acelerar la cicatrización de heridas mediante la disminución de la infiltración de neutrófilos, el aumento de la vascularización y el aumento de la tasa de epitelización en ratones diabéticos.

20 **Ejemplo 4**

Efecto de los MTA estabilizados sobre la inflamación y el choque séptico

Se sabe que el choque séptico activa numerosas vías inflamatorias en un organismo que conduce a la muerte. El ratón con choque séptico inducido por lipopolisacáridos (LPS) es un modelo ampliamente aceptado en investigaciones farmacológicas y biológicas (Villa y col. (2004) Meth. Molec. Med., 98:199-206).

25 La inducción del choque séptico se realizó la siguiente manera: se dividieron 43 ratones BALB/c machos con acceso libre a alimentos y agua en 4 grupos experimentales. El grupo "K" consiguió agua sin fármacos. Los grupos "SkQ 50", "SkQ 250" y "SkQ 1250" se trataron por vía parenteral diariamente con una forma farmacéutica de SkQ1 en agua que comprendía 50 nmol/kg, 250 nmol/kg y 1250 nmol/kg en consecuencia. Después de 3 semanas de tratamiento con SkQ1, los animales se inyectaron por vía intraperitoneal con 250 mg/kg de LPS y 700 mg/kg de D-galactosamina (D-GalN) que indujeron un choque séptico que condujo a la muerte del 50 % de los animales de control no tratados (dosis de LD50). Se registró la muerte de los animales después de 4 días de la inducción del choque séptico.

35 Los resultados del experimento se muestran en la Figura 4. SkQ1 mejoró de manera significativa la supervivencia de los ratones después del tratamiento con LPS/D-GalN. El efecto estadísticamente significativo se mostró para una dosis de 50 nmol/kg ($p = 0,03$).

Estos resultados indican claramente que el SkQ1 actúa como un agente antiinflamatorio que tiene una aplicación terapéutica para el tratamiento del choque séptico.

40 En otros estudios, se dividieron los ratones BALB/c con acceso libre a alimentos y agua en 4 grupos experimentales. El grupo "K" recibe glicerol al 20 % sin fármacos. Los grupos "SkQ 50", "SkQ 250" y "SkQ 1250" se trataron por vía parenteral diariamente con una forma farmacéutica de SkQ1 en glicerol al 20 % (Ejemplo 8) que comprendía 50 nmol/kg, 250 nmol/kg y 1250 nmol/kg en consecuencia. Después de 3 semanas de tratamiento con SkQ1, los animales se inyectaron por vía intraperitoneal con 250 mg/kg de LPS y 700 mg/kg de D-galactosamina (D-GalN) que indujeron un choque séptico que condujo a la muerte del 50 % de los animales de control no tratados (dosis de LD50). Se registró la muerte de los animales después de 4 días de la inducción del choque séptico.

45 **Ejemplo 5**

Efecto de los MTA estabilizados sobre la artritis

El modelo de rata con artritis inducida por colágeno (CIA en inglés) se usó para examinar la susceptibilidad de la artritis reumatoide (AR) al tratamiento con agentes antiartríticos potenciales (Griffiths y col. (2001) Immunol. Rev., 184:172-83).

50 Se inyectaron treinta ratas Wistar con acceso libre a alimentos y agua con adyuvante completo de Freund y 250 mg de colágeno tipo II para inducir la CIA. A partir de los 14 días y de los 24 días después de la inyección, dos grupos de 10 animales en cada uno se alimentaron diariamente con una forma farmacéutica de SkQ1 en agua que comprendía 250 nmol/kg de peso corporal por día (los grupos "SkQ1 desde el día 14" y "SkQ1 desde el día 24"; el grupo "Control" recibió agua sin fármacos).

55 Tal como se muestra en la Figura 5, SkQ1 redujo el número de animales con inflamación aparente, es decir, los

animales con volúmenes de pata aumentados medidos mediante manometría de agua, en comparación con el grupo de control. Por tanto, SkQ1 posee efectos antiinflamatorios y antiartríticos.

5 En otros estudios, se inyectaron ratas Wistar con acceso libre a alimentos y agua con adyuvante completo de Freund y 250 mg de colágeno tipo II para inducir la CIA. A partir de los 14 días y de los 24 días después de la inyección, dos grupos de animales en cada uno se alimentaron diariamente con una forma farmacéutica de SkQ1 en glicerol al 20 % (Ejemplo 8) que comprendía 250 nmol/kg de peso corporal por día (los grupos "SkQ1 desde el día 14" y "SkQ1 desde el día 24"; el grupo "Control" recibió agua sin fármacos).

Ejemplo 6

Efecto de los MTA estabilizados sobre la inflamación asociada a la cardiopatía coronaria

10 La intensa producción de citocinas inducida por la inflamación puede conducir a la muerte de las células endoteliales, lo que, junto con el aumento del estrés oxidativo y la inflamación vascular, conduce a una disfunción endotelial y aumenta el riesgo de arteriopatía coronaria.

15 Se usó la línea celular endotelial humana EA.hy926 (colección ATCC; número de catálogo CRL-2922) como modelo de endotelio vascular. Esta línea celular es similar a la línea celular HUVEC primaria (Edgell y col. (1983) PNAS, 80 (12): 3734-7; Edgell y col. (1990) In Vitro Cell Dev Biol., 26(12):1167-72) y se usa ampliamente como modelo relevante para los estudios de inflamación (Riesbeck y col. (1998) Clin. Vaccine Immunol., 5:5675-682).

20 Por consiguiente, las células endoteliales humanas EA.hy926 se incubaron previamente con solución de SkQR1 0,2 nM o SkQ1 2 nM en un Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM en inglés) suplementado con el 10 % de suero fetal (Ejemplo 1) durante 4 días. Después de eso, las células se incubaron durante una noche con un medio DMEM nuevo con el 0,2 % de suero fetal. Las células se incubaron 2 días con TNF- α (de 0,25 ng/ml a 50 ng/ml) y la muerte celular se controló usando un ensayo convencional de MTT (Berridge y col. (1996) Biochemica, 4:14-9). Los datos de este ensayo se muestran como medias \pm S.E. al menos para 3 experimentos separados.

25 Tal como se muestra en la Figura 6, tanto el SkQ1 como el SkQR1 redujeron en gran medida la muerte celular, en comparación con el control sin MTA. Por tanto, se mostró que SkQ1 y SkQR1 son sustancias eficaces que protegen las células endoteliales contra la acción inflamatoria de las citocinas y se pueden usar para la prevención y el tratamiento de la arteriopatía coronaria, incluyendo la aterosclerosis.

Ejemplo 7

Efecto de los MTA estabilizados sobre la disfunción vascular

A. Estudios *in vitro*

30 Las citocinas inflamatorias inducen la expresión de ICAM-1 (Molécula de Adhesión Intercelular 1). La ICAM-1 es una molécula fundamental que funciona en el procedimiento de adhesión intercelular y la trans migración de los leucocitos a través del endotelio vascular durante la respuesta inflamatoria. La expresión de ICAM-1, así como las citocinas inflamatorias que incluyen IL-6 y IL-8, se evalúa en muchas condiciones patológicas, incluyendo la diabetes, la aterosclerosis, el envejecimiento y las enfermedades inflamatorias crónicas.

35 Se examinaron los efectos de SkQ1 sobre la expresión de ARNm de ICAM-1 y la secreción de proteínas de citocinas (IL-6, IL-8) inducida por TNF- α en células endoteliales humanas EAhy926 (colección ATCC; número de catálogo CRL-2922). La TNF- α es una citocina proinflamatoria central que estimula la expresión de las moléculas de adhesión celular y muchas citocinas inflamatorias. Las propiedades antiinflamatorias de muchos fármacos a menudo dependen de su capacidad para inhibir la expresión de citocinas proinflamatorias inducida por TNF- α usando células endoteliales EAhy926 (Edgell y col. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:3734-7; Lombardi y col. (2009) Eur. J. Cell. Biol., 88:731-42; Manea y col. (2010) Cell Tissue Res., 340:71-9).

45 Se colocaron 300.000 células en placas de cultivo de 60 mm² y, después de la adhesión, se sometieron a tratamiento con una solución de SkQ1 (0,2 nM en un medio DMEM con suero fetal al 10 %) durante 4 días y, a continuación, se estimularon con TNF- α (0,05 ng/ml durante 4 h para la ICAM-1 o 5 ng/ml durante 15 h para las citocinas, respectivamente). La expresión de ARNm de ICAM-1 se determinó mediante PCR en tiempo real (Okada y col. (2005) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 46:4512-8). La secreción de IL-6 e IL-8 se evaluó mediante ELISA (Toma y col. (2009) Biochem. Biophys. Res. Commun., 390:877-82; Volanti y col. (2002) Photochem. Photobiol., 75:36-45.) Los datos se muestran como medias \pm S.E. al menos para 3 experimentos separados.

50 Los resultados mostrados en la Figura 7a confirman que SkQ1 es una sustancia antiinflamatoria vascular eficaz que previene la expresión excesiva de citoquinas inflamatorias e ICAM-1. Por tanto, los MTA son útiles para la prevención y el tratamiento de patologías vasculares, incluyendo la aterosclerosis.

B. Estudios *in vivo*

Tal como se ha descrito antes en el Ejemplo 7A, anteriormente, la expresión de ICAM-1 se evalúa en muchas

condiciones vasculares patológicas. La eficacia de SkQ1 en la reducción de la expresión de ICAM-1 se sometió a tratamiento *in vivo* en ratones. Al comienzo del experimento, se dividieron 30 ratones macho C57Black/CBA híbridos en 3 grupos experimentales (10 animales en cada grupo). El grupo "Ratones jóvenes" incluyó ratones a la edad de 6 meses. Los grupos "Ratones mayores" y "Ratones mayores, SkQ1" incluyeron ratones a la edad de 24 meses. El grupo "Ratones mayores, SkQ1" tuvo acceso gratuito al agua potable con SkQ1 disuelto en agua 100 nM por 1 kg de peso corporal durante 7 meses. Después de este período, se decapitaron los animales. Se extirparon las aortas y se aisló el ARN total usando el kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN), se transcribió de forma inversa en ADNc y se usó para el análisis cuantitativo de PCR en tiempo real del nivel de ARNm de ICAM-1. Para el procedimiento de normalización, se usó la geometría promedia de los niveles de expresión de los genes de mantenimiento GAPDH y RPL32. Los datos se muestran como medias \pm S.E.M.

Tal como se muestra en la Figura 7b, SkQ1 redujo de manera significativa los niveles de ARNm de ICAM-1 en ratones mayores sometidos a tratamiento en comparación con el grupo de control y se acercó al nivel de ICAM-1 en ratones jóvenes.

Los resultados demuestran que el SkQ1 previene el aumento relacionado con la edad de la expresión de ICAM-1 en el endotelio vascular. Por tanto, el SkQ1 se puede usar para la prevención de patologías vasculares relacionadas con la edad, incluyendo la aterosclerosis.

En otros estudios, se dividieron los ratones macho C57Black/CBA híbridos en 3 grupos experimentales, "jóvenes", "mayores" y "ratones mayores, SkQ1", tal como se ha descrito anteriormente. El tercer grupo recibió SkQ1 en glicerol al 20 % que comprendía 250 nmol/kg de peso corporal por día, hasta 7 meses. El grupo "mayor" era el control y recibió glicerol sin fármacos. Después de este período, se decapitaron los animales. Se extirparon las aortas y se aisló el ARN total usando el kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN), se transcribió de forma inversa en ADNc y se usó para el análisis cuantitativo de PCR en tiempo real del nivel de ARNm de ICAM-1. Para el procedimiento de normalización, se usaron la geometría promedia de los niveles de expresión de los genes de mantenimiento GAPDH y RPL32. Los datos se calculan como medias \pm S.E.M.

25 Ejemplo 8

Preparación y estabilidad de las formulaciones de SkQ1 en forma oxidada

1. SkQ1 en glicerol al 20 % (% en peso) y tampón de fosfato

El glicerol (20 g) se diluyó con el tampón de fosfato (80 g, KH_2PO_4 0,01 M, a pH 4,77). Se colocó una muestra de SkQ1 (20 mg) en un vial de vidrio de color oscuro y se disolvió en propilén glicol (0,2 ml) y se diluyó con una alícuota (19,8 ml) del disolvente anterior hasta 1 mM.

La estabilidad del SkQ1 en la solución preparada se investigó mediante su almacenamiento a TA y a 60 °C (Tabla 4).

Tabla 4

Tiempo, días	SkQ1, % /productos de degradación, % (almacenados a TA)	SkQ1, % /productos de degradación, % (almacenados a 60 °C)
0	99,34 / 0	99,34 / 0
11	99,71 / 0	-
13	99,76 / 0	-
14	99,68 / 0	-
17	99,62 / 0	-
19	99,63 / 0,07	95,30 / 4,7
21	99,52 / 0,20	-
24	99,57 / 0,08	-
61	99,49 / 0,51	-

2. SkQ1 en 1,2-propilén glicol al 50 % (% en peso) con ácido pirúvico (10 equivalentes (eq) con respecto a SkQ1)

Se colocaron el SkQ1 (50 mg) y el ácido pirúvico (71 mg, 10 eq) en un vial de vidrio de color oscuro y se disolvieron en una mezcla de propilén glicol-agua al 50 % (100 ml) para producir una solución de SkQ1 0,081 mM.

La estabilidad del SkQ1 en la solución preparada se investigó mediante su almacenamiento a 60 °C (Tabla 5).

3. SkQ1 en 1,2-propilén glicol al 50 % (% en peso) con ácido láctico (10 eq con respecto al SkQ1)

Se colocaron el SkQ1 (50 mg) y el ácido L(+)-láctico (73 mg, 10 eq) en un vial de vidrio de color oscuro y se

ES 2 704 064 T3

disolvieron en una mezcla de propilen glicol-agua al 50 % (100 ml) para producir una solución de SkQ1 0,081 mM. La estabilidad del SkQ1 en la solución preparada se investigó mediante su almacenamiento a 60 °C (Tabla 5).

Tabla 5

Tiempo, días	SkQ1, %	SkQ1, %
0	>99,9	>99,9
72	93,2	96,6

4. SkQ1 con PEG-4000

Se mezcló una solución de 8 mg de SkQ1 en 0,5 ml de EtOH con 200 mg de PEG-4000 y el disolvente se evaporó hasta sequedad.

- 5 La estabilidad del SkQ1 en la composición preparada se investigó mediante su almacenamiento a 4 °C en oscuridad (Tabla 6).

Tabla 6

Tiempo, días	SkQ1, %	Productos de degradación, %
18	>99,9	< 0,01
19	99,83	0,17
20	99,80	0,20

5. SkQ1 con dextrano

- 10 Se añadió una solución de 10 mg de SkQ1 en 0,75 ml de EtOH a una solución de 100 mg de dextrano en 1 ml de agua. La mezcla se agitó enérgicamente y el disolvente se evaporó hasta sequedad.

La estabilidad del SkQ1 en la composición preparada se investigó mediante su almacenamiento a 60 °C en oscuridad (Tabla 7).

Tabla 7

Tiempo, días	SkQ1, %	Productos de degradación, %
0	96,71	3,29
6	20,66	79,34
15	24,14	75,86
25	18,93	81,07

6. SkQ1 con ácido p-aminobenzoico (p-ABA)

- 15 Se añadió una solución de 8 mg de SkQ1 en 0,5 ml de EtOH a una solución de 200 mg de ácido p-aminobenzoico (p-ABA) en 1,5 ml de EtOH. El disolvente se evaporó hasta sequedad.

La estabilidad del SkQ1 en la composición preparada se investigó mediante su almacenamiento a TA en oscuridad (Tabla 8).

Tabla 8

Tiempo, días	SkQ1, %	Productos de degradación, %
0	100	0
30	58,42	41,58

20 7. SkQ1 con dextrano y p-ABA

Se añadió una solución de 10 mg de SkQ1 en 0,75 ml de EtOH a una solución de p-ABA (2 mg en 0,5 ml de EtOH) y dextrano (100 mg en 1 ml de agua). La mezcla se agitó enérgicamente y el disolvente se evaporó hasta sequedad.

La estabilidad del SkQ1 en la composición preparada se investigó mediante su almacenamiento a 60 °C en oscuridad (Tabla 9).

25

Tabla 9

Tiempo, días	SkQ1, %	Productos de degradación, %
0	97,13	2,87

(continuación)

Tiempo, días	SkQ1, %	Productos de degradación, %
6	39,22	60,78
15	7,07	92,93

8. SkQ1 (1 eq) con mioinosita (30 partes en peso con respecto al SkQ1)

Se añadieron 45 mg de mioinosita a una solución de 5 mg de SkQ1 en 5 ml de EtOH. La mezcla se agitó enérgicamente y el disolvente se evaporó hasta sequedad.

5 La estabilidad del SkQ1 en la composición preparada se investigó mediante su almacenamiento a TA en oscuridad (Tabla 10).

Tabla 10

Tiempo, días	SkQ1, %	Productos de degradación, %
0	95,88	4,12
5	96,86	3,14
6	95,99	4,01
15	92,26	7,74

9. SkQ1 (1 eq) con ácido pirúvico (10 eq) y Pearlitol 200 (30 partes en peso con respecto al SkQ1)

Se añadieron 375 mg de Pearlitol 200 a una solución de 12,5 mg de SkQ1 y 17,8 mg (10 eq) de ácido pirúvico en 0,75 ml de EtOH. La mezcla se agitó enérgicamente y el disolvente se evaporó hasta sequedad.

10 La estabilidad del SkQ1 en la composición preparada se investigó mediante su almacenamiento a 60 °C en oscuridad (Tabla 11).

10. SkQ1 (1 eq) con ácido pirúvico (10 eq) y celulosa microcristalina (30 partes en peso con respecto al SkQ1)

Se añadieron 375 mg de celulosa microcristalina a una solución de 12,5 mg de SkQ1 y 17,8 mg (10 eq) de ácido pirúvico en 0,75 ml de EtOH. La mezcla se agitó enérgicamente y el disolvente se evaporó hasta sequedad.

15 La estabilidad del SkQ1 en la composición preparada se investigó mediante su almacenamiento a 60 °C en oscuridad (Tabla 11).

11. SkQ1 (1 eq) con ácido pirúvico (10 eq) y F-Melt C (partes en peso con respecto al SkQ1)

Se añadieron 375 mg de F-Melt C a una solución de 12,5 mg de SkQ1 y 17,8 mg (10 eq) de ácido pirúvico en 0,75 ml de EtOH. La mezcla se agitó enérgicamente y el disolvente se evaporó hasta sequedad.

20 La estabilidad del SkQ1 en la composición preparada se investigó mediante su almacenamiento a 60 °C en oscuridad (Tabla 11).

12. SkQ1 (1 eq) con ácido pirúvico (0 eq) y Syloid FP (30 partes en peso con respecto al SkQ1)

Se añadieron 375 mg de Syloid FP a una solución de 12,5 mg de SkQ1 y 17,8 mg (10 eq) de ácido pirúvico en 0,75 ml de EtOH. La mezcla se agitó enérgicamente y el disolvente se evaporó hasta sequedad.

25 La estabilidad del SkQ1 en la composición preparada se investigó mediante su almacenamiento a 60 °C en oscuridad (Tabla 11).

Tabla 11

Tiempo, días	SkQ1, % / SkQ1H ₂ , %, Productos de degradación, %			
	(Muestra 9)	(Muestra 10)	(Muestra 11)	(Muestra 12)
0	>99,9 / <0,05 / <0,05	>99,9 / <0,05 / <0,05	>99,9 / <0,05 / <0,05	>99,9 / <0,05 / <0,05
14	60,3 / 11,3 / 28,4	50,2 / 25,8 / 24,0	38,2 / 47,7 / 14,1	57,9 / 1,4 / 40,7

Las siguientes preparaciones de SkQ1 también se pueden formular tal como se ha descrito *supra* en el Ejemplo 8:

30 SkQ1 (1 eq) con ácido cítrico (o ácido tartárico, o ácido láctico o glicina, 10 eq) y Pearlitol 200 (30 partes en peso con respecto al SkQ1H₂)

SkQ1 (1 eq) con ácido cítrico (o ácido tartárico, o ácido láctico o glicina, 10 eq) y celulosa microcristalina (30

partes en peso con respecto al SkQ1H₂)

SkQ1 (1 eq) con ácido cítrico (o ácido tartárico, o ácido láctico o glicina, 10 eq) y F-Melt C (30 partes en peso con respecto al SkQ1H₂)

5 SkQ1 (1 eq) con ácido cítrico (o ácido tartárico, o ácido láctico o glicina, 10 eq) y Syloid FP (30 partes en peso con respecto al SkQ1H₂)

Ejemplo 9

Preparación y estabilidad de las formulaciones de SkQH₂ en forma reducida

13. SkQ1H₂ (1 eq) preparado *in situ* mediante la reducción de SkQ1 y ácido ascórbico (2 eq molares) y PEG-4000 (10 partes en peso con respecto al SkQ1H₂)

10 Se añadió una solución de 10 mg de SkQ1 en 0,6 ml de EtOH a una solución de 5,7 mg (2 eq) de ácido ascórbico en 0,1 ml de agua. La mezcla se agitó hasta que se completó la reducción de SkQ1H₂ (aproximadamente 1 h). A continuación, se añadieron 100 mg de PEG-4000. La mezcla se agitó energicamente durante 30 min y el disolvente se evaporó hasta sequedad.

15 La estabilidad del SkQ1H₂ en la composición preparada se investigó mediante su almacenamiento a 4 °C en oscuridad (Tabla 12).

14. SkQ1H₂ (1 eq) preparado *in situ* mediante la reducción de SkQ1 con ácido ascórbico (2 eq molares) y dextrano

20 Se añadió una solución de 10 mg de SkQ1 en 0,6 ml de EtOH a una solución de 5,7 mg (2 eq) de ácido ascórbico en 0,1 ml de agua. La mezcla se agitó hasta que se completó la reducción de SkQ1H₂ (aproximadamente 1 h). A continuación, se añadió una solución de 100 mg de dextrano en 1 ml de agua. La mezcla se agitó energicamente durante 30 min y el disolvente se evaporó hasta sequedad.

La estabilidad del SkQ1H₂ en la composición preparada se investigó mediante su almacenamiento a 4 °C en oscuridad (Tabla 12).

Tabla 12

Tiempo días	(Muestra 13)			(Muestra 14)		
	SkQ1, %	SkQ1H ₂ , %	Productos de degradación, %	SkQ1, %	SkQ1H ₂ , %	Productos de degradación, %
0	14,65	85,35	< 0,05	3,61	96,39	< 0,05
1	7,72	92,28		2,80	97,20	
4	59,12	40,88		98,57	1,43	
6	57,53	42,47		99,55	0,45	
7	54,16	45,84		99,26	0,74	
10	54,22	45,78		98,93	1,07	

25 15. SkQ1H₂ (1 eq) preparado *in situ* mediante la reducción de SkQ1 con ácido ascórbico (10 eq molares) y dextrano (10 partes en peso con respecto al SkQ1H₂)

Se añadió una solución de 10 mg de SkQ1 en 0,6 ml de EtOH a una solución de 28,5 mg (10 eq) de ácido ascórbico en 0,25 ml de agua. La mezcla se agitó hasta que se completó la reducción de SkQ1H₂ (aproximadamente 30 min). A continuación, se añadió una solución de 100 mg de dextrano en 1 ml de agua. La mezcla se agitó energicamente durante 30 min y el disolvente se evaporó hasta sequedad.

30 La estabilidad del SkQ1H₂ en la composición preparada se investigó mediante su almacenamiento a 60 °C en oscuridad (Tabla 13).

16. SkQ1H₂ (1 eq) preparado *in situ* mediante la reducción de SkQ1 con ácido ascórbico (> 10 eq molares) con dextrano y p-ABA (10 partes en peso con respecto al SkQ1H₂)

35 Se añadió una solución de 10 mg de SkQ1 en 0,6 ml de EtOH a una solución de 28,5 mg (10 eq) de ácido ascórbico en 0,25 ml de agua. La mezcla se agitó hasta que se completó la reducción de SkQ1H₂ (aproximadamente 30 min). A continuación, se añadieron una solución de 100 mg de dextrano en 1 ml de agua y una solución de 2 mg de p-ABA en 0,5 ml de EtOH. La mezcla se agitó energicamente durante 30 min y el disolvente se evaporó hasta sequedad.

La estabilidad del SkQ1H₂ en la composición preparada se investigó mediante su almacenamiento a 60 °C en oscuridad (Tabla 13).

Tabla 13

Tiempo, días	(Muestra 15)			(Muestra 16)		
	SkQ1, %	SkQ1H ₂ , %	Productos de degradación, %	SkQ1, %	SkQ1H ₂ , %	Productos de degradación, %
0	2,35	92,59	5,06	0,74	98,65	0,61
6	4,26	91,66	4,08	2,72	97,16	0,12
15	5,11	94,27	0,62	8,49	91,12	0,39
25	5,71	88,69	5,6	11,07	86,62	2,31

17. Polvo de SkQ1H₂

5 Se añadió una solución de 2 g de SkQ1 en 40 ml de EtOH a una solución de 5,7 g de ácido ascórbico en 60 ml de agua. La mezcla se agitó hasta que se completó la reducción de SkQ1H₂ (aproximadamente 30 min). La finalización de la reducción se puede detectar a medida que la solución se vuelve incolora. A continuación, se retiró por evaporación el disolvente y se repartió el residuo entre agua (50 ml) y CHCl₃ (150 ml). La capa orgánica se lavó con agua (2 veces 25 ml), se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó.

El rendimiento del SkQ1H₂ fue de 2 g (aproximadamente el 100 % de rendimiento) en forma de polvo ligero. Los resultados de la estabilidad se muestran a continuación (Tabla 14 y Tabla 15).

10

Tabla 14

Tiempo, días	Almacenamiento a TA			Almacenamiento a 60 °C		
	SkQ1H ₂ , %	SkQ1, %	Productos de degradación, %	SkQ1H ₂ , %	SkQ1, %	Productos de degradación, %
0	98,99	1,01	< 0,1	99,2	0,75	0,05
3	99,34	0,66	< 0,1	-	-	-
5	99,37	0,63	< 0,1	99,45	0,55	0
7	99,14	0,71	< 0,1	100	0	0
11	99,12	0,83	< 0,1	99,76	0,19	0,05
17	99,49	0,28	< 0,3	98,61	1,24	0,15
28	99,45	0,50	< 0,1	88,7	11,04	0,26

Tabla 15

Tiempo, h	EtOH al 55 % en agua			CH ₂ Cl ₂		
	SkQ1H ₂ , %	SkQ1, %	Productos de degradación, %	SkQ1H ₂ , %	SkQ1, %	Productos de degradación, %
0	97,79	2,21	0	97,79	2,21	0
0,5	90,79	9,21	0	95,99	4,01	0
1,48	85,24	14,76	0	94,32	5,68	0
2,8	67,43	32,57	0	93,58	6,42	0
3,44	52,17	47,83	0	94,43	5,57	0
4,37	43,43	56,57	0	92,82	7,18	0
23,23	16,55	82,39	1,06	89,61	9,30	0,97
143,45 (~ 6 días)	9,63	77,23	13,14	82,11	16,53	1,36

18. SkQ1H₂ (1 eq) con sorbitol (30 partes en peso con respecto al SkQ1H₂)

15 Se añadió una solución de 20 mg de SkQ1H₂ en 1,3 ml de EtOH a una solución de 600 mg de sorbitol en 1,3 ml de agua. El disolvente se evaporó hasta sequedad. El residuo se secó de manera adicional con pentóxido de difósforo (P₂O₅) a presión reducida.

La estabilidad del SkQ1H₂ en la composición preparada se investigó mediante su almacenamiento a 60 °C en oscuridad (Tabla 16).

Tabla 16

Tiempo, días (a 60 °C)	SkQ1H ₂ , %	SkQ1, %	Productos de degradación, %
0	99,01	0,61	0,38
4	90,8	8,7	0,5
7	90,2	9,4	0,4
11	88,8	10,7	0,5
15	89,1	10,4	0,5
28	42,9	5,3	51,8

19. SkQ1H₂ (1 eq) con ácido ascórbico (0-5 eq) y sorbito (30 partes en peso con respecto al SkQ1H₂)

Procedimiento 1:

- 5 Se añadió una solución de 20 mg de SkQ1H₂ en 1,3 ml de EtOH a una solución de 28,4 mg (5 eq) de ácido ascórbico y 600 mg de sorbito en 1,3 ml de agua. El disolvente se evaporó hasta sequedad. El residuo se secó de manera adicional con P₂O₅ a presión reducida.

Procedimiento 2:

- 10 Se añadieron 20 mg de SkQ1H₂ y 28,4 mg (5 eq) de ácido ascórbico a sorbito (600 mg) fundido en un vial de vidrio (temperatura de baño 110 °C) lentamente con agitación enérgica y se continuó la agitación durante 1 h. La mezcla se enfrió hasta TA y se trituro enérgicamente para proporcionar un polvo microcristalino.

La estabilidad del SkQ1H₂ en las composiciones preparadas mediante ambos procedimientos se investigó mediante su almacenamiento a 60 °C y 4 °C en oscuridad (Tabla 17).

Tabla 17

SkQH ₂ , %	SkQ1, %	Productos de degradación, (total, % / índice de impurezas con un contenido > 0,5 %)	
		20 días a 60 °C	1 año a 4 °C
97,753	1,209	1 / 0	0,3 / 0

Las siguientes preparaciones de SkQ1H₂ en ácido ascórbico también se preparan como en el Ejemplo 19 *supra*:

- 15 SkQ1H₂ (1 eq) con ácido ascórbico (0-5 eq) con estearato de magnesio (10 % en peso con respecto al SkQ1H₂) y glucosa (10 partes en peso con respecto al SkQ1H₂)
- SkQ1H₂ (1 eq) con ácido ascórbico (0-5 eq) con estearato de magnesio (10 % en peso con respecto al SkQ1H₂) y monohidrato de lactosa (10 partes en peso con respecto al SkQ1H₂)
- SkQ1H₂ (1 eq) con ácido ascórbico (0-5 eq) y Pearlitol 200 (30 partes en peso con respecto al SkQ1H₂)
- 20 SkQ1H₂ (1 eq) con ácido ascórbico (0-5 eq) y celulosa microcristalina (30 partes en peso con respecto al SkQ1H₂)
- SkQ1H₂ (1 eq) con ácido ascórbico (0-5 eq) y F-Melt C (30 partes en peso con respecto al SkQ1H₂)
- SkQ1 H₂ (1 eq) con ácido ascórbico (0-5 eq) y Syloid FP (30 partes en peso con respecto al SkQ1H₂)
- 20 - 22 y 26 - 30. SkQ1H₂ con ácido ascórbico (0-5 eq) y glucosa

25 Procedimiento 3:

Se añadió una solución de 20 mg de SkQ1H₂ en 1,3 ml de EtOH a 2 mg de estearato de magnesio y solución de ácido ascórbico (cantidades desglosadas en la Tabla 18) y 600 mg de glicosa en 1,3 ml de agua (1,3 ml). El disolvente se evaporó hasta sequedad. El residuo se secó de manera adicional con P₂O₅ a presión reducida.

Procedimiento 4:

- 30 Se mezclaron 20 mg de SkQ1H₂, 2 mg de estearato de magnesio, ácido ascórbico (cantidades desglosadas en la Tabla 18) y 600 mg de glicosa anhidra y se trituro enérgicamente.

La estabilidad del SkQ1H₂ en las composiciones preparadas mediante los Procedimientos 3 y 4 se investigó mediante su almacenamiento a 60 °C en oscuridad (Tabla 18).

23. - 25. SkQ1H₂ con ácido ascórbico (0-5 eq) y monohidrato de lactosa

Las composiciones se prepararon tal como se ha descrito anteriormente en el Procedimiento 3 o 4 usando monohidrato de lactosa en lugar de glicosa.

- 5 La estabilidad del SkQ1H₂ en las composiciones preparadas mediante ambos procedimientos se investigó mediante su almacenamiento a 60 °C en oscuridad (Tabla 18).

Tabla 18

N.º muestra	Formulación (los estabilizantes y los excipientes, las cantidades se dan con respecto al SkQ1H ₂)				Procedimiento de preparación	Productos de degradación, total, % / índice de impurezas con un contenido > 0,5 %	
	Ácido ascórbico, eq	Glicosa	L (+)-Lactosa x H ₂ O	Estearato de Mg		20 días a 60 °C	1 año a 4 °C
22	1	~ 10 partes en peso	-	10 % en peso	4	>30/7	-6/2
23	3	~ 10 partes en peso	-	10 % en peso	4	>12/9	<3/1
24	0,3	~ 10 partes en peso	-	10 % en peso	4	>9/7	<3/1
25	1	-	~ 10 partes en peso	10 % en peso	4	>12/7	4,6/1
26	3	-	~ 10 partes en peso	10 % en peso	4	>9/6	<3/2
27	0,3	-	-10 partes en peso	10 % en peso	4	>10/5	3,9/2
28	1	~ 10 partes en peso	-	10 % en peso	3	-6/3	2,8/0
29	2	~ 10 partes en peso	-	10 % en peso	3	4,4/1	2,6/0
30	3	~ 10 partes en peso	-	10 % en peso	3	4,2/0	2/0
31	5	~ 10 partes en peso	-	10 % en peso	3	3,6/0	1,6/0
32	0,3	~ 10 partes en peso	-	10 % en peso	3	3,5/3 (7 días a 60 °C)	-

31. SkQ1H₂ con ácido ascórbico en EtOH al 55 %

Se añadió una solución de SkQ1H₂ puro (1 g en 5 ml de EtOH) a una solución de ácido ascórbico (2,85 g (10 eq) en 10 ml de agua).

- 10 La estabilidad del SkQ1H₂ en la solución preparada se investigó mediante su almacenamiento a TA en oscuridad (Tabla 19).

Tabla 19

Tiempo, h	SkQ1H ₂ , %	SkQ1, %	Productos de degradación, %
0	99,73	0,27	< 0,01
1,5	99,07	0,93	< 0,01
68 (~ 3 días)	99,05	0,59	< 0,4
118 (~ 5 días)	99,69	0,31	< 0,01
165 (~ 7 días)	99,74	0,26	< 0,01

32. SkQ1H₂ con ácido ascórbico y sorbitol en 1,2-propileno glicol al 30 %

Se añadió una solución de SkQ1H₂ puro (50 mg en 1 ml de 1,2-propileno glicol) a una solución de ácido ascórbico (67,4 mg (5 eq)) y sorbitol (1,5 g) en 10 ml de agua.

- 15

ES 2 704 064 T3

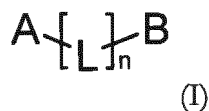
La estabilidad del SkQ1H₂ en la solución preparada se investigó mediante su almacenamiento a 60 °C en oscuridad (Tabla 20).

Tabla 20

Tiempo, días	SkQ1, %	SkQH₂, %	Productos de degradación, %
0	0,18	99,82	0,00
3	1,03	98,67	0,30
14	28,34	69,51	2,15
27	51,9	3,2	44,9

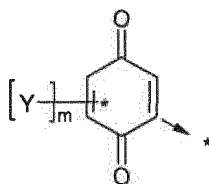
REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I



en la que:

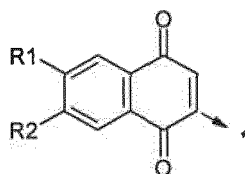
5 A es un antioxidante de Fórmula II:



(II)

y/o la forma reducida del mismo, en la que m comprende un número entero de 1 a 3;

Y se selecciona independientemente del grupo que consiste en: alquilo inferior, alcoxi inferior, o dos grupos Y adyacentes, junto con los átomos de carbono a los que se unen, forman la siguiente estructura de Fórmula III:



(III)

10

y/o la forma reducida del mismo, en la que:

R1 y R2 son iguales o diferentes y son, cada uno, independientemente, alquilo inferior o alcoxi inferior;

15 L es un grupo enlazador, que comprende: a) una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada opcionalmente sustituida con uno o más enlaces dobles o triples, o enlaces de éter, o enlaces de éster o C-S, o S-S o enlaces de péptido; y que se sustituye opcionalmente con uno o más sustituyentes seleccionados preferentemente de alquilo, alcoxi, halógeno, grupo ceto, grupo amino; o b) una cadena de isopreno natural; n es un número entero de 1 a 20; y

B es un grupo diana que comprende: a) un ion de Skulachev Sk (Sk + Z⁻) en el que: Sk es un catión lipófilo o una metaloporfirina lipófila y Z es un anión farmacéuticamente aceptable; o b) un zwitterión anfífilo,

20 en forma oxidada y/o reducida en 1,2-propilen glicol a entre el 20 % y el 100 % o glicerol al 10-30 %, con la condición de que, en el compuesto de Fórmula I, A no sea ubiquinona (por ejemplo, 2-metil-4,5-dimetoxi-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadienilo) o tocoferol o un compuesto mimético de superóxido de dismutasa o ebseleno; cuando L es un radical decilo divalente, pentilo divalente o propilo divalente y cuando B es un catión de trifenilfosfonio.

2. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto está reducido.

25 3. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto está oxidado.

4. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es SkQ1 o SkQ1H₂, o en la que el compuesto es SkQR1 o SkQR1H₂, o

en la que el compuesto es SkQ3 o SkQ3H₂, o

en la que el compuesto es SkQRB o SkQRBH₂, o

30 en la que el compuesto es SkQB1 o SkQB1H₂, o

en la que el compuesto es SkQBP1 o SkQBP1H₂.

5. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el disolvente es glicerol.

6. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación de la reivindicación 1 que comprende un compuesto estabilizado de Fórmula I en forma líquida o sólida,

35 con la condición de que, en el compuesto de Fórmula I, A no sea ubiquinona (por ejemplo, 2-metil-4,5-dimetoxi-3,6-

dioxo-1,4-ciclohexadienilo) o tocoferol o un compuesto mimético de superóxido de dismutasa o ebselenu; cuando L es un radical decilo divalente, pentilo divalente o propilo divalente y cuando B es un catión de trifenilfosfonio para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo I o tipo II, en la que el compuesto es para administrarse por vía oral a un paciente que lo necesite.

5 7. El compuesto para su uso según la reivindicación 6, para el tratamiento de la diabetes tipo II con una formulación que comprende SkQ1H₂, ácido ascórbico y sorbito.

8. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación de la reivindicación 1 que comprende un compuesto de Fórmula I, en forma líquida o sólida,

10 con la condición de que, en el compuesto de Fórmula I, A no sea ubiquinona (por ejemplo, 2-metil-4,5-dimetoxi-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadienilo) o tocoferol o un compuesto mimético de superóxido de dismutasa o ebselenu; cuando L es un radical decilo divalente, pentilo divalente o propilo divalente y cuando B es un catión de trifenilfosfonio para su uso en el tratamiento de heridas dérmicas, en la que la formulación es para administrarse por vía oral a un paciente que la necesite.

15 9. La formulación para su uso según la reivindicación 8, en la que la formulación comprende SkQ1 en glicerol al 20 %.

10. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación de la reivindicación 1 que comprende un compuesto estabilizado de Fórmula I en forma líquida o sólida,

20 con la condición de que, en el compuesto de Fórmula I, A no sea ubiquinona (por ejemplo, 2-metil-4,5-dimetoxi-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadienilo) o tocoferol o un compuesto mimético de superóxido de dismutasa o ebselenu; cuando B es un radical decilo divalente, pentilo divalente o propilo divalente y cuando B es un catión de trifenilfosfonio para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, en la que la formulación es para administrarse por vía oral a un paciente que la necesite.

11. La formulación para su uso según la reivindicación 10, en la que el trastorno inflamatorio es artritis.

25 12. La formulación para su uso según la reivindicación 11, en la que la formulación comprende SkQ1 en glicerol al 20 %.

Fig. 1

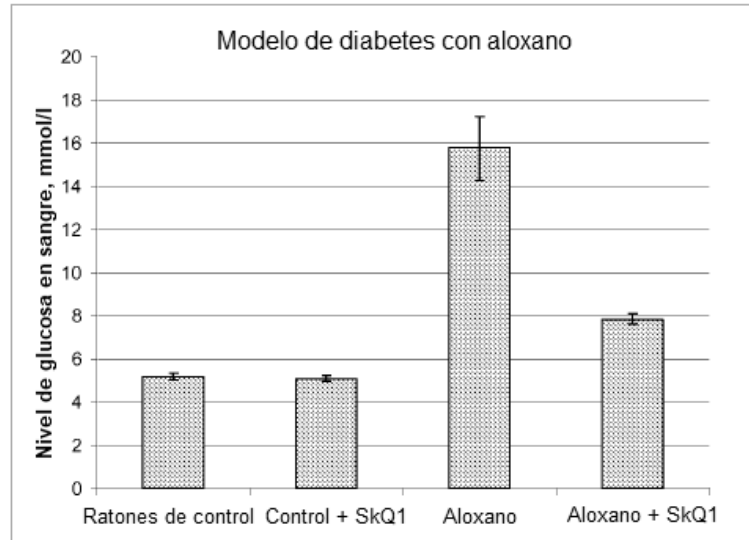


Fig. 2

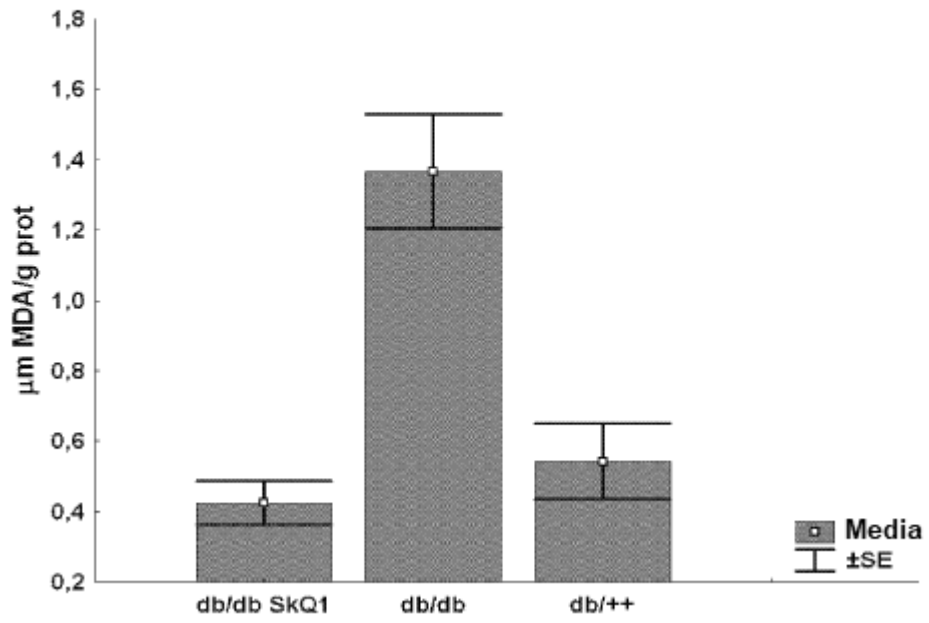


Fig. 3a

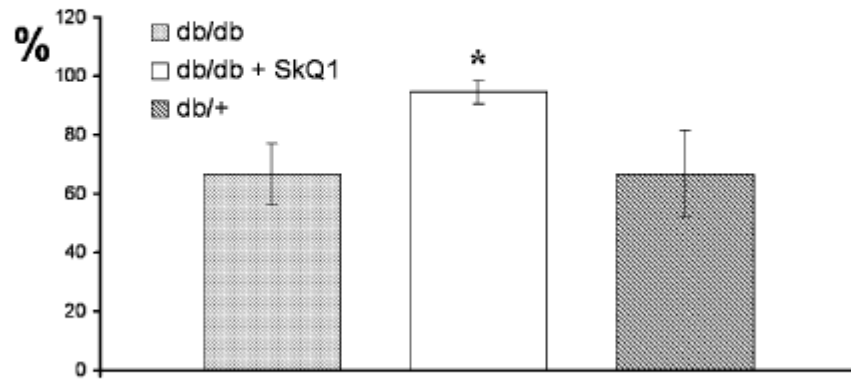


Fig. 3b

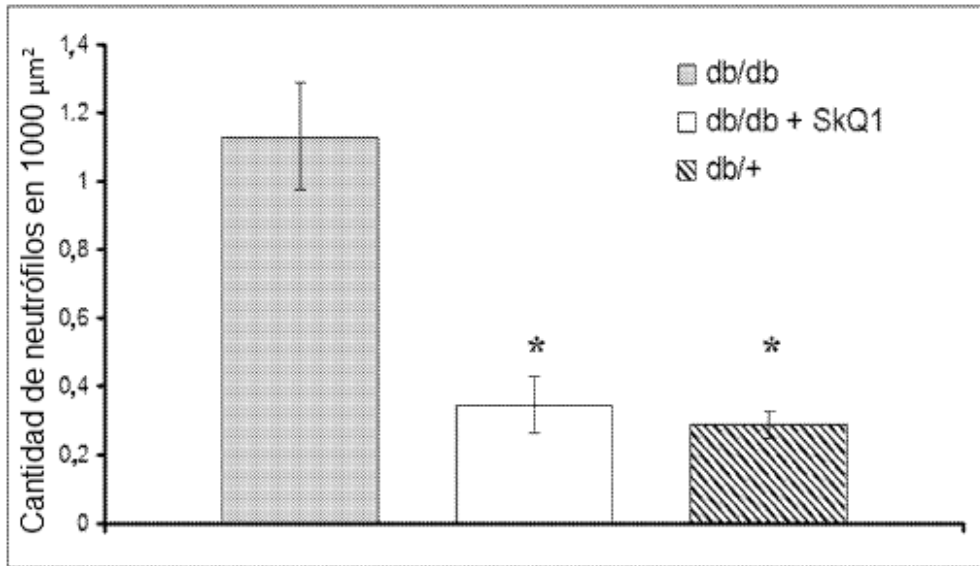


Fig. 3c

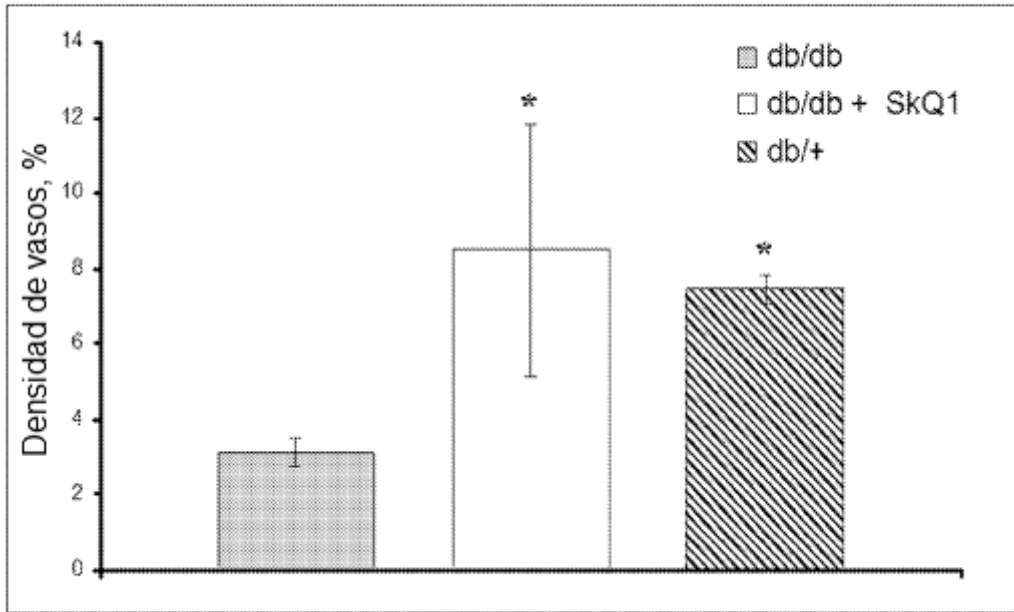


Fig. 4

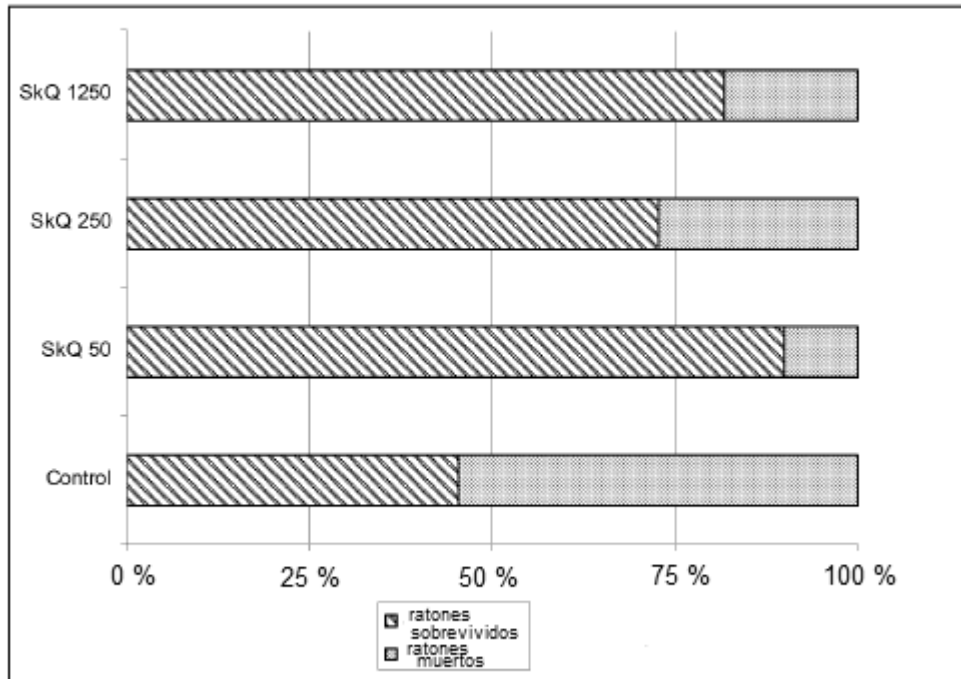


Fig. 5

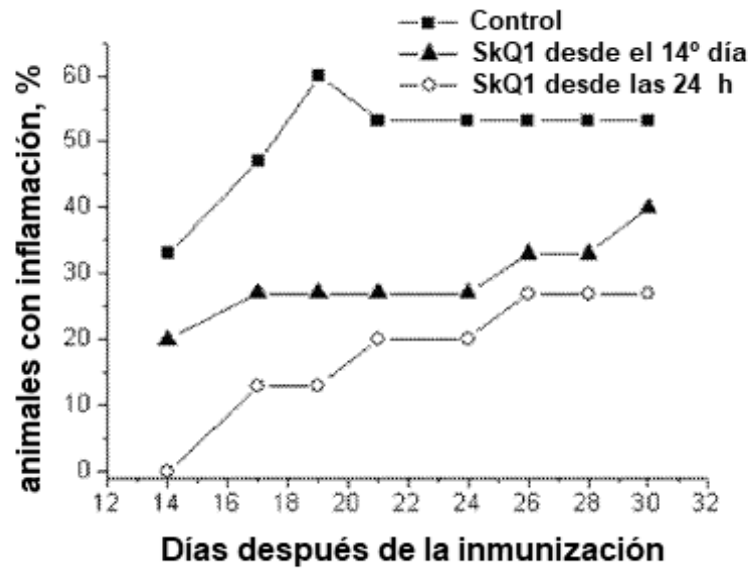


Fig. 6

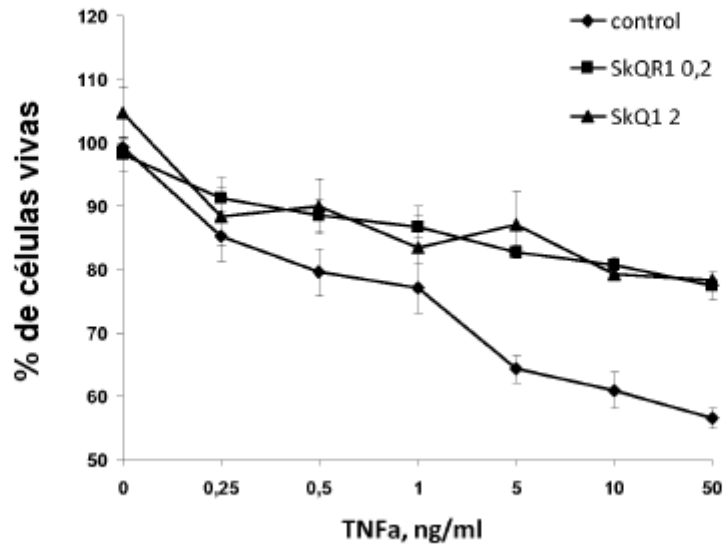


Fig. 7a

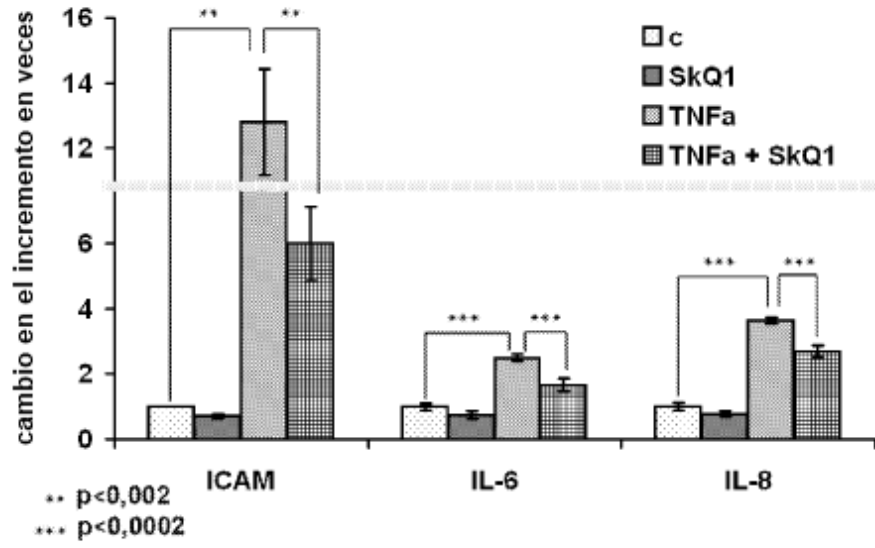


Fig. 7b

