

19



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 862**

21 Número de solicitud: 201830760

51 Int. Cl.:

A61K 31/60 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:
25.07.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:
27.01.2020

71 Solicitantes:
**UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)
 HOSPITAL REAL. AVDA. DEL HOSPICIO S/N
 18071 GRANADA ES**

72 Inventor/es:
**LUIS CARLOS, López García;
 HIDALGO GUTIÉRREZ, Agustín;
 BARRIOCANAL CASADO, Eliana;
 GONZÁLEZ GARCÍA, Pilar y
 BAKKALI, Mohammed**

54 Título: **COMPOSICIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES ASOCIADAS A UNA DEFICIENCIA DE LA SÍNTESIS ENDÓGENA CELULAR DE COENZIMA Q9 Y/O COENZIMA Q10**

57 Resumen:
 Composición para el tratamiento de enfermedades asociadas a una deficiencia de la síntesis endógena celular de coenzima Q9 y/o coenzima Q10.
 La presente invención describe el uso de β -RA para el tratamiento de enfermedades asociadas a una deficiencia de la síntesis endógena celular de CoQ₉ y/o CoQ₁₀, las cuales suelen cursar con disfunción mitocondrial y/o estrés oxidativo. Más particularmente, describe el uso de β -RA para tratar enfermedades causadas por astrogliosis y/o degeneración esponjiforme, preferentemente, para tratar encefalopatías.

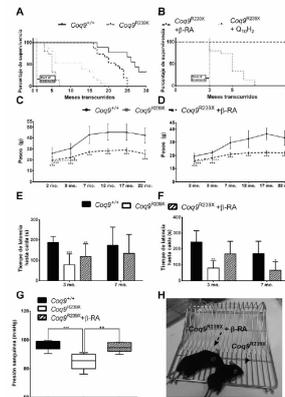


Figura 1

DESCRIPCIÓN

COMPOSICIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES ASOCIADAS A UNA DEFICIENCIA DE LA SÍNTESIS ENDÓGENA CELULAR DE COENZIMA Q9 Y/O COENZIMA Q10

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

10 La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende ácido β -
resorcílico (o ácido 2,4-dihidroxibenzoico) para la elaboración de una composición
farmacéutica que estimula la síntesis endógena celular de Coenzima Q9 (CoQ₉) y/o
Coenzima Q10 (CoQ₁₀), a la vez que reduce los niveles de otros metabolitos
intermediarios nocivos por el aumento de los niveles de las proteínas que forman el
15 complejo de síntesis de CoQ. Por tanto, el ámbito de aplicación de la invención el del
tratamiento de enfermedades que cursan con la alteración de aquellas funciones en las
que están implicadas la CoQ₉ y/o la CoQ₁₀, esto es/en particular, la producción de
energía celular, el estrés oxidativo/defensa antioxidante, el metabolismo de las
pirimidinas o el metabolismo del sulfuro de hidrógeno. De forma específica, el ámbito de
20 aplicación de la invención es importante para las deficiencias en CoQ₉ y/o CoQ₁₀.

ESTADO DE LA TÉCNICA

25 Disfunción mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos celulares que no sólo participan en la producción de
energía sino que son primordiales en un conjunto de procesos celulares. Es por ello que
la disfunción mitocondrial está involucrada, de forma primaria o secundaria, en una
amplia variedad de procesos fisiopatológicos. Entre ellos, la enfermedades mitocondriales
30 primarias constituyen desordenes metabólicos muy heterogéneos desde un punto de
vista genético, molecular, bioquímico, fisiopatológico y sintomatológico. No obstante, es
frecuente que las enfermedades mitocondriales cursen con un déficit en la producción de
energía, un aumento de estrés oxidativo y otras alteraciones metabólicas. Cuando los
síntomas afectan al sistema nervioso central, se suele apreciar en el cerebro un aumento
35 en la proliferación de astrocitos (astrogliosis), así como presencia de vacuolas en
distintas áreas cerebrales (degeneración esponjiforme). En la mayoría de enfermedades

mitocondriales no existe un tratamiento efectivo, y las intervenciones se limitan a efectos paliativos.

La disfunción mitocondrial es también un factor fisiopatológico importante en enfermedades comunes asociadas al envejecimiento, lo que incluye, entre otras, a enfermedades neurodegenerativas, el síndrome metabólico/resistencia a insulina, cardiomiopatías y sarcopenia [Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, et al. Nat Rev Dis Primers. 2016; 2: 16080].

10 Un tipo de enfermedad mitocondrial es la deficiencia primaria en CoQ, la cual se debe a defectos en los genes que codifican proteínas que participan en la biosíntesis de CoQ. La deficiencia en CoQ también se ha descrito de forma secundaria a otras condiciones, tales como la resistencia a la insulina, como efecto adverso de algunos fármacos (este es el caso de las estatinas, usadas para el tratamiento de la hipercolesterolemia), en otras
15 enfermedades mitocondriales y debido a mutaciones no relacionadas directamente con la síntesis de CoQ. En muchos de estos casos, especialmente en la resistencia a insulina y en otras enfermedades mitocondriales, la deficiencia en CoQ se debe a un descenso en los niveles de las proteínas biosintéticas de CoQ, las cuales forman un complejo de síntesis llamado Complejo Q [Kuhl I, Miranda M, Atanassov I, et al. Elife. 2017],
20 [Fazakerley DJ, Chaudhuri R, Yang P, et al. Elife. 2018].

El tratamiento clásico para las deficiencias en CoQ está basado en el suplemento exógeno de altas dosis de CoQ₁₀, lo cual no es efectivo en un porcentaje importante de los pacientes, debido al alto carácter lipofílico y baja biodisponibilidad de la CoQ₁₀
25 exógena. Para evaluar nuevos tratamientos, recientemente se generó y caracterizó un modelo de deficiencia primaria en CoQ debido a una mutación en el gen *Coq9* (*Coq9^{R239X}*), el cual presenta una encefalopatía mitocondrial letal que cursa con déficit bioenergético, daño oxidativo, astrogliosis reactiva severa y degeneración espongiiforme [Garcia-Corzo L, Luna-Sanchez M, Doerrier C, et al. Hum Mol Genet. 2013; 22(6): 1233-
30 48]. El gen *Coq9* codifica la proteína COQ9, la cual se ha demostrado que es esencial para la la estabilidad de la enzima COQ7, una hidroxilasa que cataliza la formación de 5-hidroquinona a partir del sustrato demetoxiubiquinona en la ruta biosintética de la CoQ. Por tanto, los ratones *Coq9^{R239X}* presentan deficiencia generalizada de CoQ₉ y CoQ₁₀ en paralelo a una acumulación de DMQ₉ y DMQ₁₀, dos metabolitos intermediarios que son
35 tóxicos para el correcto funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial y, en consecuencia, para la síntesis de energía. Por tanto, los índices DMQ₉/CoQ₉ o

DMQ₁₀/CoQ₁₀ se encuentran muy elevados en los distintos tejidos de los ratones *Coq9^{R239X}*.

Atendiendo a estos antecedentes, se hace necesario encontrar nuevas fórmulas terapéuticas para enfermedades asociadas a una deficiencia endógena celular de CoQ₉ y/o CoQ₁₀, usando como modelo el ratón *Coq9^{R239X}*.

Usos del ácido β-resorcílico (β-RA)

En experimentos *in vitro* se ha podido demostrar que el uso de análogos del ácido 4-hidroxibenzoico (4-HB), el sustrato natural en la ruta biosintética de la CoQ, puede aumentar la síntesis de CoQ en levaduras y fibroblastos con diferentes defectos en la ruta biosintética de la CoQ. Entre ellos, el β-RA parece aumentar parcialmente la síntesis de CoQ en levaduras y fibroblastos con defectos en COQ7 y COQ9 [Luna-Sanchez M, Diaz-Casado E, Barca E, et al. EMBO Mol Med. 2015; 7(5): 670-87], [Freyer C, Stranneheim H, Naess K, et al. J Med Genet. 2015; 52(11): 779-83]. Asimismo, en ratones knockout condicionales para *Coq7*, el β-RA aumenta parcialmente la síntesis de CoQ, si bien el efecto terapéutico del compuesto del β-RA en este modelo no se conoce desde un punto de vista fisiológico al no identificar los autores el fenotipo de este modelo animal. Además, el mecanismo propuesto para el aumento de esa síntesis endógena de CoQ es un efecto “bypass” en la ruta metabólica.

El solicitante no conoce ningún antecedente relacionado con el uso de β-RA para el aumento de la síntesis endógena de CoQ₉ y CoQ₁₀ debido a un aumento de los niveles de proteínas biosintética de la CoQ, lo que desencadena también en una reducción de los niveles de metabolitos intermediarios. En particular, no se ha descrito su uso para tratar encefalopatías.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

30

La presente invención describe el uso de β-RA para el tratamiento de enfermedades asociadas a una deficiencia de la síntesis endógena celular de CoQ₉ y/o CoQ₁₀, las cuales suelen cursar con disfunción mitocondrial y/o estrés oxidativo. Más particularmente, describe el uso de β-RA para tratar enfermedades causadas por astrogliosis y/o degeneración esponjiforme, preferentemente, para tratar encefalopatías.

35

Así, en un **primer aspecto**, la presente invención se refiere a una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de β -RA para su uso en tratamiento de enfermedades asociadas a una deficiencia de la síntesis endógena celular de CoQ₉ y/o CoQ₁₀, preferentemente, para tratar encefalopatías.

5

El tratamiento que se propone en la presente provoca un aumento de los niveles de CoQ y reducción de los niveles de un metabolito tóxico intermediario, la DMQ, en tejidos periféricos pero no en cerebro, lo que conduce a una mejora de la bionérgica mitocondrial solo en tejidos periféricos. Sorprendentemente, sin embargo, el tratamiento reduce la astrogliosis y la degeneración espongiiforme, y mejora claramente la morfología cerebral, con ausencia de daños aparentes, lo que induce a un drástico aumento de la supervivencia.

En un **segundo aspecto**, la presente invención se refiere a una composición, preparación o forma farmacéutica, que comprende:

15

a) una cantidad terapéuticamente efectiva de β -RA y

b) al menos otro principio activo apto para el tratamiento de enfermedades asociadas a una deficiencia de la síntesis endógena celular de CoQ₉ y/o CoQ₁₀, preferentemente, para tratar encefalopatías.

20

En **otro aspecto**, la presente invención se refiere a un kit ("*kit-de-partes*", del inglés "*kit of parts*") para la preparación de la composición o de la preparación combinada mencionada anteriormente.

En **otro aspecto**, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de pacientes afectados por enfermedades asociadas a una deficiencia de la síntesis endógena celular de CoQ₉ y/o CoQ₁₀, preferentemente, para tratar encefalopatías.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

30

Figura 1. Supervivencia y caracterización fenotípica de ratones *Coq9*^{R239X} tratados con β -RA. (A) Curva de supervivencia en ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{R239X}, *Coq9*^{R239X} tras el tratamiento con β -RA y *Coq9*^{R239X} tras el tratamiento con ubiquinol-10. El tratamiento empezó a 1 mes de edad. **(B)** Curva de supervivencia en ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{R239X}, *Coq9*^{R239X} tras el tratamiento con β -RA. El tratamiento empezó a los 3 meses de vida. **(C)** and **(D)** Peso corporal en machos (C) y hembras (D) de ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{R239X} and *Coq9*^{R239X} tras el tratamiento con β -RA. **(E)** and **(F)** Test de Rotarod en ratones macho y

35

hembra *Coq9^{+/+}*, *Coq9^{R239X}* and *Coq9^{R239X}* tras el tratamiento con β -RA. **(G)** Presión sanguínea en ratones *Coq9^{+/+}*, *Coq9^{R239X}* and *Coq9^{R239X}* tras el tratamiento con β -RA. **(H)** Imagen comparativa de un ratón *Coq9^{R239X}* y un ratón *Coq9^{R239X}* tras el tratamiento con β -RA a los 4 meses de edad. Los resultados está expresados como la media \pm DE. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; *Coq9^{R239X}* o *Coq9^{R239X}* tras el tratamiento con β -RA versus *Coq9^{+/+}*. +P < 0.05; *Coq9^{R239X}* versus *Coq9^{R239X}* tras el tratamiento con β -RA (ANOVA de una vía con Tukey's post hoc test; n = 13–24 para cada grupo).

Figura 2. Diferencias tejido-específicas en los niveles de CoQ₉, CoQ₁₀, DMQ₉ y del índice DMQ₉/CoQ₉ tras el tratamiento con β -RA en ratones *Coq9^{R239X}*. (A hasta S)
 Niveles de CoQ₉ (A, E, I, M y O), CoQ₁₀ (B, F, J, N y R) y DMQ₉ (C, G, K, O y S), así como en índice DMQ₉/CoQ₉ (D, H, L, P y T) en cerebro (A hasta D), riñón (E hasta H), hígado (I hasta L), músculo esquelético (M hasta P) y corazón (Q hasta T) de ratones *Coq9^{+/+}*, *Coq9^{R239X}* y *Coq9^{R239X}* tras el tratamiento con β -RA. Los resultados está expresados como la media \pm DE. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; *Coq9^{R239X}* o *Coq9^{R239X}* tras el tratamiento con β -RA versus *Coq9^{+/+}*. +P < 0.05; *Coq9^{R239X}* versus *Coq9^{R239X}* tras el tratamiento con β -RA (ANOVA de una vía con Tukey's post hoc test; n = 5–6 para cada grupo).

Figura 3. Efecto del β -RA sobre las proteínas biosintéticas de CoQ, las cuales forman parte del Complejo Q. Imágenes representativas de corazón. (A) Niveles de la proteína COQ4 en ratones *Coq9^{+/+}*, *Coq9^{R239X}* y *Coq9^{R239X}* tras el tratamiento con β -RA. **(B)** Niveles de la proteína COQ5 en ratones *Coq9^{+/+}*, *Coq9^{R239X}* y *Coq9^{R239X}* tras el tratamiento con β -RA. **(C)** Niveles de la proteína COQ6 en ratones *Coq9^{+/+}*, *Coq9^{R239X}* y *Coq9^{R239X}* tras el tratamiento con β -RA. **(D)** Niveles de la proteína COQ8A en ratones *Coq9^{+/+}*, *Coq9^{R239X}* y *Coq9^{R239X}* tras el tratamiento con β -RA. Los resultados está expresados como la media \pm DE. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; *Coq9^{R239X}* o *Coq9^{R239X}* tras el tratamiento con β -RA versus *Coq9^{+/+}*. +P < 0.05; *Coq9^{R239X}* versus *Coq9^{R239X}* tras el tratamiento con β -RA (ANOVA de una vía con Tukey's post hoc test; n = 4–6 para cada grupo).

Figura 4. Efecto del β -RA sobre la bionergética mitocondrial, mostrado datos representativos en riñón. (A) índice de consumo de oxígeno mitocondrial (representado como estado 3^o, en presencia de ADP y sustratos) en ratones *Coq9^{+/+}*, *Coq9^{R239X}* y *Coq9^{R239X}* tras el tratamiento con β -RA. **(B)** Actividad del Complejo I+III, dependiente de CoQ, en ratones *Coq9^{+/+}*, *Coq9^{R239X}* y *Coq9^{R239X}* tras el tratamiento con β -RA. **(C)** Actividad del Complejo II+III, dependiente de CoQ, en ratones *Coq9^{+/+}*, *Coq9^{R239X}*

y $Coq9^{R239X}$ tras el tratamiento con β -RA. Los resultados está expresados como la media \pm DE. *P < 0.05; **P < 0.01; $Coq9^{R239X}$ o $Coq9^{R239X}$ tras el tratamiento con β -RA versus $Coq9^{+/+}$. +P < 0.05; $Coq9^{R239X}$ versus $Coq9^{R239X}$ tras el tratamiento con β -RA (ANOVA de una vía con Tukey's post hoc test; n = 6–9 para cada grupo).

5

Figura 5. Cambios estructurales, distribución de astrocitos y oxidación de proteínas en regiones del cerebro (diencefalo y puente) tras el tratamiento con β -RA en ratones $Coq9^{R239X}$. (A hasta F) Tinción de hematosilina-eosina en diencefalo de ratones $Coq9^{+/+}$ (A y D), $Coq9^{R239X}$ (B y E) y $Coq9^{R239X}$ tras el tratamiento con β -RA (C y F). (G hasta L) Tinción inmunohistoquímica frente a GFAP en diencefalo de ratones $Coq9^{+/+}$ (G y J), $Coq9^{R239X}$ (H y K) y $Coq9^{R239X}$ tras el tratamiento con β -RA (I y L). (M hasta O) Tinción inmunohistoquímica frente a grupos carbonilos, marcador de oxidación de proteínas, en diencefalo de ratones $Coq9^{+/+}$ (M), $Coq9^{R239X}$ (N) y $Coq9^{R239X}$ tras el tratamiento con β -RA (O).

10

15

Figura 6. Imágenes de resonancia magnética y detección espectroscópica de lactato en el cerebro de ratones $Coq9^{R239X}$ tratados con β -RA. (A hasta C) Imágenes de diencefalo y puente de ratones $Coq9^{+/+}$. (D hasta F) Imágenes de diencefalo y puente de ratones $Coq9^{R239X}$. (G hasta I) Imágenes de diencefalo y puente de ratones $Coq9^{R239X}$ tras el tratamiento con β -RA. (J hasta L) Pico de lactato en cerebro de ratones $Coq9^{+/+}$ (J), $Coq9^{R239X}$ (K) y $Coq9^{R239X}$ tras el tratamiento con β -RA (L).

20

Figura 7. Efecto del tratamiento con β -RA en los niveles de expresión génicas y rutas afectadas. (A) Rutas alteradas considerando exclusivamente los genes que están significativamente alterados en ratones $Coq9^{R239X}$ comparado con ratones $Coq9^{+/+}$. El eje de las Y representa el porcentaje de genes que corresponden a una ruta en la muestra de genes cuyo nivel de expresión está significativamente alterado cuando se comparan muestras de ratones. (B) Mapa de calor que muestra la visión comparativa de niveles de expresión por muestra en 27 genes cuya expresión está alterada por la mutación y normalizada tras el tratamiento con β -RA. Existen genes cuyos niveles de expresión aparecen significativamente alterados tanto en la comparación entre ratones $Coq9^{R239X}$ y $Coq9^{+/+}$ como en la comparación entre ratones $Coq9^{R239X}$ y $Coq9^{R239X}$ tras el tratamiento con β -RA. Hay que destacar que el agrupamiento por niveles de expresión génica hace colocar todas las muestras de ratones $Coq9^{R239X}$ en una rama diferente, muestras que las muestras de ratones $Coq9^{+/+}$ y $Coq9^{R239X}$ tras el tratamiento con β -RA aparecen juntas en un segundo racimo. Los números de la columnas se corresponden con diferentes

25

30

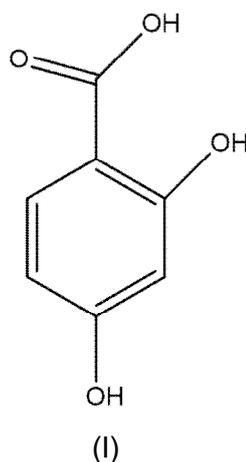
muestras biológicas y los nombre de las filas con el nombre del gen según el “ENSEMBL gene ID” y el símbolo del gen (entre paréntesis). El color verde significa niveles de expresión comparativamente más altos; el color rojo significa niveles de expresión comparativamente más bajos; y el color negro significa ausencia de diferencias en niveles de expresión.

Figura 8. Tinción de COX y SDH en *gastrocnemius* donde se aprecia un cambio de distribución de fibras tipo I y fibras tipo II tras el tratamiento con β -RA. (A hasta C) Tinción de Citocromo c Oxidasa (COX) o complejo IV mitocondrial en *gastrocnemius* de ratones *Coq9^{+/+}* (A), *Coq9^{R239X}* (B) y *Coq9^{R239X}* tras el tratamiento con β -RA (C). (D hasta F) Tinción de Succinato Deshidrogenasa (SDH) o complejo II mitocondrial en *gastrocnemius* de ratones *Coq9^{+/+}* (D), *Coq9^{R239X}* (E) y *Coq9^{R239X}* tras el tratamiento con β -RA (F).

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

El término “ácido β -resorcílico” o “ β -RA” hace referencia a un compuesto de fórmula (I):



20

Otras denominaciones de este compuesto son: 2,4-dihidroxibenzoato, ácido 2,4-dihidroxibenzoico, ácido 2,4-dihidroxibenzoico - sal de plomo, ácido 2,4-dihidroxibenzoico – sal monosódica o ácido 2,4-dihidroxibenzoico – sal disódica.

25

En una realización particular se considerará comprendido en el término “ β -RA” cualquier análogo de análogo del ácido 2-4-hidroxibenzoico, preferentemente ácido 4-

hidroxibenzoico, ácido 3,4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido 2-metil-4-hidroxibenzoico o ácido 2,3-dimethoxi-4-hidroxibenzoico, así como cualquiera de sus sales; cualquier equivalente biológico funcional, y cualquier combinación de los anteriores

- 5 El término "CoQ" hace alusión tanto a CoQ₉ como a CoQ₁₀ y, por tanto, se refiere indistintamente, a CoQ₉ y CoQ₁₀ o a ambas.

El término "biosíntesis de CoQ" se refiere al proceso natural de síntesis de Coenzimas Q, en particular CoQ₉ y CoQ₁₀.

10

El término "proteína de biosíntesis de CoQ" se refiere a todas aquellas proteínas que participan en la biosíntesis de CoQ, en particular PDSS1, PDSS2, COQ2, COQ3, COQ4, COQ5, COQ6, COQ7, COQ8A, COQ8B y COQ9.

- 15 El término "DMQ" hace alusión tanto a DMQ₉ como a DMQ₁₀ y, por tanto, se refiere indistintamente, a DMQ₉ y DMQ₁₀ o a ambos.

El término "Complejo Q" se refiere al complejo multiproteico para la síntesis de CoQ, compuesto por las proteínas COQ3, COQ4, COQ5, COQ6, COQ7, COQ8A y COQ9.

20

El término "COQ7" se refiere a una proteína de biosíntesis de CoQ que tiene actividad hidroxilasa y cuya función es catalizar la formación de 5-hidroxiquinona (5-HQ) a partir de demetoxiubiquinona-9 (DMQ₉).

- 25 Los términos "5-hidroxiquinona" ("5-HQ"), "demetoxiubiquinona-9" ("DMQ₉") y "demetoxiubiquinona-10" ("DMQ₁₀") se refieren a moléculas intermediarias en la ruta biosintética de CoQ₉ y CoQ₁₀, y que cuando se acumulan a niveles suprafisiológicos pueden ejercer efectos tóxicos en la célula, en particular en la maquinaria de producción de energía en las mitocondrias.

30

El término "bypass" se refiere a que la composición de una molécula le confiere la capacidad para saltarse parcialmente un paso determinado en una ruta metabólica, de forma que cuando ese paso presenta un defecto, la molécula en cuestión podrá saltarse ese defecto y continuar la ruta metabólica.

35

El término "bioenergética mitocondrial" hace referencia a una serie de parámetros que permiten valorar la capacidad de las mitocondrias para generar energía útil para la célula.

En ese estudio los parámetros usados son el índice de consumo de oxígeno mitocondrial (OCR) y las actividades del complejo I+III y del complejo II+III mitocondriales.

El término "paciente" se emplea en este documento para referirse cualquier animal, preferentemente mamífero, más preferentemente humano, sometido o que se va a someter a tratamiento.

Por su parte, el término "tratamiento" o "tratar" en el contexto de este documento se refiere a la administración de un compuesto o una composición según la invención para mejorar o eliminar una enfermedad, condición patológica o uno o más síntomas asociados con dicha enfermedad o condición en un paciente. "Tratamiento" también abarca la mejora o eliminación de las secuelas fisiológicas de la enfermedad.

Concretamente, el concepto "tratar" se puede interpretar como:

- i. Prevenir la enfermedad o condición patológica, es decir, impedir o retrasar su aparición;
- ii. Inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- iii. Aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causa la regresión de la enfermedad o la condición patológica;
- iv. Estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

El término "medicamento", tal y como se usa en esta descripción, hace referencia a cualquier sustancia utilizada para el tratamiento de enfermedades o condiciones patológicas en el hombre o en un animal.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de principio activo calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dicho principio y el efecto terapéutico a conseguir. Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

El término "equivalente biológico funcional" o "variable bioequivalente" tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una molécula con la misma función que la molécula descrita, que puede presentar ligeras variaciones con respecto a la molécula descrita sin que dichas variaciones aporten ningún efecto técnico añadido a dicha

molécula. En la presente invención se refiere por lo tanto a variantes de β -RA que presenten la misma función y que presenten ligeras variaciones sin que dichas variaciones aporten ningún efecto técnico añadido al β -RA.

5 Por "concentración que sea equivalente" se entiende aquella concentración necesaria para el equivalente biológico funcional de β -RA que produzca el mismo efecto que el descrito en la presente invención.

10 El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de la composición de la invención, estabiliza dicha composición farmacéutica o ayuda a su preparación en el sentido de darle consistencia. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad.

15

El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a que el compuesto al que hace referencia esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

20 Un "vehículo farmacéuticamente aceptable", o farmacológicamente aceptable, se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensoactivos. El vehículo puede ser una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los compuestos de la presente
25 invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación del producto de expresión de la invención así como también de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica.

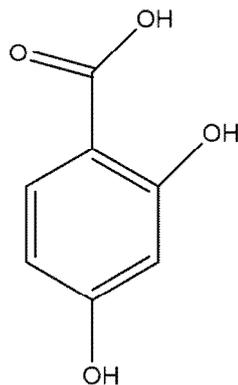
30 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones el término "comprende", que también podrá interpretarse como "consiste en", y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

35 **Composiciones de la invención**

En este contexto, en su primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición, en adelante "composición de la invención" que comprende una cantidad

terapéuticamente efectiva β -RA para el tratamiento de enfermedades asociadas a una deficiencia de la síntesis endógena celular de CoQ₉ y/o CoQ₁₀, las cuales suelen cursar con disfunción mitocondrial y/o estrés oxidativo. Más particularmente, la composición de la invención es útil para tratar enfermedades causadas por astrogliosis y/o degeneración esponjiforme, preferentemente, para tratar encefalopatías.

En una realización particular, β -RA es ácido β -resorcílico, o ácido 2,4-dihidroxibenzoico de fórmula general (I):



10

(I)

En otra realización particular, la composición de la invención es apta para su administración oral

15 En una realización particular, la composición comprende β -RA como único principio activo. De forma más particular, la composición consiste en β -RA.

En otra realización particular, la composición de la invención comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la composición de la invención comprende además excipientes.

En otra realización particular, la composición de la invención comprende además otros principios activos para el tratamiento de las enfermedades mencionadas, preferentemente CoQ₉ y/o CoQ₁₀.

25

En otra realización particular, la composición también comprende un compuesto seleccionado del grupo formado por ácido 4-hidroxibenzoico, ácido 3,4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido 2-metil-4-hidroxibenzoico o ácido 2,3-dimethoxi-4-hidroxibenzoico, sales de los compuestos de este grupo o algún equivalente biológico funcional de los compuestos de este grupo.

30

Preparaciones combinadas

El término "preparación combinada" o también denominada "yuxtaposición", en esta memoria, significa que los componentes de la preparación combinada no necesitan encontrarse presentes como unión, por ejemplo en una composición verdadera, para poder encontrarse disponibles para su aplicación combinada, separada o secuencial. De esta manera, la expresión "yuxtapuesta" implica que no resulta necesariamente una combinación verdadera, a la vista de la separación física de los componentes.

10 Así, en otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición, preparación o forma farmacéutica de ahora en adelante "preparación combinada de la invención", que comprende:

a) una cantidad terapéuticamente efectiva de β -RA y

15 b) al menos otro principio activo apto para el tratamiento de enfermedades asociadas a una deficiencia de la síntesis endógena celular de CoQ₉ y/o CoQ₁₀, las cuales suelen cursar con disfunción mitocondrial y/o estrés oxidativo. Más particularmente para tratar enfermedades causadas por astrogliosis y/o degeneración esponjiforme, preferentemente, para tratar encefalopatías.

20 En una realización particular, el segundo principio activo es CoQ₉ o CoQ₁₀.

En otra realización particular, el segundo principio activo se selecciona del grupo formado por ácido 4-hidroxibenzoico, ácido 3,4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido 2-metil-4-hidroxibenzoico o ácido 2,3-dimethoxi-4-hidroxibenzoico, así como cualquiera de las sales de los compuestos de este grupo o algún equivalente biológico funcional de los compuestos de este grupo.

25

Kit de la invención

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit ("*kit-de-partes*", del inglés "*kit of parts*") para la preparación de la composición o de la preparación combinada de la invención.

30

El término "*kit*", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una combinación de un conjunto de componentes adecuados para la obtención de la composición o de la preparación combinada de la invención, que pueden estar o no empaquetados juntos, junto con sus contenedores y envases apropiados para su venta comercial, etc.

35

En la presente invención, se entiende como "componente adecuado para la obtención de la composición o de la preparación combinada de la invención", a cualquier compuesto que puede usarse para la obtención de las mismas, e incluye, sin limitación, soluciones acuosas, preparados sólidos, tampones, jarabes, soluciones de preservación, aromatizantes, correctores de pH, espesantes, etc.

Los componentes del kit se pueden proporcionar en viales separados (en forma de "kit-de-partes") o en un único vial. Además, se entiende que el kit de la presente invención está destinado a la preparación de la composición o de la preparación combinada o de la forma farmacéutica de la invención. Preferiblemente, los componentes del kit de la presente invención están listos para ser usados para preparar la composición o la preparación combinada o la forma farmacéutica de la presente invención. Además, el kit contiene preferiblemente instrucciones explicativas acerca de cómo preparar la composición o la preparación combinada o la forma farmacéutica de la presente invención. Las instrucciones se pueden proporcionar a los usuarios en forma electrónica o en papel.

En una realización particular, la invención proporciona un kit para la preparación de la composición de la invención o de la preparación combinada de la invención un recipiente que comprende un envase que contiene β -RA en cualquier formulación farmacéuticamente aceptable, junto con componentes adecuados para la obtención de la composición o de la preparación combinada de la invención.

25 **Usos de β -RA**

Otro aspecto de la invención consiste en el uso de β -RA para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades asociadas a una deficiencia de la síntesis endógena celular de CoQ₉ y/o CoQ₁₀, las cuales suelen cursar con disfunción mitocondrial y/o estrés oxidativo. Más particularmente para tratar enfermedades causadas por astrogliosis y/o degeneración espongiiforme, preferentemente, para tratar encefalopatías.

Consecuentemente la invención se refiere al uso de las composiciones y/o las preparaciones combinadas y/o el kit de la invención como medicamento o para la elaboración de un medicamento apto para el tratamiento de enfermedades causadas por, o que están acompañadas de, una deficiencia de la síntesis endógena celular de CoQ₉ y/o CoQ₁₀, las cuales suelen cursar con disfunción mitocondrial y/o estrés oxidativo. Más

particularmente para tratar enfermedades causadas por astrogliosis y/o degeneración espongiiforme, preferentemente, para tratar encefalopatías.

Método de tratamiento

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de pacientes afectados por enfermedades causadas por, o que están acompañadas de, una deficiencia de la síntesis endógena celular de CoQ₉ y/o CoQ₁₀, las cuales suelen cursar con disfunción mitocondrial y/o estrés oxidativo, y más particularmente para tratar enfermedades causadas por astrogliosis y/o degeneración espongiiforme,
10 preferentemente, para tratar encefalopatías., en adelante "método de tratamiento de la invención", mediante el uso de los compuestos y/o las composiciones y/o las preparaciones combinadas y/o el kit de la invención.

Los efectos de este método de tratamiento incluyen, pero no se limitan, a los efectos de
15 curación de la enfermedad, el incremento del tiempo de progresión de la enfermedad y al índice de supervivencia. Los efectos del tratamiento incluyen a más largo plazo el control de la enfermedad.

En una realización preferente, el tratamiento consiste en administrar para mejorar la
20 eficiencia en la síntesis de CoQ₉ y CoQ₁₀, de forma que en ciertos tejidos (riñones) se aprecia un aumento de los niveles de CoQ₉ y/o CoQ₁₀ junto con un descenso de los niveles de DMQ₉ y/o DMQ₁₀, mientras que en otros tejidos (corazón, músculo esquelético y riñones) se aprecia un descenso de los niveles de DMQ₉ y/o DMQ₁₀. Estos defectos son consecuencia del aumento en los niveles de las proteínas biosintéticas de CoQ, y más
25 concretamente de aquellas que forman parte del Complejo Q. En cualquier caso, siempre que se produce un descenso en los niveles de DMQ₉ y/o DMQ₁₀, se observa un aumento de la bioenergética mitocondrial.

Este tratamiento consiste en la administración a los individuos afectados por estas
30 enfermedades de cantidades terapéuticamente efectivas de la β-RA, de la composición de la invención, o de la composición combinada de la invención.

La cantidad administrada dependerá del tipo de enfermedad, del estado del paciente y de la fase de desarrollo de la enfermedad.

35

De forma preferente, para pacientes humanos, el β -RA se administra por vía oral con una dosis de entre 10 y 850 mg/kg de peso del paciente, preferentemente entre 20 y 162 mg/kg y más preferentemente entre 40 y 81 mg/kg de peso del paciente.

- 5 Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende β -RA para el tratamiento de las enfermedades mencionadas, donde el β -RA se administra a dosis de entre 10 y 850 mg/kg de peso del paciente, preferentemente entre 20 y 162 mg/kg y más preferentemente entre 40 y 81 mg/kg de peso del paciente.
- 10 La administración de las composiciones de la invención, en solitario o en combinación con otros compuestos, composiciones o medicamentos, se puede llevar a cabo por medio de los modos de administración de agentes aceptados para servir a similares utilidades.

15 **MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION**

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

20

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la utilidad del β -RA para el tratamiento de enfermedades causadas por deficiencia de Coenzima Q.

25

Ratones utilizados y tratamiento experimental

Para el estudio se utilizaron ratones control (*Coq9*^{+/+}), ratones mutantes para el gen *Coq9* (*Coq9*^{R239X}) y ratones mutantes para *Coq9* tratados con β -RA (*Coq9*^{R239X} + β -RA). Todos los experimentos se desarrollaron acorde al protocolo aprobado por el comité de ética de experimentación animal de la Universidad de Granada (procedimiento n°: 9-CEEA-OH-2013).

30

El tratamiento experimental se basó en la incorporación al pienso de β -RA a una concentración del 1%. Los ratones se supusieron en tratamiento tras el destete, a los 21 días de vida y los ensayos experimentales se realizaron al mes 3 de vida, salvo en los

35

experimentos de supervivencia y fenotipaje. La evaluación de la coordinación motora se hizo a través del test de rotarod.

Medida de la presión sanguínea y frecuencia cardíaca en ratones

- 5 La presión sanguínea y la frecuencia cardíaca se hizo por pletismografía en la cola de ratón, tal y como hemos descrito previamente [Luna-Sanchez M, Hidalgo-Gutierrez A, Hildebrandt TM, et al. *EMBO Mol Med.* 2017; 9(1): 78-95].

Cuantificación de niveles de CoQ₉, CoQ₁₀, DMQ₉ y DMQ₁₀ en tejidos de ratón

- 10 Los niveles de las distintas quinonas se determinaron en extractos lipídicos de los tejidos, realizando la separación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la detección posterior en un detector electroquímico, tal y como hemos descrito previamente [Garcia-Corzo L, Luna-Sanchez M, Doerrier C, et al. *Hum Mol Genet.* 2013; 22(6): 1233-48].

15

Cuantificación de proteínas mediante Western blot en tejidos

La cuantificación de proteínas específicas se llevó a cabo en extractos proteicos de tejidos mediante electroforesis en geles de acrilamida al 12%, la posterior transferencia a membranas de PVDF y la incubación secuencial con anticuerpos primarios y secundario.

- 20 Los anticuerpos primarios usados fueron: anti-COQ4 (Proteintech, 16654-1-AP), anti-COQ5 (Proteintech, 17453-1-AP), anti-COQ6 (Proteintech, 12481-1-AP), anti-COQ8A (Proteintech, 15528-1-AP) y anti-VDAC1 (Abcam, ab14734) [Luna-Sanchez M, Diaz-Casado E, Barca E, et al. *EMBO Mol Med.* 2015; 7(5): 670-87].

25 Respiración mitocondrial

La respiración mitocondrial se llevó a cabo en extractos de mitocondrias crudas en el equipo XFe²⁴ Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience) [Luna-Sanchez M, Diaz-Casado E, Barca E, et al. *EMBO Mol Med.* 2015; 7(5): 670-87].

30 Actividades de la cadena respiratoria dependientes de CoQ

Las actividades de los complejos I+III y II+III se determinaron por técnicas espectrofotométricas [Garcia-Corzo L, Luna-Sanchez M, Doerrier C, et al. *Hum Mol Genet.* 2013; 22(6): 1233-48].

Cuantificación de niveles de β -resorcílico en tejidos de ratones mediante extracción lipídica

La cuantificación del β -RA se llevó a cabo por HPLC-UV usando una columna Ultra Aqueous C18 y una fase móvil consistente en fosfato potásico 20 mM y acetonitrilo al 15% (pH 2.5). La curva estándar consistió en β -RA a una concentración de 5, 25 and 100 μ g /ml. Los resultados se expresaron en μ g de β -RA/mg proteína.

Histología e Inmunohistoquímica

En el cerebro se realizó la tinción de hematoxilina-eosina (H&E) y la inmunohistoquímica se hizo usando los anticuerpos primarios anti-GFAP (Millipore, MAB360) y el OxyIHC™ Oxidative Stress Detection Kit (S7450, Millipore) [Garcia-Corzo L, Luna-Sanchez M, Doerrier C, et al. *Hum Mol Genet.* 2013; 22(6): 1233-48], [Diaz F, Garcia S, Padgett KR, et al. *Hum Mol Genet.* 2012; 21(23): 5066-77]. Las distribuciones de fibras tipo I y tipo II en músculo esquelético se determinó por la detección histoquímica de las actividades enzimáticas de la Citocromo Oxidasa (COX) y Succinato Deshidrogenasa (SDH) [Luna-Sanchez M, Diaz-Casado E, Barca E, et al. *EMBO Mol Med.* 2015; 7(5): 670-87].

MRI *in vivo* y MRS mediante protones

La evaluación por MRI y MRA se llevó a cabo en un magnet Bruker Biospec TM 70/20 USR horizontal de 7 Teslas diseñado para pequeños animales de experimentación. Tras el escáner de localización se tomaron datos de alta resolución axial y coronal en T2 para poder visualizar cualquier atrofia cerebral o estructural [Diaz F, Garcia S, Padgett KR, et al. *Hum Mol Genet.* 2012; 21(23): 5066-77].

Análisis del transcriptoma mediante secuenciación del RNA

La secuenciación del RNA se llevó a cabo en un HiSeq 4000 system (Illumina, Inc.). Los análisis posteriores se llevaron a cabo tal y como se ha descrito previamente [Martin-Blazquez R, Chen B, Kang L., et al. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 6653]. Usamos un nivel umbral de p de 0,05 tras la corrección del error tipo I de "False Discovery Rate". La figura del heatmap se realizó usando la función de heatmap en R (<https://www.r-project.org/>). Las

anotaciones de los genes diferencialmente expresados se obtuvo del Mouse Genome Informatics (<http://www.informatics.jax.org/>).

Análisis estadístico

- 5 Los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar de 4-10 experimentos por grupo. Para comparar las diferencias entre los 3 grupos experimentales se llevó a cabo un análisis ANOVA de una vía con un post-test de Tukey. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. La curva de supervivencia se analizó a través de los test log-rank (Mantel-Cox) y Gehan-Breslow-Wilcoxon.

10

B. Parámetros evaluados

- 15 Niveles de β -RA para conocer la biodisponibilidad del compuesto terapéutico cuando se administra por vía oral o vía intraperitoneal. Estas determinaciones se hacen en plasma sanguíneo, riñón y cerebro.

Supervivencia y peso corporal para conocer la potencia del compuesto terapéutico (β -RA) para mejorar el estado de salud y prolongar de manera significativa la vida.

Coordinación y actividad locomotora corporal para conocer la potencia del compuesto terapéutico (β -RA) para mejorar las funciones motoras.

- 20 Niveles de Coenzima Q9 (CoQ₉) para conocer el efecto del compuesto terapéutico (β -RA) en la síntesis endógena de CoQ₉, entendiendo como endógena aquella que se da en el interior de la propia célula.

- 25 Niveles de Coenzima Q10 (CoQ₁₀) para conocer el efecto del compuesto terapéutico (β -RA) en la síntesis endógena de CoQ₁₀, entendiendo como endógena aquella que se da en el interior de la propia célula.

Niveles de Demetoxiubiquinona-9 (DMQ₉) para conocer el efecto del compuesto terapéutico (β -RA) en la ruta biosintética de CoQ₉, y particularmente sobre la reducción en los niveles de este compuesto que es tóxico para la función mitocondrial.

- 30 Niveles de Demetoxiubiquinona-10 (DMQ₁₀) para conocer el efecto del compuesto terapéutico (β -RA) en la ruta biosintética de CoQ₁₀, y particularmente sobre la reducción en los niveles de este compuesto que es tóxico para la función mitocondrial.

Niveles de COQ4, COQ5, COQ6 y COQ8A para conocer el efecto del compuesto terapéutico (β -RA) sobre el complejo multiprotéico de biosíntesis de CoQ (Complejo Q).

5 Bioenergética mitocondrial para conocer el efecto del compuesto terapéutico (β -RA) sobre la maquinaria celular de producción de energía localizada en las mitocondria. Para ello, se hacen las siguientes determinaciones: índice de consumo de oxígeno mitocondrial (OCR) y las actividades del complejo I+III y del complejo II+III mitocondriales.

10 Tinciones histológicas e inmunohistoquímicas para conocer los cambios morfológicos y distribución celular en cerebro y músculo esquelético. Específicamente, la tinción de hematoxilina-eosina (H&E) nos permite apreciar la presencia de vacuolas característica de la degeneración esponjiforme; la tinción inmunohistoquímica de GFAP nos permite detectar las células que expresan la proteína GFAP, lo cual es característico de los astrocitos y, en consecuencia, nos permite identificar la proliferación anómala/patológica de astrocitos característica de la astrogliosis reactiva; la tinción inmunohistoquímica
15 OxyIHC nos permite visualizar los grupos carbonilos cuyos niveles aumentan cuando se da un incremento de oxidación de proteínas en situaciones de aumento de estrés oxidativo y daño oxidativo.

20 Imágenes de resonancia magnética y espectroscopía para identificar de daño tisular en cerebro, lo cual es característico de enfermedades neurológicas severas; así como para determinar los niveles de lactato, los cuales aumentan cuando la fosforilación oxidativa mitocondrial están comprometida y hay déficit bionergético.

Análisis transcriptómico en cerebro para identificar cambios en el patrón de expresión de genes y su agrupación en rutas funcionales para averiguar las dianas y mecanismos terapéuticos del β -RA.

25

COMPOSICIÓN, FÓRMULA Y ADMINISTRACIÓN DEL COMPUESTO TERAPEÚTICO

Se ha empleado β -RA como agente terapéutico, el cual se administra en el pienso de comida a una concentración del 1 % (peso/peso), lo que representa una dosis de 1-2 g/kg de peso corporal/día. Por tanto, el β -RA se administra de forma crónica por vía oral,
30 demostrándose que el mismo aparece en sangre, riñones y cerebro.

A efectos de biodisponibilidad, los inventores hacen una prueba de administración aguda intraperitoneal a una dosis de 0,25 g/ kg peso corporal y se demuestra que el compuesto aparece en sangre, riñones y cerebro después de 30 minutos de la administración.

A efectos experimentales, el tratamiento oral se inicia al mes de vida y los análisis se realizan a los 3 meses de vida, tras dos meses de tratamiento, a excepción de la adquisición de datos para la curva y análisis de la supervivencia. Asimismo se hace un
5 prueba de supervivencia iniciando el tratamiento a los 3 meses de vida, con la evidencia externa de la sintomatología de la enfermedad (reducción de peso y de movilidad).

La composición ha mostrado ser eficaz empleando dosis de entre 0,25 y 2 g/kg de peso del ratón, preferentemente entre 0,5 y 1 g/kg de peso del ratón. Eso se podría
10 corresponder a una dosis comprendida entre 10 y 850 mg/kg de peso del paciente, preferentemente entre 40 y 81 mg/kg de peso del paciente, según la fórmula de traslación de dosis basada en la superficie de área corporal [Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. FASEB J. 2008; 22(3): 659-61].

15 *EFFECTOS DEL β -RA SOBRE LA SUPERVIVENCIA Y ESTADO FENOTÍPICO DE LOS RATONES $Coq9^{R239X}$*

Los inventores muestran que la administración oral crónica del el β -RA iniciada al primes mes de vida aumenta considerablemente la supervivencia de los ratones $Coq9^{R239X}$, acercándose a la vida media de ratones control normales. Concretamente los ratones
20 $Coq9^{R239X}$ pasan de tener una vida media de 5 meses y máxima de 7 meses a tener una vida media de 22 meses y una máxima de 25 meses.

A destacar que los efectos de supervivencia son muy superiores a los obtenidos con el tratamiento convencional de suplemento oral de CoQ₁₀, con el cual se alcanza una vida
25 media de 13 meses y una vida máxima de 17 meses.

Cuando el tratamiento con β -RA se inicia más tarde, en un período que se considera sintomático, a los 3 meses de vida, el 100 % de los ratones tratados alcanzan los 10 meses de vida, en comparación con el 0% de supervivencia de ratones $Coq9^{R239X}$ sin
30 tratar a la misma edad.

Los efectos del β -RA sobre la supervivencia se ponen también de manifiesto una mejora de la función y coordinación locomotora, así como un mejor aspecto general.

35 *EFFECTOS DEL β -RA SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE CoQ*

El tratamiento con β -RA tiene efectos sobre la biosíntesis de CoQ en riñón, hígado, corazón y músculo esquelético de ratones $Coq9^{R239X}$. Concretamente, los inventores

muestran que el tratamiento con β -RA aumenta los niveles de CoQ₉ y CoQ₁₀ en riñón de ratones *Coq9^{R239X}*. En riñón, hígado, corazón y músculo esquelético de ratones *Coq9^{R239X}*, el tratamiento reduce los niveles de DMQ₉, sustrato de la enzima COQ7.

- 5 Estos efectos del β -RA se deben a un aumento de los niveles de las proteínas que forman parte del Complejo Q, concretamente COQ4, COQ5, COQ6, COQ7 y COQ8A.

El tratamiento con β -RA no tiene ningún efecto sobre la biosíntesis de CoQ en cerebro de ratones *Coq9^{R239X}*, a pesar de que es el cerebro el tejido más importante desde un punto de vista fisiopatológico y sintomatológico en este modelo. Ello sugiere que el efecto terapéutico en el cerebro se puede deber a cambios interacciones endocrinas, lo cual está por demostrar.

EFECTOS DEL β -RA SOBRE LA BIONERGÉTICA MITOCONDRIAL

- 15 Los inventores han observado que los efectos del β -RA sobre la bioenergética mitocondrial en cada tejido son directamente indirectamente proporcionales a los niveles de DMQ que se observan en dichos tejidos. Por tanto, los inventores muestran que la bioenergética mitocondrial mejora cuando se produce un descenso en el índice DMQ/CoQ. Por ello, en riñón de ratones *Coq9^{R239X}* tratados con β -RA la bioenergética mitocondrial aumenta hasta casi normalizarse. Una situación similar ocurre en músculo esquelético, corazón e hígado.

EFECTOS DEL β -RA SOBRE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN CEREBRAL

- 25 A pesar de que el tratamiento con β -RA no ejerce ningún efecto sobre la ruta biosintética de CoQ ni sobre ni sobre la bioenergética mitocondrial en cerebro de ratones *Coq9^{R239X}*, los inventores sí que observan mejoras morfológicas muy evidentes en cerebro de ratones *Coq9^{R239X}* en tratamiento con β -RA. En concreto, el tratamiento con β -RA ejerce los siguientes efectos en el cerebro de los ratones *Coq9^{R239X}*: 1) reducción de la degeneración esponjiforme o espongiótica, esto es, reducción de la presencia de vacuolas; 2) reducción en la astrogliosis reactiva, esto es, disminución en el número de astrocitos que proliferan de forma anómala; 3) reducción del daño oxidativo determinado por presencia de proteínas oxidadas (grupos carbonilos); y 4) reducción de zonas con daño cerebral evidenciado en imágenes de resonancia magnética.

35

En el equipo de MRI también se hace una espectroscopía que muestra un aumento de los niveles de lactato en cerebro de ratones *Coq9^{R239X}*, lo cual no cambia con el

tratamiento con β -RA. Este dato corrobora la ausencia de efecto del β -RA en la bioenergética mitocondrial en cerebro de ratones *Coq9^{R239X}*.

5 En músculo esquelético (*gastrocnemius*) el tratamiento con β -RA induce una normalización de la distribución de fibras tipo I y fibras tipo II en ratones *Coq9^{R239X}*.

EFFECTOS DEL β -RA SOBRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA ACTIVIDAD NEUROINFLAMATORIA DE LOS ASTROCITOS

10 Para entender el mecanismo de acción terapéutica de β -RA en el cerebro de los ratones *Coq9^{R239X}* los inventores han llevado a cabo un experimento de RNA-Seq con el fin de identificar cambios globales de expresión génica que identifiquen rutas que especialmente se ven modificadas en cada uno de los grupos experimentales. Los datos muestran que en el tronco del encéfalo de los ratones *Coq9^{R239X}* hay 298 genes que se
 15 sobre expresan y 161 genes que se reprime su expresión al compararlo con ratones control *Coq9^{+/+}*. Al comparar los ratones *Coq9^{R239X}* tratados con β -RA con ratones *Coq9^{R239X}* sin tratar, se observa que en el tronco del encéfalo hay 187 que se sobreexpresan y 160 que se reprime su expresión en los ratones *Coq9^{R239X}* comparándolo con los ratones *Coq9^{R239X}* tratados con β -RA. Al comparar las rutas
 20 alteradas se observa que hay un número significativo de genes con inflamación vía quimioquinas, citoquinas e integrinas.

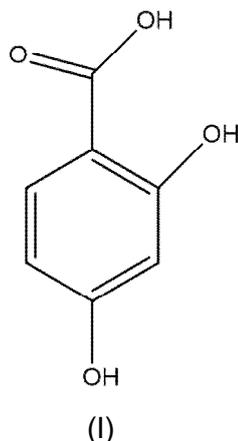
A destacar que la identificación de 27 genes que están alterados tanto en la comparación *Coq9^{R239X}* vs *Coq9^{+/+}* y en la comparación *Coq9^{R239X}* vs *Coq9^{R239X}* tratado con β -RA. De
 25 esos 27 genes, aquellos que estaban sobreexpresados en ratones *Coq9^{R239X}*, comparado con los ratones *Coq9^{+/+}*, se reprimió su expresión en los ratones *Coq9^{R239X}* tratados con β -RA, comparándolo con ratones *Coq9^{R239X}*, y viceversa. En consecuencia, los niveles de expresión de estos 27 genes se normalizan tras el tratamiento con β -RA en ratones *Coq9^{R239X}*. La mayoría de estos genes tienen funciones relacionadas con inflamación
 30 mediada/influenciada por astrocitos.

En su conjunto, en la presente invención se describe una terapia consistente en el suministro de β -RA para el tratamiento de enfermedades asociadas a una deficiencia de la síntesis endógena celular de CoQ₉ y/o CoQ₁₀, las cuales suelen cursar con disfunción
 35 mitocondrial y/o estrés oxidativo. Más particularmente para tratar enfermedades causadas por astrogliosis y/o degeneración esponjiforme, preferentemente, para tratar encefalopatías.

REIVINDICACIONES

5 1. Composición para su uso en tratamiento de enfermedades asociadas a una deficiencia de la síntesis endógena celular de CoQ₉ y/o CoQ₁₀, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de β -RA.

2. Composición, según reivindicación anterior, en la que β -RA es ácido β -resorcílico, o ácido 2,4-di-hidroxibenzoico (de fórmula general (I):



15 3. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende β -RA como único principio activo.

4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende además CoQ₉ y/o CoQ₁₀.

20 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4 que además comprende un compuesto seleccionado del grupo formado por ácido 4-hidroxibenzoico, ácido 3,4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido 2-metil-4-hidroxibenzoico y ácido 2,3-dimethoxi-4-hidroxibenzoico; o alguna de sus sales o un equivalente biológico funcional de los compuestos de dicho grupo.

25 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, apta para su administración por vía oral.

7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde β -RA se administra a una dosis de entre 20 y 850 mg/kg de peso del paciente,

preferentemente entre 20 y 162 mg/kg y más preferentemente entre 40 y 81 mg/kg de peso del paciente.

- 5 8. Preparación combinada para su uso en tratamiento de enfermedades asociadas a una deficiencia de la síntesis endógena celular de CoQ₉ y/o CoQ₁₀, que comprende:
- a) una cantidad terapéuticamente efectiva de β-RA;
 - b) al menos un segundo principio activo apto para el tratamiento de enfermedades asociadas a una deficiencia de la síntesis endógena celular de CoQ₉ y/o CoQ₁₀.
- 10 9. Preparación según reivindicación anterior en la que el segundo principio activo es CoQ₉ y/o CoQ₁₀.
- 15 10. Preparación según reivindicación 6 en la que el segundo principio activo es un compuesto seleccionado del grupo formado por ácido 4-hidroxibenzoico, ácido 3,4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido 2-metil-4-hidroxibenzoico y ácido 2,3-dimethoxi-4-hidroxibenzoico; o alguna de sus sales o un equivalente biológico funcional de los compuestos de dicho grupo.
- 20 11. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde β-RA se administra a una dosis de entre 20 y 850 mg/kg de peso del paciente, preferentemente entre 20 y 162 mg/kg y más preferentemente entre 40 y 81 mg/kg de peso del paciente.
- 25 12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; o preparación según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que las enfermedades cursan con deficiencia en CoQ₉ y/o CoQ₁₀, y/o aumento de los niveles de DMQ₉ y/ DMQ₁₀.
- 30 13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; o preparación según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que las enfermedades cursan con disfunción mitocondrial.
- 35 14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; o preparación según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que las enfermedades cursan con estrés oxidativo.

15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; o preparación según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que las enfermedades cursan con astrogliosis y/o degeneración espongiiforme.
- 5 16. Composición o preparación, según reivindicación anterior, en la que la enfermedad es encefalopatía.
- 10 17. Kit para la preparación de una composición o de una preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende un envase que contiene β -RA en cualquier formulación farmacéuticamente aceptable, junto con componentes adecuados para la obtención de la composición.

15

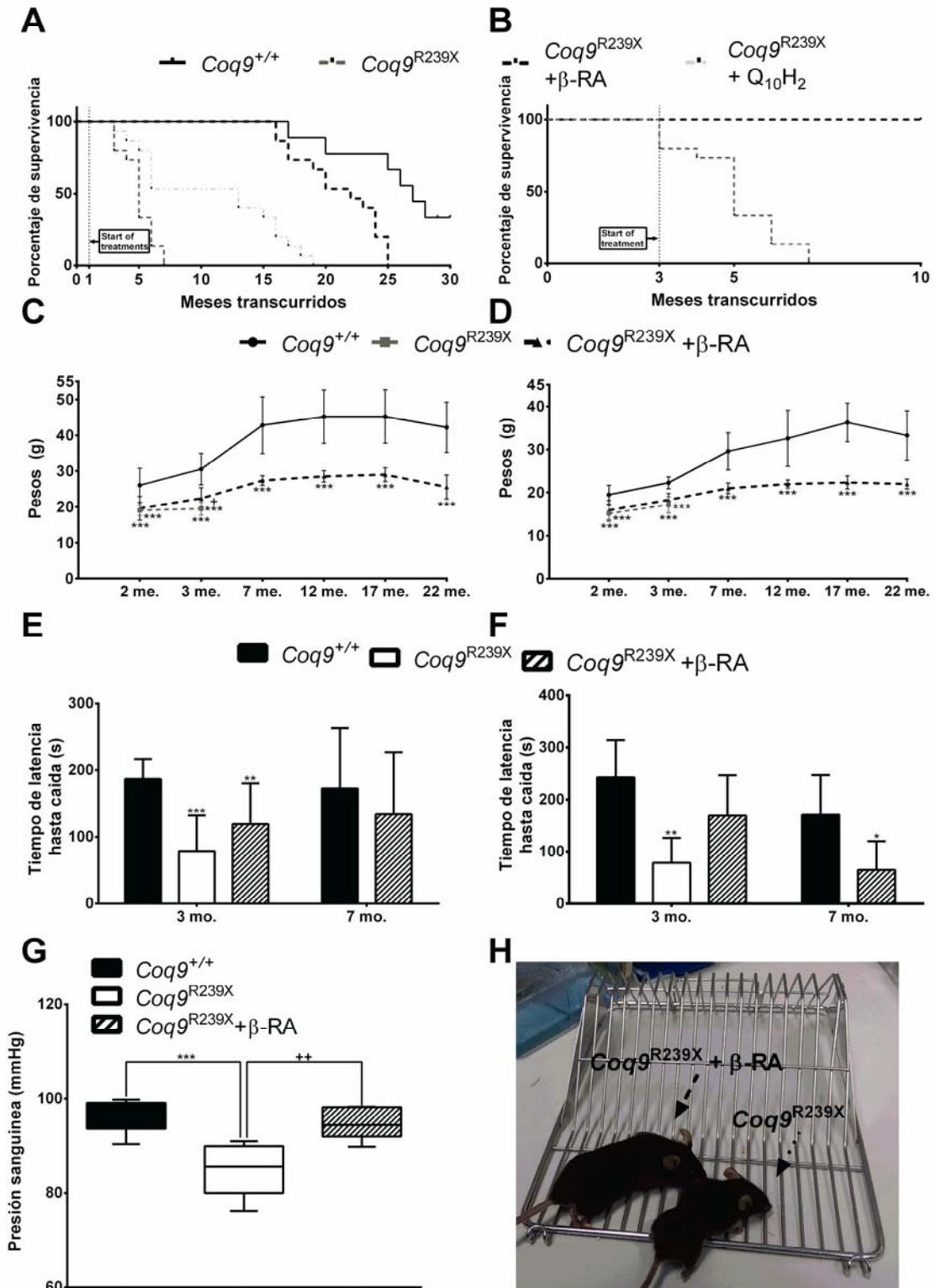


Figura1

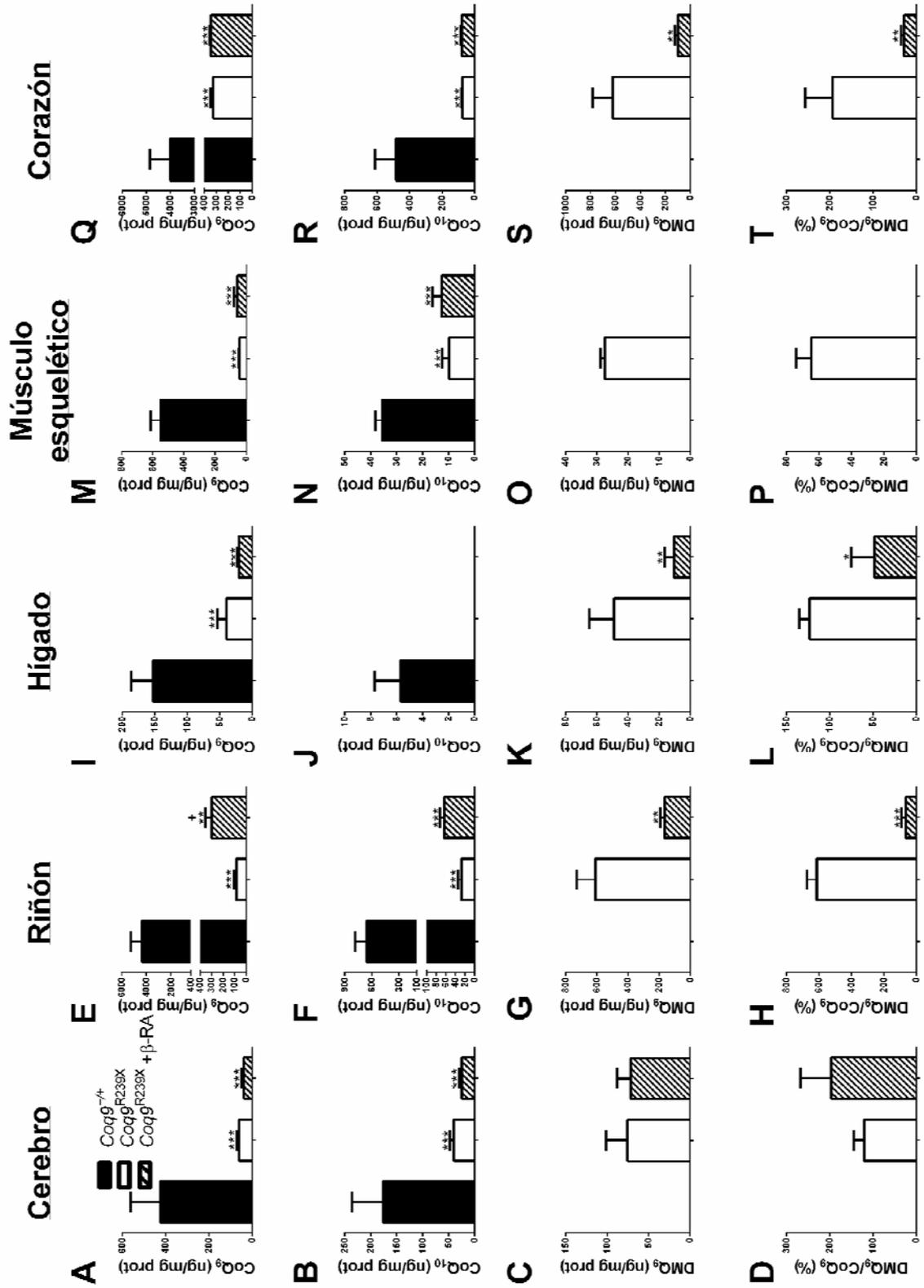


Figura 2

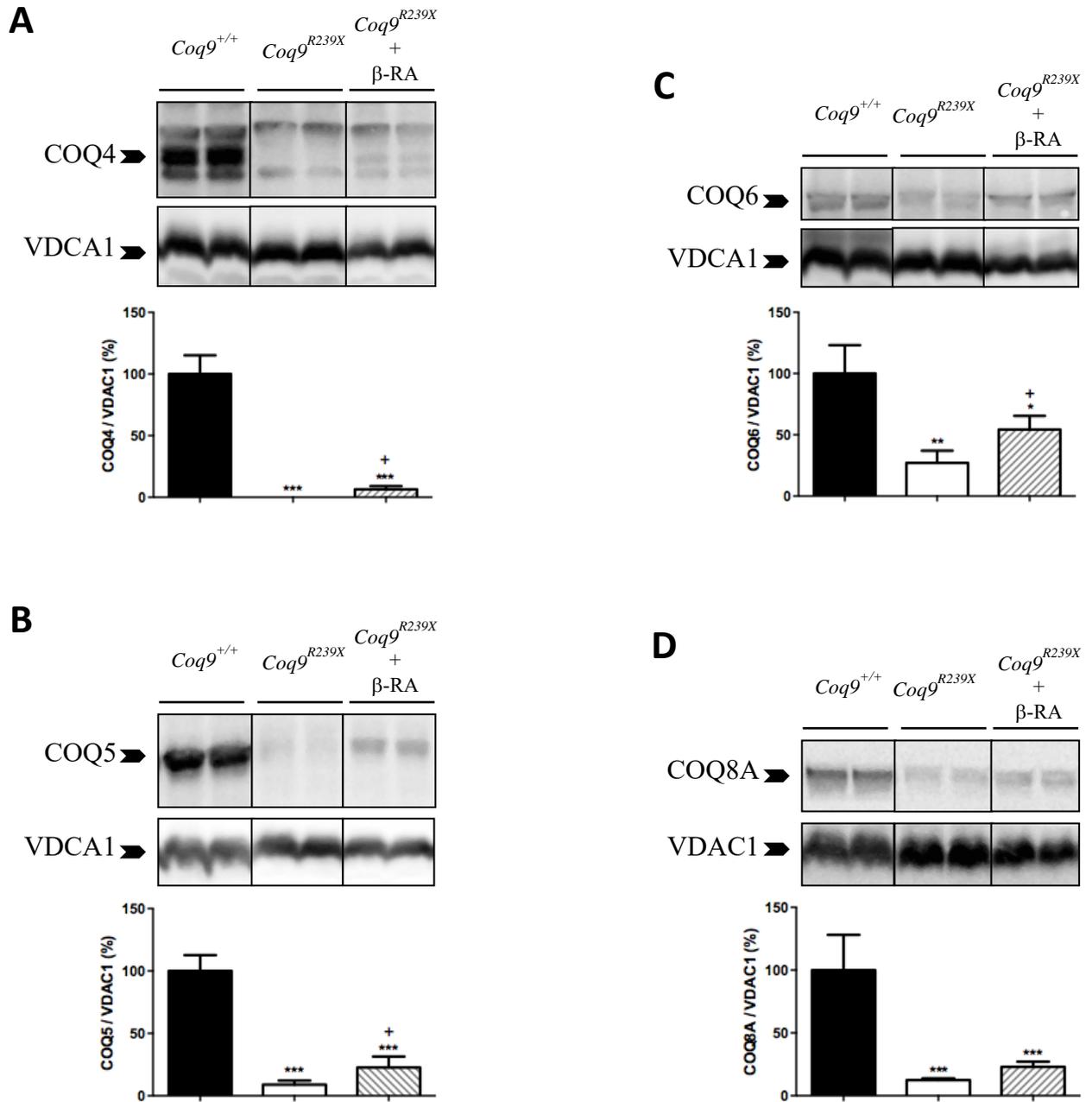


Figura 3

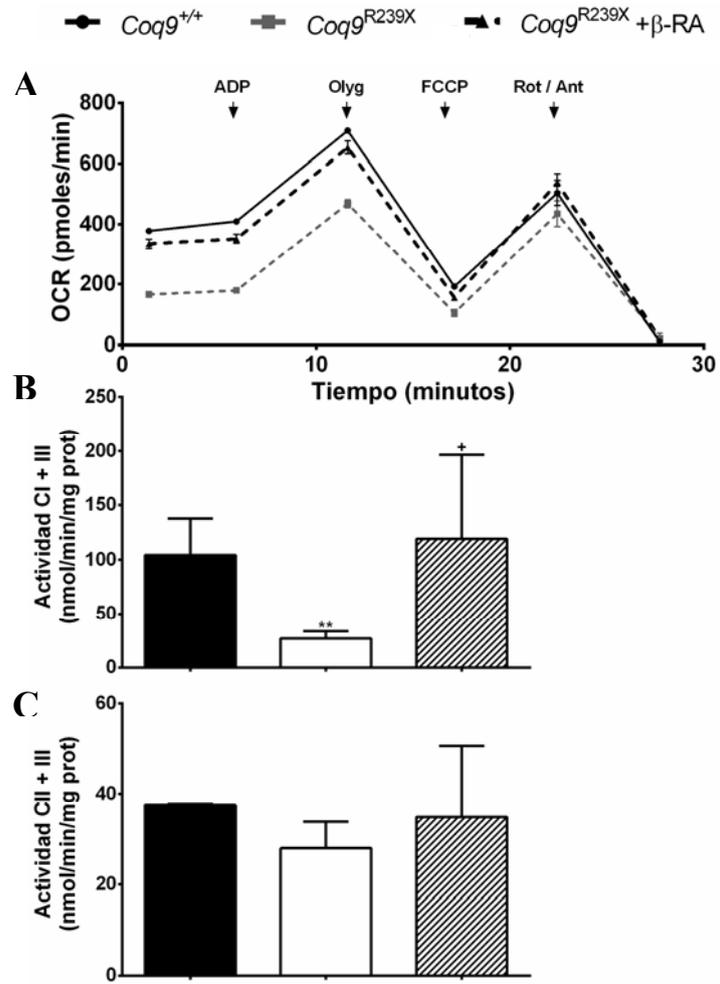


Figura 4

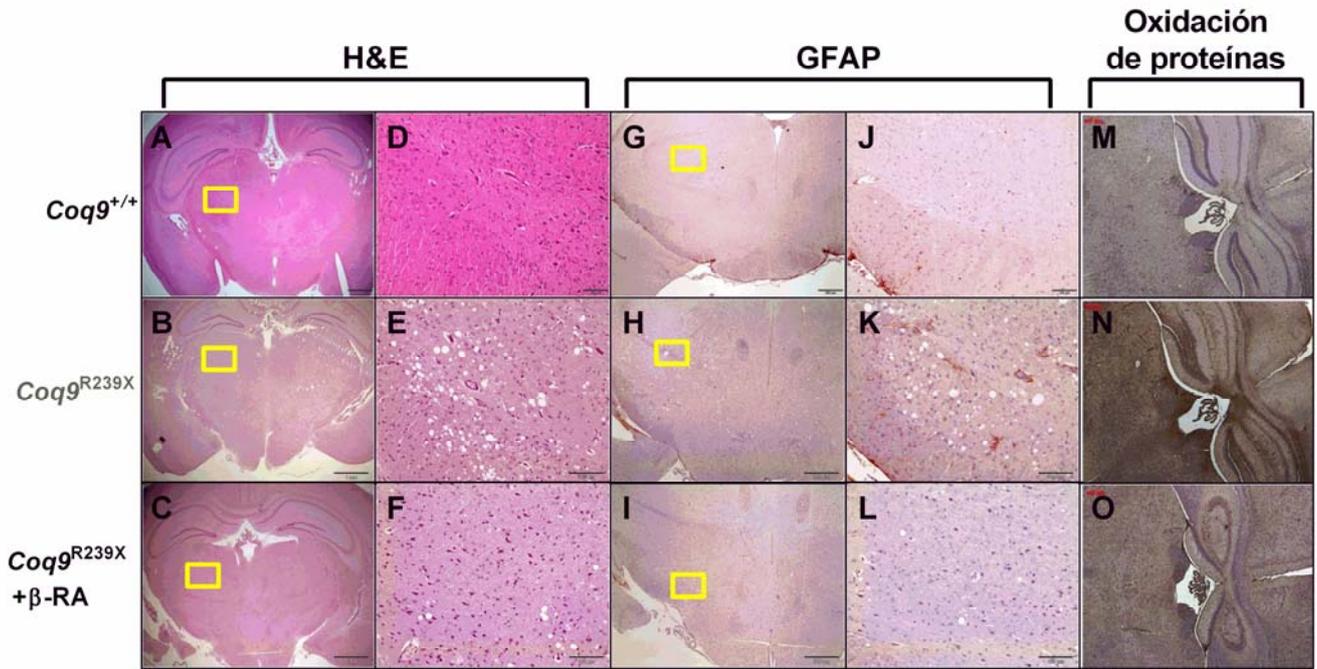


Figura 5

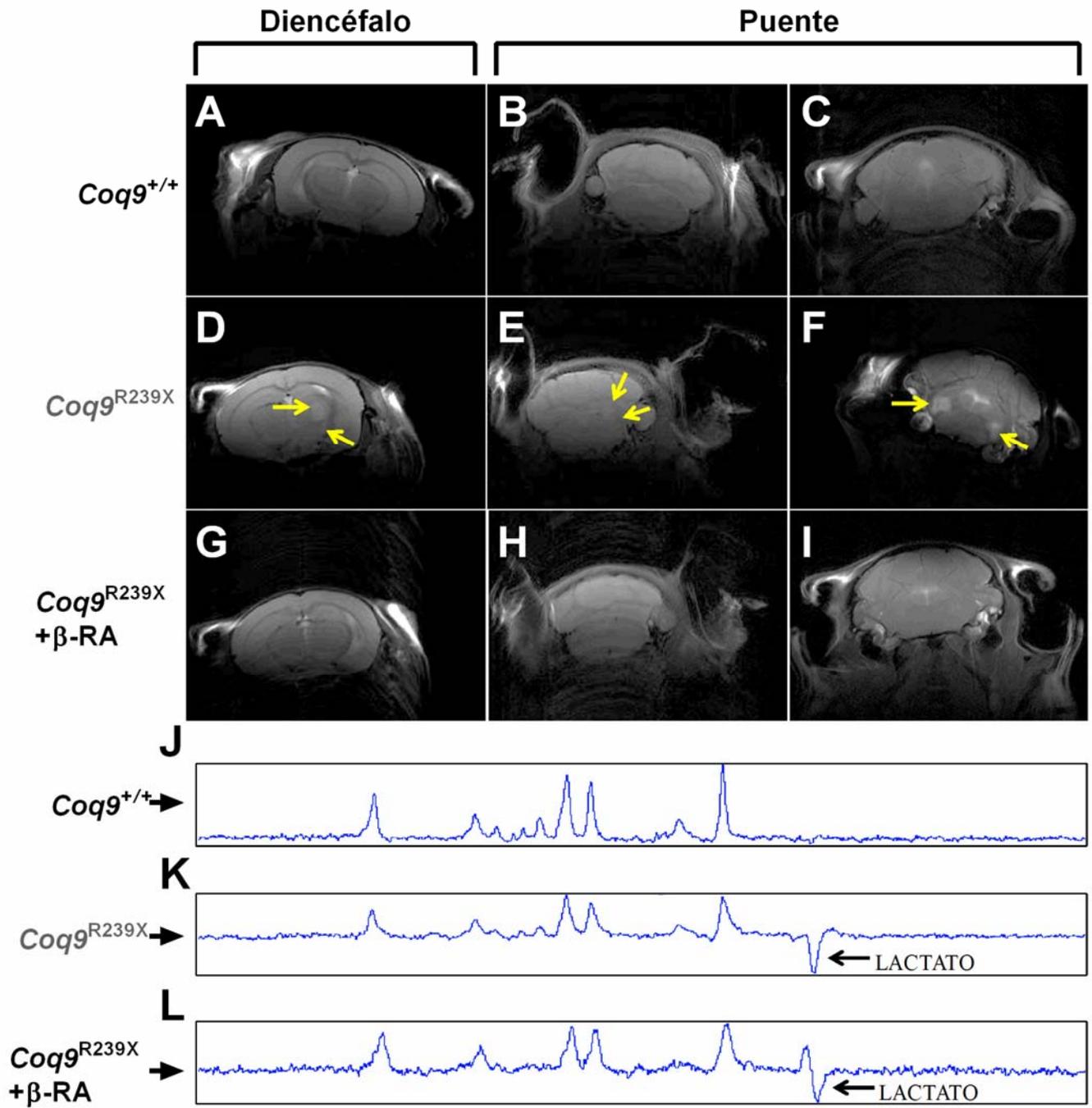


Figura 6

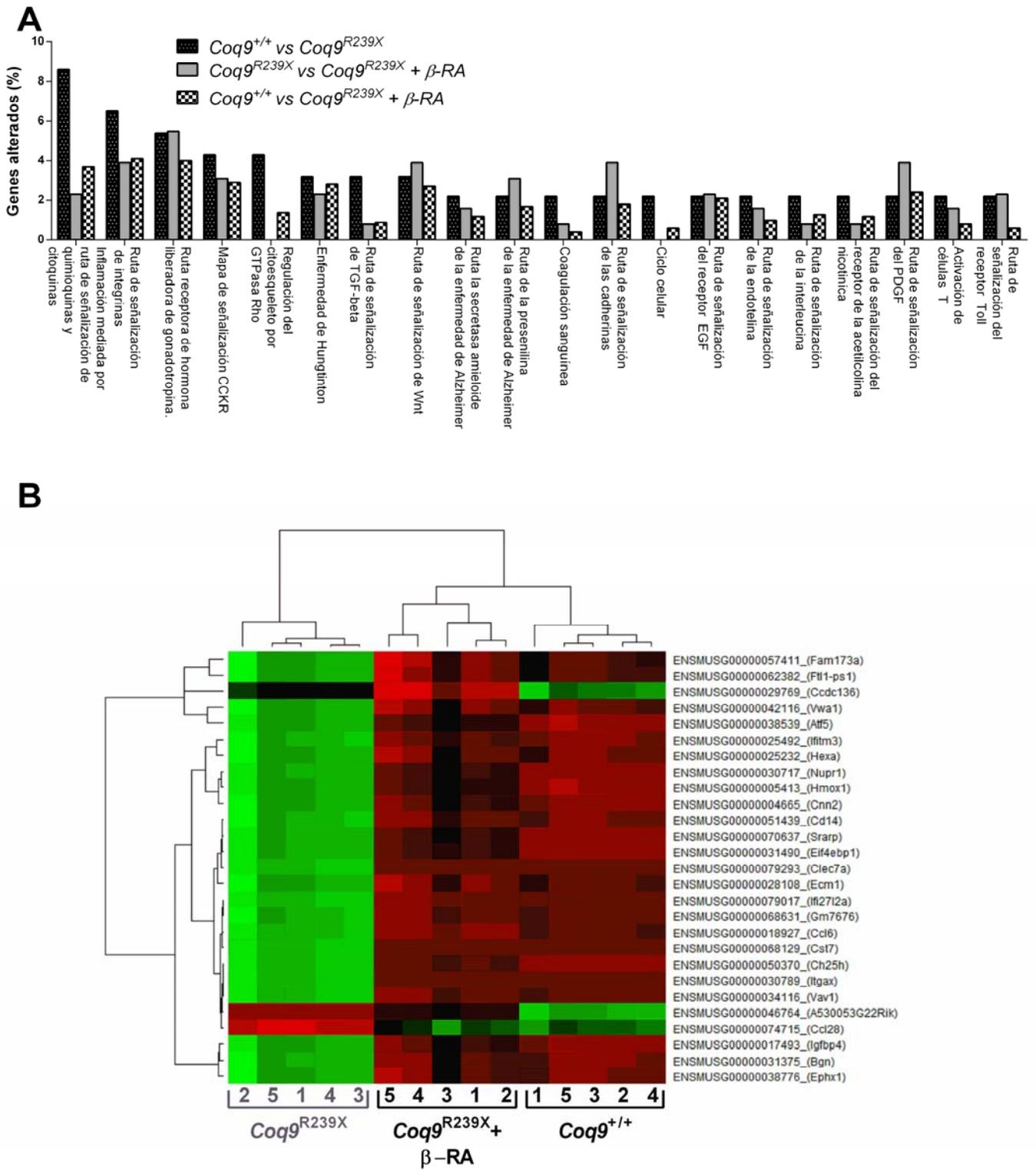


Figura 7

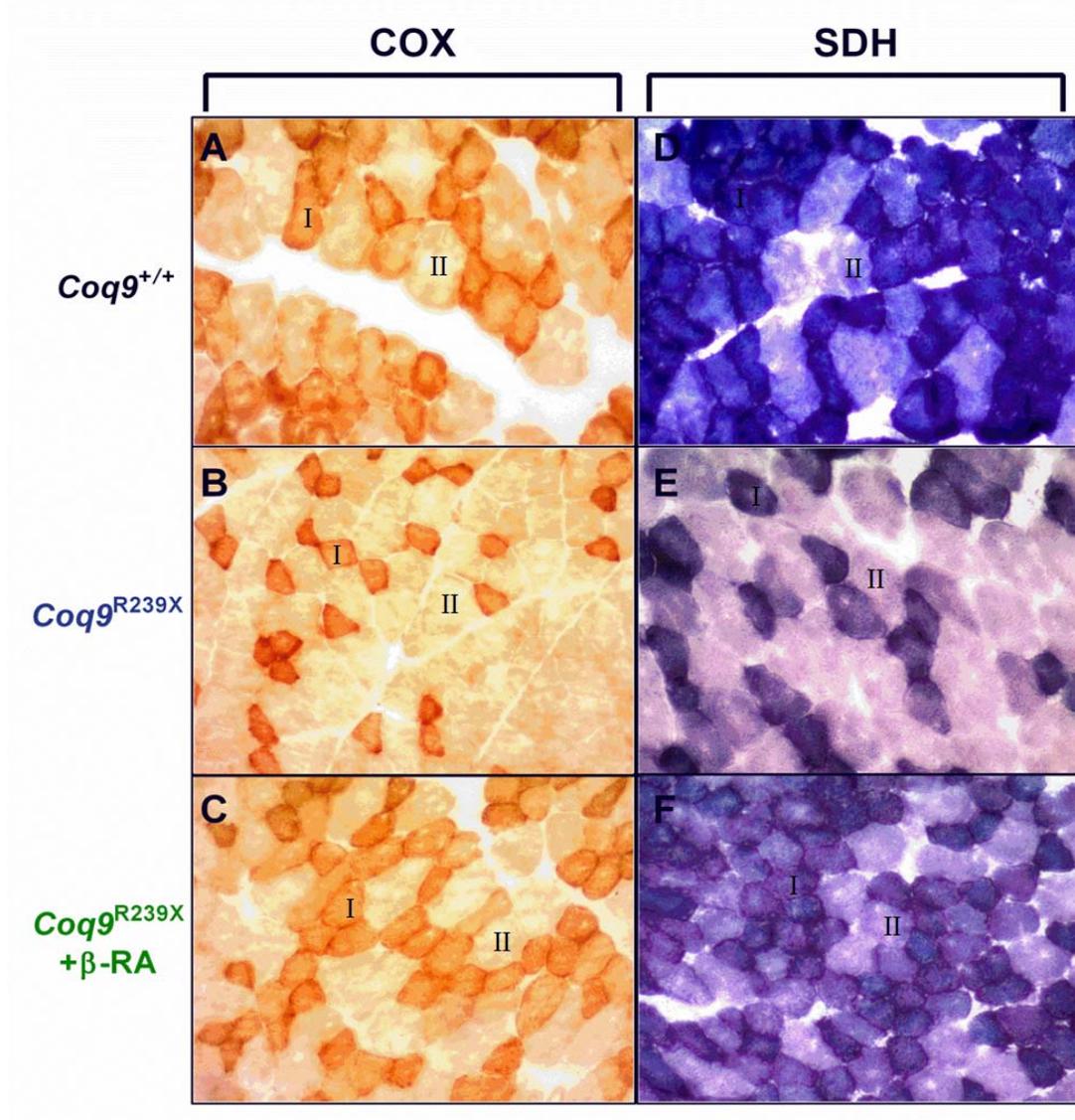


Figura 8



- ②① N.º solicitud: 201830760
②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.07.2018
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LUNA-SÁNCHEZ, MARTA <i>et al.</i> The clinical heterogeneity of coenzyme Q10 deficiency results from genotypic differences in the Coq9 gene. EMBO molecular medicine England May 2015, 30/04/2015, Vol. 7, Páginas 670 - 687, ISSN 1757-4684 (Electronic), <DOI: doi:10.15252/emmm.201404632 pubmed: 25802402>. Figura 10C, Figura 10D.	1-3, 6, 7, 12-17
Y		4, 5, 8-11
X	WANG, YING <i>et al.</i> Mitochondrial function and lifespan of mice with controlled ubiquinone biosynthesis. Nature Communications MAR 2015, 28/02/2015, Vol. 6, Páginas 1-14, Article No.: 6393, ISSN 2041-1723, <DOI: doi: 10.1038/ncomms7393>. Figura 7d, Figura 6.	1-3, 6, 7, 12-17
X	FREYER, CHRISTOPH <i>et al.</i> Rescue of primary ubiquinone deficiency due to a novel COQ7 defect using 2, 4-dihydroxybenzoic acid. Journal of Medical Genetics NOV 2015, 31/10/2015, Vol. 52, Páginas 779-783, ISSN 0022-2593(print) ISSN 1468-6244(electronic), <DOI: doi: 10.1136/jmedgenet-2015-102986>. Figura 2B.	1-3, 12-17
Y	GARCÍA-CORZO, LAURA <i>et al.</i> Ubiquinol-10 ameliorates mitochondrial encephalopathy associated with CoQ deficiency. Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease Amsterdam, NL. Waterham H R; Wanders R J A, 24/02/2014, Vol. 1842, Páginas 893 - 901, ISSN 0925-4439, <DOI: doi:10.1016/j.bbadis.2014.02.008>. Tabla 1, Figuras 1, 2, 4, 5.	4, 8, 9, 11
Y	HEREBIAN, DIRAN <i>et al.</i> 4-Hydroxybenzoic acid restores CoQ10biosynthesis in human COQ2 deficiency. Annals of Clinical and Translational Neurology United States 12 2017, 30/11/2017, Vol. 4, Páginas 902 - 908, ISSN 2328-9503 (Print), <DOI: doi:10.1002/acn3.486 pubmed: 29296619>. Figura 1C.	5, 8, 10, 11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
05.03.2019

Examinador
N. Vera Gutierrez

Página
1/3



- ②¹ N.º solicitud: 201830760
②² Fecha de presentación de la solicitud: 25.07.2018
③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	DOIMO, MARA <i>et al.</i> Effect of vanillic acid on COQ6 mutants identified in patients with coenzyme Q10 deficiency. <i>Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease</i> Amsterdam, NL. Waterham H R; Wanders R J A, 18/10/2013, Vol. 1842, Páginas 1 - 6, ISSN 0925-4439, <DOI: doi:10.1016/j.bbadis.2013.10.007>. Figura 3C.	5, 8, 10, 11
A	OZEIR, MOHAMMAD <i>et al.</i> Coenzyme Q Biosynthesis: Coq6 Is Required for the C5-Hydroxylation Reaction and Substrate Analogs Rescue Coq6 Deficiency. <i>Chemistry and Biology</i> , 20110706 CURRENT BIOLOGY, LONDON, GB, 06/07/2011, Vol. 18, Páginas 1134 - 1142, ISSN 1074-5521, <DOI: doi:10.1016/j.chembiol.2011.07.008>. Figura 3.	1-17
A	PIERREL, FABIEN. Impact of Chemical Analogs of 4-Hydroxybenzoic Acid on Coenzyme Q Biosynthesis: From Inhibition to Bypass of Coenzyme Q Deficiency. <i>Frontiers in Physiology</i> JUN 22 2017, 22/06/2017, Vol. 8, Páginas 1-7, Article No.: 436, ISSN 1664-042X(print) ISSN 1664-042X(electronic), <DOI: doi:10.3389/fphys.2017.00436>	1-17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
05.03.2019

Examinador
N. Vera Gutierrez

Página
2/3

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/60 (2006.01)

A61K31/192 (2006.01)

A61P43/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, REGISTRY, CAS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL, XPESP, PATENW