

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 917**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/519** (2006.01)

**A61K 31/7068** (2006.01)

**A61P 25/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2016 E 16306094 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3290039**

54 Título: **Compuestos para tratar enfermedades asociadas con una disfunción mitocondrial**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.01.2021**

73 Titular/es:

**AMABIOTICS (100.0%)  
47, rue de Montmorency  
75003 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**DANCHIN, ANTOINE;  
SEKOWSKA, AGNIESZKA y  
GARNIER, PATRICE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 800 917 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 tratar enfermedades asociadas con una disfunción mitocondrial

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a compuestos, composiciones farmacéuticas y suplementos dietéticos para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa asociada con una disfunción mitocondrial, en particular la enfermedad de Parkinson.

**Antecedentes de la invención**

10 La enfermedad de Parkinson (EP), el trastorno de la motilidad más común y la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después de la enfermedad de Alzheimer se caracteriza principalmente por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la pars compacta de la sustancia negra, que conduce a un déficit de dopamina en el cuerpo estriado. La consiguiente desregulación de los circuitos de los ganglios basales explica los síntomas motores más prominentes, que incluyen bradicinesia, hipocinesia, rigidez, temblor en reposo e inestabilidad postural. Además de los síntomas motores típicos, se pueden desarrollar diversas características no motoras, como disfunción autónoma, trastornos del sueño, depresión y deterioro cognitivo, lo que indica un proceso degenerativo más generalizado.

15 Poco se sabe sobre la etiopatogenia de la EP. La forma esporádica más común de la EP parece ser un trastorno multifactorial complejo con contribuciones variables de factores ambientales y susceptibilidad genética, siendo el envejecimiento el factor de riesgo más importante.

20 El tratamiento actual de la EP tiene como objetivo corregir las consecuencias de la pérdida de neuronas dopaminérgicas aumentando las concentraciones de dopamina a través de la administración de L-DOPA. La L-DOPA cruza la barrera hematoencefálica protectora, mientras que la dopamina en sí no puede, y una vez que la L-DOPA ha entrado en el sistema nervioso central, la enzima DOPA descarboxilasa la convierte en dopamina. El fosfato de piridoxal (vitamina B6) es un cofactor requerido en esta reacción, y ocasionalmente se puede administrar junto con L-DOPA, por regla general en forma de piridoxina.

25 Sin embargo, la administración crónica de L-DOPA en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson induce varios efectos secundarios no deseados, como el deterioro de la función al final de la dosis, oscilaciones de activación/desactivación, congelación durante el movimiento, discinesia a la dosis máxima y síndrome de desregulación de dopamina, así como resistencia a los medicamentos (Thanvi & Lo (2004) Postgrad. Med. J. 80: 452-458).

30 Además, la evidencia directa o indirecta sugiere que la queuina o Q-ARNt participa en muchas funciones celulares, como la inhibición de la proliferación celular, el control del metabolismo aeróbico y anaeróbico, la virulencia bacteriana, etc. (Vinayak et al. (2010) Biosci. Rep. 30: 135-148).

En consecuencia, existe la necesidad de tratamientos alternativos a la administración de L-DOPA en la enfermedad de Parkinson.

**Compendio de la invención**

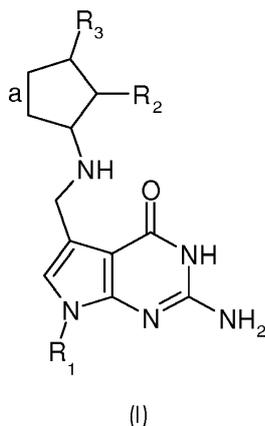
35 Investigaciones recientes sobre la función y la disfunción de los genes asociados con la EP han proporcionado nuevas percepciones fundamentales sobre las vías bioquímicas que están asociadas con el proceso de la enfermedad. Estos hallazgos han establecido que la disfunción mitocondrial es un denominador común de la EP esporádica y familiar, llevando a las mitocondrias a la vanguardia de la investigación de la EP (Winklhofer & Haass (2010) Biochimica et Biophysica Acta 1802: 29-44).

40 La presente invención surge del hallazgo inesperado, por los presentes inventores, de que la queuina tiene un efecto neuroprotector en un modelo *in vitro* de enfermedad de Parkinson que implica disfunción mitocondrial.

Así, la presente invención se refiere a queuina, un precursor de queuina, un derivado de queuina, o un estereoisómero de queuina, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de los mismos, para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa asociada con una disfunción mitocondrial.

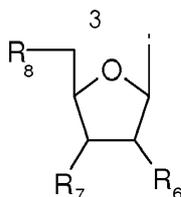
45

La presente invención también se refiere a un compuesto de la siguiente fórmula (I):



en donde:

- a representa un doble enlace o un grupo epoxi, y
- 5 - R<sub>1</sub> representa -H o un grupo ribosilo de la siguiente fórmula:



en donde:

- R<sub>6</sub> representa -H; -O-R<sub>9</sub> u -O-CO-R<sub>9</sub>, en donde R<sub>9</sub> es H, un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o un grupo arilo que tiene de 3 a 12 átomos de carbono;
- 10 • R<sub>7</sub> representa -H; -O-R<sub>10</sub> u -O-CO-R<sub>10</sub>, en donde R<sub>10</sub> es H, un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o un grupo arilo que tiene de 3 a 12 átomos de carbono; un grupo de ácido desoxirribonucleico; o un grupo de ácido ribonucleico;
- 15 • R<sub>8</sub> representa -H; -O-R<sub>11</sub> u -O-CO-R<sub>11</sub>, en donde R<sub>11</sub> es H, un grupo alquilo que tiene de 1 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo que tiene de 3 a 20 átomos de carbono; un grupo fosfato; un grupo difosfato; un grupo trifosfato; un grupo de ácido desoxirribonucleico; o un grupo de ácido ribonucleico;
- R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub>, que son idénticos o diferentes, representan -O-R<sub>4</sub>, en donde R<sub>4</sub> es H, un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, un grupo arilo que tiene de 3 a 12 átomos de carbono, un grupo glicosilo o un grupo aminoacilo; u -O-CO-R<sub>5</sub>, en donde R<sub>5</sub> es un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, un grupo arilo que tiene de 3 a 12 átomos de carbono o un grupo glicosilo;
- 20 o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo,

para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa asociada con una disfunción mitocondrial.

25 En una realización de la invención, el compuesto de la fórmula (I), o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso tal como se define más arriba, está en combinación con al menos un compuesto adicional útil para la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada con una disfunción mitocondrial.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende como sustancia activa un compuesto de la fórmula (I), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define más arriba, opcionalmente en asociación con al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa asociada con una disfunción mitocondrial.

30 En una realización de la invención, la composición farmacéutica arriba definida comprende además al menos un compuesto adicional útil para la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa asociada con una disfunción mitocondrial.

5 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende como sustancia activa un compuesto de la fórmula (I), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la prevención o el tratamiento de la enfermedad neurodegenerativa tal como se define más arriba, que comprende además al menos un compuesto adicional para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada con una disfunción mitocondrial, opcionalmente en asociación con al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también se refiere a productos que comprenden:

- un compuesto de la fórmula (I), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define más arriba,
- 10 - al menos un compuesto adicional útil para la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada con una disfunción mitocondrial,

como una preparación combinada para su uso simultáneo, independiente o secuencial en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa asociada con una disfunción mitocondrial en un individuo.

15 La presente invención también se refiere a un suplemento dietético que comprende un compuesto de la fórmula (I), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define más arriba, para su uso en la reducción del riesgo de una enfermedad neurodegenerativa asociada con una disfunción mitocondrial.

En una realización de la invención, el suplemento dietético tal como se define más arriba comprende opcionalmente compuestos adicionales, preferiblemente seleccionados entre el grupo que consiste en vitaminas, minerales, ácidos grasos, aminoácidos y antioxidantes.

20 Se describe un método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada con una disfunción mitocondrial en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un compuesto de la fórmula (I), o de una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define más arriba.

En una realización, el método tal como se define más arriba comprende además la administración de al menos un compuesto útil para la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa asociada con una disfunción mitocondrial.

25 La presente invención también se refiere al uso de un compuesto de la fórmula (I) tal como se define más arriba para la fabricación de un medicamento destinado a la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa asociada con una disfunción mitocondrial en un individuo.

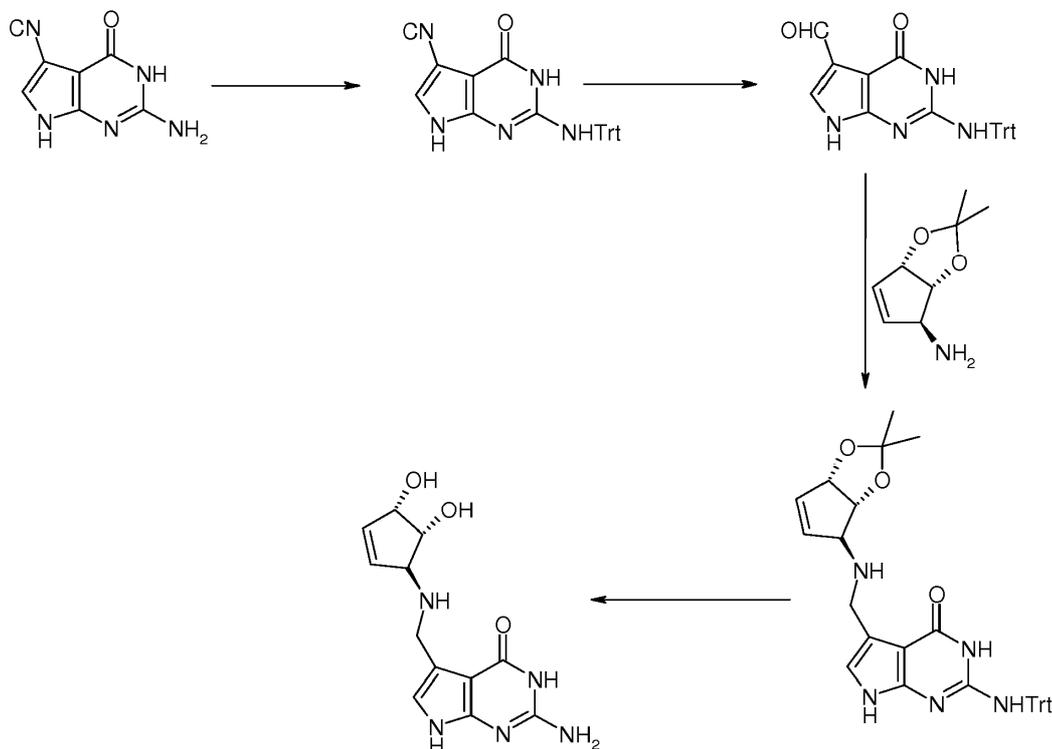
30 En una realización de la invención, el medicamento tal como se define más arriba comprende además al menos un compuesto útil para la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa asociada con una disfunción mitocondrial.

### **Descripción detallada de la invención**

Compuesto de la fórmula (I)

35 Los compuestos de la fórmula (I) tal como se definen más arriba pueden ser sintetizados químicamente con facilidad por un experto en la técnica, tal como se describe en particular en Barnett & Grubb (2000), Tetrahedron 56: 9221-9225, Oxenford et al. (2004) Tetrahedron Letters 45: 9053-9055, Brooks et al. (2010) Tetrahedron Letters 51: 4163-4165, Gerber et al. (2012) Org. Biomol. Chem 10: 8660-8668 y la tesis de Allen Brook titulada "Synthesis of Tritium Labeled Queuine, PreQ1 and Related Azide Probes Toward Examining the Prevalence of Queuine" (2012, Universidad de Michigan).

Brevemente, a modo de ejemplo, la queuina se puede sintetizar de acuerdo con el siguiente esquema de reacción:



Además, los compuestos de la fórmula (I) tal como se definen más arriba se pueden extraer y opcionalmente purificar a partir de fuentes naturales tales como microorganismos, en particular bacterias, o de plantas, en particular de plantas noduladas con alfa-proteobacterias tales como bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, y *Sinorhizobium*.

A modo de ejemplo, la queuosina se puede obtener a partir de ARNt, en particular ARNt<sup>Asn</sup>, ARNt<sup>Asp</sup>, ARNt<sup>His</sup> y ARNt<sup>Tyr</sup>, preparado de la siguiente manera:

#### Preparación de ARN total bajo condiciones ácidas

Las cepas de *B. subtilis* (u otras bacterias relevantes) se cultivan en medio líquido ED con suplementos apropiados a 37 °C con aireación constante. En 15 ml de medio ED se inoculan cultivos frescos durante la noche hasta una densidad óptica a 600 nm (OD600) de 0,1. Las células se cultivan a 37 °C hasta una OD600 de 1 y se enfrían en un volumen igual de metanol al 60% en Hepes 70 mM, pH 7,5 a -80 °C. Todas las etapas posteriores se llevan a cabo en frío y la solución para el ARN crudo preparado se trata con pirocarbonato de dietilo y se esteriliza. Las células se sedimentan a 4 °C, se lavan en agua y se resuspenden en 0,5 ml de glucosa al 10%, Tris 11 mM, EDTA 10 mM. Las suspensiones se transfieren a tubos que contienen 0,1 g de perlas de vidrio lavadas con ácido (sigma-Aldrich, G4649). Se disponen tubos en el CoolPrep Adapter of FastPrep®-24 Instrument (MP Biomedicals), que contiene 50 g de hielo seco. Las células se rompen después de tres ciclos utilizando los siguientes parámetros: 6 metros por segundo durante 45 s. Después de cada ciclo, las suspensiones se mantienen 1 minuto en hielo. Después de centrifugar 2 min a 10.000 rpm, los sobrenadantes se transfieren a un tubo eppendorf nuevo. Se añade acetato de sodio 0,3 M, pH 5,2, y se aísla el ARN total en condiciones ácidas. Se añade un volumen de fenol ácido:cloroformo con alcohol isoamílico (125:24:1), pH 4,5 (Amresco, AM9720). Las muestras se mezclan agitando 10 segundos con formación de vórtice y se incuban durante 3 minutos en un baño de agua a 65 °C. Las fases se separan mediante 5 minutos de rotación a 14.000 rpm, después se vuelve a extraer la fase acuosa una vez con el mismo procedimiento de fenol de ácido caliente. La fase acuosa se transfiere a un nuevo tubo y se complementa con un volumen de fenol ácido frío. Después de 5 min de centrifugación a 14.000 rpm, el ARN se precipita con 2,5 volúmenes de etanol absoluto durante 1 h a -80 °C. El ARN se sedimenta a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C y se lava con etanol al 70%. El sedimento de ARN se disuelve en Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5.

#### Enriquecimiento de ARNt

La preparación de ARN total se mezcla luego con un volumen de cloruro de litio 8 M, pH 4,5, y acetato sódico, pH 5,2, a una concentración final de 0,01 mM. Esta solución de ARN se incuba durante 2 h a -80 °C. Después de la centrifugación a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, el ARNt quedó en el sobrenadante. Para eliminar la contaminación por sal, el ARNt se precipita durante 1 h a -80 °C mediante la adición de acetato de sodio 0,3 M, pH 5,2, y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Después, el ARNt se sedimenta por centrifugación a

14.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C y se lava con etanol al 70%. El sedimento de ARNt se disuelve en Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5.

El estereoisómero de queuina según la invención puede ser de cualquier tipo. Preferiblemente, el estereoisómero de queuina es ent-queuina.

- 5 La sal o hidrato farmacéuticamente aceptable según la invención puede ser de cualquier tipo. Sin embargo, es preferible que la sal farmacéuticamente aceptable según la invención sea una sal de clorhidrato.

Preferiblemente, el grupo glucosilo según la invención se selecciona entre el grupo que consiste en un grupo manosilo, un grupo galactosilo o un grupo glutamilo.

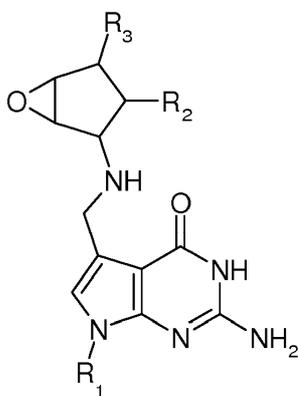
- 10 Preferiblemente, el grupo aminoacilo se selecciona entre alanina (ala, A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gin, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V).

En una realización preferida del compuesto de la fórmula (I) tal como se define más arriba:

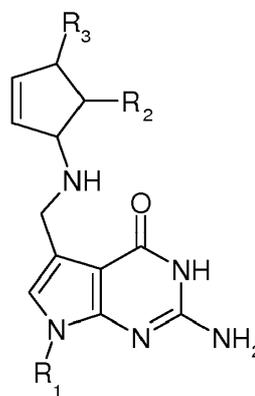
- 15 - R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub>, que son idénticos o diferentes, representan -OH, un grupo -O-manosilo, un grupo -O-galactosilo o un grupo -O-glutamilo;
- R<sub>6</sub> representa -OH;
- R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub>, que son idénticos o diferentes, representan -OH o un grupo de ácido ribonucleico.

- 20 Preferiblemente, cuando tanto R<sub>7</sub> como R<sub>8</sub> representan un grupo de ácido ribonucleico, el compuesto de la fórmula (I) según la invención está incluido en un ARN de transferencia (ARNt) como un ribonucleósido del ARNt. Más preferiblemente, el compuesto de la fórmula (I) según la invención es un ribonucleósido del anticodón del ARNt, lo más preferiblemente el primer nucleósido del anticodón, es decir, el nucleósido 5' del anticodón o el nucleósido en la posición de balanceo del anticodón. Los ARNt preferidos según la invención se seleccionan entre la lista que consiste en ARNt<sup>Asn</sup>, ARNt<sup>Asp</sup>, ARNt<sup>His</sup> y ARNt<sup>Tyr</sup>.

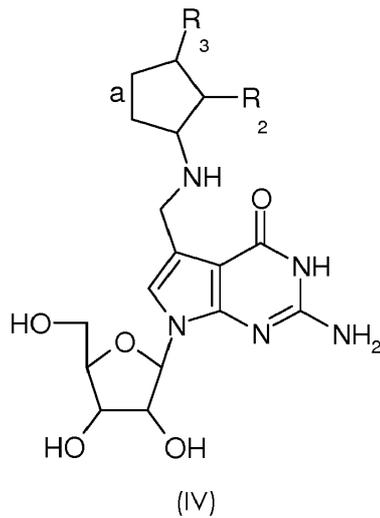
- 25 Preferiblemente, el compuesto de la fórmula (I) tal como se define más arriba está representado por las siguientes fórmulas (II), (III) o (IV):



(II)



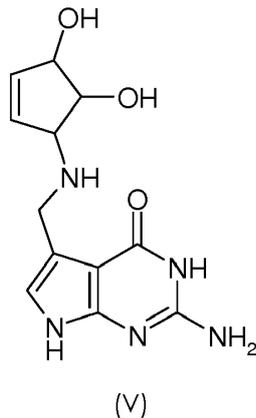
(III)



Preferiblemente, cuando un compuesto de las fórmulas (I) - (III) según la invención está incluido en un ARNt<sup>Asp</sup>, entonces R<sub>3</sub> es OH y R<sub>2</sub> es O-manosa.

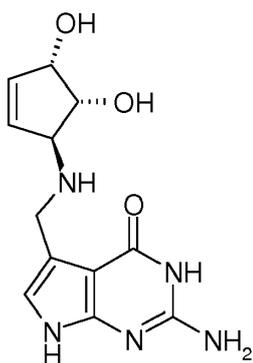
5 Preferiblemente también, cuando un compuesto de las fórmulas (I) - (III) según la invención está incluido en un ARNt<sup>Tyr</sup>, entonces R<sub>3</sub> es OH y R<sub>2</sub> es O-galactosa

Preferiblemente, el compuesto de la fórmula (I) según la invención está representado por la siguiente fórmula (V):

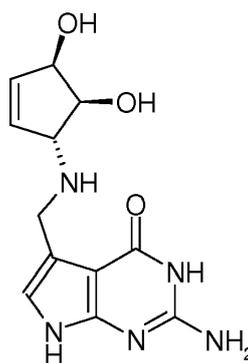


10 Como debería entender claramente un experto en la técnica, se pretende que todas las configuraciones estereoquímicas de los compuestos según la invención estén cubiertas por las fórmulas mostradas en la presente memoria. En particular, como se pretende en la presente memoria, cuando no se especifica la estereoconfiguración de un enlace, el enlace puede representar cualquiera de un enlace ascendente, un enlace descendente y una mezcla de los dos, en particular una mezcla 1/1 de los dos.

Por lo tanto, el compuesto de la fórmula (I) según la invención también se refiere a las formas ópticamente activas del compuesto de la fórmula (V), tales como los enantiómeros representados por las siguientes fórmulas (Va) y (Vb):



(Va)

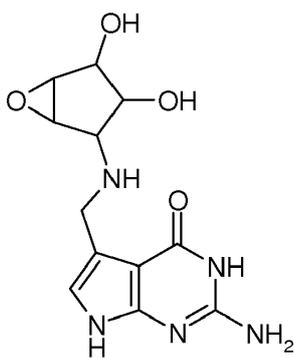


(Vb)

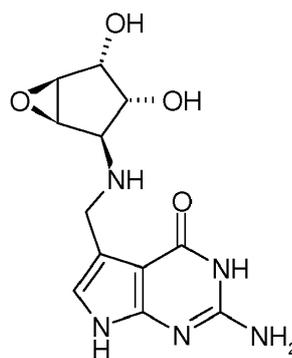
o sus mezclas, en particular una mezcla racémica de los mismos.

El compuesto de la fórmula (Va) es queuina. La queuina también se conoce como 7-(3,4-trans-4,5-*cis*-dihidroxi-1-ciclopenten-3-ilaminometil)-7-deazaguanina. El compuesto de la fórmula (Vb) es ent-queuina.

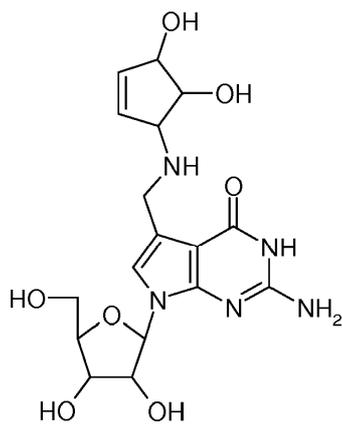
- 5 Preferiblemente, el compuesto de la fórmula (I) según la invención está representado por las siguientes fórmulas (VI), (VIa), (VII), (VIIa), (VIII) o (VIIIa):



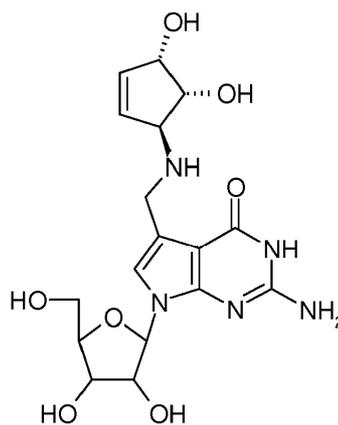
(VI)



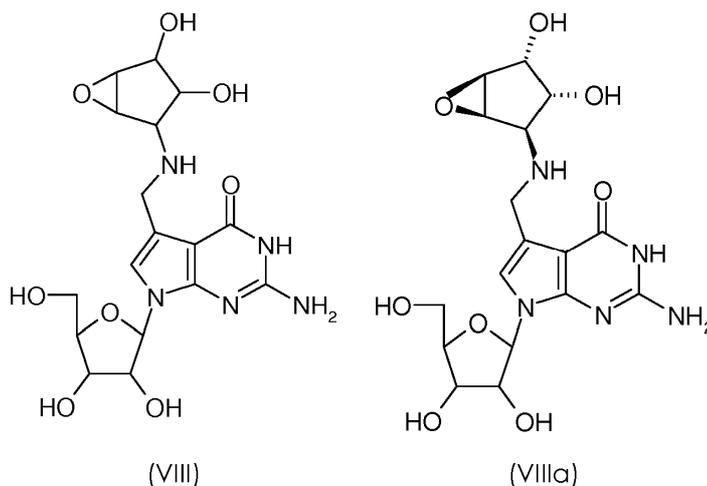
(VIa)



(VII)



(VIIa)



El compuesto de la fórmula (VIa) es epoxiqueuina, también conocida como 7-(5-[3,4-epoxi-2,5-dihidroxiciclopent-1-il]amino)metil)-7-deazaguanina.

5 El compuesto de la fórmula (VIIa) es queuosina, también conocida como 2-amino-5-(((1S,4S,5R)-4,5-dihidroxiciclopent-2-en-1-il]amino)metil)-7-(β-D-ribofuranosil)-1,7-dihidro-4H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-ona.

El compuesto de la fórmula (VIIIa) es epoxiqueuosina, también conocida como 7-(5-[(3,4-epoxi-2,5-dihidroxiciclopent-1-il]amino)metil)-7-deazaguanosina.

10 Preferiblemente, el compuesto de la fórmula (I) según la invención se selecciona entre el grupo que consiste en manosil-queuina, galactosil-queuina, glutamil-queuina, galactosil-queuosina, manosil-queuosina, glutamil-queuosina, queuina-ARNt y epoxiqueuina-ARNt.

Preferiblemente, el compuesto de la fórmula (I) según la invención también se selecciona entre el grupo que consiste en queuina-ARNt<sup>Asp</sup>, queuina-ARNt<sup>Tyr</sup>, epoxiqueuina-ARNt<sup>Asp</sup>, epoxiqueuina-ARNt<sup>Tyr</sup>, queuina-ARNt<sup>Asn</sup>, queuina-ARNt<sup>His</sup>, epoxiqueuina-ARNt<sup>Asn</sup>, epoxiqueuina-ARNt<sup>His</sup>, manosil-queuina-ARNt<sup>Asp</sup>, galactosil-queuina-NAt<sup>Tyr</sup>, manosil-epoxiqueuina-ARNt<sup>Asp</sup>, y galactosil-epoxiqueuina-ARNt<sup>Tyr</sup>.

15 Lo más preferiblemente, el compuesto de la fórmula (I) según la invención también se selecciona entre el grupo que consiste en queuina, ent-queuina, queuosina, epoxiqueuina, epoxiqueuosina, manosil-queuina, galactosil-queuina, glutamil-queuina, galactosil-queuosina, mannosil-queuosina, glutamil-queuosina, queuina-ARNt y epoxiqueuina-ARNt.

Enfermedad asociada con una disfunción mitocondrial

20 Tal como se pretende en la presente memoria, la expresión "enfermedad asociada con una disfunción mitocondrial" abarca enfermedades relacionadas con o causadas por una disfunción, trastorno o enfermedad mitocondrial.

Preferiblemente, la enfermedad asociada con una disfunción mitocondrial según la invención es una enfermedad neuronal asociada con una disfunción mitocondrial, más preferiblemente una enfermedad del sistema nervioso central asociada con una disfunción mitocondrial y lo más preferiblemente una enfermedad neurodegenerativa asociada con una disfunción mitocondrial.

25 Preferiblemente, la enfermedad asociada con una disfunción mitocondrial según la invención es la enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson es muy conocida para un experto en la técnica y se define en particular en las secciones G20, G21 y G22 de la ICD-10 versión: 2016.

Tal como se pretende en la presente memoria, la enfermedad de Parkinson según la invención abarca en particular:

- 30
- parkinsonismo primario (idiopático),
  - parkinsonismo secundario (adquirido),
  - parkinsonismo atípico, y
  - enfermedad neurodegenerativa familiar que causa parkinsonismo.

La enfermedad de Parkinson según la invención también abarca la enfermedad de Parkinson esporádica y familiar.

35 La enfermedad de Parkinson de acuerdo con la invención también abarca en particular la enfermedad de Parkinson

en estadio I, estadio II, estadio III, estadio IV y estadio V.

#### Individuo

Tal como se pretende en la presente memoria, el individuo según la invención es preferiblemente un ser humano.

Preferiblemente, el individuo según la invención tiene más de 30, 40, 50, 60, 70 u 80 años.

- 5 También preferiblemente, el individuo según la invención tiene menos de 80, 70, 60, 50 o 40 años.

También preferiblemente, el individuo de acuerdo con la invención es un individuo con la enfermedad de Parkinson en estadio I, II, III, IV o V.

- 10 También preferiblemente, el individuo según la invención no está afectado por la enfermedad de Parkinson o no presenta síntomas de la enfermedad de Parkinson y está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Parkinson. Más preferiblemente, el individuo según la invención no está afectado por la enfermedad de Parkinson o no presenta síntomas de la enfermedad de Parkinson y al menos uno de los familiares del individuo padece la enfermedad de Parkinson.

#### Compuesto adicional

- 15 El compuesto adicional útil para la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada con una disfunción mitocondrial puede ser de cualquier tipo conocido por un experto en la técnica. Preferiblemente, el compuesto adicional según la invención se selecciona entre el grupo que consiste en vitaminas, minerales, ácidos grasos, aminoácidos, antioxidantes y derivados o precursores de los mismos.

Preferiblemente, las vitaminas se seleccionan entre el grupo que consiste en piridoxina, fosfato de piridoxal (vitamina B<sub>6</sub>), riboflavina, tiamina, vitamina E, vitamina K<sub>3</sub>, vitamina C, niacina, CoQ10 y β-caroteno.

- 20 Preferiblemente, los minerales se seleccionan entre el grupo que consiste en calcio, magnesio, selenio y fósforo.

Preferiblemente, el aminoácido es L-DOPA (levodopa).

Preferiblemente, los ácidos grasos se seleccionan entre el grupo que consiste en Levo-carnitina y acetil-L-carnitina.

#### Administración

- 25 Tal como se pretende en la presente memoria, "combinado" o "en combinación" significa que el compuesto de la fórmula (I), tal como se define más arriba, se administra al mismo tiempo que otro compuesto o producto, ya sea juntos, es decir, en el mismo sitio de administración, o por separado, o en diferentes momentos, siempre que el período de tiempo durante el cual el compuesto de la fórmula (I) tal como se define más arriba ejerce sus efectos sobre el individuo y el período de tiempo durante el cual el agente o producto adicional ejerce sus efectos farmacológicos sobre el individuo se crucen al menos parcialmente.

- 30 Preferiblemente, el compuesto de la fórmula (I) según la invención, o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, está previsto para una administración o se administra en un régimen de dosificación de 0,01 a 40 mg/kg/día, más preferiblemente de 0,01 a 10 mg/kg, incluso más preferiblemente de 0,01 a 1 mg/kg/d, y lo más preferiblemente de 0,01 a 0,1 mg/kg/d.

- 35 Preferiblemente, el compuesto de la fórmula (I) según la invención o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo está en una forma adecuada para una administración o se administra por vía oral, vía intradérmica, vía intravenosa, vía intramuscular o vía subcutánea. Preferiblemente, el compuesto de la fórmula (I) según la invención, o la composición farmacéutica, medicamento, productos o suplemento dietético que lo comprenden, están en una forma adecuada para una administración o se administran mediante un implante hipodérmico.

- 40 Preferiblemente, el compuesto de la fórmula (I) según la invención, o la composición farmacéutica, medicamento, productos o suplemento dietético que lo comprenden, están en forma de un polvo, sobres, tabletas, gelatina, cápsulas o una solución líquida o de gel.

También preferiblemente, la composición farmacéutica, medicamento, productos o suplemento dietético según la invención comprenden el compuesto de la fórmula (I) según la invención, en particular queuina, ent-queuina o queuosina en una dosis unitaria de al menos 0,15 mg, 1 mg, 10 mg, 50 mg, 100 mg, 500 mg o 1.000 mg.

- 45 También preferiblemente, la composición farmacéutica, medicamento, productos o suplemento dietético según la invención comprenden un extracto, en particular un extracto purificado, de microorganismos y/o plantas, que comprende el compuesto de la fórmula (I) según la invención, en particular queuina, ent-queuina o queuosina, en particular en una dosis unitaria de al menos 0,15 mg, 1 mg, 10 mg, 50 mg, 100 mg, 500 mg o 1.000 mg.

## Descripción de las figuras

Figura 1 La figura 1 representa la supervivencia del cultivo primario de neuronas dopaminérgicas expresada en % de control en ausencia de 6-OHDA (barra gris, control), con 6-OHDA solo (barra negra), con 6-OHDA + queuina añadida 1 día antes de intoxicación por 6-OHDA (barra punteada), y con 6-OHDA + BDNF. \* representa  $p < 0,05$  vs. 6-OHDA.

Figura 2 La Figura 2 representa la supervivencia del cultivo primario de neuronas dopaminérgicas expresada en % de control en ausencia de 6-OHDA (barra gris, control), con 6-OHDA solo (barra negra), con 6-OHDA + queuina añadida 6 días antes de intoxicación por 6-OHDA (barra de puntos pequeños) y con 6-OHDA + BDNF (barra de puntos grandes). \* representa  $p < 0,05$  vs. 6-OHDA.

## Ejemplo

La 6-hidroxidopamina (6-OHDA) es una neurotoxina catecolaminérgica selectiva que no solo se usa como agente farmacológico capaz de desencadenar estigmas similares a la enfermedad de Parkinson (Sauer y Ortel (1994) Neuroscience 59: 401-15; Cass et al. (2002) Brain Res. 938: 29-37), sino que probablemente también corresponde a un catabolito dopaminérgico natural que se acumula en los cerebros afectados por la enfermedad de Parkinson y que parece contribuir en gran medida a esta patología (Ellenberg et al. (1995) en "Etiology of Parkinson's Disease", eds. Ellenberg, Koller, Langston (Marcel Dekker, Nueva York), pp. 153-201; Jellinger et al. (1995) J. Neural. Transm. 46:297-314).

Por esta razón, la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por 6-OHDA en ratas se usa mucho como modelo para la investigación de la EP (Simola et al. (2007) Neurotox. Res. 11: 151-167; Mercanti (2012) Methods Mol. Biol. 846: 355-364; De Jesus-Cortes et al. (2015) npj Parkinson's Disease 1:15010). Además, se ha demostrado que la 6-OHDA deteriora la función mitocondrial en este modelo de rata de la enfermedad de Parkinson, lo que permitiría la detección de una disfunción mitocondrial clara como un marcador sustitutivo adecuado para la evaluación preclínica de posibles estrategias neuroprotectoras (Kupsch et al. (2014) J. Neural. Transm. 121: 1245-1257).

A este respecto, la neurodegeneración de neuronas dopaminérgicas inducida por 6-OHDA *in vitro* también proporciona un modelo útil de la enfermedad de Parkinson, especialmente en lo que respecta a la restauración de la función de las mitocondrias (Wei et al. (2015) Translational Neurodegeneration 4:11).

Por consiguiente, este estudio investiga el efecto de la queuina en cultivos mesencefálicos primarios de ratas lesionadas por exposición a 6-OHDA. Se ha sugerido que el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) reduce la neurodegeneración inducida por 6-OHDA *in vitro* y se usa como control positivo.

### 1. Material y métodos

#### 1.1. Compuestos

La 6-OHDA se obtiene de Sigma (ref.: H116).

La queuina se sintetiza de acuerdo con Brooks et al. (2010) Tetrahedron Letters 51: 4163-4165 y la tesis de Allen Brooks titulada "Synthesis of Tritium Labeled Queuine, PreQ1 and Related Azide Probes Toward Examining the Prevalence of Queuine" (2012, Universidad de Michigan).

El BDNF se obtiene de PanBiotech (ref.: CB-1115002).

En los siguientes experimentos, la 6-OHDA, la queuina y el BDNF se suspenden en el medio de cultivo definido más abajo.

#### 1.2. Cultivos primarios de neuronas dopaminérgicas de rata

Las neuronas dopaminérgicas de rata se cultivan de acuerdo con la descripción de Schinelli et al. (1988) J. Neurochem. 50: 1900-1907.

En pocas palabras, unas ratas hembra preñadas (ratas Wistar; Janvier) son sacrificadas mediante dislocación cervical a los 15 días de gestación y los fetos se extraen del útero. El mesencéfalo embrionario se extrae y se coloca en medio Leibovitz helado (L15; PanBiotech) que contiene un 2% de penicilina-estreptomina (PS; PanBiotech) y un 1% de albúmina de suero bovino (BSA; PanBiotech). Para las preparaciones celulares solo se utilizan las porciones ventrales de la curvatura mesencefálica, ya que esta es la región del cerebro en desarrollo rica en neuronas dopaminérgicas. El mesencéfalo se disocia mediante tripsinización durante 20 minutos a 37 °C (Trypsin EDTA 1X; PanBiotech). La reacción se detiene mediante la adición de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; PanBiotech) que contiene ADNsa I grado II (0,1 mg/ml; Roche Diagnostic) y un 10% de suero fetal bovino (FCS; Invitrogen). Las células se disocian mecánicamente mediante 3 pasos a través de una pipeta de 10 ml. Después, las células disociadas se centrifugan a 180 x g durante 10 minutos a 4 °C sobre una capa de BSA (3,5%) en medio L15. El sobrenadante se desecha y las células sedimentadas se resuspenden en un medio de cultivo que consiste en Neurobasal (Invitrogen, ref.: 21103, lote: 1725098) suplementado con B27 (2%; Invitrogen, ref.: 17504), L-glutamina (2 mM ; PanBiotech, ref.:

P04-80100) y un 2% de PS, 10 ng/ml de BDNF (PanBiotech, ref.: CB-1115002) y 1 ng/ml de GDNF (PanBiotech, ref.: CB-1116001). Las células viables se cuentan en un citómetro de Neubauer utilizando la prueba de exclusión de azul de tripano. Las células se siembran después con una densidad de 40.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos previamente recubiertas con poli-D-lisina (Greiner) y se cultivan a 37 °C en una atmósfera de aire humidificado (95%)/CO2 (5%). La mitad del medio se sustituye cada 2 días por medio fresco. En estas condiciones, después de 5 días de cultivo, el cultivo presenta astrocitos que liberan el factor de crecimiento que permite la diferenciación de las neuronas. Del cinco al seis por ciento de la población de células neuronales son neuronas dopaminérgicas.

### 1.3. Evaluación del efecto neuroprotector en neuronas dopaminérgicas de rata

El efecto neuroprotector de la queuina se evalúa en cultivos de 6 días de antigüedad de acuerdo con el siguiente protocolo:

- adición de medio de control (medio de cultivo);
- adición de 6-OHDA (20 µM, 48H) + medio de cultivo;
- adición de 6-OHDA (20 µM, 48H) + BDNF (50 ng/ml);
- adición de 6-OHDA (20 µM, 48H) + queuina (7 concentraciones desde 0,03 µM hasta 30 µM) añadida en tres momentos diferentes antes, durante o después de la intoxicación por 6-OHDA:
  - o 6 días antes de la intoxicación por 6-OHDA, el compuesto permanecerá en el medio hasta la intoxicación;
  - o 1 día antes de la intoxicación por 6-OHDA;
  - o 1 día después de la intoxicación.

Las mismas condiciones sin 6-OHDA (sin intoxicación) se prueban en paralelo para evaluar los efectos de la queuina en la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas.

Cada condición se reproduce en seis pocillos de las placas de cultivo de 96 pocillos.

### 1.4. Evaluación de punto final: determinación del número total de neuronas dopaminérgicas

Al final del tiempo de incubación, las células se fijan con una solución de paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después, las células se permeabilizan y los sitios no específicos se bloquean con una solución salina tamponada con fosfato (PBS; PanBiotech) que contiene un 0,1% de saponina (Sigma) y un 1% de suero fetal bovino (FCS) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las células se incuban con un anticuerpo de ratón monoclonal anti-tirosina hidroxilasa (TH) (Sigma) en PBS que contiene un 1% de FCS y un 0,1% de saponina, durante 2 h a temperatura ambiente. El anticuerpo anti-TH se dirige a las neuronas dopaminérgicas.

El anticuerpo se revela con una IgG anti-ratón de cabra marcada con Alexa Fluor 488 (sonda molecular) en PBS con un 1% de FCS, un 0,1% de saponina, durante 1 hora a temperatura ambiente. El núcleo de las células se tiñe con un marcador fluorescente (solución de Hoechst, SIGMA) en la misma solución.

Para cada condición se toman 20 imágenes por pocillo usando InCell Analyzer™ 2000 (GE Healthcare) con un aumento de 20x. También se toman imágenes de cada cultivo.

El análisis de los cuerpos celulares de las neuronas positivas para TH se realiza utilizando el *software* Developer (GE healthcare). Se obtiene un total de 6 datos por condición experimental. Todos los valores se expresan como media ± e.e. de la media. Para los análisis estadísticos se realiza ANOVA seguido de la prueba de Dunnett.

## 2. Resultados

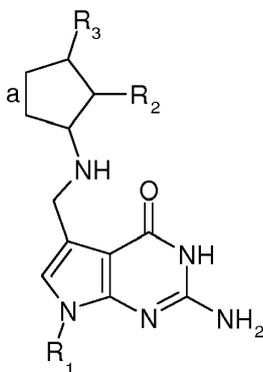
Los resultados preliminares indican que la queuina tiene un efecto neuroprotector sobre la neurotoxicidad inducida por 6-OHDA.

Como tal, de acuerdo con la figura 1 y la figura 2, la 6-OHDA administrada a 20 µM durante 48 h induce una disminución grande y significativa de las neuronas TH positivas. La administración de BDNF (50 ng/ml) 1 día y 6 días antes de la intoxicación por 6-OHDA muestra un efecto protector contra la lesión por 6-OHDA (\*, p < 0,05, 80,80% del control en la figura 1, y \*, p < 0,05, 83,44% del control en la figura 2). Estos resultados validan el estudio.

Además, la figura 1 muestra que la queuina 1 µM presenta un efecto protector significativo contra la 6-OHDA (\*, p < 0,05, 81,33% del control) cuando se añade 1 día (24 horas) antes de la intoxicación por 6-OHDA. Adicionalmente, la figura 2 muestra que la queuina 0,3 µM tiene un efecto protector significativo contra la intoxicación por 6-OHDA (\*, p < 0,05, 80,47% del control) cuando se añade 6 días antes de la intoxicación por 6-OHDA.

**REIVINDICACIONES**

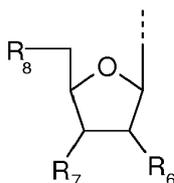
1. Un compuesto de la siguiente fórmula (I):



(I)

en donde:

- 5
- a representa un doble enlace o un grupo epoxi, y
  - R<sub>1</sub> representa -H o un grupo ribosilo de la siguiente fórmula:



en donde:

- 10
- R<sub>6</sub> representa -H; -O-R<sub>9</sub> u -O-CO-R<sub>9</sub>, en donde R<sub>9</sub> es H, un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o un grupo arilo que tiene de 3 a 12 átomos de carbono;
  - R<sub>7</sub> representa -H; -O-R<sub>10</sub> u -O-CO-R<sub>10</sub>, en donde R<sub>10</sub> es H, un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o un grupo arilo que tiene de 3 a 12 átomos de carbono; un grupo de ácido desoxirribonucleico; o un grupo de ácido ribonucleico;
  - R<sub>8</sub> representa -H; -O-R<sub>11</sub> u -O-CO-R<sub>11</sub>, en donde R<sub>11</sub> es H, un grupo alquilo que tiene de 1 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo que tiene de 3 a 20 átomos de carbono; un grupo fosfato; un grupo difosfato; un grupo trifosfato; un grupo de ácido desoxirribonucleico; o un grupo de ácido ribonucleico;
- 15
- R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub>, que son idénticos o diferentes, representan -O-R<sub>4</sub>, en donde R<sub>4</sub> es H, un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, un grupo arilo que tiene de 3 a 12 átomos de carbono, un grupo glicosilo o un grupo aminoacilo; u -O-CO-R<sub>5</sub>, en donde R<sub>5</sub> es un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, un grupo arilo que tiene de 3 a 12 átomos de carbono o un grupo glicosilo;
- 20

o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo,

para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa asociada con una disfunción mitocondrial en un individuo.

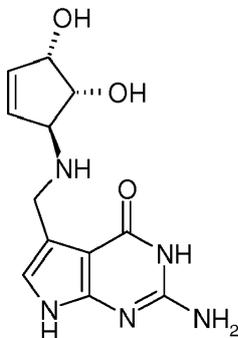
25 **2.** El compuesto o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según la reivindicación 1, en donde:

- R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub>, que son idénticos o diferentes, representan -OH, un grupo -O-manosilo, un grupo -O-galactosilo o un grupo -O-glutamilo;
  - R<sub>6</sub> representa -OH;
  - R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub>, que son idénticos o diferentes, representan -OH o un grupo de ácido ribonucleico.
- 30

**3.** El compuesto o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según la reivindicación 1

o 2, en donde el compuesto se selecciona entre el grupo que consiste en queuina, ent-queuina, queuosina, epoxiqueuina, epoxiqueuosina, manosil-queuina, galactosil-queuina, glutamil-queuina, galactosil-queuosina, manosil-queuosina, glutamil-queuosina, queuina-ARNt y epoxiqueuina-ARNt.

- 5 **4.** El compuesto o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto es queuina:



- 5.** El compuesto o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la enfermedad neurodegenerativa asociada con una disfunción mitocondrial es la enfermedad de Parkinson.
- 10 **6.** El compuesto o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para una administración con un régimen de dosificación de 0,01 a 40 mg/kg/día.
- 7.** El compuesto o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en una forma adecuada para una administración por vía oral, vía intradérmica, vía intravenosa, vía intramuscular o vía subcutánea.
- 15 **8.** El compuesto o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en combinación con al menos un compuesto adicional útil para la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada con una disfunción mitocondrial.
- 9.** Una composición farmacéutica que comprende como sustancia activa un compuesto de la fórmula (I) o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, opcionalmente en asociación con al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa asociada con una disfunción mitocondrial según la reivindicación 1 o 5 en un individuo.
- 20 **10.** Una composición farmacéutica que comprende como sustancia activa un compuesto de la fórmula (I) o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además al menos un compuesto adicional para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada con una disfunción mitocondrial, opcionalmente en asociación con al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa asociada con una disfunción mitocondrial según la reivindicación 1 o 5 en un individuo.
- 25 **11.** Productos que comprenden:
- 30 - un compuesto de la fórmula (I) tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4,
- al menos un compuesto adicional útil para la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada con una disfunción mitocondrial,
- como una preparación combinada para uso simultáneo, independiente o secuencial en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa asociada con una disfunción mitocondrial según la
- 35 reivindicación 1 o 5 en un individuo.
- 12.** Un suplemento dietético que comprende un compuesto de la fórmula (I) tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en la reducción del riesgo de una enfermedad neurodegenerativa asociada con una disfunción mitocondrial según la reivindicación 1 o 5 en un individuo.
- 40 **13.** El suplemento dietético para su uso según la reivindicación 12, que comprende compuestos adicionales seleccionados entre el grupo que consiste en vitaminas, minerales, ácidos grasos, aminoácidos y antioxidantes.

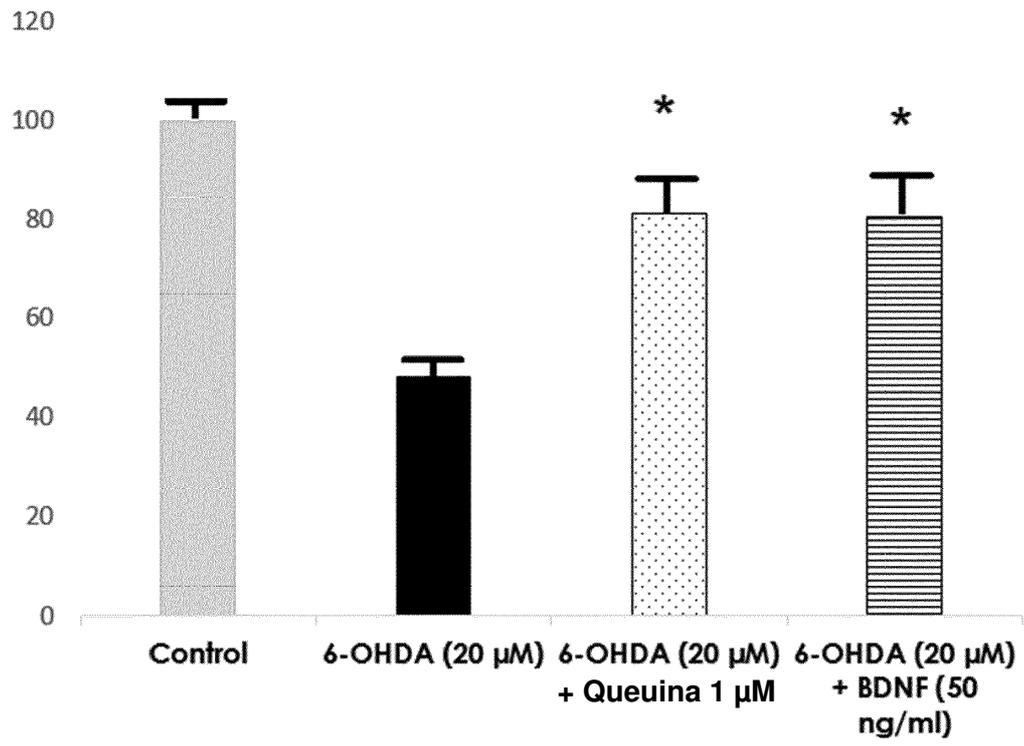


Figura 1

