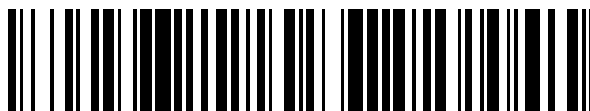


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 695**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/137** (2006.01)  
**A61K 31/138** (2006.01)  
**A61K 31/14** (2006.01)  
**A61K 31/18** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.12.2015 PCT/FR2015/053286**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016 WO16087771**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2015 E 15821108 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 3226850**

54 Título: **Compuestos para el tratamiento de las enfermedades mitocondriales**

30 Prioridad:

**02.12.2014 FR 1461817**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.03.2020**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ PARIS-SUD (25.0%)**  
**15, rue Georges Clémenceau**  
**91405 Orsay Cedex, FR;**  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE (25.0%);**  
**UNIVERSITE D'ANGERS (25.0%) y**  
**CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE**  
**D'ANGERS (25.0%)**

72 Inventor/es:

**DELAHODDE, AGNÈS;**  
**PITAYU NUGROHO, LARAS;**  
**BARUFFINI, ENRICO;**  
**LODI, TIZIANA;**  
**RÖTIG, AGNÈS y**  
**PROCACCIO, VINCENT**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 749 695 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Compuestos para el tratamiento de las enfermedades mitocondriales

La invención tiene por objeto compuestos para su utilización en el tratamiento y la prevención de las enfermedades mitocondriales.

5 Las enfermedades mitocondriales agrupan un conjunto muy grande y heterogéneo de enfermedades huérfanas, que comprenden particularmente los problemas relacionados con la inestabilidad del ADN mitocondrial (ADNmt). Entre ellas, la oftalmoplejia externa progresiva (Progressive External Ophthalmoplegia, PEO), la insuficiencia hepática neonatal y la enfermedad de Alpers (Alpers-Huttenlocher Syndrome, AHS) son causadas por mutaciones en el gen que codifica la polimerasa gamma del ADN mitocondrial: el gen POLG (Spinazzola A, Zeviani M. Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic communication. Biosci Rep 2007; 27 (1-3): 39-51).

10 Las mutaciones en el gen POLG pueden dar lugar a una acumulación de sustituciones de bases, a deleciones del ADNmt, así como a deleciones del ADNmt que dan como resultado una producción alterada de la energía a través de la fosforilación oxidativa.

15 Hasta la actualidad se han notificado más de 200 mutaciones patógenas en el gen POLG. Estas mutaciones están asociadas con un espectro muy amplio de enfermedades mitocondriales que incluyen, entre otras, la PEO, la miopatía, el parkinsonismo, la menopausia prematura, los problemas psicológicos, la ataxia, la encefalopatía y la enfermedad de Alpers (Hudson G, Chinnery PF. Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease. Hum Mol Genet. 2006; 15: R244-52). Las mutaciones dominantes del POLG dan lugar a una oftalmoplejia externa progresiva asociada con deleciones múltiples del ADNmt, mientras que las mutaciones recesivas provocan una depleción del ADNmt (un 2-10 % de la cantidad normal de ADNmt) y una insuficiencia hepática neonatal o una enfermedad de Alpers.

20 Hoy en día no existe ningún tratamiento curativo de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADNmt. Los tratamientos actualmente se limitan a la gestión de los síntomas y a cuidados de mantenimiento. Se ha utilizado una gran diversidad de vitaminas y cofactores en los individuos que padecen problemas mitocondriales, aunque una revisión sistemática reciente ha puesto en evidencia la ausencia de pruebas que justifiquen su utilización (Chinnery P, Majamaa K, Turnbull D, Thorburn D. Treatment for mitochondrial disorders. Cochrane Database Syst Rev. 2006 Jan 25; (1): CD004426. Review. Update in: Cochrane Database Syst Rev. 2012; 4: CD004426). La levocarnitina, la creatina monohidratada, la coenzima Q<sub>10</sub>, las vitaminas B y los antioxidantes, tales como el ácido lipoico alfa, la vitamina E y la vitamina C, se han utilizado como complementos mitocondriales.

25 Así, pueden proponerse unas terapias basadas en vitaminas y cofactores con el objetivo de fortalecer las funciones mitocondriales. No obstante, no se han realizado estudios formales sobre la utilización de estas vitaminas y cofactores para la enfermedad de Alpers o para otras enfermedades relacionadas con el gen POLG (Parkih S, Saneto R, Falk MJ, Anslem I, Cohen BH, Haas R. A modern approach to the treatment of mitochondrial diseases. Current Treatment Options in Neurology. 2009; 11: 414-430). Igualmente se ha notificado que el empleo de levoarginina ayuda a reducir la frecuencia y la gravedad de los accidentes vasculares cerebrales asociados con el síndrome MELAS y podría ser considerada eficaz en los pacientes que padecen enfermedades relacionadas con el POLG, en particular si se confirma una carencia en el plasma o una concentración de arginina en el líquido cefalorraquídeo.

30 El recurso a tratamientos para la epilepsia resistente tales como la corticotropina o la prednisona, el régimen cetógeno y las inmunoglobulinas G intravenosas no ha demostrado ser eficaz para el tratamiento del AHS.

35 Un trasplante de hígado en los adultos que padecen el AHS y que poseen una calidad de vida aceptable podría ser beneficioso. Sin embargo, el trasplante de hígado no está aconsejado en niños, ya que no tiene efecto sobre la rápida progresión del ataque neurológico (Kelly DA. Liver transplantation: to do or not to do? Pediatr Transplant. 2000; 4: 170-2).

El tosilato de clofilio es un agente antiarrítmico de clase III cuyo mecanismo de acción se basa en el bloqueo de los canales de potasio, aumentando así la duración de los potenciales de acción cardiaca (documento US 4 289 787).

45 La ibutilida es un agente antiarrítmico de clase III comercializado con el nombre de Corvert (en forma de fumarato de ibutilida) por Pfizer. Este medicamento se utiliza para la reducción rápida de la fibrilación o flutter auricular a un ritmo sinusal. Actúa retardando la repolarización mediante la activación de una corriente lenta que introduce esencialmente sodio (documento EP0 164 865).

50 La dofetilida es un antiarrítmico de clase III comercializado por Pfizer con el nombre Tikosyn. Se prescribe para el tratamiento de fibrilaciones y flutters auriculares. Actúa bloqueando los canales de potasio (documento EP 0 245 997).

Uno de los objetivos de la invención es proporcionar compuestos eficaces en el tratamiento de las enfermedades mitocondriales.

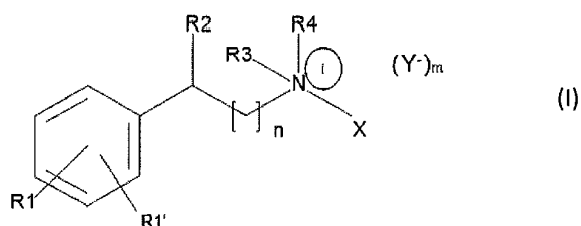
Otro aspecto de la invención es proporcionar compuestos eficaces en el tratamiento de las patologías resultantes de mutaciones en el gen POLG.

Otro aspecto de la invención es proporcionar compuestos eficaces en el tratamiento del síndrome MELAS.

Una de las ventajas de la invención es proporcionar compuestos eficaces en el adulto y en el niño.

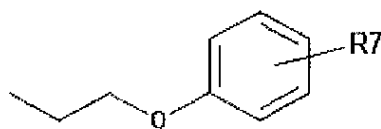
Otra ventaja de la invención es proporcionar compuestos que permiten un tratamiento curativo de las enfermedades mitocondriales y que no se limitan a la gestión de los síntomas de las enfermedades mitocondriales.

5 La presente divulgación describe un compuesto que tiene la fórmula I



en la que

- 10  $R_1$  y  $R_{1'}$  representan independientemente entre sí un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, particularmente Cl o Br, un grupo alcoxi C1-C4, un grupo alquilo C1-C3 o  $\text{NHSO}_2\text{R}_6$ , siempre que al menos uno de los dos elementos  $R_1$  o  $R_{1'}$  sea diferente de H;  
 $R_2$  representa OH o H;  
 $R_3$  y  $R_4$  representan independientemente entre sí un grupo alquilo de 1 a 10 átomos de carbono o

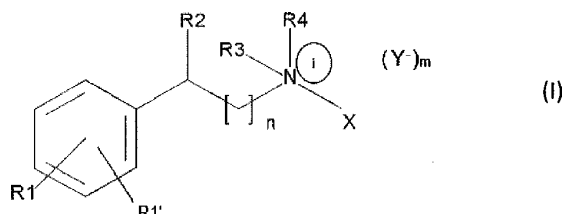


- 15 en la que  $R_7$  representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alcoxi C1-C4, un grupo alquilo C1-C3 o  $\text{NHSO}_2\text{R}_8$ ;  
 $R_6$  y  $R_8$  representan independientemente entre sí un grupo alquilo C1-C4;  
 $-X = -R_5$  o el doblete electrónico del nitrógeno que no participa en un enlace, siempre que  $i = +$  cuando  $-X = -R_5$ ;  
 $R_5$  representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-C4;  
20  $m = 0$  o 1, siempre que  $m = 1$  cuando  $-X = -R_5$  y  $m = 0$  cuando  $-X =$  el doblete electrónico del nitrógeno que no participa en un enlace;  $n = 0, 1, 2$  o 3;  
 $Y^-$  es un anión aceptable en el ámbito terapéutico;

para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

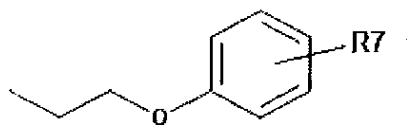
25  $\emptyset$  representa el conjunto vacío.

La presente divulgación describe en particular un compuesto de fórmula I



en la que

- 30  $R_1$  y  $R_{1'}$  representan independientemente entre sí un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, particularmente Cl o Br, un grupo alcoxi C1-C4, un grupo alquilo C1-C3 o  $\text{NHSO}_2\text{R}_6$ , siempre que al menos uno de los dos elementos  $R_1$  o  $R_{1'}$  sea diferente de H;  
 $R_2$  representa OH o H;  
 $R_3$  y  $R_4$  representan independientemente entre sí un grupo alquilo de 1 a 10 átomos de carbono o



en la que R<sub>7</sub> representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alcoxi C1-C4, un grupo alquilo C1-C3 o NHSO<sub>2</sub>R<sub>8</sub>;

R<sub>6</sub> y R<sub>8</sub> representan independientemente entre sí un grupo alquilo C1-C4;

5 -X = -R<sub>5</sub> o el doblete electrónico del nitrógeno que no participa en un enlace, siempre que i = + cuando -X = -R<sub>5</sub>;

R<sub>5</sub> representa un grupo alquilo C1-C4;

m = 0 o 1, siempre que m = 1 cuando -X = -R<sub>5</sub> y m = 0 cuando -X = 1e doblete electrónico del nitrógeno que no participa en un enlace;

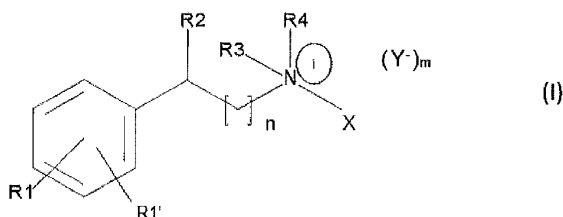
n = 0, 1, 2 o 3;

10 Y<sup>-</sup> es un anión aceptable en el ámbito terapéutico;

para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

15 En una forma de realización en particular de la divulgación, el compuesto de fórmula I tal como se define más arriba, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial, comprende un elemento Y<sup>-</sup> elegido entre el ion tosilato, el ion carbonato, el ion fosfato y el ion cloruro.

Ventajosamente, la presente divulgación concierne a un compuesto de fórmula I tal como se define más arriba

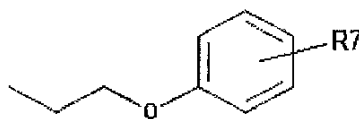


fórmula en la que:

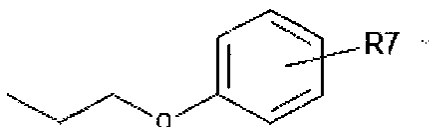
20 R<sub>1</sub> y R<sub>1'</sub> representan independientemente entre sí un átomo de hidrógeno, Cl, Br o NHSO<sub>2</sub>R<sub>6</sub>, siempre que al menos uno de los dos elementos R<sub>1</sub> o R<sub>1'</sub> sea diferente de H;

R<sub>2</sub> representa OH o H;

R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> representan independientemente entre sí un grupo alquilo de 1 a 10 átomos de carbono o



25 en la que R<sub>7</sub> representa un átomo de halógeno o NHSO<sub>2</sub>R<sub>8</sub>, con la condición de que R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> no pueden ser simultáneamente



;

R<sub>6</sub> y R<sub>8</sub> representan independientemente entre sí un grupo alquilo C1-C4;

30 -X = -R<sub>5</sub> o el doblete electrónico del nitrógeno que no participa en un enlace, siempre que i = + cuando -X = -R<sub>5</sub>;

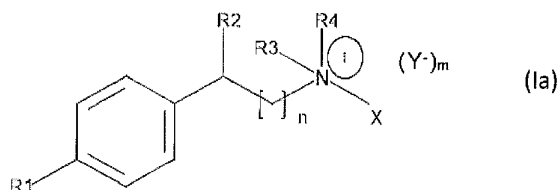
R<sub>5</sub> representa un grupo alquilo C1-C4;

m = 0 o 1, siempre que m = 1 cuando -X = -R<sub>5</sub> y m = 0 cuando -X = el doblete electrónico del nitrógeno que no participa en un enlace; n = 0, 1, 2 o 3;

Y<sup>-</sup> se elige entre el ion tosilato, el ion carbonato, el ion fosfato y el ion cloruro;

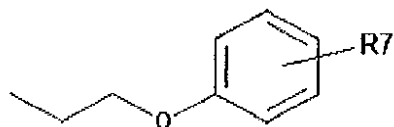
35 para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

La presente invención concierne un compuesto que tiene la fórmula la:



en la que

- 5 R<sub>1</sub> representa un átomo de halógeno, particularmente Cl o Br, un grupo alcoxi C1-C4, un grupo alquilo C1-C3 o NHSO<sub>2</sub>R<sub>6</sub>;  
 R<sub>2</sub> representa OH o H;  
 R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> representan independientemente entre sí un grupo alquilo de 1 a 10 átomos de carbono o



- 10 en la que R<sub>7</sub> representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alcoxi C1-C4, un grupo alquilo C1-C3 o NHSO<sub>2</sub>R<sub>6</sub>;  
 R<sub>6</sub> y R<sub>8</sub> representan independientemente entre sí un grupo alquilo C1-C4;  
 -X = -R<sub>5</sub> o el doblete electrónico del nitrógeno que no participa en un enlace, siempre que i = + cuando -X = -R<sub>5</sub>;  
 R<sub>5</sub> representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-C4;  
 15 m = 0 o 1, siempre que m = 1 cuando -X = -R<sub>5</sub> y m = 0 cuando -X = el doblete electrónico del nitrógeno que no participa en un enlace; n = 0, 1, 2 o 3;  
 Y<sup>-</sup> es un anión aceptable en el ámbito terapéutico;

para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

- 20 Los inventores han averiguado de forma inesperada que la aplicación de los compuestos de la invención a organismos que padecen una enfermedad mitocondrial permitía una mejora de su estado. Esta invención se basa particularmente en los resultados obtenidos al aplicar los compuestos definidos más arriba a organismos que simulan una enfermedad mitocondrial o a cultivos celulares de fibroblastos cutáneos de un paciente que padece una enfermedad mitocondrial o a cultivos celulares de híbridos neuronales derivados de un paciente que padece una enfermedad mitocondrial.

- 25 El término « grupo alcoxi Cx-Cy » significa un grupo alquilo, que posee entre x e y átomos de carbono, unido a un átomo de oxígeno.

El término « grupo alquilo Cx-Cy » significa una cadena hidrocarbonada saturada, lineal o ramificada, que comprende entre x e y átomos de carbono.

- 30 Por « X = -R<sub>5</sub> », se entiende que la amina a la cual está unido el grupo R<sub>5</sub> es una amina cuaternaria y que en ese caso, i = + y m = 1, estando el compuesto entonces en forma de una sal.

Por « X = el doblete electrónico del nitrógeno que no participa en un enlace », se entiende que la amina correspondiente es una amina terciaria y que en ese caso, i = ∅, m = 0 e (Y<sup>-</sup>)<sub>m</sub> = ∅.

- 35 Por « amina cuaternaria », se entiende que el átomo de nitrógeno está cargado positivamente, es decir, que está en forma de catión, y que está sustituido por 4 sustituyentes. En el sentido de la presente invención, uno de los sustituyentes puede ser el átomo de hidrógeno.

Por « amina terciaria », se entiende que el átomo de nitrógeno está sustituido por 3 sustituyentes.

Por « anión aceptable en el ámbito terapéutico », se entiende cualquier anión no tóxico y que no induzca una pérdida del efecto terapéutico o profiláctico del catión al que está asociado.

- 40 Por « inestabilidad del ADN mitocondrial », se entiende la presencia de cualquier mutación, delección y/o depleción del ADN mitocondrial con respecto al ADN mitocondrial de un individuo sano.

En el sentido de la presente invención, se entiende por « enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial » las enfermedades relacionadas con el aspecto cuantitativo de la inestabilidad del ADN mitocondrial y

las enfermedades relacionadas con el aspecto cualitativo de la inestabilidad del ADN mitocondrial.

Por « enfermedades relacionadas con el aspecto cuantitativo de la inestabilidad del ADN mitocondrial », se entiende las enfermedades relacionadas con una depleción del ADN mitocondrial. Esta depleción puede ser debida particularmente a una o a varias mutaciones presentes en el gen POLG, un gen nuclear que codifica la polimerasa POLG específica del ADN mitocondrial.

Por « depleción del ADN mitocondrial », se entiende una reducción en el número de copias de las moléculas de ADN mitocondrial en las mitocondrias de un organismo con respecto a un organismo sano. Las depleciones son específicas del tejido.

Por « enfermedades relacionadas con el aspecto cualitativo de la inestabilidad del ADN mitocondrial », se entiende las enfermedades cuya causa reside en la presencia de deleciones y/o de mutaciones en el ADN mitocondrial.

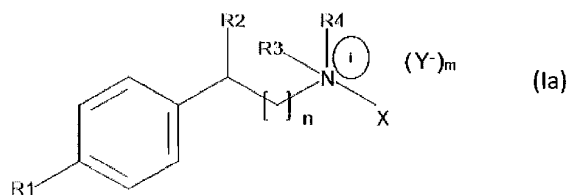
La expresión « deleción del ADN mitocondrial » significa una pérdida de material genético en el ADN mitocondrial con respecto a un ADN mitocondrial natural. Una deleción puede concernir a uno o a varios nucleótidos, particularmente a varias centenas de nucleótidos, del ADN mitocondrial.

La expresión « mutación del ADN mitocondrial » significa una modificación del ADN mitocondrial con respecto a un ADN mitocondrial natural. Las mutaciones se agrupan en las mutaciones por sustitución, las mutaciones por inserción y las mutaciones por deleción de pequeño tamaño (de 1 a 10 nucleótidos). El término « mutación por sustitución » significa la sustitución de uno o de varios nucleótidos por un nucleótido diferente en la molécula de ADN mitocondrial. El término « mutación por inserción » significa la adición de uno o de varios nucleótidos en la molécula de ADN mitocondrial.

Las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial comprenden particularmente, pero no se limitan a, el síndrome de Alpers-Huttenlocher les (AHS), el espectro de las mio-cerebro-hepatopatías del niño (MCHS), las epilepsias mioclónicas con miopatía y ataxia sensitiva MEMSA (Myoclonic epilepsy myopathy sensory ataxia), la ataxia espinocerebelosa con epilepsia (SCAE), las ataxias con neuropatías que incluyen los síndromes MIRAS y SANDO, la oftalmoplejia externa progresiva autosómica recesiva (arPEO), la oftalmoplejia externa progresiva autosómica dominante (adPEO), la encefalomiopatía mitocondrial neurogastrointestinal (MNGIE), la miopatía infantil y la amiotrofia espinal relacionadas con las mutaciones en el *TK2*, las insuficiencias hepáticas con depleción del ADNmt, las patologías asociadas con las mutaciones de los genes *SUCLA2* y *SUCLAG1*, *RRM2B*, *AIF1*, *MPV17*, la neuropatía óptica hereditaria de Leber, el síndrome MELAS, el síndrome MERRF, así como ciertas formas del síndrome de Leigh, de oftalmoplejia externa progresiva crónica, de miopatía, de cardiomiopatía, de diabetes-sordera, de encefalomiopatía y de sordera.

En una forma de realización en particular de la invención, el compuesto de fórmula la tal como se define más arriba, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial, comprende un elemento Y elegido entre el ion tosilato, el ion carbonato, el ion fosfato y el ion cloruro.

En una forma de realización en particular, la invención concierne a un compuesto tal como se define más arriba, de fórmula la:

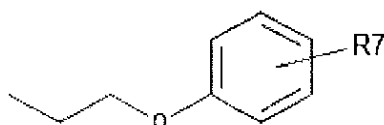


en la que

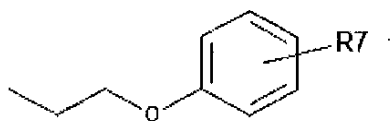
R<sub>1</sub> representa Cl, Br o NHSO<sub>2</sub>R<sub>6</sub>;

R<sub>2</sub> representa OH o H;

R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> representan independientemente entre sí un grupo alquilo de 1 a 10 átomos de carbono o



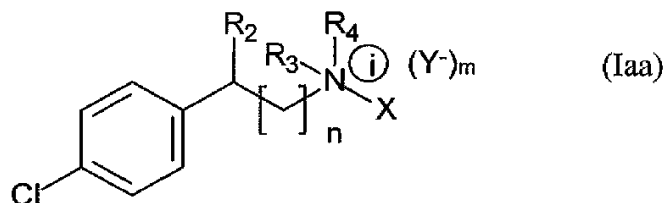
en la que R<sub>7</sub> representa un átomo de halógeno o NHSO<sub>2</sub>R<sub>8</sub>, con la condición de que R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> no pueden ser simultáneamente



- 5  $R_6$  y  $R_8$  representan independientemente entre sí un grupo alquilo C1-C4;  
 $-X = -R_5$  o el doblete electrónico del nitrógeno que no participa en un enlace, siempre que  $i = +$  cuando  $-X = -R_5$ ;  
 $R_5$  representa un grupo alquilo C1-C4;  
 $m = 0$  o  $1$ , siempre que  $m = 1$  cuando  $-X = -R_5$  y  $m = 0$  cuando  $-X =$  el doblete electrónico del nitrógeno que no participa en un enlace;  $n = 0, 1, 2$  o  $3$ ;  
 $Y^-$  se elige entre el ion tosilato, el ion carbonato, el ion fosfato y el ion cloruro;

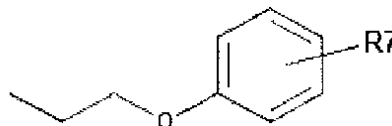
para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

- 10 En una forma de realización en particular, la invención concierne a un compuesto tal como se define más arriba, de fórmula Iaa:



en la que

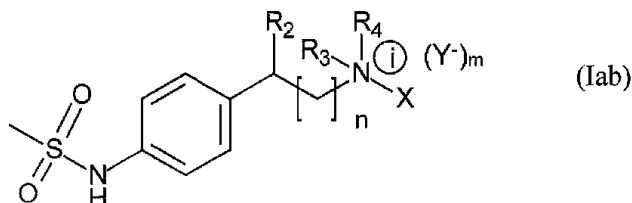
- 15  $R_2$  representa OH o H;  
 $R_3$  y  $R_4$  representan independientemente entre sí un grupo alquilo de 1 a 10 átomos de carbono o



- 20 en la que  $R_7$  representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alcoxi C1-C4, un grupo alquilo C1-C3 o  $NHSO_2R_8$ ;  
 $R_8$  representa un grupo alquilo C1-C4;  
 $-X = -R_5$  o el doblete electrónico del nitrógeno que no participa en un enlace, siempre que  $i = +$  cuando  $-X = -R_5$ ;  
 $R_5$  representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-C4;  
 $m = 0$  o  $1$ , siempre que  $m = 1$  cuando  $-X = -R_5$  y  $m = 0$  cuando  $-X =$  el doblete electrónico del nitrógeno que no participa en un enlace;  $n = 0, 1, 2$  o  $3$ ;  
 $Y^-$  es un anión aceptable en el ámbito terapéutico;

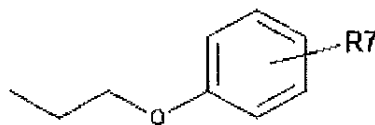
- 25 para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto tal como se define más arriba, de fórmula Iab:



30 en la que

- $R_2$  representa OH o H;  
 $R_3$  y  $R_4$  representan independientemente entre sí un grupo alquilo de 1 a 10 átomos de carbono o



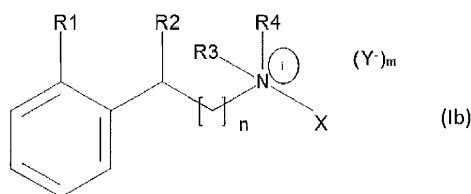
en la que R<sub>7</sub> representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alcoxi C1-C4, un grupo alquilo C1-C3 o NHSO<sub>2</sub>R<sub>8</sub>;

R<sub>g</sub> representa un grupo alquilo C1-C4;

- 5 -X = -R<sub>5</sub> o el doblete electrónico del nitrógeno que no participa en un enlace, siempre que i = + cuando -X = -R<sub>5</sub>;  
 R<sub>5</sub> representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-C4;  
 m = 0 o 1, siempre que m = 1 cuando -X = -R<sub>5</sub> y m = 0 cuando -X = el doblete electrónico del nitrógeno que no participa en un enlace; n = 0, 1, 2 o 3;  
 Y<sup>-</sup> es un anión aceptable en el ámbito terapéutico;

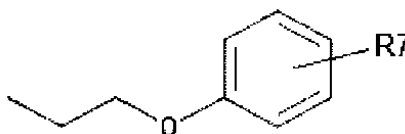
- 10 para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

La presente divulgación describe igualmente un compuesto de fórmula Ib



en la que

- 15 R<sub>1</sub> representa un átomo de halógeno, particularmente Cl o Br, un grupo alcoxi C1-C4, un grupo alquilo C1-C3 o NHSO<sub>2</sub>R<sub>6</sub>;  
 R<sub>2</sub> representa OH o H;  
 R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> representan independientemente entre sí un grupo alquilo de 1 a 10 átomos de carbono o



- 20 en la que R<sub>7</sub> representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alcoxi C1-C4, un grupo alquilo C1-C3 o NHSO<sub>2</sub>R<sub>8</sub>;

R<sub>6</sub> y R<sub>8</sub> representan independientemente entre sí un grupo alquilo C1-C4;

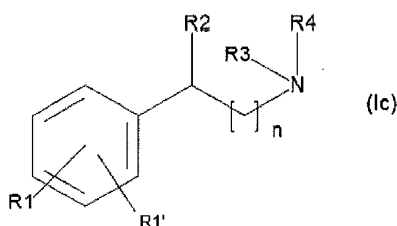
-X = -R<sub>5</sub> o el doblete electrónico del nitrógeno que no participa en un enlace, siempre que i = + cuando -X = -R<sub>5</sub>;

R<sub>5</sub> representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-C4;

- 25 m = 0 o 1, siempre que m = 1 cuando -X = -R<sub>5</sub> y m = 0 cuando -X = el doblete electrónico del nitrógeno que no participa en un enlace; n = 0, 1, 2 o 3;  
 Y<sup>-</sup> es un anión aceptable en el ámbito terapéutico;

para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

- 30 La presente divulgación describe igualmente un compuesto de fórmula Ic

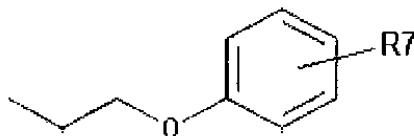


en la que

R<sub>1</sub> y R<sub>1</sub>' representan independientemente entre sí un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, particularmente



Cl o Br, un grupo alcoxi C1-C4, un grupo alquilo C1-C3 o  $\text{NHSO}_2\text{R}_6$ , siempre que al menos uno de los dos elementos  $\text{R}_1$  o  $\text{R}_{1'}$  sea diferente de H;  
 $\text{R}_2$  representa OH o H;  
 $\text{R}_3$  y  $\text{R}_4$  representan independientemente entre sí un grupo alquilo de 1 a 10 átomos de carbono o

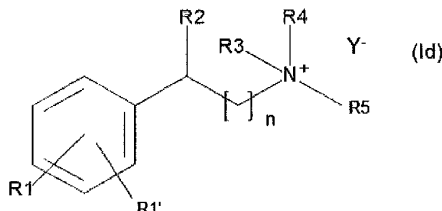


5 en la que  $\text{R}_7$  representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alcoxi C1-C4, un grupo alquilo C1-C3 o  $\text{NHSO}_2\text{R}_8$ ;  
 $\text{R}_6$  y  $\text{R}_8$  representan independientemente entre sí un grupo alquilo C1-C4;  
 $n = 0, 1, 2$  o  $3$ ;

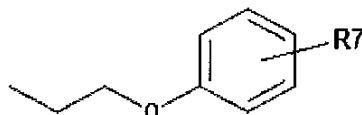
10 para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

El grupo amino que soporta los grupos  $\text{R}_3$  y  $\text{R}_4$  del compuesto de fórmula Ic es una amina terciaria.

En otro modo de realización en particular, la presente divulgación describe un compuesto de fórmula Id



15 en la que  
 $\text{R}_1$  y  $\text{R}_{1'}$  representan independientemente entre sí un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, particularmente Cl o Br, un grupo alcoxi C1-C4, un grupo alquilo C1-C3 o  $\text{NHSO}_2\text{R}_6$ , siempre que al menos uno de los dos elementos  $\text{R}_1$  o  $\text{R}_{1'}$  sea diferente de H;  
 $\text{R}_2$  representa OH o H;  
 $\text{R}_3$  y  $\text{R}_4$  representan independientemente entre sí un grupo alquilo de 1 a 10 átomos de carbono o

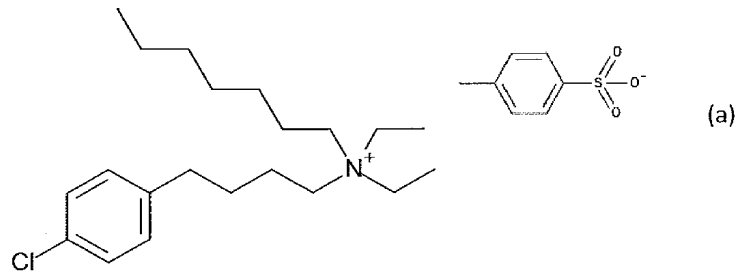


25 en la que  $\text{R}_7$  representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alcoxi C1-C4, un grupo alquilo C1-C3 o  $\text{NHSO}_2\text{R}_8$ ;  
 $\text{R}_6$  y  $\text{R}_8$  representan independientemente entre sí un grupo alquilo C1-C4;  
 $\text{R}_5$  representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-C4;  
 $n = 0, 1, 2$  o  $3$ ;  
 $\text{Y}^-$  es un anión aceptable en el ámbito terapéutico;

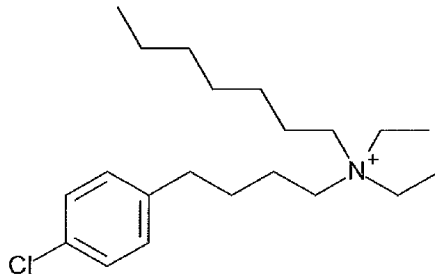
para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

30 El grupo amino que soporta los grupos  $\text{R}_3$ ,  $\text{R}_4$  y  $\text{R}_5$  de compuesto del fórmula Id es una amina cuaternaria.

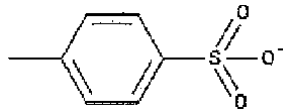
En un modo de realización ventajoso, el compuesto de la invención tal como se define más arriba tiene como fórmula (a):



El compuesto de fórmula (a) es el tosilato de clofilio, siendo el compuesto de fórmula:

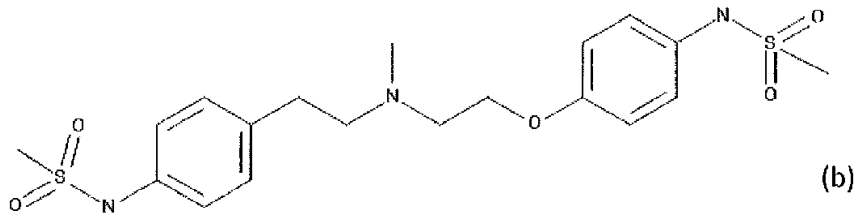


5 el clofilio,  
y siendo el compuesto de fórmula:



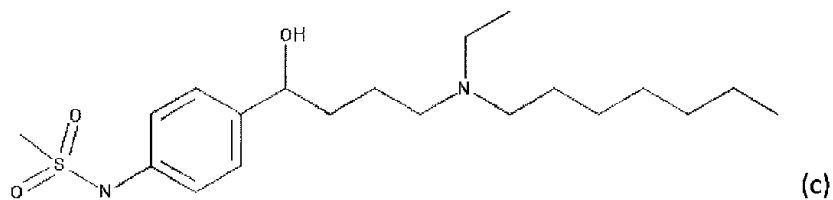
el ion tosilato.

10 En otro modo de realización ventajoso, el compuesto de la invención tal como se define más arriba tiene como fórmula (b):



El compuesto de fórmula (b) es la dofetilida.

15 En otro modo de realización ventajoso, el compuesto de la invención tal como se define más arriba tiene como fórmula (c):



El compuesto de fórmula (c) es la ibutilida.

20 En una forma de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), para una administración a una dosis de entre 1 µg/kg y 50 mg/kg, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

- 5 Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), para una administración a una dosis de entre 1 y 50 µg/kg, de entre 50 y 500 µg/kg, de entre 500 µg y 5 mg/kg o de entre 5 y 50 mg/kg, aún más particularmente a una dosis de entre 1 y 12 µg/kg, de entre 12 y 20 µg/kg, de entre 20 y 50 µg/kg, de entre 20 y 300 µg/kg, de entre 50 y 300 µg/kg, de entre 300 y 500 µg/kg, de entre 500 µg/kg y 1 mg/kg, de entre 1 y 5 mg/kg, de entre 5 y 30 mg/kg o de entre 30 y 50 mg/kg, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.
- 10 En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 30 µg y 6.000 mg, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.
- 15 En el sentido de la presente invención, se entiende por « dosis unitaria » la dosis correspondiente a la dosis total de compuesto tomada en una sola vez, cualquiera que sea el modo de administración de compuesto.
- Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 30 y 500 µg, de entre 500 µg y 2,5 mg, de entre 2,5 y 60 mg, de entre 60 y 150 mg o de entre 150 y 6.000 mg, aún más particularmente que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 30 y 150 µg, de entre 150 y 300 µg, de entre 300 y 500 µg, de entre 500 µg y 1 mg, de entre 1 y 2,5 mg, de entre 2,5 y 30 mg, de entre 30 mg y 60 mg, de entre 150 y 2.500 mg, de entre 2.500 y 4.500 mg o de entre 4.500 y 6.000 mg, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.
- 20 En una forma de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), para una administración por vía oral a una dosis de entre 1 µg/kg y 50 mg/kg, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.
- 25 Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), para una administración por vía oral a una dosis de entre 1 y 50 µg/kg, de entre 50 y 500 µg/kg, de entre 500 µg/kg y 5 mg/kg o de entre 5 y 50 mg/kg, aún más particularmente a una dosis de entre 1 y 20 µg/kg, de entre 20 y 50 µg/kg, de entre 50 y 300 µg/kg, de entre 300 y 500 µg/kg, de entre 500 µg/kg y 1 mg/kg, de entre 1 y 5 mg/kg, de entre 5 y 30 mg/kg o de entre 30 y 50 mg/kg, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.
- 30 En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 30 µg y 6.000 mg, para una administración por vía oral, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.
- 35 Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 30 y 500 µg, de entre 500 µg y 60 mg o de entre 60 mg y 6.000 mg, aún más particularmente que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 30 y 125 µg, de entre 125 y 300 µg, de entre 300 y 500 µg, de entre 500 µg y 1,5 mg, de entre 1,5 y 25 mg, de entre 25 y 60 mg, de entre 60 y 500 mg, de entre 500 y 2.000 mg, o de entre 2.000 y 6.000 mg, para una administración por vía oral, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.
- 40 En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), para una administración por vía intravenosa a una dosis de entre 1 µg/kg y 50 mg/kg, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.
- 45 Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), para una administración por vía intravenosa a una dosis de entre 1 y 20 µg/kg, de entre 20 y 500 µg/kg, de entre 500 µg/kg y 5 mg/kg o de entre 5 y 50 mg/kg, aún más particularmente a una dosis de entre 1 y 12 µg/kg, de entre 12 y 20 µg/kg, de entre 20 y 50 µg/kg, de entre 20 y 150 µg/kg, de entre 50 y 300 µg/kg, de entre 300 y 500 µg/kg, de entre 500 µg/kg y 1 mg/kg, de entre 1 y 5 mg/kg, de entre 5 y 30 mg/kg o de entre 30 y 50 mg/kg, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.
- 50 En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 30 µg y 6.000 mg, para una administración por vía intravenosa, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.
- 55 Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 30 y 500 µg, de entre 500 µg y 30 mg, de entre 30 y 150 mg o de entre 150 y 6.000 mg, aún más particularmente que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 30 y 150 µg, de entre 150 y 500 µg, de entre 500 µg y 1,5 mg, de entre 1,5 y 30 mg, de entre 30 y 60 mg, de entre 60 y 150 mg, de entre 150 y 1.000 mg, de entre 1.000 y 2.500 mg o de entre 2.500 y 6.000 mg, para una administración por vía intravenosa, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), para una administración a una dosis de entre 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 5  $\text{mg}/\text{kg}$ , para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

5 Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), para una administración a una dosis de entre 0,1 y 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 5 y 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 0,5  $\text{mg}/\text{kg}$  o de entre 0,5 y 5  $\text{mg}/\text{kg}$ , aún más particularmente a una dosis de entre 0,1 y 1,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 1,2 y 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 2 y 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 2 y 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 5 y 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 30 y 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 100 y 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 3  $\text{mg}/\text{kg}$  o de entre 3 y 5  $\text{mg}/\text{kg}$ , para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

10 En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 3  $\mu\text{g}$  y 600  $\text{mg}$ , para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

15 Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 3 y 50  $\mu\text{g}$ , de entre 50  $\mu\text{g}$  y 250  $\mu\text{g}$ , de entre 250  $\mu\text{g}$  y 6  $\text{mg}$ , de entre 6 y 15  $\text{mg}$  o de entre 15 y 600  $\text{mg}$ , aún más particularmente que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 3 y 15  $\mu\text{g}$ , de entre 15 y 30  $\mu\text{g}$ , de entre 30 y 50  $\mu\text{g}$ , de entre 50  $\mu\text{g}$  y 0,1  $\text{mg}$ , de entre 0,1 y 0,25  $\text{mg}$ , de entre 0,25 y 3  $\text{mg}$ , de entre 3  $\text{mg}$  y 6  $\text{mg}$ , de entre 15 y 250  $\text{mg}$ , de entre 250 y 450  $\text{mg}$  o de entre 450 y 600  $\text{mg}$ , para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

20 En una forma de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), para una administración por vía oral a una dosis de entre 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 5  $\text{mg}/\text{kg}$ , para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

25 Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), para una administración por vía oral a una dosis de entre 0,1 y 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 5 y 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 0,5  $\text{mg}/\text{kg}$  o de entre 0,5 y 5  $\text{mg}/\text{kg}$ , aún más particularmente a una dosis de entre 0,1 y 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 2 y 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 5 y 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 30 y 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 3  $\text{mg}/\text{kg}$  o de entre 3 y 5  $\text{mg}/\text{kg}$ , para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

30 En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 3  $\mu\text{g}$  y 600  $\text{mg}$ , para una administración por vía oral, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

35 Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 3 y 50  $\mu\text{g}$ , de entre 50  $\mu\text{g}$  y 6  $\text{mg}$  o de entre 6  $\text{mg}$  y 600  $\text{mg}$ , aún más particularmente que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 3 y 12,5  $\mu\text{g}$ , de entre 12,5 y 30  $\mu\text{g}$ , de entre 30 y 50  $\mu\text{g}$ , de entre 50  $\mu\text{g}$  y 150  $\mu\text{g}$ , de entre 150  $\mu\text{g}$  y 2,5  $\text{mg}$ , de entre 2,5 y 6  $\text{mg}$ , de entre 6 y 50  $\text{mg}$ , de entre 50 y 200  $\text{mg}$  o de entre 200 y 600  $\text{mg}$ , para una administración por vía oral, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

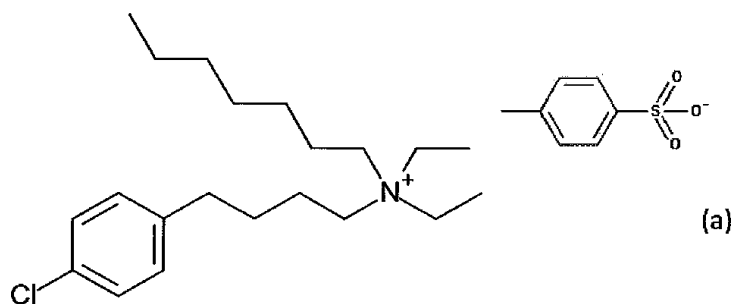
En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), para una administración por vía intravenosa a una dosis de entre 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 5  $\text{mg}/\text{kg}$ , para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

40 Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), para una administración por vía intravenosa a una dosis de entre 0,1 y 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 2 y 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 0,5  $\text{mg}/\text{kg}$  o de entre 0,5 y 5  $\text{mg}/\text{kg}$ , aún más particularmente a una dosis de entre 0,1 y 1,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 1,2 y 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 2 y 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 2 y 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 5 y 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 30 y 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 100 y 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 3  $\text{mg}/\text{kg}$  o de entre 3 y 5  $\text{mg}/\text{kg}$ , para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

45 En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 3  $\mu\text{g}$  y 600  $\text{mg}$ , para una administración por vía intravenosa, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

50 Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 3 y 50  $\mu\text{g}$ , de entre 50  $\mu\text{g}$  y 3  $\text{mg}$ , de entre 3 y 15  $\text{mg}$  o de entre 15 y 600  $\text{mg}$ , aún más particularmente que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 3 y 15  $\mu\text{g}$ , de entre 15 y 50  $\mu\text{g}$ , de entre 50  $\mu\text{g}$  y 0,15  $\text{mg}$ , de entre 0,15 y 3  $\text{mg}$ , de entre 3 y 6  $\text{mg}$ , de entre 6 y 15  $\text{mg}$ , de entre 15 y 100  $\text{mg}$ , de entre 100 y 250  $\text{mg}$  o de entre 250 y 600  $\text{mg}$ , para una administración por vía intravenosa, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

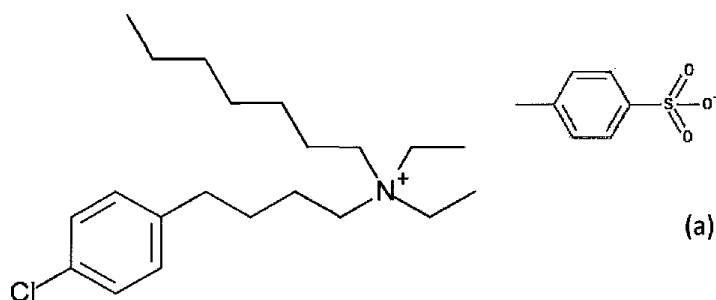
55 En un modo de realización aún más particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a):



para una administración por vía oral a una dosis de entre 50 y 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

- 5 Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), para una administración por vía oral a una dosis de entre 50 y 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  o de entre 300 y 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , aún más particularmente a una dosis de entre 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 100 y 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 200 y 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 300 y 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  o de entre 400 y 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

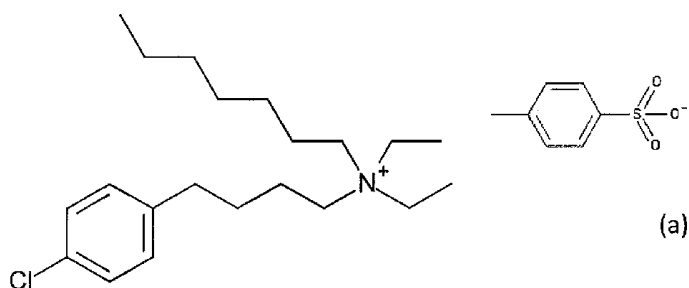
- 10 En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a):



que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 1,5 mg y 60 mg, para una administración por vía oral, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

- 15 Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 1,5 y 25 mg o de entre 25 y 60 mg, aún más particularmente de entre 1,5 y 8 mg, de entre 8 y 15 mg, de entre 15 y 25 mg, de entre 25 y 35 mg, de entre 35 y 60 mg, de entre 35 y 45 mg o de entre 45 y 60 mg, para una administración por vía oral, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

- 20 En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a):

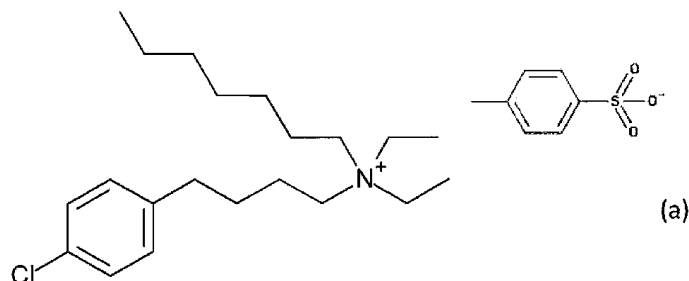


para una administración por vía intravenosa a una dosis de entre 20 y 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

- 25 Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), para una administración por vía intravenosa a una dosis de entre 20 y 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  o de entre 150 y 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , aún más particularmente a una dosis de entre 20 y 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 100 y 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de entre 150 y 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  o de entre 200 y 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad

del ADN mitocondrial.

En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a):

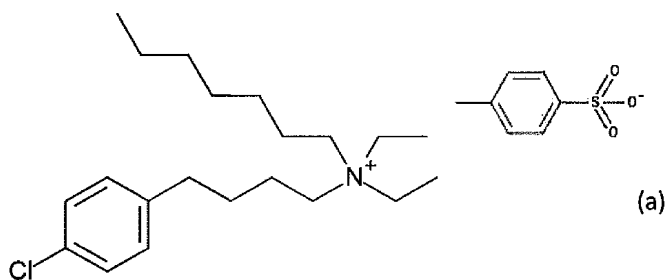


5 que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 0,5 mg y 30 mg, para una administración por vía intravenosa, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 0,5 mg y 12 mg o de entre 12 y 30 mg, aún más particularmente que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 0,5 y 4 mg, de entre 4 y 8 mg, de entre 8 y 12 mg, de entre 12 y 16 mg, de entre 16 y 30 mg, de entre 16 y 20 mg o de entre 20 y 30 mg, para una administración por vía intravenosa, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

10

En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a):



15 para una administración por vía oral a una dosis de entre 5 y 50 µg/kg, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), para una administración por vía oral a una dosis de entre 5 y 30 µg/kg o de entre 30 y 50 µg/kg, aún más particularmente a una dosis de entre 5 y 10 µg/kg, de entre 10 y 20 µg/kg, de entre 20 y 30 µg/kg, de entre 30 y 40 µg/kg o de entre 40 y 50 µg/kg, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

20

En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 150 µg y 6 mg, para una administración por vía oral, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 150 µg y 2,5 mg o de entre 2,5 y 6 mg, aún más particularmente de entre 150 µg y 800 µg, de entre 800 µg y 1,5 mg, de entre 1,5 y 2,5 mg, de entre 2,5 y 3,5 mg, de entre 3,5 y 6 mg, de entre 3,5 y 4,5 mg o de entre 4,5 y 6 mg, para una administración por vía oral, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

25

En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), para una administración por vía intravenosa a una dosis de entre 2 y 25 µg/kg, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

30

Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), para una administración por vía intravenosa a una dosis de entre 2 y 15 µg/kg o de entre 15 y 25 µg/kg, aún más particularmente a una dosis de entre 2 y 5 µg/kg, de entre 5 y 10 µg/kg, de entre 10 y 15 µg/kg, de entre 15 y 20 µg/kg o de entre 20 y 25 µg/kg, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN

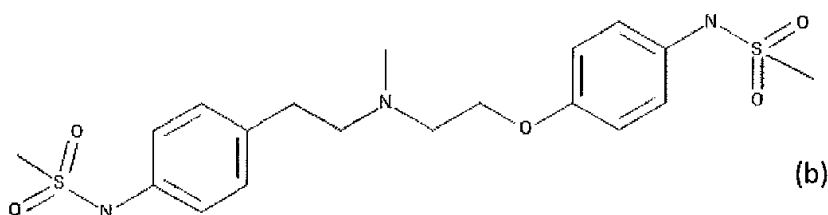
35

mitocondrial.

En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 50  $\mu\text{g}$  y 3 mg, para una administración por vía intravenosa, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

- 5 Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 50  $\mu\text{g}$  y 1,2 mg o de entre 1,2 y 3 mg, aún más particularmente que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 50  $\mu\text{g}$  y 400  $\mu\text{g}$ , de entre 400 y 800  $\mu\text{g}$ , de entre 800  $\mu\text{g}$  y 1,2 mg, de entre 1,2 y 1,6 mg, de entre 1,6 y 3 mg, de entre 1,6 y 2 mg o de entre 2 y 3 mg, para una administración por vía intravenosa, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

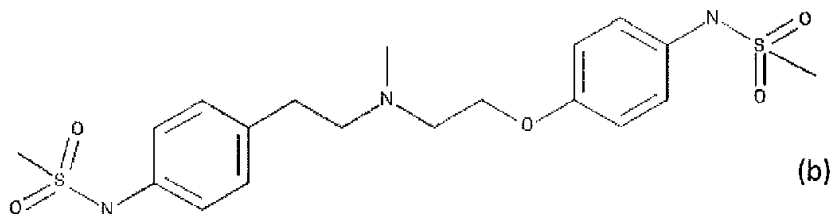
En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (b):



- 15 que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 125 y 500  $\mu\text{g}$  dos veces al día, para una administración por vía oral, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

- 20 Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (b), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 125 y 300  $\mu\text{g}$  o de entre 300 y 500  $\mu\text{g}$  dos veces al día, aún más particularmente que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 125 y 200  $\mu\text{g}$ , de entre 200 y 300  $\mu\text{g}$ , de entre 300 y 400  $\mu\text{g}$  o de entre 400 y 500  $\mu\text{g}$  dos veces al día, para una administración por vía oral, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

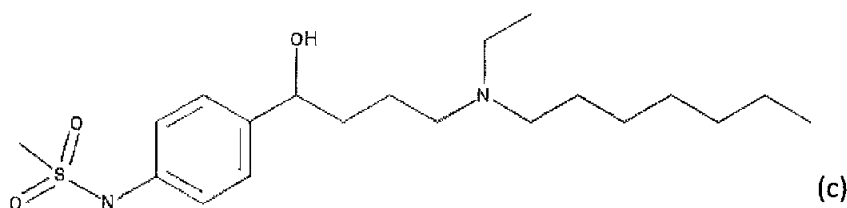
En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (b):



- 25 que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 12,5 y 50  $\mu\text{g}$ , para una administración por vía oral, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

- 30 Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (b), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 12,5 y 30  $\mu\text{g}$  o de entre 30 y 50  $\mu\text{g}$ , aún más particularmente que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 12,5 y 20  $\mu\text{g}$ , de entre 20 y 30  $\mu\text{g}$ , de entre 30 y 40  $\mu\text{g}$  o de entre 40 y 50  $\mu\text{g}$ , para una administración por vía oral, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

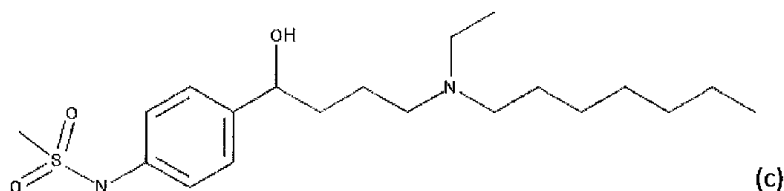
En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (c):



para una administración por vía intravenosa a una dosis de entre 5 µg/kg y 20 µg/kg, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

- 5 Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (c), para una administración por vía intravenosa a una dosis de entre 5 y 12 µg/kg o de entre 12 y 20 µg/kg, aún más particularmente a una dosis de entre 5 y 8 µg/kg, de entre 8 y 12 µg/kg, de entre 12 y 16 µg/kg o de entre 16 y 20 µg/kg, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

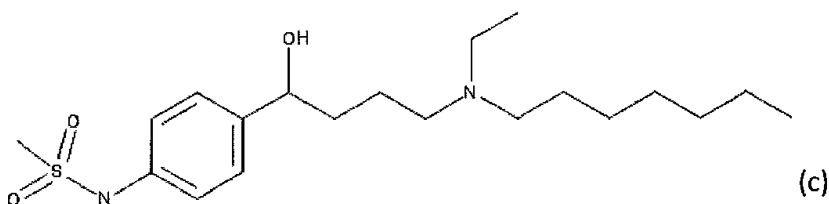
En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (c):



- 10 que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 150 µg y 2.500 µg, para una administración por vía intravenosa, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

- 15 Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (c), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 150 y 1.000 µg o de entre 1.000 y 2.500 µg, aún más particularmente que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 150 y 650 µg, de entre 650 y 1.000 µg, de entre 1.000 y 1.500 µg, de entre 1.500 y 2.500 µg, de entre 1.500 y 2.000 µg o de entre 2.000 y 2.500 µg, para una administración por vía intravenosa, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

En otro modo de realización, la invención concierne a un compuesto de fórmula (c):



- 20 para una administración por vía intravenosa a una dosis de entre 0,5 µg/kg y 2 µg/kg, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

- 25 Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (c), para una administración por vía intravenosa a una dosis de entre 0,5 y 1,2 µg/kg o de entre 1,2 y 2 µg/kg, aún más particularmente a una dosis de entre 0,5 y 0,8 µg/kg, de entre 0,8 y 1,2 µg/kg, de entre 1,2 y 1,6 µg/kg o de entre 1,6 y 2 µg/kg, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (c), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 15 µg y 250 µg, para una administración por vía intravenosa, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

- 30 Más particularmente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (c), que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 15 y 100 µg o de entre 100 y 250 µg, aún más particularmente que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 15 y 65 µg, de entre 65 y 100 µg, de entre 100 y 150 µg, de entre 150 y 250 µg, de entre 150 y 200 µg o de entre 200 y 250 µg, para una administración por vía intravenosa, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

- 35 Ventajosamente, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), que se presenta en forma de una solución inyectable, de un jarabe, de una suspensión, de un polvo, de una cápsula, de un comprimido, de una pastilla,



de un gránulo, de una píldora o de un supositorio, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

5 En una forma de realización en particular, la invención concierne a un compuesto de fórmula (a), (b) o (c), para una administración por vía oral, que se presenta en forma de un jarabe, de una suspensión, de un polvo, de una cápsula, de un comprimido, de una pastilla, de un gránulo o de una píldora, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

Ventajosamente, la invención concierne a un compuesto tal como se define más arriba, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con al menos una mutación, o con al menos una delección o con al menos una inserción, o con una combinación de estos elementos, en el gen POLG.

10 En otro modo de realización, la invención concierne a un compuesto tal como se define más arriba, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial no relacionada con las mutaciones en el gen POLG.

15 En una forma de realización en particular, la invención concierne a un compuesto tal como se define más arriba, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con una depleción o una delección del ADN mitocondrial.

En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto tal como se define más arriba, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con una mutación puntual del ADN mitocondrial.

20 En un modo de realización aún más particular, la invención concierne a un compuesto tal como se define más arriba, para su utilización en el tratamiento o en la prevención

- de las enfermedades asociadas con anomalías cuantitativas o cualitativas del ADN mitocondrial tales como la enfermedad de Alpers (AHS), el espectro de las mio-cerebro-hepatopatías del niño (MCHS), las epilepsias mioclónicas con miopatía y ataxia sensitiva MEMSA (Myoclonic epilepsy myopathy sensory ataxia), la ataxia espinocerebelosa con epilepsia (SCAE), las ataxias con neuropatías que incluyen los síndromes MIRAS y SANDO, la oftalmoplejia externa progresiva autosómica recesiva (arPEO), la oftalmoplejia externa progresiva autosómica dominante (adPEO), la encefalomiopatía mitocondrial neurogastrointestinal (MNGIE), el síndrome de Pearson, el síndrome de Kearns-Sayre, la miopatía infantil y la amiotrofia espinal relacionadas con las mutaciones en el *TK2*, las insuficiencias hepáticas con depleción del ADNmt, las patologías asociadas con las mutaciones de los genes *SUCLA2* y *SUCLAG1*, *RRM2B*, *AIF1*, *MPV17* o
- 30 - de las enfermedades asociadas con mutaciones puntuales del ADN mitocondrial tales como la neuropatía óptica hereditaria de Leber, el síndrome MELAS, el síndrome MERRF y ciertas formas del síndrome de Leigh, de oftalmoplejia externa progresiva crónica, de miopatía, de cardiomiopatía, de diabetes-sordera, de encefalomiopatía y de sordera.

35 En una forma de realización en particular, la invención concierne a un compuesto tal como se define más arriba, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con al menos una mutación, o con al menos una delección o con al menos una inserción, o con una combinación de estos elementos, en el gen POLG, comprendiendo dichas enfermedades la enfermedad de Alpers (AHS), el espectro de las mio-cerebro-hepatopatías del niño (MCHS), las epilepsias mioclónicas con miopatía y ataxia sensitiva MEMSA (Myoclonic epilepsy myopathy sensory ataxia), las ataxias espinocerebelosas con epilepsia (SCAE), las ataxias con neuropatías que incluyen los síndromes MIRAS y SANDO, la oftalmoplejia externa progresiva autosómica recesiva (arPEO) y la oftalmoplejia externa progresiva autosómica dominante (adPEO).

45 En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto tal como se define más arriba, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con una depleción o una delección del ADN mitocondrial, comprendiendo dichas enfermedades la oftalmoplejia externa progresiva autosómica recesiva, la encefalomiopatía mitocondrial neurogastrointestinal, el síndrome de Pearson, el síndrome de Kearns-Sayre, la miopatía infantil y la amiotrofia espinal relacionadas con las mutaciones en el *TK2*, las insuficiencias hepáticas con depleción del ADNmt, las patologías asociadas con las mutaciones de los genes *SUCLA2* y *SUCLAG1*, *RRM2B*, *AIF1*, *MPV17* y la oftalmoplejia externa progresiva autosómica dominante.

50 En otro modo de realización en particular, la invención concierne a un compuesto tal como se define más arriba, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con una mutación puntual del ADN mitocondrial, comprendiendo dichas enfermedades la neuropatía óptica de Leber, el síndrome MELAS, el síndrome MERRF, y ciertas formas del síndrome de Leigh, de oftalmoplejia externa progresiva crónica, de miopatía, de cardiomiopatía, de diabetes-sordera, de encefalomiopatía y de sordera.

55 En un modo de realización aún más particular, la invención concierne a un compuesto tal como se define más arriba, para su utilización en el tratamiento o en la prevención del síndrome MELAS.

El síndrome MELAS (Mitochondrial Encephalopathy Lactic Acidosis Stroke) es una mitocondropatía debida lo más

frecuentemente a una mutación A3243G en el ARNt<sup>Leu</sup> del ADN mitocondrial. La enfermedad aparece lo más a menudo en la infancia o en los adultos jóvenes. En los sujetos que padecen este síndrome a menudo existen unos síntomas crónicos como miocardiopatía, sordera, diabetes, pequeño tamaño, debilidad muscular, retraso mental, problemas de aprendizaje, de memoria o de atención. Para las formas más graves de MELAS, los accidentes vasculares de repetición son igualmente responsables de ataques neurológicos graves. Los pacientes que padecen el síndrome MELAS presentan una hiperlactacidemia en su sangre, es decir, un aumento del lactato, debida a una disfunción mitocondrial y a la deficiencia energética resultante. Se observa igualmente en los individuos que padecen el síndrome MELAS una reducción significativa de la actividad del complejo I, que es la primera enzima de la cadena respiratoria mitocondrial. Por lo tanto, se espera que un medicamento eficaz para el tratamiento del síndrome MELAS aumente la actividad del complejo I y reduzca la producción de lactato (por un aumento de la producción energética) en el paciente.

**Descripción de las figuras**

**Figura 1:** la figura 1 representa la densidad óptica (DO<sub>600</sub>) de un cultivo celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mutante en el gen *MIP1* (*mip1<sup>G651S</sup>*) después de 24 horas de cultivo en función de la concentración de tosilato de clofilio añadida al medio de cultivo.

**Figura 2:** la figura 2 representa la frecuencia, en porcentaje, de producción de colonias *petite* de la cepa de levadura *mip1<sup>G651S</sup>* en presencia (CLOF) y ausencia (DMSO) de tosilato de clofilio 32 µM en el medio de cultivo.

**Figura 3:** la parte A representa la frecuencia, en porcentaje, de producción de colonias *petite* de los mutantes *mip1* recesivos.

La parte B representa la reducción en el número de colonias *petite* en presencia de tosilato de clofilio 32 µM en comparación con el número de células no tratadas (células en presencia de DMSO) en los mutantes *mip1* recesivos.

La parte C representa la frecuencia, en porcentaje, de producción de colonias *petite* de los mutantes *mip1* dominantes. La parte D representa la reducción en el número de colonias *petite* en presencia de tosilato de clofilio 32 µM en comparación con el número de células no tratadas (células en presencia de DMSO) en los mutantes *mip1* dominantes.

**Figura 4:** la figura 4 representa el número de colonias resistentes a la eritromicina (Ery<sup>R</sup>) sobre el número total de colonias (frecuencia de las células resistentes a la eritromicina) de los mutantes *mip1* recesivos en ausencia (DMSO) y en presencia (CLOF) de tosilato de clofilio 32 µM.

**Figura 5:** la figura 5 representa la frecuencia, en porcentaje, de producción de colonias *petite*, en las cepas de levaduras *mip1<sup>G651S</sup>*, *mip1<sup>G651S</sup> Δsml1*, *mip1<sup>A692T</sup>* y *mip1<sup>A692T</sup> Δsml1*, en presencia de tosilato de clofilio 32 µM (gris oscuro) o en ausencia de tosilato de clofilio (presencia de DMSO, gris claro).

**Figura 6:** la figura 6 representa la velocidad de consumo de dioxígeno (VO<sub>2</sub>) en nmol/2 x 10<sup>6</sup> células/min en las levaduras que expresan el gen natural *MIP1* o el gen mutado *mip1<sup>G651S</sup>*, en presencia (CLOF) o en ausencia (DMSO) de tosilato de clofilio 32 µM.

**Figura 7:** la figura 7 representa el análisis por electroforesis en gel de SDS/PAGE de las fracciones proteicas mitocondriales de las células de levadura cultivadas en presencia (CLOF, +) o en ausencia (DMSO, -) de tosilato de clofilio 32 µM. Las proteínas estudiadas son la proteína Mip1-HA, la proteína Mip1G651S-HA (análisis en gel de SDS/PAGE al 6 %), la proteína mitocondrial Cox2 y la porina (análisis en gel de SDS/PAGE al 10 %). Las proteínas después de la separación son transferidas a una membrana de nitrocelulosa y después son reveladas mediante una detección de la actividad de la peroxidasa ECL<sup>Plus</sup> con la ayuda de anticuerpos primarios y de anticuerpos secundarios acoplados a la peroxidasa horseradish (HRP). La banda marcada con un \* es una reacción no específica del anticuerpo anti-HA.

**Figura 8:** la figura 8 representa el porcentaje de nematodo *Caenorhabditis elegans* en los estadios L1 a L3 y en el estadio L4-adulto con respecto al número total de nematodos en una línea natural (N2) y en una línea mutada TB2143 (*polg-1* (*ok1548Δ/+*)) que porta una delección heterocigota de 2149 bp en la secuencia codificante del gen *polg-1*, en función de la concentración en tosilato de clofilio contenido en el medio de cultivo de los nematodos (placas NGM).

**Figura 9:** la figura 9 representa el porcentaje de larvas de nematodo TB2143 (*polg-1* (*ok1548Δ/+*)) haploinsuficientes cultivadas en placas NGM que contienen 30 µg/ml de bromuro de etidio, cuyo desarrollo se ha detenido en el estadio L3 según la ausencia (DMSO) o la presencia (CLOF) de tosilato de clofilio 50 µM en las placas.

**Figura 10:** la figura 10 representa la curva de dosis-respuesta del tosilato de clofilio sobre la resistencia de los nematodos TB2143 haploinsuficientes (*polg-1* (*ok1548Δ/+*)) al bromuro de etidio: el porcentaje de larvas L3 (detención del desarrollo) está representado en función de la concentración del tosilato de clofilio contenido en las placas NGM de los nematodos que comprenden 30 µg/ml de bromuro de etidio.

**Figura 11:** la figura 11 representa la curva de dosis-respuesta de la quinidina sobre la resistencia de los nematodos TB2143 haploinsuficientes (*polg-1* (*ok1548Δ/+*)) al bromuro de etidio: el porcentaje de larvas L3 (detención del desarrollo) está representada en función de la concentración de quinidina contenida en las placas NGM de los nematodos que comprenden 30 μg/ml de bromuro de etidio.

**Figura 12:** la parte A representa el número de huevos depositados por los nematodos homocigotos TB2143 (*polg-1* (*Δ/Δ*)) en ausencia (DMSO) o en presencia (CLOF) de tosilato de clofilio 50 μM en las placas NGM de los nematodos. La parte B representa el número de larvas, por lo tanto, de eclosiones de los huevos depositados, por 5 nematodos homocigotos TB2143 (*polg-1* (*Δ/Δ*)) en ausencia (DMSO) o en presencia (CLOF) de tosilato de clofilio 50 μM en las placas NGM de los nematodos.

**Figura 13:** la figura 13 representa el porcentaje de nematodos TB2143 homocigotos (*polg-1* (*ok1548Δ/Δ*)) muertos y que presentan una extrusión del intestino y/o de las gónadas el 7º día del adulto en ausencia (DMSO) y en presencia (CLOF) de tosilato de clofilio 50 μM.

**Figura 14:** la figura 14 representa el porcentaje de ADNmt de los nematodos TB2143 homocigotos (*polg-1* (*ok1548Δ/Δ*)) con respecto a la cepa de referencia N2 en presencia de DMSO y en presencia de tosilato de clofilio 50 μM.

**Figura 15:** la figura 15 representa el índice celular, representativo de la viabilidad de las células, de fibroblastos humanos cultivados con diferentes concentraciones de tosilato de clofilio en función del tiempo. La parte A representa el índice celular de los fibroblastos de control. La parte B representa el índice celular de los fibroblastos de un paciente que tiene una mutación en cada alelo del gen POLG.

**Figura 16:** la figura 16 representa la proporción entre la cantidad de ADNmt y la cantidad de ADN nuclear (ADNnu) en los fibroblastos de control y en los fibroblastos de un paciente que presentan una mutación en cada alelo del gen POLG cultivados en ausencia (DMSO) y en presencia (CLOF) de tosilato de clofilio 2,5 μM.

**Figura 17:** la figura 17 representa el porcentaje de depleción del ADNmt de los fibroblastos cutáneos de un paciente que presentan una mutación en cada alelo del gen POLG en comparación con la cantidad de ADNmt de los fibroblastos cutáneos de control cultivados en medio quiescente en ausencia de tratamiento (NT) o en presencia de DMSO (DMSO) o en presencia de tosilato de clofilio 1 μM (CLOF), en función del tiempo.

**Figura 18:** la figura 18 representa el porcentaje de nematodos haploinsuficientes TB2143 (*polg-1* (*ok1548Δ/+*)) en el estadio de adulto y en el estadio de desarrollo L4 después de 4 días de cultivo en placas NGM complementadas con 30 μg/ml de bromuro de etidio y diferentes concentraciones de tosilato de clofilio o de DMSO.

**Figura 19:** la figura 19 representa el porcentaje de nematodos haploinsuficientes TB2143 (*polg-1* (*ok1548Δ1/+*)) en el estadio de adulto y en el estadio de desarrollo L4 después de 4 días de cultivo en placas NGM complementadas con 30 μg/ml de bromuro de etidio y diferentes concentraciones de hemifuramato de ibutilida o de DMSO.

**Figura 20:** la figura 20 representa el porcentaje de nematodos haploinsuficientes TB2143 (*polg-1* (*ok1548Δ/+*)) en el estadio de adulto y en el estadio de desarrollo L4 después de 4 días de cultivo en placas NGM complementadas con 30 μg/ml de bromuro de etidio y con tosilato de clofilio 50 μM, o diferentes concentraciones de dofetilida o de DMSO.

**Figura 21:** la parte A representa la frecuencia de número de colonias *petite* en presencia de tosilato de clofilio 32 μM (gris oscuro) comparada con la frecuencia de número de colonias *petite* de células no tratadas (DMSO, gris claro) en el mutante *Δfis1*.

La parte B representa la frecuencia de número de colonias *petite* en presencia de tosilato de clofilio 32 μM (gris oscuro) comparada con la frecuencia de número de colonias *petite* de células no tratadas (DMSO, gris claro) en el mutante *mip1<sup>G807R</sup>* así como la frecuencia calculada (esperada) y la observada en el mutante doble *mip1<sup>G807R</sup> Δfis1*. La parte C representa la frecuencia de número de colonias *petite* en presencia de tosilato de clofilio 32 μM (gris oscuro) comparada con la frecuencia de número de colonias *petite* de células no tratadas (DMSO, gris claro) en el mutante *mip1<sup>G651S</sup>* así como la frecuencia calculada (esperada) y la observada en el mutante doble *mip1<sup>G651S</sup> Δfis1*.

**Figura 22:** la figura 22 representa el efecto del tosilato de clofilio sobre la proporción entre las actividades del complejo I / sintasa de citrato y la producción de lactato de cíbridos neuronales derivados de un paciente con MELAS (mutación m.3243A>G tRNA<sup>leu</sup>).

La parte A representa la proporción entre las actividades del complejo I / sintasa de citrato, en porcentaje con respecto al control, después del tratamiento de los cíbridos neuronales con DMSO (control) o con 300 nM (CT 300 nM) de tosilato de clofilio, después de 48 horas de tratamiento. N = 4. CS = sintasa de citrato.

La parte B representa la producción de lactato, en porcentaje con respecto al control, por parte de los cíbridos neuronales después del tratamiento de los cíbridos neuronales con DMSO (control) o con 300 nM (CT 300 nM) de tosilato de clofilio durante 48 horas. N = 4.

**Figura 23:** la figura 23 representa el efecto de la dosis de ibutilida sobre la proporción entre las actividades del complejo I / sintasa de citrato y la producción de lactato de los cíbridos neuronales derivados de un paciente con MELAS (mutación m.3243A>G tRNA<sup>leu</sup>). La parte A representa la proporción entre las actividades del complejo I / sintasa de citrato, en porcentaje con respecto al blanco, después del tratamiento de los cíbridos neuronales con DMSO (blanco), o con 1  $\mu$ M (ibu 1 $\mu$ M) o 300 nM (ibu 300 nM) de ibutilida durante 48 horas. N = 4. CS = sintasa de citrato. La parte B representa la producción de lactato, en porcentaje con respecto al control, por parte de los cíbridos neuronales después del tratamiento de los cíbridos neuronales con DMSO (blanco) o con 1  $\mu$ M (ibu 1 $\mu$ M) o 300 nM (ibu 300 nM) de ibutilida durante 48 horas. N = 4.

**Figura 24:** la figura 24 representa el análisis por electroforesis en gel de SDS/PAGE de las fracciones proteicas de los extractos totales de los fibroblastos de control (control) y de los fibroblastos de un paciente con una mutación en cada alelo del gen POLG (paciente) en condiciones de proliferación celular. Los fibroblastos son cultivados en presencia de DMSO al 0,1 % (D) o con 0,5  $\mu$ M o 1,0  $\mu$ M de tosilato de clofilio (CLO). Las proteínas estudiadas son la proteína POLG (análisis en gel de SDS/PAGE al 6 %), las proteínas mitocondriales ATP5B y TFAM así como la proteína citosólica TUB3A como control de carga.

**Figura 25:** la figura 25 representa el porcentaje de aumento en el número de copias del ADNmt de los fibroblastos cutáneos de un paciente que presentan una mutación en cada alelo del gen POLG en comparación con el número de copias del ADNmt de los fibroblastos del paciente no tratados (DMSO), cultivados en medio quiescente en presencia de DMSO (DMSO) o en presencia de diferentes concentraciones de tosilato de clofilio: 0,5  $\mu$ M (CLO 0.5), 1  $\mu$ M (CLO 1), 2,5  $\mu$ M (CLO 2.5), en función de número de días de tratamiento (tratamiento de 18 días).

### Ejemplos

Los ejemplos 1 a 14, 17 a 22 y 24 a 25 conciernen al tosilato de clofilio: los ejemplos 1 a 6 y 17 conciernen a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, los ejemplos 7 a 11 y 20 conciernen al nematodo *Caenorhabditis elegans*, los ejemplos 12 a 14, 18, 19, 24 y 25 conciernen a los fibroblastos humanos y el ejemplo 22 concierne a los cíbridos neuronales derivados de un paciente con MELAS (mutación m.3243A>G tRNA<sup>leu</sup>). El ejemplo 21 concierne a la combinación de tosilato de clofilio con el resveratrol y los fibroblastos humanos.

El ejemplo 15 concierne a la ibutilida y al nematodo, el ejemplo 23 concierne a la ibutilida y a los cíbridos neuronales derivados de un paciente con MELAS (mutación m.3243A>G tRNA<sup>leu</sup>), el ejemplo 16 concierne a la dofetilida y al nematodo.

### **Material y métodos**

Las levaduras *S. cerevisiae* utilizadas en los ejemplos 1 a 6 y 17 son unas levaduras de fondo genético DWM-5A: Mat a *ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11,15 can1-100  $\Delta$ mip1::KanR* transformadas por un plásmido monocopia (ARS-CEN) pFL39 (*TRP1*) que permiten la expresión de los diferentes alelos del *MIP1* (Baruffini, E., Lodi, T., Dallabona, C., Puglisi, A., Zeviani, M. and Ferrero, I. (2006) Genetic and Chemical rescue of the *Saccharomyces cerevisiae* phenotype induced by mitochondrial DNA polymerase mutations associated with progressive external ophthalmoplegia in humans. *Hum. Mol. Genet.*, 15, 2846 - 2855).

Los nematodos *C. elegans* utilizados en los ejemplos 7 a 11 y 15, 16 y 20 son la línea BRISTOL N2 natural, la línea VC1224 (*polg-1 (ok1548)/mT1 II; +/mT1[dpy-10(e128)] II*) del consorcio *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC), la línea TB2143 (*polg-1 (ok1548)/+ II; +/mln [dpy-10(e128) mls14] II*) (A. Trifunovic, Alemania) y la línea DA631 (*eat-3(ad426) II; him-8(e1489) IV*) (CGC).

### **Ejemplo 1: determinación de la concentración máxima de tosilato de clofilio tolerada por la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae mip1<sup>G61S</sup>*.**

Se prueba la inhibición del crecimiento (MIC, Minimum Inhibitory Concentration) del tosilato de clofilio sobre la cepa *mip1<sup>G61S</sup>* para unas concentraciones de tosilato de clofilio de 512  $\mu$ M, de 256  $\mu$ M, de 128  $\mu$ M, de 64  $\mu$ M, de 32  $\mu$ M, de 16  $\mu$ M, de 8  $\mu$ M, de 4  $\mu$ M, de 2  $\mu$ M y de 1  $\mu$ M.

A partir de un precultivo o/n en medio selectivo (SC-URA, 2 % de etanol (v/v)), 50 ml de medio rico YPD (1 % de Yeast Extract, 0,5 % de Bacto Peptone, 2 % de glucosa) se siembran a una DO<sub>600</sub> de 0,05/ml. Estos 50 ml de cultivo se reparten en una serie de diez tubos, a razón de 2 ml de cultivo / tubo, y se depositan 4 ml de cultivo en un último tubo. En este último tubo (tubo 1) se añade el tosilato de clofilio a la concentración máxima: 512  $\mu$ M (solubilidad máxima). De este tubo se ponen 1,2 ml de cultivo en el tubo 2. El tubo 2 contiene 4 ml de cultivo y el tosilato de clofilio a una concentración de 256  $\mu$ M. Se añaden 2 ml de tubo 2 al tubo 3 y así sucesivamente. Cada tubo contiene la droga a una concentración igual a la mitad de la del tubo anterior. Se efectúan dos controles, sin tosilato de clofilio y con DMSO (siendo el volumen el mismo que el que ha servido para diluir el tosilato de clofilio). Los cultivos se incuban a 28 °C con agitación durante 24 horas y se mide la densidad óptica (DO<sub>600</sub>).

Los resultados se presentan en la Figura 1.

La concentración elegida de tosilato de clofilio para el estudio de su efecto en la levadura *S. cerevisiae* es de 32  $\mu$ M.

**Ejemplo 2: efecto del tosilato de clofilio sobre la producción de colonias *petite* en cepas *mip1* mutadas de levadura**

El índice de células *petite* en una población representa las células que no respiran debido a reestructuraciones en el ADNmt y/o a que han perdido su ADNmt.

**2.1. Modo operativo**

A partir de un precultivo en medio selectivo (SC-TRP, 2 % de etanol (v/v)) de la cepa *mip1* mutada, se siembran  $2 \cdot 10^5$  células/ml en 2 ml de medio rico YPD (1 % de Yeast Extract, 0,5 % de Bacto Peptone, 2 % de glucosa) en presencia de tosilato de clofilio 32  $\mu$ M o de DMSO. Después, las células se incuban a 28 °C durante dos ciclos de 24 horas. A continuación las células se diluyen para tener aproximadamente entre 200 y 250 células por placa y se extienden sobre medio sintético diferencial (SC-TRP, 0,3 % de glucosa, 2 % de etanol). El número de colonias *petite* se calcula después de 6 días de incubación a 28 °C (Baruffini, E., Lodi, T., Dallabona, C., Puglisi, A., Zeviani, M. and Ferrera, I. (2006) Genetic and Chemical rescue of the *Saccharomyces cerevisiae* phenotype induced by mitochondrial DNA polymerase mutations associated with progressive external ophtalmoplegia in humans. Hum. Mol. Genet., 15, 2846 - 2855).

**2.2. Efecto del tosilato de clofilio sobre la producción de colonias *petite* de la cepa de levadura mutante *mip1*<sup>G651S</sup>**

Se mide el efecto del tosilato de clofilio sobre la producción de colonias *petite* en la levadura mutante *mip1*<sup>G651S</sup>.

Los resultados se presentan en la Figura 2.

El tosilato de clofilio reduce la producción de colonias *petite* de la cepa de levadura mutante *mip1*<sup>G651S</sup>.

**2.3. Efecto del tosilato de clofilio sobre la producción de colonias *petite* sobre diferentes mutantes recesivos y dominantes de *mip1* en la levadura**

Se mide el efecto del tosilato de clofilio sobre la producción de colonias *petite* en 8 mutantes recesivos *mip1*:

- H734Y (dominio mutado: polimerasa)
- G259R (dominio mutado: exonucleasa)
- C261R (dominio mutado: exonucleasa)
- P829L (dominio mutado: polimerasa)
- A692T (dominio mutado: polimerasa)
- G651S (dominio mutado: polimerasa)
- R467W (dominio mutado: linker)
- G807R (dominio mutado: polimerasa)

y en 3 mutantes dominantes *mip1*:

- Y757C (dominio mutado: polimerasa)
- K749R (dominio mutado: polimerasa)
- E698G (dominio mutado: polimerasa)

Los resultados se presentan en la Figura 3.

El tosilato de clofilio reduce la producción de células que no respiran, cualquiera que sea el dominio de *MIP1* mutado (exonucleasa, polimerasa o linker) con la excepción de las mutaciones que producen más de un 90 % de colonias *petite*.

**Ejemplo 3: efecto del tosilato de clofilio sobre la fidelidad de los diferentes mutantes de *MIP1* en la levadura**

Una perturbación de la fidelidad de la polimerasa mitocondrial Mip1 puede ser evaluada midiendo la frecuencia de las células resistentes a la eritromicina (Ery<sup>R</sup>). Las mutaciones Ery<sup>R</sup> están causadas por mutaciones en el ARN ribosómico mitocondrial 21S codificado por el ADNmt, que puede ser producido después de la incorporación de un nucleótido malo (Baruffini, E., Lodi, T., Dallabona, C., Puglisi, A., Zeviani, M. and Ferraro, I. (2006) Genetic and Chemical rescue of the *Saccharomyces cerevisiae* phenotype induced by mitochondrial DNA polymerase mutations associated with progressive external ophtalmoplegia in humans. Hum. Mol. Genet., 15, 2846-2855). Una medida de la resistencia a la eritromicina es un medio para medir directamente las mutaciones puntuales en el ADNmt.

Se siembran colonias independientes en 10 ml de medio mínimo (SC-TRP, 2 % de glucosa) en presencia de tosilato de clofilio 32  $\mu$ M o de DMSO hasta la fase estacionaria. Para determinar el número total de células capaces de respirar, se extiende una alícuota de cada cultivo en medio rico YPE (1 % de Yeast Extract, 0,5 % de Bacto Peptone, 2 % de etanol). El resto de los cultivos se extiende sobre medio N1 que contiene 2,5 mg/ml de eritromicina (2 % de peptona, un 1 % de yeast extract, 40 mg/l de adenina, 3 % de etanol, 3 % de glicerol en 25 mM de tampón de fosfato a un pH de 6,5 y complementado con 2,5 g/l de eritromicina (SIGMA)) y se incuban a 28 °C durante 8 días. El experimento se realiza por duplicado. La frecuencia de las mutaciones se calcula como el número de colonias Ery<sup>R</sup> con respecto al número total de colonias (Baruffini, E., Lodi, T., Dallabona, C., Puglisi, A., Zeviani, M. and Ferrera, I. (2006) Genetic and Chemical rescue of the *Saccharomyces cerevisiae* phenotype induced by mitochondrial DNA polymerase mutations associated with progressive external ophtalmoplegia in humans. *Hum. Mol. Genet.*, 15, 2846 - 2855).

Los resultados se presentan en la Figura 4.

El tosilato de clofilio no tiene ningún efecto sobre la fidelidad de los diferentes mutantes de levadura de *MIP1*.

#### **Ejemplo 4: efecto del tosilato de clofilio y de la disponibilidad de los dNTP sobre la estabilidad del ADNmt de los mutantes de levadura *mip1*<sup>G651S</sup> y *mip1*<sup>A692T</sup>**

La delección del gen *SML1* que codifica el inhibidor de la *RNR1* (reductasa de ribonucleótido-difosfato, enzima limitante de la ruta sintética de los dNTP) es conocida por ser un supresor genético de la inestabilidad del ADNmt debido a las mutaciones en el gen *MIP1* (Wang PJ, Chabes A, Casagrande R, Tian XC, Thelander L and Huffaker TC. (1997) Rnr4p a novel ribonucleotide reductase small-subunit protein. *Mol Cell Biol*, 17, 6114-6121).

Se determina la frecuencia de colonias *petite* para las cepas *mip1*<sup>G651S</sup> y *mip1*<sup>A692T</sup> delecionadas o no para el gen *SML1* y en presencia de tosilato de clofilio 32  $\mu$ M o de DMSO.

A partir de precultivos en medio selectivo (SC-TRP, 2 % de etanol (v/v)) de las cepas *mip1* mutadas, se siembran 2.10<sup>5</sup> células/ml en 2 ml de medio rico YPD en presencia de tosilato de clofilio 32  $\mu$ M o de DMSO, después se incuban a 28 °C durante 24 horas. A continuación las células se diluyen para tener aproximadamente entre 200 y 250 células por placa y se extienden sobre medio sintético diferencial (SC-TRP, 0,3 % de glucosa, 2 % de etanol). El número de colonias *petite* se calcula después de 5 días de incubación a 28 °C.

Los resultados se presentan en la Figura 5.

El tosilato de clofilio y la disponibilidad de los dNTP (debida a la delección del gen *SML1*) tienen un efecto aditivo sobre la estabilidad del ADNmt de los mutantes de levadura *mip1*<sup>G651S</sup> y *mip1*<sup>A692T</sup>.

#### **Ejemplo 5: efecto del tosilato de clofilio sobre la respiración de las células de levadura**

La intensidad respiratoria es la cantidad de oxígeno consumido por unidad de tiempo y de materia biológica. Refleja la actividad del metabolismo oxidativo de las células.

El consumo de oxígeno en células enteras se mide con ayuda de un electrodo HANSATECH. Las células de levadura que expresan el gen natural *MIP1* o el gen mutado *mip1*<sup>G651S</sup> se cultivan durante 7-8 generaciones en un medio YPE (1 % de Yeast Extract, 0,5 % de Bacto Peptone, 2 % de etanol) complementado con DMSO o con tosilato de clofilio 32  $\mu$ M a 28 °C con agitación. Se centrifuga un volumen correspondiente a un total de 60 unidades de DO<sub>600</sub> de cada cultivo durante 5 min a 3.000 g. El sedimento se resuspende en YPE con el fin de obtener 6.10<sup>5</sup> células/ $\mu$ l. Se introducen 50  $\mu$ l, es decir, 3.10<sup>7</sup> células, en la cámara de medición del electrodo HANSATECH que se mantiene a 28 °C. Se observa el consumo de O<sub>2</sub> y se registra en tiempo real. La velocidad del consumo de O<sub>2</sub> se calcula a partir de la parte lineal de la curva de consumo de O<sub>2</sub>.

Los resultados se presentan en la Figura 6.

Las células de levadura tratadas con el tosilato de clofilio respiran mejor.

#### **Ejemplo 6: efecto del tosilato de clofilio sobre la cantidad de proteínas Mip1 naturales o Mip1G651S mutadas de levadura**

El análisis del efecto de tosilato de clofilio sobre la cantidad de proteínas Mip1 naturales o mutadas se lleva a cabo sobre extractos celulares enriquecidos en mitocondrias. Con el fin de visualizar la expresión de las proteínas Mip1 y Mip1G651S, se ha clonado la secuencia que codifica tres epítomos HA en 3' y en fase con la secuencia codificante de la Mip1 y de la Mip1G651S.

Las células de levadura se ponen en cultivo en medio selectivo (SC-TRP, 2 % de etanol) durante una noche. Después, las células se siembran a una densidad óptica (DO<sub>600</sub>) inicial de 0,05 en 100 ml de YPE (1 % de Yeast Extract, 0,5 % de Bacto Peptone, 2 % de etanol) complementado bien con DMSO o bien con tosilato de clofilio 32  $\mu$ M a 28 °C con

agitación hasta una  $DO_{600}$  comprendida entre 3 y 4. Las células se centrifugan a 3.000 g durante 5 min y se lavan con agua. El aislamiento de la fracción enriquecida en mitocondrias y la extracción proteica de esta fracción se llevan a cabo según el protocolo descrito por Hoffman y col., 2009 (Hofmann, L., Saunier, R., Cossard, R., Esposito, M., Rinaldi, T. and Delahodde, A. (2009) A non-proteolytic proteasome activity controls organelle fission in yeast. *J. Cell. Sci.*, 122, 3673-3682).

Los extractos proteicos de las fracciones enriquecidas en mitocondrias son analizados mediante una electroforesis en gel de SDS/PAGE al 6 % para el análisis de las proteínas Mip1-HA y Mip1G651S-HA, y al 10 % para el análisis de las proteínas mitocondriales Cox2 (codificada por el ADNmt) y porina. Después de la separación en gel de poliacrilamida, las proteínas son transferidas sobre una membrana de nitrocelulosa. Después de la saturación de las membranas mediante una solución de leche desnatada al 5 % (p/v), las membranas se incuban durante una hora con agitación en presencia de los correspondientes anticuerpos primarios (proteína Mip1:anti-HA diluidas a 1/5.000, proteína Cox2:anti-Cox2 diluidas a 1/500, porina:anti-porina diluidas a 1/25.000). Después de lavar con tampón TBS, las membranas se incuban durante una hora en presencia de los anticuerpos secundarios acoplados a la peroxidasa *horseradish* (HRP) diluidos a 1/5.000. Después, las membranas se lavan de nuevo con tampón TBS. Las proteínas se lavan a continuación de nuevo con la ayuda del Kit de detección de la actividad de la peroxidasa *ECL<sup>Plus</sup>* de GE Healthcare.

Los resultados se presentan en la Figura 7.

La cantidad de proteína Mip1 natural o de Mip1G651S mutada de levadura está aumentada en presencia del tosilato de clofilio.

#### **Ejemplo 7: determinación de la concentración no tóxica de tosilato de clofilio (MIC, *Minimum Inhibitory Concentration*) en el nematodo *Caenorhabditis elegans***

Se prepara una serie de placas NGM que contienen tosilato de clofilio a unas concentraciones de 1  $\mu$ M, de 5  $\mu$ M, de 10  $\mu$ M, de 50  $\mu$ M, de 100  $\mu$ M o de 200  $\mu$ M (tres placas para cada concentración). Se depositan entre 30 y 40 larvas L1 sincronizadas de las líneas naturales N2 BRISTOL o mutada VC1224 (polg-1 (ok1548 $\Delta$ /+)/mT1 II; +/-mT1 [dpy-10(e128)]II), nematodos que portan una delección heterocigota de 2149 bp en la secuencia codificante del gen polg-1, sobre cada una de estas placas. Se observa su desarrollo durante 4 días.

Los resultados se presentan en la Figura 8.

Para la línea natural, se observa una detención del desarrollo en el estadio L3 o una ralentización del desarrollo a 100  $\mu$ M de tosilato de clofilio, lo que indica que la concentración máxima que se puede utilizar es de 50  $\mu$ M. Para la cepa polg-1 (ok1548 $\Delta$ /+), las larvas se desarrollan de una forma similar para las concentraciones que varían entre 1  $\mu$ M y 50  $\mu$ M de tosilato de clofilio. La concentración de tosilato de clofilio elegida para los futuros experimentos con el nematodo es de 50  $\mu$ M

#### **Ejemplo 8: efecto del tosilato de clofilio sobre la resistencia de los nematodos polg-1 haploinsuficientes polg-1 (ok1548 $\Delta$ /+) al bromuro de etidio**

El bromuro de etidio es un agente intercalante del ADN, y más especialmente del ADNmt, rico en adenina y timidina. A una concentración elevada, induce una parada del desarrollo en el estadio L3 de los gusanos (Addo, M. G., Cossard, R., Pichard, D., Obiri-Danso, K., Rotig, A. and Delahodde, A. (2010) *Caenorhabditis elegans*, a pluricellular model organism to screen new genes involved in mitochondrial genome maintenance. *BBA-Mol. Basis Dis.*, 1802, 765 - 773). Los nematodos TB2143 polg-1 (ok1548 $\Delta$ /+) haploinsuficientes son muy sensibles a unas dosis bajas de bromuro de etidio (30  $\mu$ g/ml), con un 90 % de las larvas paradas en el estadio L3.

##### **8.1. Prueba de resistencia al bromuro de etidio**

Se deposita una treintena de larvas sincronizadas en el estadio L1 naturales o mutadas en polg-1 (línea TB2143 polg-1 (ok1548 $\Delta$ /+)) sobre placas NGM que contienen 30  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio y bien DMSO o bien tosilato de clofilio 50  $\mu$ M (el experimento se realiza por triplicado). Se analizó el desarrollo larvario después de 4 días de tratamiento.

Los resultados se presentan en la Figura 9.

El tosilato de clofilio provoca una resistencia adquirida de los nematodos haploinsuficientes polg-1 (ok1548 $\Delta$ /+) al bromuro de etidio.

##### **8.2. Dosis respuesta del tosilato de clofilio sobre la resistencia de los nematodos haploinsuficientes polg-1 (ok1548 $\Delta$ /+) al bromuro de etidio**

Se deposita una treintena de larvas sincronizadas en el estadio L1 mutadas en polg-1, línea TB2143 polg-1 (ok1548 $\Delta$ /+), sobre placas NGM que contienen 30  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio y bien DMSO o bien diferentes concentraciones de tosilato de clofilio: 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 50  $\mu$ M (experimento realizado por triplicado). Se analizó

el desarrollo larvario después de 4 días de tratamiento.

La curva de dosis-respuesta se proporciona en la Figura 10.

- 5 La dosis-respuesta del tosilato de clofilio se determina otra vez según el mismo modo operativo, con unas concentraciones de tosilato de clofilio de 0,1  $\mu\text{M}$ , de 0,5  $\mu\text{M}$ , de 1  $\mu\text{M}$ , de 5  $\mu\text{M}$ , de 10  $\mu\text{M}$  y de 50  $\mu\text{M}$ .

Los resultados se presentan en la Figura 18.

10 **8.3. Dosis respuesta de la quinidina (control negativo) sobre la resistencia de los nematodos haploinsuficientes *polg-1* (*ok1548 $\Delta$ /+*) al bromuro de etidio**

15 Se deposita una treintena de larvas sincronizadas en el estadio L1 mutadas en *polg-1*, línea TB2143 *polg-1* (*ok1548 $\Delta$ /+*), sobre placas NGM que contienen 30  $\mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio y bien DMSO o bien diferentes concentraciones de quinidina, un antiarrítmico de clase 1: 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  y 300  $\mu\text{M}$  (experimento realizado por triplicado). Se analizó el desarrollo larvario después de 4 días de tratamiento.

La curva de dosis-respuesta se proporciona en la Figura 11.

20 **Ejemplo 9: efecto del tosilato de clofilio sobre el número de huevos depositados y eclosionados de los nematodos homocigotos TB2143 *polg-1* ( $\Delta/\Delta$ )**

25 Se depositan cuatro larvas en el estadio L4 TB2143 *polg-1* (*ok1548 $\Delta$ / $\Delta$* ) homocigotas sobre cada placa NGM que contiene bien DMSO o bien tosilato de clofilio 50  $\mu\text{M}$  (tres placas para cada grupo de tratamiento). Se incuban a 20 °C hasta el estadio adulto. Cada 9 a 12 horas, y esto durante entre 6 y 7 días, hasta la ausencia de huevos en el útero, los adultos son desplazados sobre nuevas placas que contienen DMSO o tosilato de clofilio 50  $\mu\text{M}$ , y se cuenta el número de huevos depositados. Se hace un seguimiento de cada puesta hasta el día siguiente para el recuento de la eclosión.

30 Los resultados se presentan en la Figura 12.

El tosilato de clofilio aumenta el número de huevos depositados y la eclosión de los embriones de los nematodos homocigotos TB2143 *polg-1* ( $\Delta/\Delta$ ).

35 **Ejemplo 10: efecto del tosilato de clofilio sobre la extrusión de las gónadas y/o del intestino de los nematodos homocigotos**

40 Se depositan diez larvas en el estadio L4 TB2143 *polg-1* (*ok1548 $\Delta$ / $\Delta$* ) homocigotas sobre cada placa NGM que contiene bien DMSO o bien tosilato de clofilio 50  $\mu\text{M}$  (tres placas por cada grupo de tratamiento) y se incuban a 20 °C. Se hace un seguimiento de su supervivencia hasta el 7º día del adulto. Se cuenta el número de animales muertos que no responden a ninguna estimulación y que presentan una extrusión del intestino y/o de las gónadas. Los raros animales muertos por deshidratación en el borde de las placas de Petri son excluidos del análisis.

45 Los resultados se presentan en la Figura 13.

El tosilato de clofilio reduce la muerte prematura de los nematodos homocigotos por extrusión de las gónadas y/o del intestino.

50 **Ejemplo 11: efecto del tosilato de clofilio sobre la cantidad de ADNmt de los nematodos homocigotos TB2143 *polg-1* (*ok1548 $\Delta$ / $\Delta$* ) deplecionados en ADNmt**

55 Se depositan diez larvas en el estadio L4 TB2143 *polg-1* (*ok1548 $\Delta$ / $\Delta$* ) homocigotas o naturales sobre cada placa NGM que contiene bien DMSO o bien tosilato de clofilio 50  $\mu\text{M}$  (tres placas por cada grupo de tratamiento). Se incuban a 20 °C hasta el 6º día del adulto. La extracción de los ADN totales de los nematodos se lleva a cabo con el kit *Nucleospin Kit Tissue* (Macherey Nagel). Las cuantificaciones del ADNmt y del ADN nuclear se llevan a cabo como se describe en Addo et al., 2010 (Addo, M. G., Cossard, R., Pichard, D., Obiri-Danso, K., Rotig, A. and Delahodde, A. (2010) *Caenorhabditis elegans*, a pluricellular model organism to screen new genes involved in mitochondrial genome maintenance. *BBA-Mol. Basis Dis.*, 1802, 765 - 773).

60 Los resultados se presentan en la Figura 14 y en la Tabla 1.

65 **Tabla 1:** proporción entre la cantidad de ADNmt y la cantidad de ADN nuclear por nematodo natural N2 BRISTOL tratado con DMSO y por nematodo homocigoto TB2143 *polg-1* (*ok1548 $\Delta$ / $\Delta$* ) tratado bien con DMSO o bien con tosilato de clofilio 50  $\mu\text{M}$  (CLOF).



genotipo	tratamiento	ADNmt/ADNnu
natural (N2)	DMSO	488,9
polg-1 (ok1548 $\Delta/\Delta$ )	DMSO	11,2
polg-1 (ok1548 $\Delta/\Delta$ )	CLOF	69,2

El tosilato de clofilio aumenta la cantidad de ADNmt de los nematodos homocigotos TB2143 polg-1 (ok1548 $\Delta/\Delta$ ) deplecionados en ADNmt.

5 **Ejemplo 12: determinación de la concentración máxima no tóxica de tosilato de clofilio en cultivos de fibroblastos de control y de fibroblastos de un paciente con una mutación en cada alelo del gen POLG**

10 Los fibroblastos cutáneos de control y del paciente se cultivan en DMEM Galactosa (DMEM desprovisto de glucosa (Life Technologies) complementado con 10 mM de galactosa, un 10 % de suero bovino fetal, 200 U/ml de penicilina, 200 U/ml de estreptomycin). Se añaden uridina (50  $\mu\text{g/ml}$ ) y piruvato de sodio (2,5 mM) al medio de cultivo con el fin de mantener las células que expresan un déficit de la cadena respiratoria. Las células se incuban en una atmósfera controlada a 37 °C y un 5 % de CO<sub>2</sub>.

15 La proliferación celular de los fibroblastos del paciente y de control se mide de forma continuada durante 140 h mediante la utilización de un autómata xCELLigence (ACEA Biosciences) en placas de 96 pocillos. La señal del ruido de fondo se mide con 50  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo por pocillo. A continuación se añaden 50  $\mu\text{l}$  de medio que contienen 1350 fibroblastos en cada pocillo. La medición de la impedancia se le lleva a cabo cada minuto durante 9 h, y después cada 15 minutos hasta el fin del análisis.

20 El tosilato de clofilio se diluye en DMSO al 0,1 % y se utiliza a diferentes concentraciones (2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ) en un volumen total de 50  $\mu\text{l}$ . La determinación de las concentraciones tóxicas de tosilato de clofilio se llevó a cabo añadiendo la droga desde la siembra de las células. Para cada concentración de droga y cada control, el análisis se lleva a cabo por triplicado sobre placas de 96 pocillos. Un algoritmo matemático permite la conversión de la señal de la impedancia en índice celular (IC). Este índice es proporcional al número de células que se adhieren al fondo de los pocillos, así como a su forma.

25 Los resultados se presentan en la Figura 15.

30 La concentración máxima de tosilato de clofilio autorizada sobre los cultivos de fibroblastos de control y del paciente con una mutación en cada alelo del gen POLG es de 2,5  $\mu\text{M}$ .

**Ejemplo 13: efecto del tosilato de clofilio sobre la cantidad de ADNmt en los fibroblastos de un paciente con una mutación en cada alelo del gen POLG cultivados en condiciones de proliferación celular**

35 Se cultivan fibroblastos cutáneos de control y del paciente hasta un 100 % de confluencia en un medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) con un alto contenido en glucosa completo (4,5 g/l de D-glucosa, 110 mg/l de piruvato de sodio, un 10 % de suero bovino fetal, un 1 % de penicilina/estreptomycin a partir de la solución madre de penicilina de 10.000 UI y de estreptomycin de 10.000  $\mu\text{g/ml}$ ) a 37 °C bajo un 5 % de CO<sub>2</sub>. En la confluencia, los cultivos se tratan con tripsina y se renuevan en un cultivo al 30 % de confluencia en un medio DMEM con un alto contenido en glucosa completo suplementado bien con un 0,1 % de DMSO o bien con 2,5  $\mu\text{M}$  de tosilato de clofilio. Se incuban a 37 °C bajo un 5 % de CO<sub>2</sub> y se recogen al 100 % de confluencia. Los ADN totales de los fibroblastos se extraen mediante el método del fenol-cloroformo y la cuantificación de los ADNmt y del ADN nuclear se lleva a cabo mediante una qPCR como se describe en Sarzi y col., 2007 (Sarzi, E., Bourdon, A., Chrétien, D., Zarhrate, M., Coreos, J., Slama, A., Cormier-Daire, V., De Lonlay, P., Munnich, A. and Rötig, A. (2007) Mitochondrial DNA Depletion is a Prevalent Cause of Multiple Respiratory Chain Deficiency in Childhood. *J Pediatr*, 105, 531 - 534).

45 Los resultados se presentan en la Figura 16.

50 En unas condiciones de proliferación celular, el tosilato de clofilio aumenta ligeramente la cantidad de ADNmt en los fibroblastos del paciente con una mutación en cada alelo del gen POLG.

55 Se mide el efecto del tosilato de clofilio sobre la cantidad de ADNmt en los fibroblastos de un paciente con una mutación en cada alelo del gen POLG en condiciones de proliferación celular cultivados en un medio DMEM glucosa completo o galactosa completo una segunda vez. Los fibroblastos cutáneos de control y del paciente se cultivan hasta un 100 % de confluencia en un medio DMEM glucosa completo o galactosa completo (4,5 g/l de D-glucosa o 4,5 g/l de D-galactosa, 110 mg/l de piruvato de sodio, un 10 % de suero bovino fetal, un 1 % de penicilina/estreptomycin a partir de la solución madre de penicilina de 10.000 UI y de estreptomycin de 10.000  $\mu\text{g/ml}$ ) a 37 °C bajo un 5 % de CO<sub>2</sub>. En la confluencia, los cultivos se tratan con tripsina y se renuevan en un cultivo al 30 % de confluencia en un medio DMEM glucosa completo o galactosa completo complementado bien con un 0,1 % de DMSO o bien con tosilato de clofilio 2,5  $\mu\text{M}$ . se incuban a 37 °C bajo un 5 % de CO<sub>2</sub> y se recogen al 100 % de confluencia. Los ADN totales de los

60

fibroblastos se extraen mediante el método del fenol-cloroformo y la cuantificación de los ADNmt y del ADN nuclear se lleva a cabo mediante una qPCR como se describe en Sarzi y col., 2007 (Sarzi, E., Bourdon, A., Chrétien, D., Zarhrate, M., Coreos, J., Slama, A., Cormier-Daire, V., De Lonlay, P., Munnich, A. and Rötig, A. (2007) Mitochondrial DNA Depletion is a Prevalent Cause of Multiple Respiratory Chain Deficiency in Childhood. *J Pediatr*, 105, 531 - 534).

5 **Ejemplo 14: efecto del tosilato de clofilio sobre la cantidad de ADNmt de los fibroblastos de un paciente con una mutación en cada alelo del gen POLG cultivados en condiciones de quiescencia**

10 Se cultivan fibroblastos cutáneos de control y del paciente hasta un 100 % de confluencia en DMEM a 37 °C bajo un 5 % de CO<sub>2</sub>. Al 100 % de confluencia, los fibroblastos se lavan con PBS y se añade el medio quiescente (4,5 g/l de D-glucosa, 110 mg/l de piruvato de sodio, un 0,1 % de suero bovino fetal, un 1 % de penicilina/estreptomicina a partir de la solución madre de penicilina de 10.000 UI y de estreptomicina de 10.000 µg/ml). Después de cuatro días en medio quiescente, se añaden el tosilato de clofilio 1 µM o el DMSO (0,1 %) al medio de cultivo. El tratamiento se lleva a cabo durante 18 días cambiando el medio de cultivo con o sin tosilato de clofilio cada tres días. Los fibroblastos se recogen cada 6 días y el ADN total se extrae con fenol-cloroformo. El ADNmt y el ADN nuclear se cuantifica mediante una qPCR (Sarzi, E., Bourdon, A., Chrétien, D., Zarhrate, M., Coreos, J., Slama, A., Cormier-Daire, V., De Lonlay, P., Munnich, A. and Rötig, A. (2007) Mitochondrial DNA Depletion is a Prevalent Cause of Multiple Respiratory Chain Deficiency in Childhood. *J Pediatr*, 105, 531 - 534).

20 Los resultados se presentan en la Figura 17.

El tosilato de clofilio aumenta la cantidad de ADNmt de los fibroblastos del paciente con una mutación en cada alelo del gen POLG en condiciones de quiescencia.

25 El efecto del tosilato de clofilio sobre la cantidad de ADNmt de los fibroblastos de un paciente con una mutación en cada alelo del gen POLG en condiciones de quiescencia se mide una segunda vez según el mismo modo operativo.

30 **Ejemplo 15: dosis-respuesta de la ibutilida sobre la resistencia de los nematodos haploinsuficientes polg-1 (ok1548Δ/+) al bromuro de etidio**

Se preparan placas NGM complementadas con 30 µg/ml de bromuro de etidio y DMSO o 1 µM, 5 µM, 10 µM o 50 µM de hemifumarato de ibutilida (tres placas por cada grupo de tratamiento). Se depositan entre 30 y 40 larvas de la cepa TB2143 polg-1 (ok1548Δ/+) sincronizadas en el estadio L1 sobre cada una de estas placas. Su desarrollo se observa durante 4 días.

35 Los resultados se presentan en la Figura 19.

40 **Ejemplo 16: dosis-respuesta de la dofetilida sobre la resistencia de los nematodos haploinsuficientes polg-1 (ok1548Δ/+) al bromuro de etidio**

Se preparan placas NGM complementadas con 30 µg/ml de bromuro de etidio y DMSO o 1 µM, 5 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM o 200 µM de dofetilida o 50 µM de tosilato de clofilio (tres placas por cada grupo de tratamiento). Se depositan entre 30 y 40 larvas de la cepa TB2143 polg-1 (ok1548Δ/+) sincronizadas en el estadio L1 sobre cada una de estas placas. Su desarrollo se observa durante 4 días.

45 Los resultados se presentan en la Figura 20.

50 **Ejemplo 17: efecto del tosilato de clofilio sobre la producción de colonias *petite* de la cepa de levadura mutante  $\Delta fis1$**

El efecto del clofilio es evaluado según el mismo modo operativo que para el Ejemplo 2 con las levaduras mutantes  $\Delta fis1$ .

55 Los resultados se presentan en la Figura 21.

El producto del gen *FIS1*, implicado en el proceso de fisión de las mitocondrias, interviene en el mecanismo de acción del tosilato de clofilio.

60 **Ejemplo 18: aumento de la dosis-respuesta del tosilato de clofilio sobre la cantidad de ADNmt de los fibroblastos de un paciente con una mutación en cada alelo del gen POLG cultivados en condiciones de quiescencia**

Se cultivan fibroblastos cutáneos de control y del paciente hasta un 100 % de confluencia en DMEM a 37 °C bajo un 5 % de CO<sub>2</sub>. Al 100 % de confluencia, los fibroblastos se lavan con PBS y se añade el medio quiescente (4,5 g/l de D-glucosa, 110 mg/l de piruvato de sodio, un 0,1 % de suero bovino fetal, un 1 % de penicilina/estreptomicina a partir de la solución madre de penicilina de 10.000 UI y de estreptomicina de 10.000 µg/ml). Después de cuatro días en medio

65

quiescente, se añade el tosilato de clofilio 30 nM, 100 nM, 300 nM o 1  $\mu$ M o el DMSO (0,1 %) al medio de cultivo. El tratamiento se lleva a cabo durante 18 días cambiando el medio de cultivo con o sin tosilato de clofilio cada tres días. Los fibroblastos se recogen cada 6 días y el ADN total se extrae con fenol-cloroformo. El ADNmt y el ADN nuclear se cuantifican mediante una qPCR (Sarzi, E., Bourdon, A., Chrétien, D., Zarhrate, M., Coreos, J., Slama, A., Cormier-Daire, V., De Lonlay, P., Munnich, A. and Rötig, A. (2007) Mitochondrial DNA Depletion is a Prevalent Cause of Multiple Respiratory Chain Deficiency in Childhood. *J Pediatr*, 105, 531 - 534).

**Ejemplo 19: efecto del tosilato de clofilio sobre la cantidad de ADNmt de los fibroblastos de otro paciente con mutaciones diferentes en cada alelo del gen POLG cultivados en condiciones de quiescencia**

Se cultivan fibroblastos cutáneos de control y del paciente hasta un 100 % de confluencia en DMEM a 37 °C bajo un 5 % de CO<sub>2</sub>. Al 100 % de confluencia, los fibroblastos se lavan con PBS y se añade el medio quiescente (4,5 g/l de D-glucosa, 110 mg/l de piruvato de sodio, un 0,1 % de suero bovino fetal, un 1 % de penicilina/estreptomicina a partir de la solución madre de penicilina de 10.000 UI y de estreptomicina de 10.000  $\mu$ g/ml). Después de cuatro días en medio quiescente, se añade el tosilato de clofilio 1  $\mu$ M o el DMSO (0,1 %) al medio de cultivo. El tratamiento se lleva a cabo durante 18 días cambiando el medio de cultivo con o sin tosilato de clofilio cada tres días. Los fibroblastos se recogen cada 6 días y el ADN total se extrae con fenol-cloroformo. El ADNmt y el ADN nuclear se cuantifican mediante una qPCR (Sarzi, E., Bourdon, A., Chrétien, D., Zarhrate, M., Coreos, J., Slama, A., Cormier-Daire, V., De Lonlay, P., Munnich, A. and Rötig, A. (2007) Mitochondrial DNA Depletion is a Prevalent Cause of Multiple Respiratory Chain Deficiency in Childhood. *J Pediatr*, 105, 531 -534).

**Ejemplo 20: efecto del tosilato de clofilio sobre un modelo de depleción del ADNmt (no debida a una mutación en el gen POLG) con una mutación en el gen ortólogo de OPA1 (eat-3) en *Caenorhabditis elegans*.**

**20.1. Efecto del tosilato de clofilio sobre los fenotipos del gusano homocigoto mutado en el gen eat-3 (eat-3(ad426) II; him-8(e1489) IV): prueba de resistencia al bromuro de etidio**

Se deposita una treintena de larvas sincronizadas en el estadio L1 naturales o mutadas en eat-3 (línea DA631 eat-3(ad426)) sobre placas NGM que contienen diferentes concentraciones de bromuro de etidio (10, 20, 30, 40, 50  $\mu$ g/ml) y bien DMSO o bien tosilato de clofilio 50  $\mu$ M (experimento por triplicado). Se analiza el desarrollo larvario después de 4 días de tratamiento.

**20.2. Efecto del tosilato de clofilio sobre el número de huevos depositados y eclosionados de los nematodos DA631 y sobre su desarrollo**

Se depositan cuatro larvas en el estadio L4 DA631 (eat-3(ad426)) sobre cada placa NGM que contiene bien DMSO o bien tosilato de clofilio 50  $\mu$ M (tres placas por cada grupo de tratamiento). Se incuban a 20 °C hasta el estadio adulto. Cada 9 y 12 horas y esto durante entre 6 y 7 días hasta la ausencia de huevos en el útero, los adultos son desplazados sobre nuevas placas que contienen DMSO o tosilato de clofilio 50  $\mu$ M, y se cuenta el número de huevos depositados. Se hace un seguimiento de cada puesta para el recuento de la eclosión y el desarrollo larvario.

**20.3. Efecto del tosilato de clofilio sobre la cantidad de ADNmt de los nematodos DA631**

Se depositan diez larvas DA631 (eat-3(ad426)) en el estadio L4 o naturales sobre cada placa NGM que contiene bien DMSO o bien tosilato de clofilio 50  $\mu$ M (tres placas por cada grupo de tratamiento). Se incuban a 20 °C hasta el 6º día del adulto. La extracción de los ADN totales de los nematodos se lleva a cabo con el kit *Nucleospin Kit Tissue* (Macherey Nagel). Las cuantificaciones del ADNmt y del ADN nuclear se llevan a cabo como se describe en Addo y col., 2010 (Addo, M. G., Cossard, R., Pichard, D., Obiri-Danso, K., Rotig, A. and Delahodde, A. (2010) *Caenorhabditis elegans*, a pluricellular model organism to screen new genes involved in mitochondrial genome maintenance. *BBA-Mol. Basis Dis.*, 1802, 765-773).

**20.4. Efecto del tosilato de clofilio sobre la morfología mitocondrial de los nematodos DA631**

Se depositan diez larvas DA631 en el estadio L4 o naturales, que expresan la GFP dirigida a las mitocondrias de los músculos locomotores, sobre una placa NGM que contiene bien DMSO o bien tosilato de clofilio 50  $\mu$ M. Se incuban a 20 °C hasta el 3º día del adulto. Después los adultos son anestesiados y se ponen entre hoja y lámina para un examen de la morfología mitocondrial con el microscopio de fluorescencia.

**Ejemplo 21: efecto de la combinación de la administración de resveratrol (antioxidante) y de tosilato de clofilio sobre los fibroblastos de un paciente con una mutación en cada alelo del gen POLG**

**21.1: efecto sobre la proliferación celular**

Los fibroblastos cutáneos de control y del paciente se cultivan en medio DMEM Galactosa (DMEM desprovisto de glucosa (Life Technologies) complementado con 10 mM de galactosa, un 10 % de suero bovino fetal, 200 U/ml de penicilina, 200 U/ml de estreptomicina). Se añaden uridina (50  $\mu$ g/ml) y piruvato de sodio (2,5 mM) al medio de cultivo

con el fin de mantener las células que expresan un déficit de la cadena respiratoria. Las células se incuban en una atmósfera controlada a 37 °C y un 5 % de CO<sub>2</sub>. La proliferación celular de los fibroblastos del paciente y de control se mide de forma continuada durante 140 h mediante la utilización de un autómata xCELLigence (ACEA Biosciences) en placas de 96 pocillos. La señal del ruido de fondo se mide con 50 µl de medio de cultivo por pocillo. A continuación se añaden 50 µl de medio que contiene 1350 fibroblastos en cada pocillo. La medición de la impedancia se lleva a cabo cada minuto durante 9 h, y después cada 15 minutos hasta el fin del análisis. Desde la siembra de las células, se añaden el tosilato de clofilio (< 2 µM) o el resveratrol (< 50 µM) o una combinación de tosilato de clofilio (< 2 µM) y de resveratrol (< 50 µM) o DMSO. Para cada droga o combinación de drogas y cada control, el análisis se lleva a cabo por triplicado en placas de 96 pocillos. Un algoritmo matemático permite la conversión de la señal de la impedancia en índice celular (IC). Este índice es proporcional al número de células que se adhieren al fondo de los pocillos, así como a su forma.

### 21.2: efecto sobre la cantidad de ADNmt

Los fibroblastos cutáneos de control y del paciente se cultivan en medio DMEM Galactosa (DMEM desprovisto de glucosa (Life Technologies) complementado con 10 mM de galactosa, un 10 % de suero bovino fetal, 200 U/ml de penicilina, 200 U/ml de estreptomina). Se añaden uridina (50 µg/ml) y piruvato de sodio (2,5 mM) al medio de cultivo. Las células se incuban en una atmósfera controlada a 37 °C y un 5 % de CO<sub>2</sub>. En la confluencia, los cultivos se tratan con tripsina y se renuevan en un cultivo al 30 % de confluencia en un medio DMEM galactosa completo complementado bien con DMSO al 0,1 %, bien con tosilato de clofilio (< 2 µM), bien con resveratrol (< 50 µM), bien con una combinación de tosilato de clofilio (< 2 µM) y de resveratrol (< 50 µM). Se incuban a 37 °C bajo un 5 % de CO<sub>2</sub> y después se recogen al 100 % de confluencia. Los ADN totales de los fibroblastos se extraen mediante el método del fenol-cloroformo y la cuantificación de los ADNmt y del ADN nuclear se lleva a cabo mediante una qPCR como se describe en Sarzi y col., 2007 (Sarzi, E., Bourdon, A., Chrétien, D., Zarhrate, M., Coreos, J., Slama, A., Cormier-Daire, V., De Lonlay, P., Munnich, A. and Rötig, A. (2007) Mitochondrial DNA Depletion is a Prevalent Cause of Multiple Respiratory Chain Deficiency in Childhood. *J Pediatr*, 105, 531 - 534).

### Ejemplo 22: efecto del tosilato de clofilio sobre la proporción entre las actividades del complejo I / sintasa de citrato y la producción de lactato de los cíbridos neuronales derivados de un paciente con MELAS (m.3243A>G tRNA<sup>leu</sup> mutación)

El aumento en la producción de lactato es un reflejo de la toxicidad de la droga utilizada, pero igualmente de una disfunción mitocondrial (deficiencia energética) presente en el síndrome MELAS.

La actividad de la sintasa de citrato es un marcador de la masa mitocondrial y permite normalizar la actividad del complejo I, que es la primera enzima de la cadena respiratoria mitocondrial, que está significativamente reducida en el síndrome MELAS.

La línea transmitocondrial neuronal mutante MELAS, resultante de la fusión de la línea parental de neuroblastoma inmortalizada SHSY-5Y con fibroblastos portadores de la mutación m.3243A>G ha sido creada en el laboratorio del Pr Procaccio.

Las líneas neuronales cíbridas portadoras de la mutación MELAS y la línea parental de control se cultivan en matraces de cultivo estériles y se introducen en una estufa de incubación a 37 °C con un 5 % de CO<sub>2</sub>, en un medio compuesto de DMEM con 1,5 g/l de glucosa, 2 mM de L-glutamina y complementado con un 10 % de suero bovino fetal, así como con uridina (5 µg/ml) y piruvato (10 µg/ml). Las células se recogen mediante una tripsinización en fase exponencial y se utilizan para los posteriores análisis bioquímicos o moleculares mitocondriales.

Se ha utilizado la línea neuronal cíbrida MELAS portadora de la mutación aparentemente en un estado homoplásmico (es decir, que alcanza casi un 100 % de mutación MELAS) y la línea parental SHSY-5Y de control para las mediciones de las actividades enzimáticas. Los cíbridos neuronales en cultivo a una confluencia de aproximadamente el 50 % se han tratado con el vehículo (DMSO) o con una concentración de 300 nM (CT 300 nM) de tosilato de clofilio. Las células se incuban a continuación a 37 °C bajo un 5 % de CO<sub>2</sub> y se recogen después de 48 horas de tratamiento. Después del tratamiento con tripsina, las células cíbridas se centrifugan y se congelan en unos tubos conservados a -80 °C en forma de sedimentos celulares. Estos sedimentos celulares se analizan a continuación mediante una espectrofotometría con la medición de las diferentes actividades bioquímicas mitocondriales, en particular la actividad de la sintasa de citrato y la actividad del complejo I de la cadena respiratoria. La sintasa de citrato localizada en la matriz mitocondrial cataliza la primera reacción del ciclo de Krebs. La dosis de su actividad se utiliza como un blanco de la cantidad de mitocondrias.

Las actividades enzimáticas del complejo I y de la sintasa de citrato se han medido según el protocolo descrito en Medjda *et al*, 2009 (Medja F, Allouche S, Frachon P, Jardel C, Malgat M, Mousson de Camaret B, Slama A, Lunardi J, Mazat JP, Lombès A. Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion*. 2009 Sep; 9 (5): 331-9).

La concentración de lactato en el medio de cultivo de las células neuronales cíbridas y parentales se ha determinado

mediante una espectrofotometría con la ayuda de un kit enzimático (Bohringer) con un aparato Hitachi-Roche (Roche Diagnostics GmbH). La producción de lactato se ha medido según el protocolo descrito en Desquiret *et al*, 2012 (Desquiret-Dumas V, Gueguen N, Barth M, Chevrollier A, Hancock S, Wallace DC, Amati-Bonneau P, Henrion D, Bonneau D, Reynier P, Procaccio V. Metabolically induced heteroplasmy shifting and L-arginine treatment reduce the energetic defect in a neuronal-like model of MELAS (2012) *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease*. 1822 (6): 1019-29).

Los resultados se presentan en la Figura 22.

El tosilato de clofilio aumenta la actividad del complejo I sin aumentar la producción de lactato para una línea celular cíbrida portadora de la mutación m.3243A>G para el tRNA<sup>leu</sup> responsable del síndrome MELAS.

**Ejemplo 23: efecto de la dosis de ibutilida sobre la proporción entre las actividades del complejo I / sintasa de citrato y la producción de lactato de los cíbridos neuronales derivados de un paciente con MELAS (m.3243A>G tRNA<sup>leu</sup> mutación)**

Se ha utilizado la línea neuronal cíbrida MELAS portadora de la mutación aparentemente en un estado homoplásmico (es decir, que alcanza casi un 100 % de mutación MELAS) y la línea parental SHSY-5Y de control para las mediciones de las actividades enzimáticas. Los cíbridos neuronales en cultivo a una confluencia de aproximadamente el 50 % se han tratado con el blanco (DMSO) o con unas concentraciones de 1  $\mu$ M (ibu 1  $\mu$ M) o de 300 nM (ibu 300 nM) de ibutilida. Las células se incuban a continuación a 37 °C bajo un 5 % de CO<sub>2</sub> y se recogen después de 48 horas de tratamiento. Después del tratamiento con tripsina, las células cíbridas se centrifugan y se congelan en tubos conservados a -80 °C en forma de sedimentos celulares. Estos sedimentos celulares se analizan a continuación mediante una espectrofotometría con la medición de las diferentes actividades bioquímicas mitocondriales, en particular la actividad de la sintasa de citrato y la actividad del complejo I de la cadena respiratoria. La sintasa de citrato localizada en la matriz mitocondrial cataliza la primera reacción del ciclo de Krebs. La dosis de su actividad se utiliza como un blanco de la cantidad de mitocondrias.

Las actividades enzimáticas se han medido según el protocolo descrito en Medjda *et al*, 2009 (Medja F, Allouche S, Frachon P, Jardel C, Malgat M, Mousson de Camaret B, Slama A, Lunardi J, Mazat JP, Lombès A. Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion*. 2009 Sep; 9 (5): 331-9). La producción de lactato se ha medido según el protocolo descrito en Desquiret *et al*, 2012 (Desquiret-Dumas V, Gueguen N, Barth M, Chevrollier A, Hancock S, Wallace DC, Amati-Bonneau P, Henrion D, Bonneau D, Reynier P, Procaccio V. Metabolically induced heteroplasmy shifting and L-arginine treatment reduce the energetic defect in a neuronal-like model of MELAS (2012) *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease*. 1822 (6): 1019-29).

Los resultados se presentan en la Figura 23.

La ibutilida aumenta la actividad del complejo I y disminuye la producción de lactato para una línea celular cíbrida portadora de la mutación m.3243A>G para el tRNA<sup>leu</sup> responsable del síndrome MELAS.

**Ejemplo 24: efecto del tosilato de clofilio sobre la cantidad de proteína POLG en los fibroblastos de control y en los fibroblastos de un paciente con una mutación en cada alelo del gen POLG en condiciones de proliferación celular.**

Las fracciones proteicas de los extractos totales de los fibroblastos de control y de los fibroblastos de un paciente con una mutación en cada alelo del gen POLG cultivados en presencia de DMSO al 0,1 % o con 0,5  $\mu$ M o 1,0  $\mu$ M de tosilato de clofilio son analizadas mediante una electroforesis.

Los fibroblastos cutáneos de control y del paciente se cultivan hasta un 100 % de confluencia en un medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) con un alto contenido en glucosa completo (4,5 g/l de D-glucosa, 110 mg/l de piruvato de sodio, un 10 % de suero bovino fetal, un 1 % de penicilina/estreptomina a partir de la solución madre de penicilina de 10.000 UI y de estreptomina de 10.000  $\mu$ g/ml) a 37 °C bajo un 5 % de CO<sub>2</sub>. En la confluencia, los cultivos se tratan con tripsina y se renuevan en un cultivo al 30 % de confluencia en un medio DMEM con un alto contenido en glucosa completo complementado bien con DMSO al 0,1 % o bien con 0,5  $\mu$ M o 1,0  $\mu$ M de tosilato de clofilio. Las células se incuban a continuación a 37 °C bajo un 5 % de CO<sub>2</sub> y se recogen al 100 % de confluencia. Después del tratamiento con tripsina, las proteínas totales de los fibroblastos son extraídas y analizadas mediante una inmunotransferencia western. Las proteínas estudiadas son la proteína POLG (analizada en un gel de SDS/PAGE al 6 %), las proteínas mitocondriales ATP5B y TFAM así como la proteína citosólica TUB3A como control de carga. Se depositan 45  $\mu$ g de proteínas y, después de la separación, las proteínas son transferidas a una membrana de PVDF y después se revelan para la detección de la actividad de peroxidasa ECL<sup>Plus</sup> con ayuda de anticuerpos primarios y de anticuerpos secundarios acoplados a la peroxidasa horseradish (HRP).

Los resultados se presentan en la figura 24.

El tosilato de clofilio aumenta la cantidad de las proteínas mitocondriales POLG, TFAM y ATP5B.

**Ejemplo 25: dosis respuesta del tosilato de clofilio sobre la cantidad de ADNmt de los fibroblastos de un paciente con una mutación en cada alelo del gen POLG cultivados en condiciones de quiescencia**

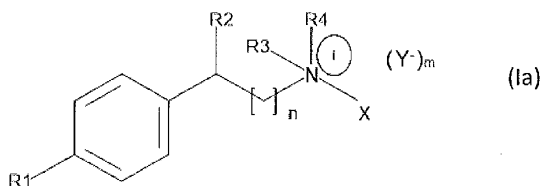
5 Se cultivan fibroblastos cutáneos del paciente hasta un 100 % de confluencia en DMEM a 37 °C bajo un 5 % de CO<sub>2</sub>. Al 100 % de confluencia, los fibroblastos se lavan con PBS y se añade el medio quiescente (4,5 g/l de D-glucosa, 110 mg/l de piruvato de sodio, un 0,1 % de suero bovino fetal, un 1 % de penicilina/estreptomicina a partir de la solución madre de penicilina de 10.000 UI y de estreptomicina de 10.000 µg/ml). Después de cuatro días en medio quiescente, se añade el tosilato de clofilio a 0,5 µM, 1 µM, 2,5 µM o el DMSO (0,1 %) al medio de cultivo. El tratamiento se lleva a cabo durante 18 días cambiando el medio de cultivo con o sin tosilato de clofilio cada tres días. Los fibroblastos se recogen cada 6 días y el ADN total se extrae con fenol-cloroformo. El ADNmt y el ADN nuclear se cuantifican mediante una qPCR (Sarzi, E., Bourdon, A., Chrétien, D., Zarhrate, M., Coreos, J., Slama, A., Cormier-Daire, V., De Lonlay, P., Munnich, A. and Rötig, A. (2007) Mitochondrial DNA Depletion is a Prevalent Cause of Multiple Respiratory Chain Deficiency in Childhood. *J Pediatr*, 105, 531 - 534).

Los resultados se presentan en la Figura 25.

20 El tosilato de clofilio aumenta la cantidad de ADNmt de los fibroblastos del paciente con una mutación en cada alelo del gen POLG en condiciones de quiescencia para unas concentraciones de tosilato de clofilio de 0,5 µM y de 1 µM.

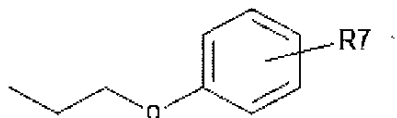
REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula la:



en la que

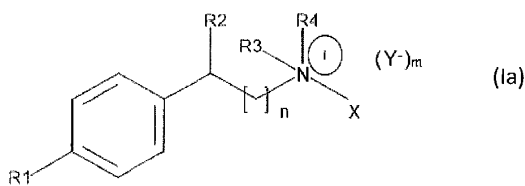
- 5 R<sub>1</sub> representa un átomo de halógeno, particularmente Cl o Br, un grupo alcoxi C1-C4, un grupo alquilo C1-C3 o NHSO<sub>2</sub>R<sub>6</sub>;  
 R<sub>2</sub> representa OH o H;  
 R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> representan independientemente entre sí un grupo alquilo de 1 a 10 átomos de carbono o



- 10 en la que R<sub>7</sub> representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alcoxi C1-C4, un grupo alquilo C1-C3 o NHSO<sub>2</sub>R<sub>6</sub>;  
 R<sub>6</sub> y R<sub>8</sub> representan independientemente entre sí un grupo alquilo C1-C4;  
 -X = -R<sub>5</sub> o el doblete electrónico del nitrógeno que no participa en un enlace, a condición de que i = + cuando -X = -R<sub>5</sub>;  
 15 R<sub>5</sub> representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1-C4;  
 m = 0 o 1, a condición de que m = 1 cuando -X = -R<sub>5</sub> y m = 0 cuando -X = el doblete electrónico del nitrógeno que no participa en un enlace; n = 0, 1, 2 o 3;  
 Y<sup>-</sup> es un anión aceptable en el ámbito terapéutico, en particular Y<sup>-</sup> se elige entre el ion tosilato, el ion carbonato, el ion fosfato y el ion cloruro;

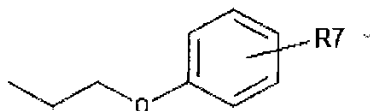
20 para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

2. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula la:

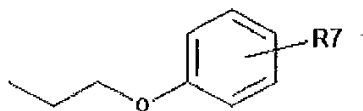


en la que

- 25 R<sub>1</sub> representa Cl, Br o NHSO<sub>2</sub>R<sub>6</sub>; R<sub>2</sub> representa OH o H;  
 R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> representan independientemente entre sí un grupo alquilo de 1 a 10 átomos de carbono o



en la que R<sub>7</sub> representa un átomo de halógeno o NHSO<sub>2</sub>R<sub>6</sub>, con la condición de que R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> no pueden ser simultáneamente



30

R<sub>6</sub> y R<sub>8</sub> representan independientemente entre sí un grupo alquilo C1-C4;

-X = -R<sub>5</sub> o el doblete electrónico del nitrógeno que no participa en un enlace, a condición de que i = + cuando -X = -R<sub>5</sub>;

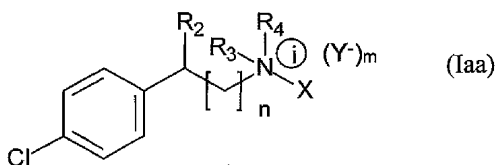
R<sub>5</sub> representa un grupo alquilo C1-C4;

5 m = 0 o 1, a condición de que m = 1 cuando -X = -R<sub>5</sub> y m = 0 cuando -X = el doblete electrónico del nitrógeno que no participa en un enlace; n = 0, 1, 2 o 3;

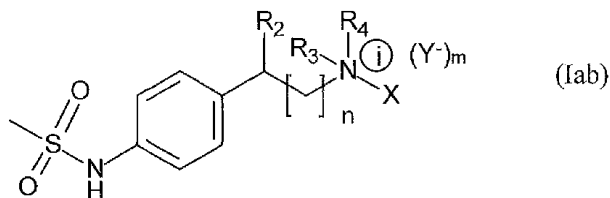
Y<sup>-</sup> se elige entre el ion tosilato, el ion carbonato, el ion fosfato y el ion cloruro;

para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

10 3. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula Iaa:



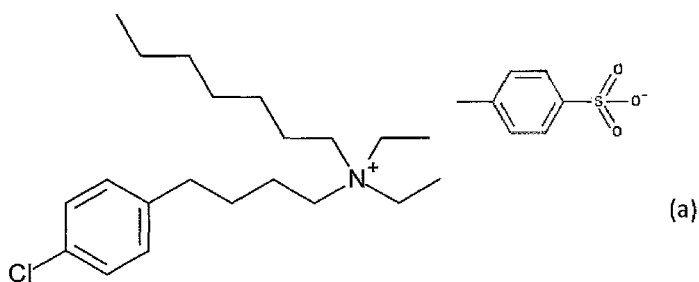
o de fórmula Iab:



15 en las que R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, X, R<sub>5</sub>,  $\textcircled{i}$  Y<sup>-</sup>, m y n, tienen los significados indicados en la reivindicación 1;

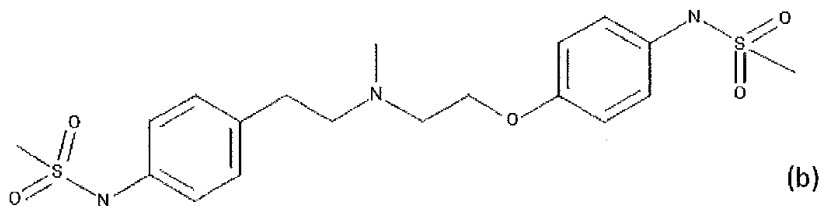
para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

4. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula (a):



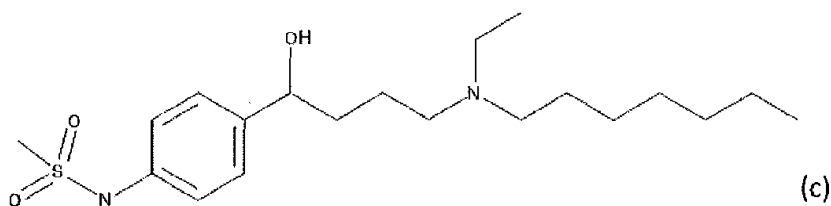
20

o de fórmula (b):



o de fórmula (c):



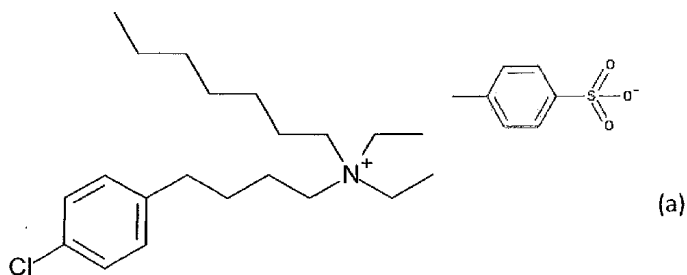


para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

5. Compuesto según la reivindicación 4, que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 30  $\mu\text{g}$  y 6.000 mg, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

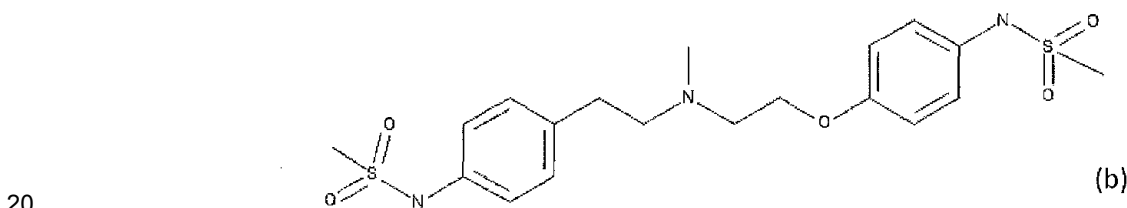
6. Compuesto según la reivindicación 4 o 5, que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 30  $\mu\text{g}$  y 6.000 mg, para una administración por vía oral, o que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 30  $\mu\text{g}$  y 6.000 mg, para una administración por vía intravenosa, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

7. Compuesto según la reivindicación 4, de fórmula (a):



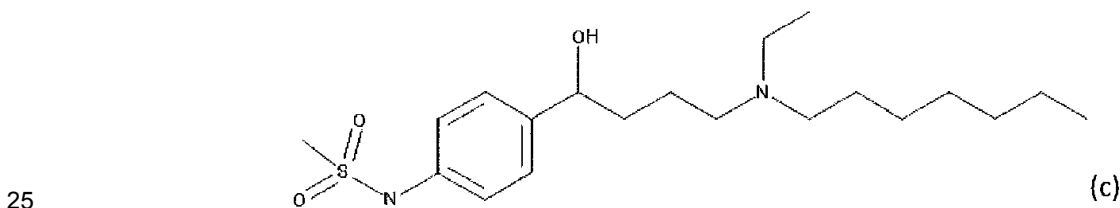
15 que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 1,5 mg y 60 mg para una administración por vía oral, o que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 0,5 mg y 30 mg, para una administración por vía intravenosa, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

8. Compuesto según la reivindicación 4, de fórmula (b):



20 que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 125 y 500  $\mu\text{g}$ , para una administración por vía oral, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

9. Compuesto según la reivindicación 4, de fórmula (c):



25 que se presenta en forma de una dosis unitaria de entre 150 y 2.500  $\mu\text{g}$ , para una administración por vía intravenosa,

para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial.

5 10. Compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 9, para su utilización en el tratamiento o en la prevención de las enfermedades relacionadas con al menos una mutación, o al menos una delección o al menos una inserción, o una combinación de estos elementos, en el gen POLG, o de las enfermedades relacionadas con la inestabilidad del ADN mitocondrial no relacionadas con mutaciones en el gen POLG, o de las enfermedades relacionadas con una depleción o una delección del ADN mitocondrial, o de las enfermedades relacionadas con una mutación puntual del ADN mitocondrial.

11. Compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 9, para su utilización en el tratamiento o en la prevención

10 - de las enfermedades asociadas con unas anomalías cuantitativas o cualitativas del ADN mitocondrial tales como la enfermedad de Alpers (AHS), el espectro de las mio-cerebro-hepatopatías del niño (MCHS), las epilepsias mioclónicas con miopatía y ataxia sensitiva MEMSA (Myoclonic epilepsy myopathy sensory ataxia), la ataxia espinocerebelosa con epilepsia (SCAE), las ataxias con neuropatías que incluyen los síndromes MIRAS y SANDO,  
15 la oftalmoplejia externa progresiva autosómica recesiva (arPEO), la oftalmoplejia externa progresiva autosómica dominante (adPEO), la encefalomiopatía mitocondrial neurogastrointestinal (MN-GIE), el síndrome de Pearson, el síndrome de Kearns-Sayre, la miopatía infantil y la amiotrofia espinal asociadas con mutaciones en el *TK2*, las insuficiencias hepáticas con depleción del ADNmt, las patologías asociadas con las mutaciones de los genes *SUCLA2* y *SUCLAG1*, *RRM2B*, *AIF1*, *MPV17*, o  
20 - de las enfermedades asociadas con mutaciones puntuales del ADN mitocondrial tales como la neuropatía óptica hereditaria de Leber, el síndrome MELAS, el síndrome MERRF y ciertas formas del síndrome de Leigh, de oftalmoplejia externa progresiva crónica, de miopatía, de cardiomiopatía, de diabetes-sordera, de encefalomiopatía y de sordera.

12. Compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 11, para su utilización en el tratamiento o en la prevención del síndrome MELAS.

25

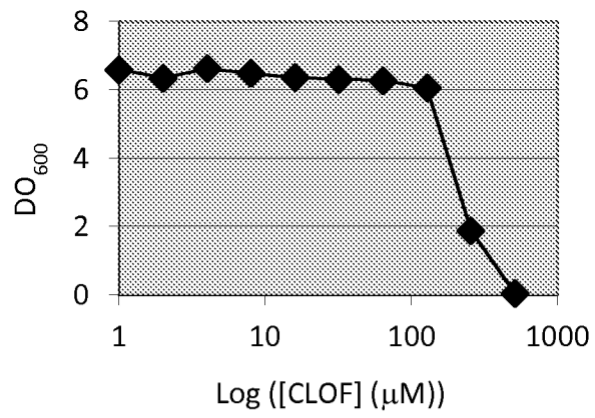


Figura 1

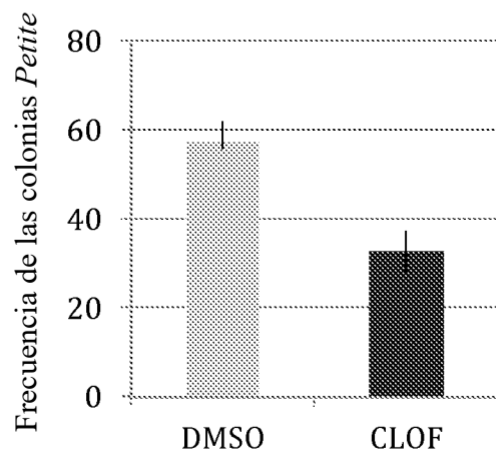


Figura 2

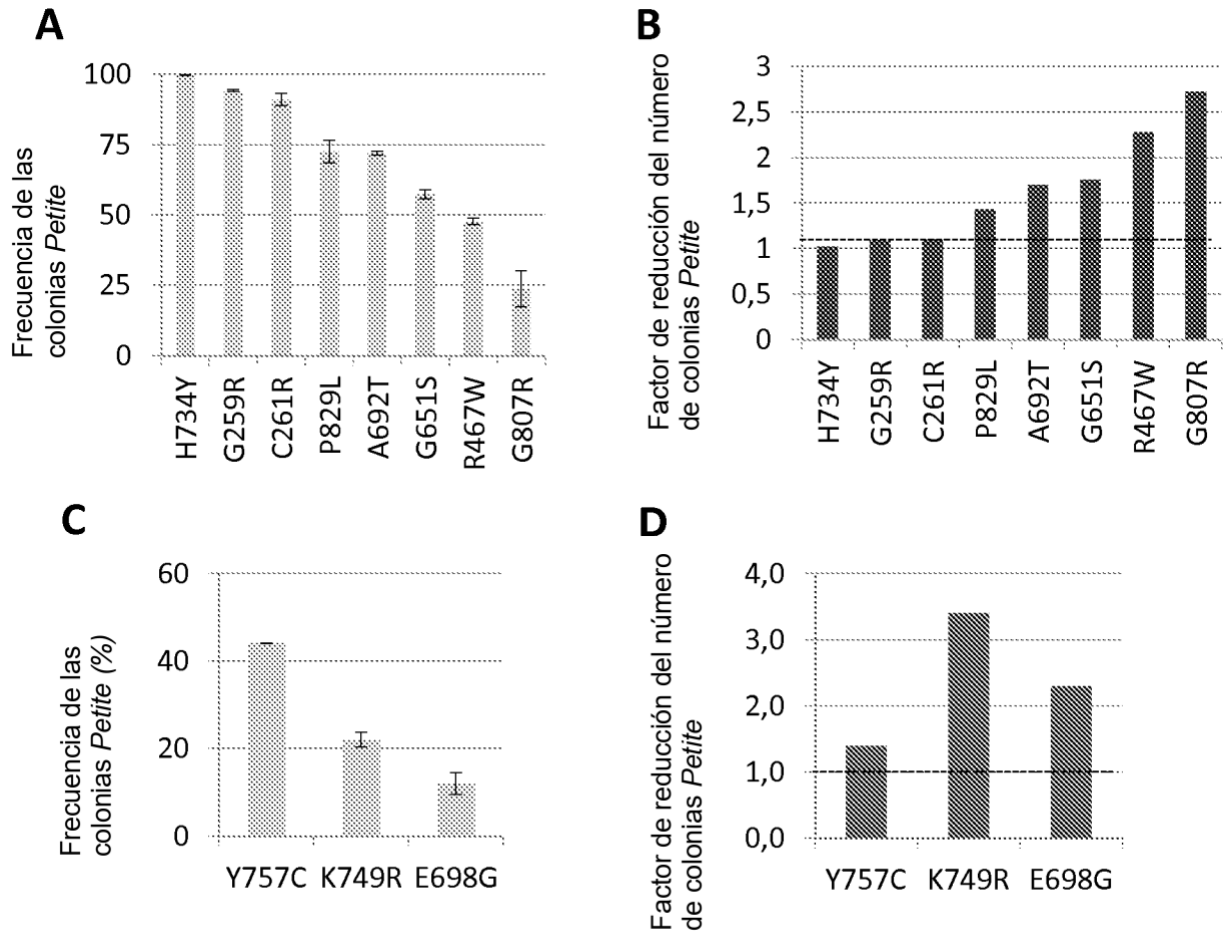


Figura 3

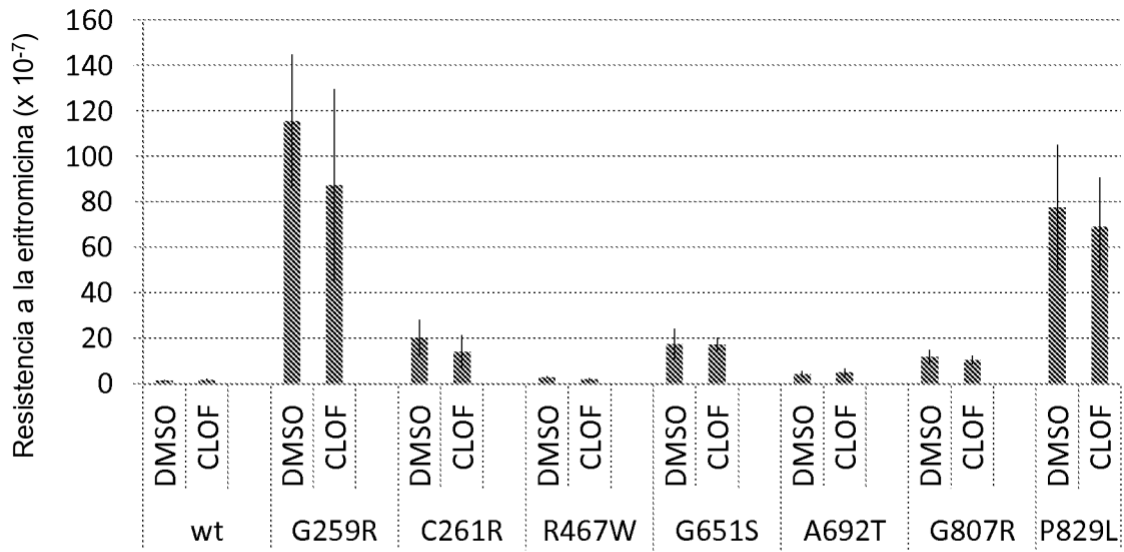


Figura 4

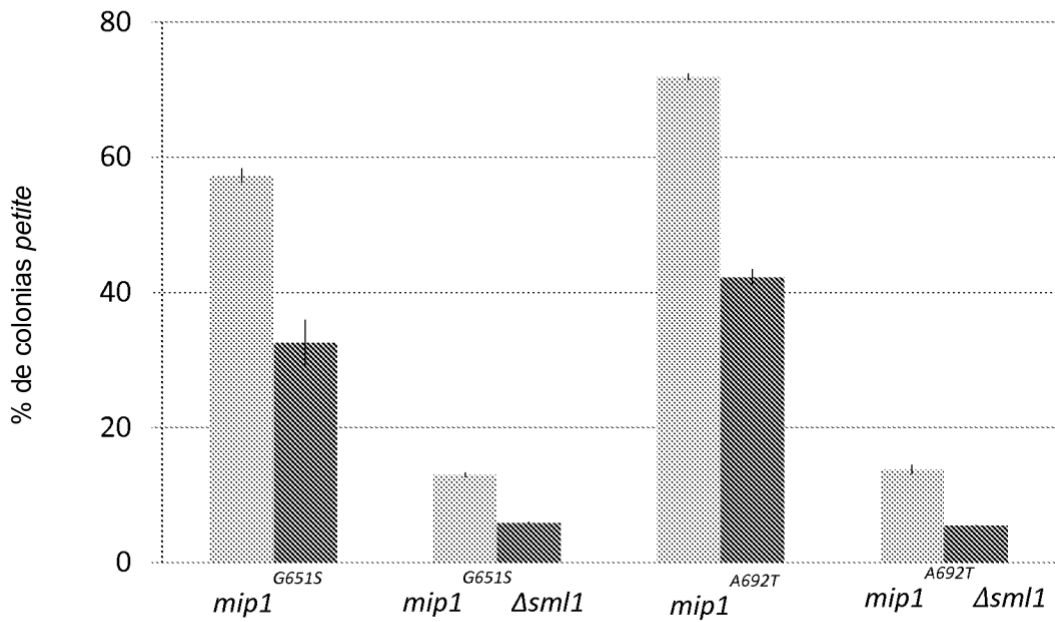


Figura 5

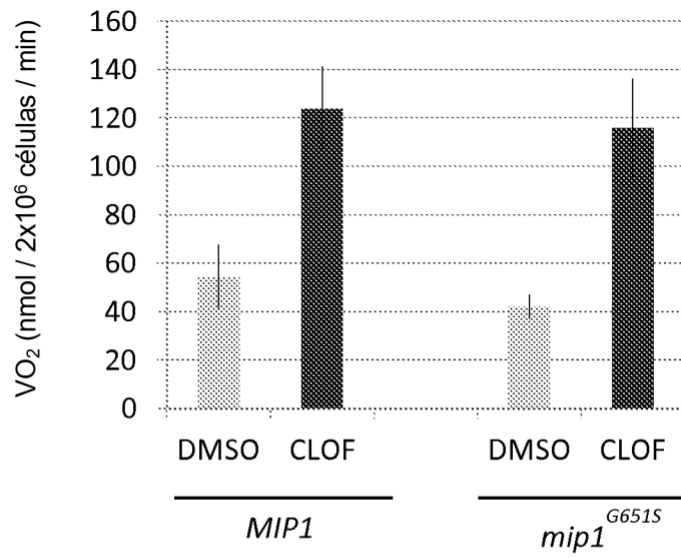


Figura 6

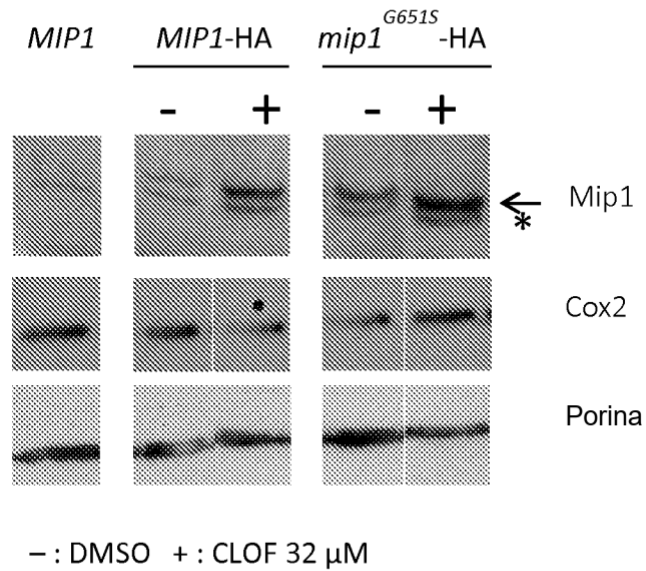


Figura 7

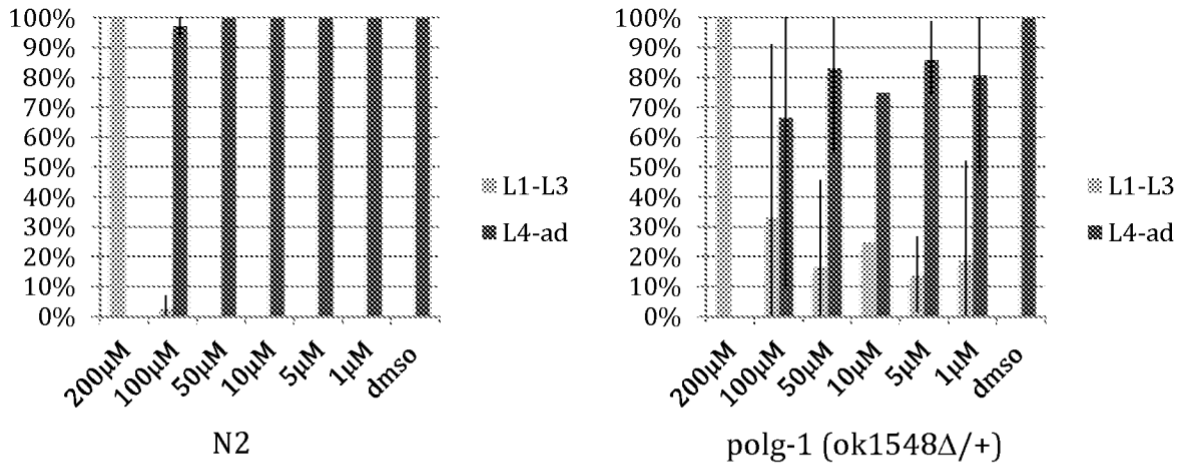


Figura 8

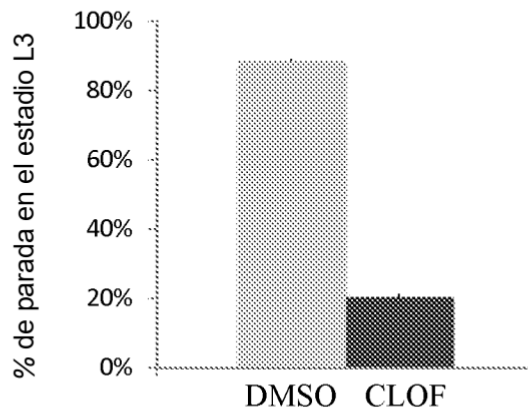
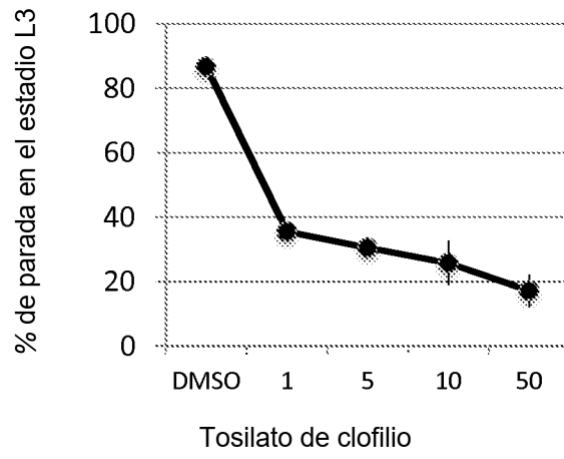
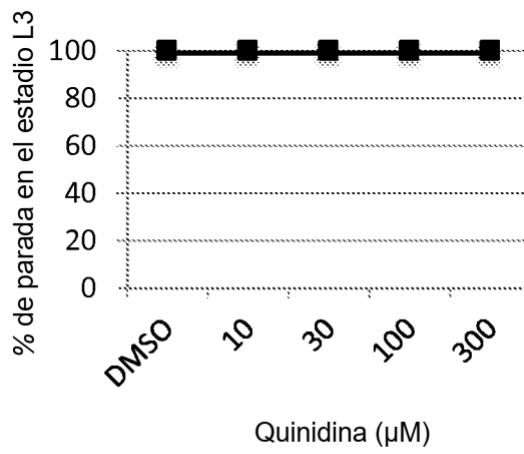


Figura 9



**Figura 10**



**Figura 11**



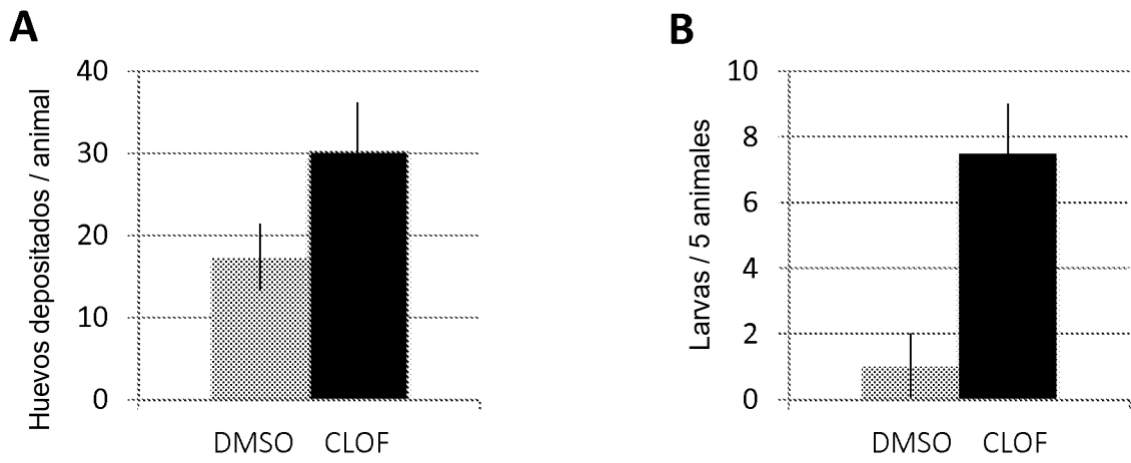


Figura 12

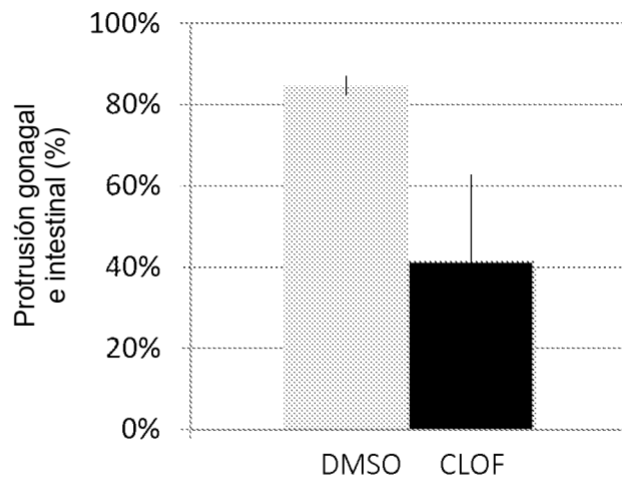


Figura 13

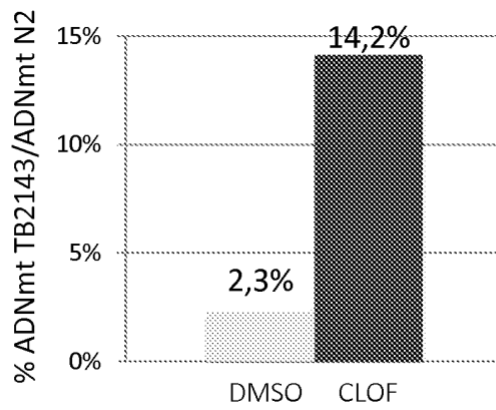


Figura 14

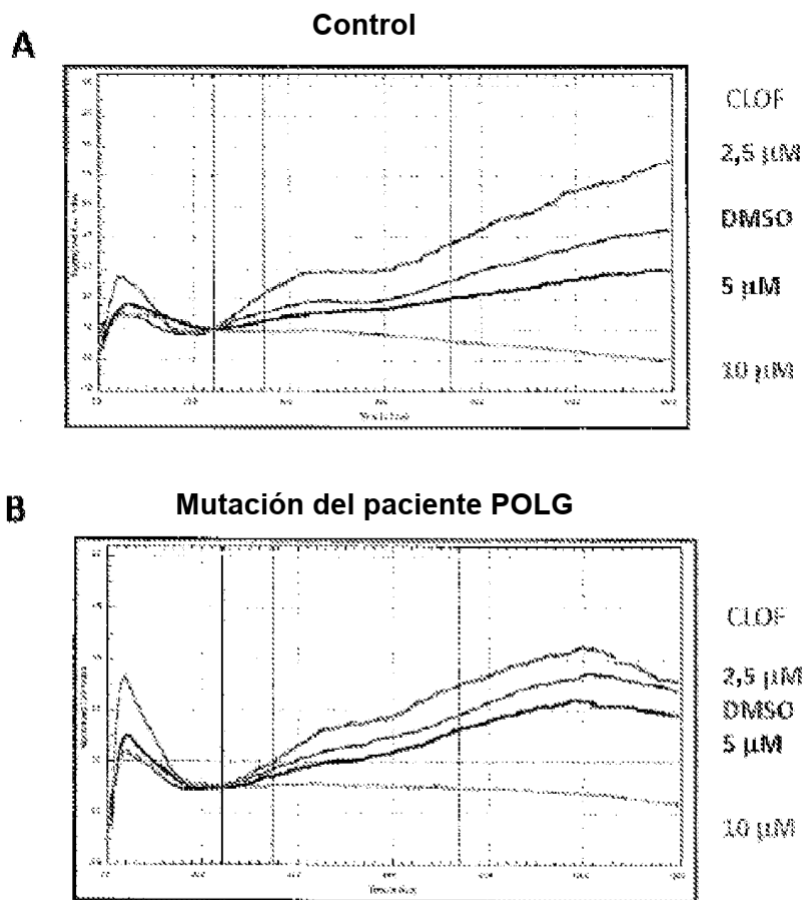


Figura 15

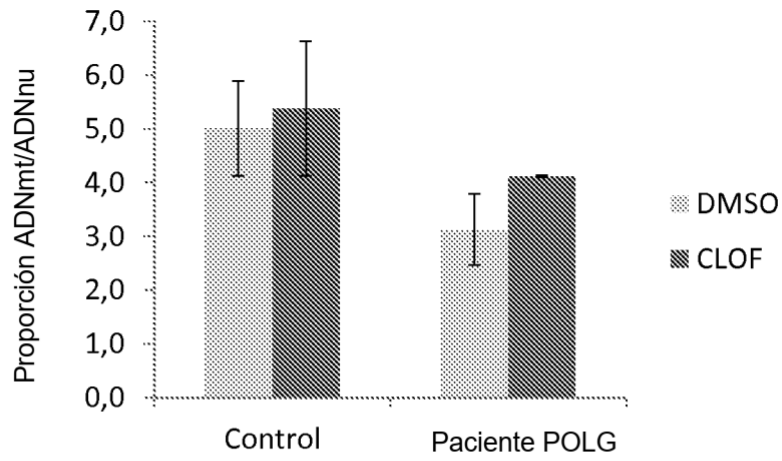


Figura 16

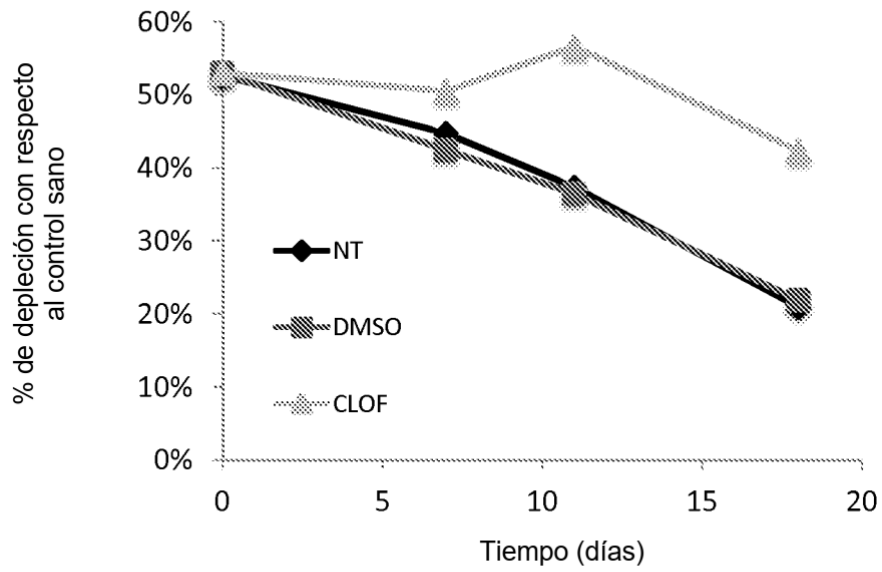


Figura 17

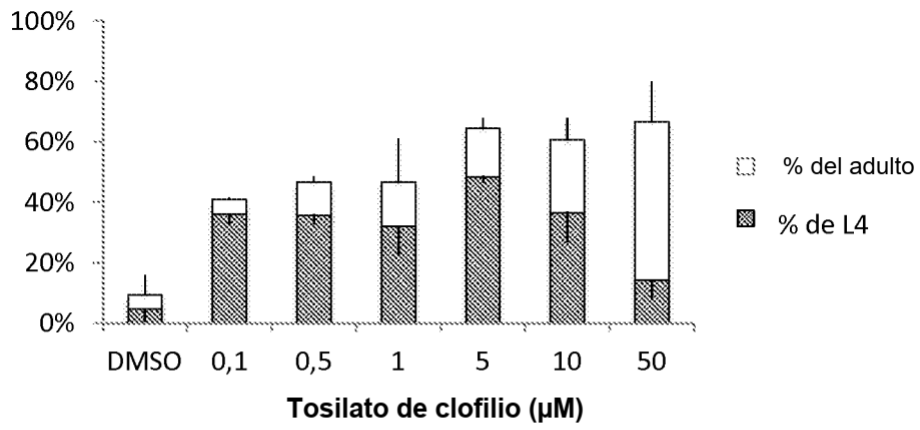


Figura 18

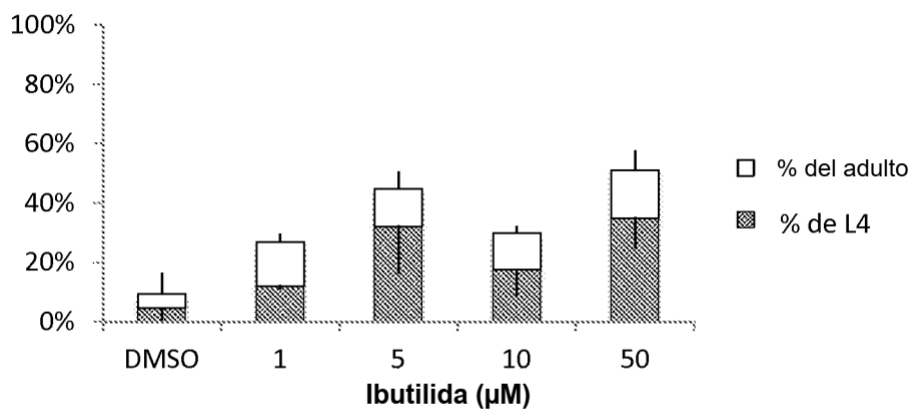


Figura 19

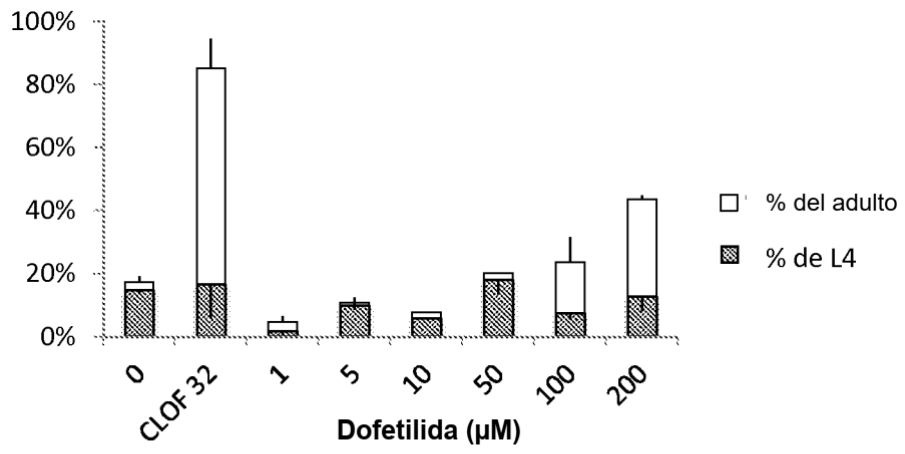
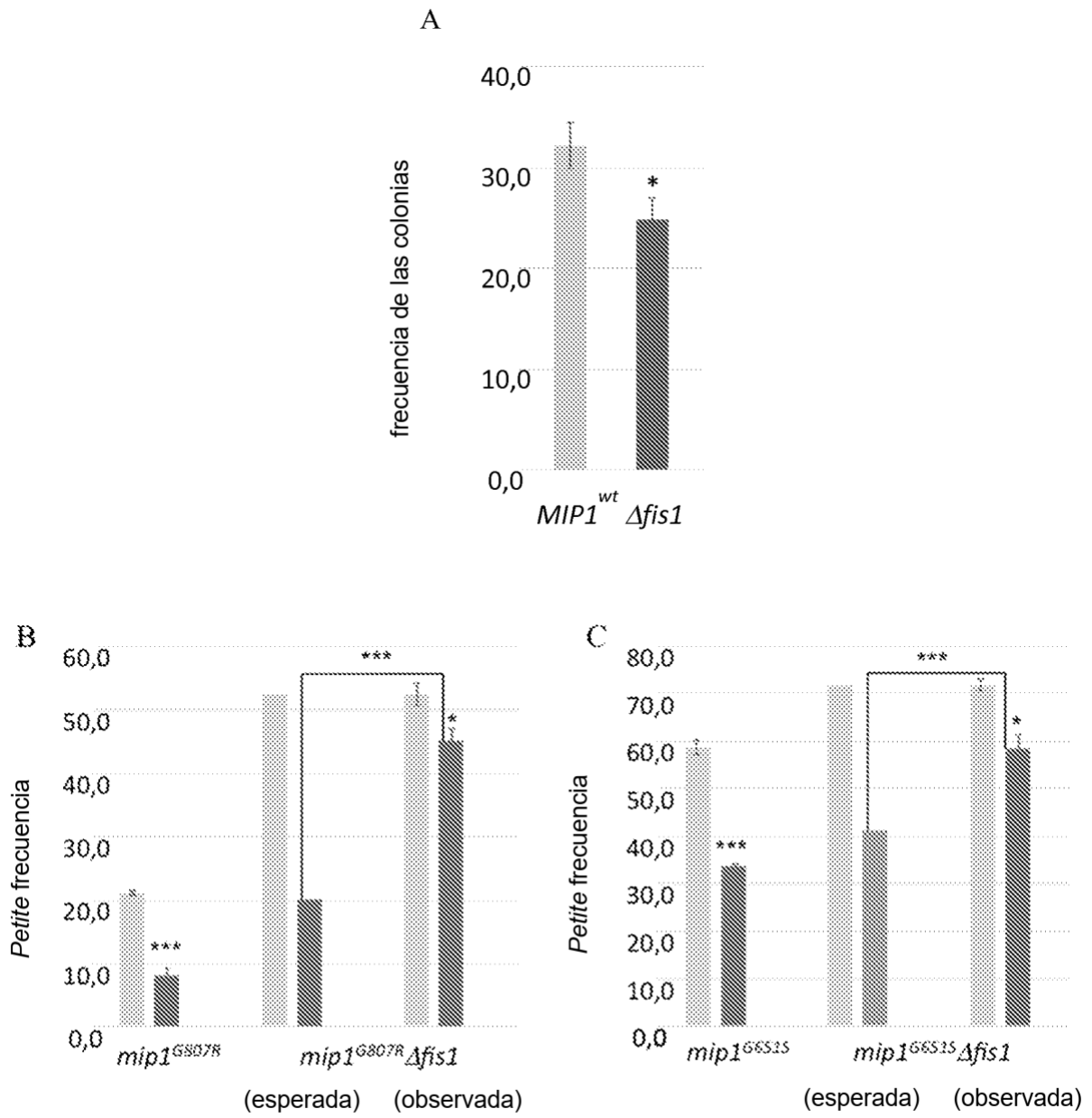
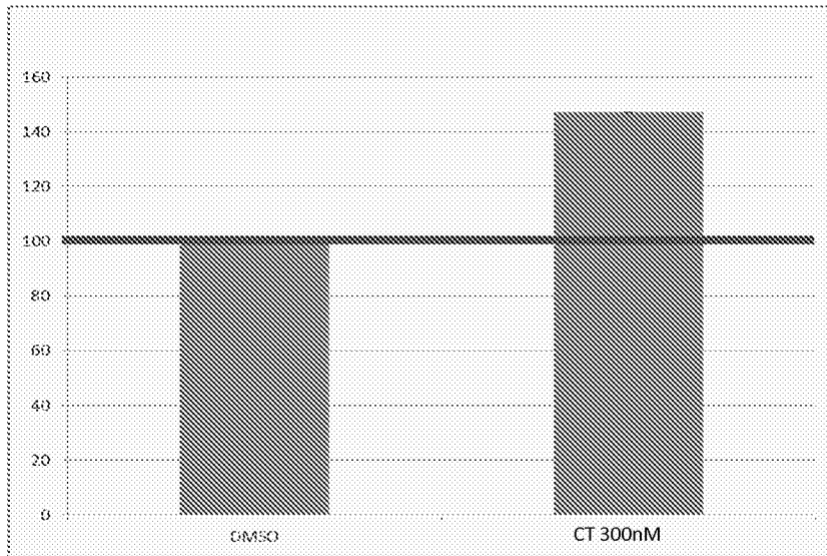


Figura 20

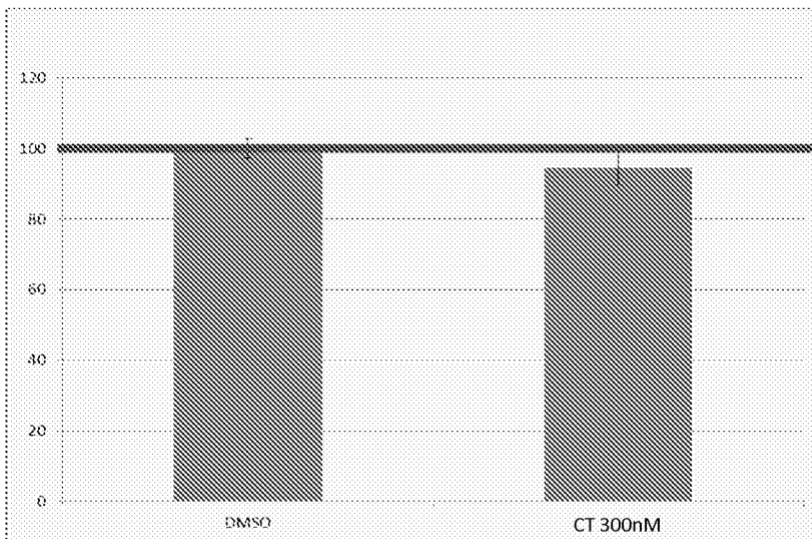


**Figura 21**

**A** Proporción entre la actividad del Complejo I y la actividad de la CS (en % con respecto al control (DMSO))

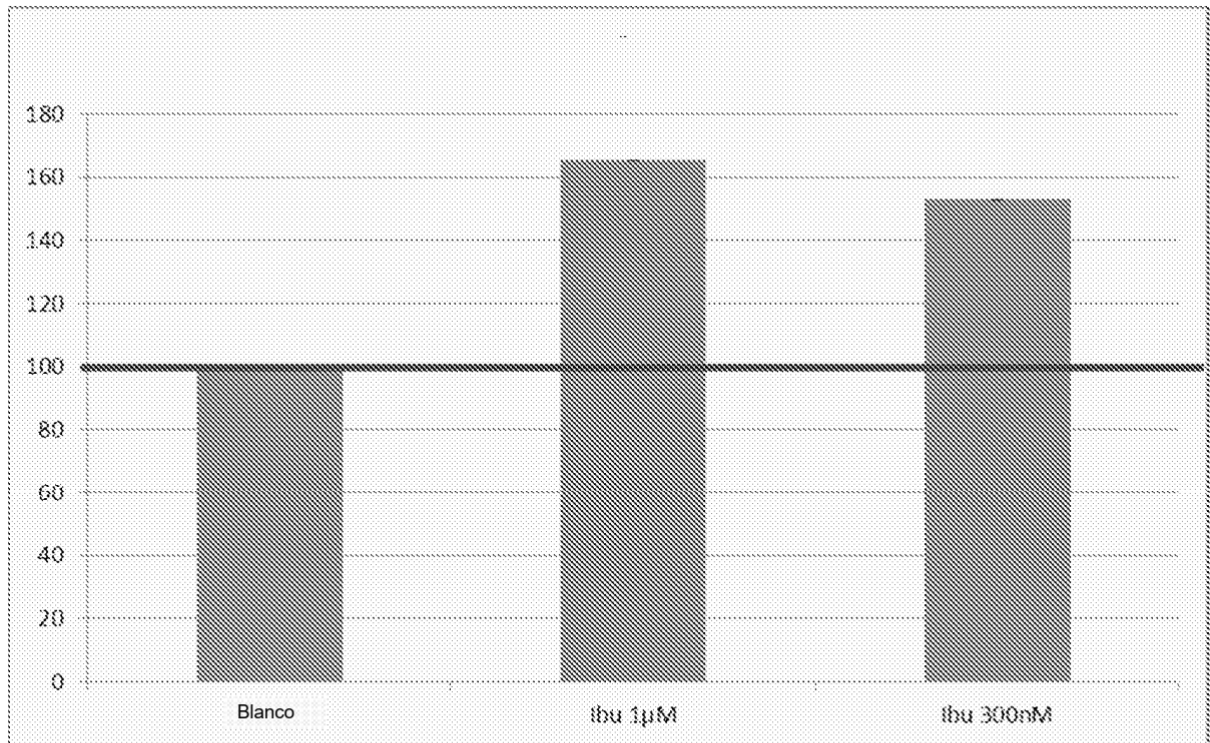


**B** Producción de lactato (en % con respecto al control (DMSO))

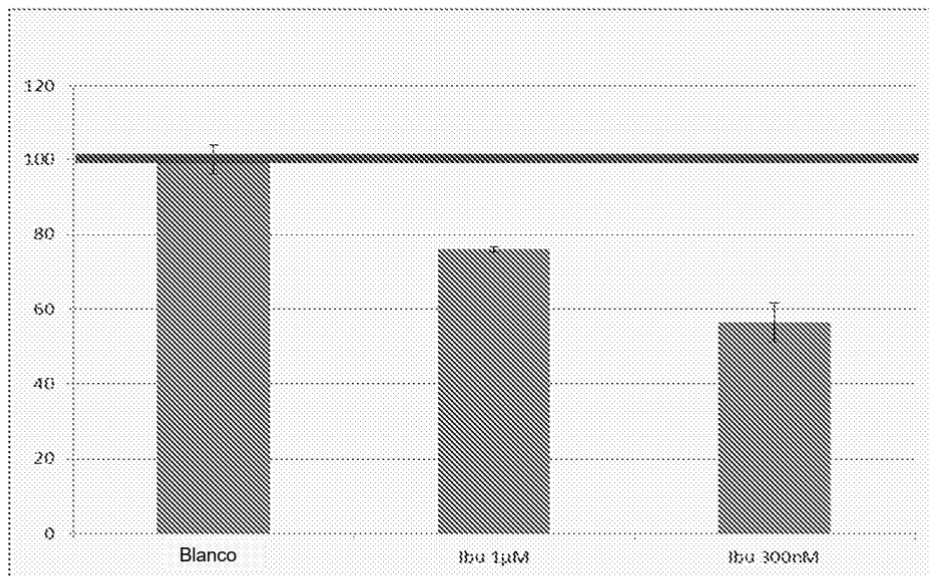


**Figura 22**

**A** Proporción entre la actividad del Complejo I y la actividad de la CS  
(en % con respecto al blanco (DMSO))



**B** Producción de lactato  
(en % con respecto al blanco (DMSO))



**Figura 23**



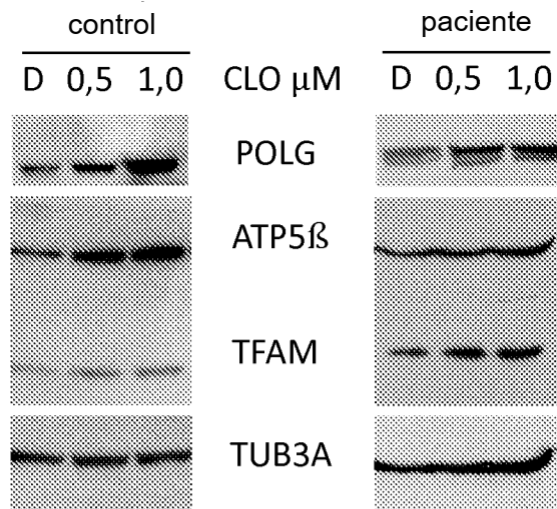


Figura 24

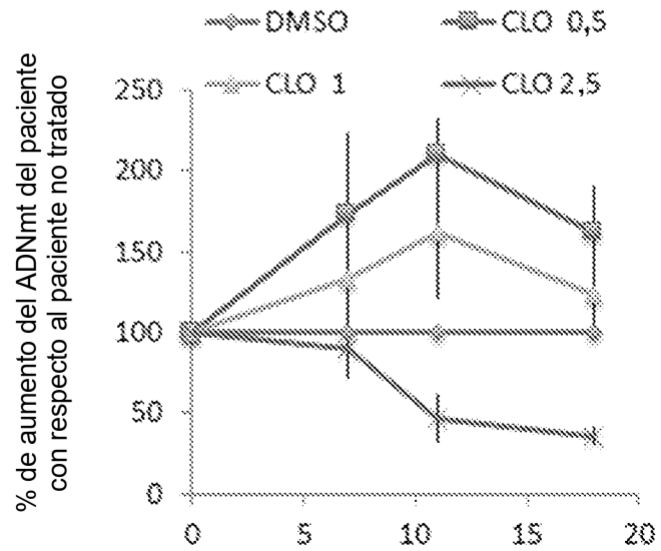


Figura 25