

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 802 123**

51 Int. Cl.:

C07F 9/54 (2006.01)

A61K 31/66 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2014 PCT/EP2014/075323**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15075200**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2014 E 14818889 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3071582**

54 Título: **Compuestos secuestrantes de dicarbonilo dirigidos a mitocondrias**

30 Prioridad:

22.11.2013 GB 201320636

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

15.01.2021

73 Titular/es:

**UNITED KINGDOM RESEARCH AND
INNOVATION (100.0%)
Polaris House, North Star Avenue
Swindon SN2 1FL, GB**

72 Inventor/es:

**MURPHY, MICHAEL, PATRICK;
SMITH, ROBIN ANDREW JAMES y
HARTLEY, RICHARD CHARLES**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 802 123 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 secuestrantes de dicarbonilo dirigidos a mitocondrias

5 Campo de la invención

La invención se refiere a compuestos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos que comprenden un resto secuestrante de dicarbonilo, un resto enlazador opcional y un resto de direccionamiento mitocondrial. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos y sales, y al uso de dichos compuestos y sales para tratar diabetes, preferentemente diabetes hiperglucémica. La invención también se refiere a la provisión de una sonda de espectrometría de masas y a un procedimiento para marcar una molécula biológica para detección por espectrometría de masas.

15 Antecedentes

La hiperglucemia es una afección médica perjudicial. La hiperglucemia causa sus efectos mediante la glicación inapropiada de moléculas dentro de las células. Esta glicación tiene lugar después de la generación de 1,2-dicarbonilos reactivos tales como glioxal y metilglioxal. Estas especies reactivas modifican las moléculas presentes en la célula y causan una patología negativa.

La glicación, la formación no enzimática de aductos de azúcar-proteína y azúcar-nucleótido, desempeña un papel importante en la alteración de la función celular y provoca daños en los tejidos en una diversidad de patologías tales como diabetes, envejecimiento y neurodegeneración [1-3]. La glicación se incrementa en respuesta al aumento de glucosa que se produce en la diabetes no regulada y es una causa importante de complicaciones diabéticas [4, 5]. Dentro de la célula, el exceso de glucosa puede provocar daños moleculares mediante la formación de compuestos de 1,2-dicarbonilo, tales como metilglioxal, a partir de los intermedios de triosa fosfato de la glucólisis [1, 6] o del metabolismo de acetona generada durante cetosis [7]. Estos 1,2-dicarbonilos reactivos a menudo están presentes en formas químicas modificadas *in situ*, incluidos hemiacetales, hemitioacetales y hemiaminales reversibles con biomoléculas pequeñas y con restos reactivos en proteínas y ácidos nucleicos [8, 9]. Además, pueden reaccionar directamente con funciones amina libres presentes en proteínas y ácidos nucleicos, generando así modificaciones sustanciales permanentes, tales como hidroimidazolonas derivadas de arginina y enlaces cruzados de lisina en proteínas [10], e imidazopurinonas derivadas de guanina en ADN [11]. Se cree que dichas modificaciones dan como resultado una disfunción bioquímica mediante la alteración de la estructura y la actividad de las proteínas, y mediante la inducción de mutaciones genómicas [2]. Estos marcadores de daño por glicación están elevados en muchas muestras clínicas de pacientes diabéticos y también en modelos animales de diabetes y envejecimiento [2, 4, 9, 12, 13], lo que concuerda con la contribución de estas reacciones al daño celular y la patología. Un papel importante del metilglioxal y el glioxal en la patología se ve respaldado también por la existencia del sistema enzimático de la glioxalasa, que degrada específicamente estos dos dicarbonilos [14]. La pérdida de la ruta de degradación de la glioxalasa hace que los organismos sean más susceptibles a la glicación y al daño subsiguiente, mientras que su sobreexpresión aumenta la esperanza de vida en *Caenorhabditis elegans* [15]. Por lo tanto, la glicación asociada a dicarbonilo de proteínas y ácidos nucleicos es un factor que contribuye significativamente a una serie de patologías, particularmente aquellas asociadas con diabetes o envejecimiento.

En hiperglucemia existe una evidencia considerable de daño mitocondrial y estrés oxidativo elevado que contribuye a la patología, y esto se ha atribuido en parte a la glicación mitocondrial debida al metilglioxal y al glioxal [16-21]. Además, estos dicarbonilos reactivos alteran la función mitocondrial *in vitro* [22-24]. Por lo tanto, comprender la contribución del daño por glicación producido por dicarbonilos reactivos a la disfunción mitocondrial es importante para analizar y comprender la patología asociada con hiperglucemia. No obstante, los detalles mecanicistas son inciertos, y se ha demostrado que es difícil evaluar específicamente la importancia de estos procesos. Esto se debe en parte a las incertidumbres relacionadas con la distribución de metilglioxal y glioxal entre el citosol y las mitocondrias. En enfoques conocidos para combatir los efectos de la hiperglucemia, se ha intentado el uso de grupos de guanidina reactivos. Esto forma un enfoque generalizado de "limpieza". Los grupos guanidina reaccionan con grupos glioxal/metilglioxal. Sin embargo, este enfoque de guanidina es completamente no dirigido. Este es un inconveniente en la técnica.

El documento CN 102617467 divulga una sonda fluorescente de sensibilidad ultraalta para detectar monóxido de nitrógeno. Los experimentos de toma de imágenes confocales con láser indican que la sonda tiene una permeabilidad celular fina, no tiene efectos tóxicos ni secundarios sobre células y organismos, y puede utilizarse para detectar monóxido de nitrógeno protogenético de un modo muy sensible.

El documento US 6419711 divulga una composición de teñido por oxidación para fibras queratinosas que contiene al menos un agente de acoplamiento de monobenceno que incluye al menos un grupo catiónico Z que porta al menos una unidad de amonio cuaternario ciclada o no ciclada, el uso de dichos agentes de acoplamiento para teñir fibras queratinosas, procedimientos de teñido utilizando la misma y agentes de acoplamiento de monobenceno novedosos que comprenden al menos un grupo catiónico Z que porta al menos un amonio cuaternario ciclado o no ciclado.

65

5 K. M. Robinson et al.: "Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 103, N.º 41, 10 de octubre de 2006, páginas 15038-15043 divulgan la toma selectiva de imágenes fluorescentes de superóxido *in vivo* utilizando sondas basadas en etidio (Etd). Este artículo demuestra que la oxidación de la hidroetidina HE para dar un producto hidroxilado HO-Etd⁺ y de un indicador de superóxido mitocondrial Mito-HE para dar HO-Mito-Etd⁺ puede ser un indicador sensible para supervisar cambios dinámicos en la generación de O₂⁻ endógeno.

10 Pamela Boon Li Pun et al.: "Pathological Significance of Mitochondrial Glycation"; INTERNATIONAL JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 19, N.º 3, 1 de enero de 2012, páginas 231-13 divulgan la posibilidad de que la glicación mitocondrial contribuya como un agente perjudicial común en un amplio espectro de enfermedades.

15 Robin A. Smith et al.: "Mitochondrial pharmacology", TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, vol. 33, N.º 6, junio de 2012, páginas 341-352, divulgan las propiedades biológicas que hacen que las mitocondrias sean determinantes importantes de la salud y la enfermedad, y describen las estrategias farmacológicas que se están desarrollando para abordar la disfunción mitocondrial.

20 Susan Chalmers et al.: "Selective Uncoupling of Individual Mitochondria within a cell using a Mitochondria-Targeted Photoactivated Protonophore", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 134, N.º 2, 18 de enero de 2012, páginas 758-761 divulgan la despolarización de una mitocondria individual o de pequeñas agrupaciones de mitocondrias dentro de las células utilizando una sonda fotoactivable. La sonda se dirige a la matriz de la mitocondria mediante un catión lipófilo de alquiltrifenilfosfonio y libera el protonóforo 2,4-dinitrofenol localmente en regiones predeterminadas en respuesta a la irradiación dirigida con luz UV por medio de un sistema de fotólisis local.

25 Phing-How Lou et al.: "Mitochondrial uncouplers with an extraordinary dynamic range", BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 407, N.º 1, 1 de octubre de 2007, páginas 129-140, divulgan una serie de desacopladores débiles (tipificados por medio de hidroxitolueno butilado) que tienen un rango dinámico superior a 10⁶ *in vitro*: la concentración que proporciona un desacoplamiento medible es inferior a una millonésima parte de la concentración que causa el desacoplamiento completo. Esto se logra mediante una interacción de alta afinidad con la adenina nucleótido translocasa mitocondrial que causa un desacoplamiento significativo pero limitado a concentraciones de desacoplador extremadamente bajas, junto con un desacoplamiento más convencional a concentraciones mucho más altas. Se considera que el amplio rango dinámico de estos desacopladores en mitocondrias aisladas y células intactas revela una activación alostérica del transporte de protones a través de la adenina nucleótido translocasa y proporciona un punto de partida para diseñar desacopladores más seguros para el tratamiento contra la obesidad.

35 Sumario

Al abordar el o los problemas asociados con la técnica anterior, la solución proporcionada por los inventores incluye compuestos de la invención que se dirigen específicamente a grupos moleculares capaces de secuestrar los dicarbonilos que se encuentran dentro de las mitocondrias en condiciones de hiperglucemia.

40 Estos compuestos acoplan un resto de direccionamiento a un resto secuestrante para que los compuestos se acumulen preferentemente en las mitocondrias, donde son sumamente eficaces para reducir y/o prevenir el daño causado por los dicarbonilos reactivos. Opcionalmente, el resto secuestrante puede unirse al resto de direccionamiento a través de un resto enlazador. Cabe señalar que el enfoque de secuestro de los grupos reactivos dentro de las mitocondrias es nuevo. Este enfoque no se ha contemplado en ningún tratamiento conocido. Cabe señalar que el enfoque subyacente de la invención de secuestrar los grupos reactivos dentro de las propias mitocondrias se aparta de las técnicas conocidas. A partir de la invención tal como se explica a continuación se infieren estos y otros beneficios.

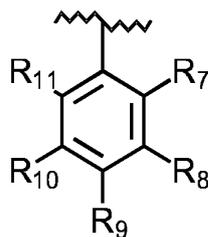
50 Por lo tanto, en un aspecto amplio, la invención se refiere a un compuesto de fórmula 1:

A-L-B

Fórmula 1

55 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

A es un resto secuestrante de dicarbonilo, siendo A un grupo arilo sustituido de fórmula 3:



Fórmula 3

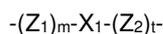
5 en la que dos o más de R₇-R₁₁ se seleccionan independientemente de entre -NH₂, -NHR₁, -NR₁R₁, -alquilen C₁₋₆-NH₂, -alquilen C₁₋₆-NHR₁, -O-NH₂, -O-NHR₁, -alquilen C₁₋₆-O-NH₂, -alquilen C₁₋₆-O-NHR₁, -NHCOR₁, -NR'-NHR', -alquilen C₁₋₆-NR'-NHR'; y

10 los grupos R₇-R₁₁ restantes se seleccionan independientemente de entre -H, -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆, -alquino C₂₋₆, -halógeno, -alquilen C₁₋₆-OH, -alquilen C₁₋₆-O-R₁, -CO₂H, -alquilen C₁₋₆-CO₂H, -CO₂R₁, -alquilen C₁₋₆-CO₂R₁, -alquilen C₁₋₆-O-C(O)-R₁, -CH(OH)-C(O)-R₁, -alquilen C₁₋₆-CH(OH)-C(O)-R₁, -CHO, -C(O)-R₁, -C(O)NH₂, -C(O)NHR₁, -SO₂NH₂ y SO₂NHR₁; y

15 cada R₁ se selecciona independientemente de entre -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆ y -alquino C₂₋₆; y

15 cada R' se selecciona independientemente de entre -H y -alquilo C₁₋₆;

L es un resto enlazador de fórmula 6:



20

Fórmula 6

25 en la que Z₁ y Z₂ se seleccionan independientemente de entre O, NR₁₂, NR₁₂-C(O), C(O)NR₁₂, O-C(O), C(O)-O y S;

25 R₁₂ se selecciona de entre -H y -alquilo C₁₋₆;

m y t se seleccionan independientemente de entre 0 o 1;

30 X₁ se selecciona de entre alqueno C₁₋₃₀, alqueno C₂₋₃₀, alqueno C₂₋₃₀ y cicloalqueno C₃₋₃₀; y

B es un resto de direccionamiento mitocondrial; siendo B un catión trifenilfosfonio.

35 En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: un compuesto de fórmula 1, tal como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención proporciona un compuesto de fórmula 1, tal como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como medicamento.

40 Otro aspecto de la invención proporciona un compuesto de fórmula 1, tal como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de diabetes, preferentemente diabetes hiperglucémica.

45 Otro aspecto de la invención proporciona un compuesto de fórmula 1, tal como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de diabetes, preferentemente diabetes hiperglucémica.

50 También se divulga en el presente documento un procedimiento para tratar una enfermedad o afección en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula 1, tal como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, siendo la enfermedad o afección diabetes, preferentemente diabetes hiperglucémica.

55 Otro aspecto de la invención proporciona un compuesto de fórmula 1, tal como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la conservación de órganos y tejidos para trasplantes quirúrgicos.

Otro aspecto de la invención proporciona un compuesto de fórmula 1, tal como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el almacenamiento de sangre.

5 Otro aspecto de la invención proporciona un compuesto de fórmula 1, tal como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la prevención o el tratamiento de hiperglucemia.

Otro aspecto de la invención proporciona un compuesto de fórmula 1, tal como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como una sonda de espectrometría de masas.

10 Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento para marcar una molécula biológica para detección por espectrometría de masas que comprende poner en contacto dichas moléculas con un compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Descripción detallada de la invención

15 "Sustituido", cuando se utiliza con respecto a un sustituyente o un resto químico (por ejemplo, un grupo alquilo), significa que uno o más átomos de hidrógeno del sustituyente o del resto se han reemplazado por uno o más átomos o grupos que no son hidrógeno, siempre que se cumplan los requerimientos de valencia y que se obtenga como resultado de la sustitución un compuesto químicamente estable.

20 "Alquilo" se refiere a grupos hidrocarburo saturados de cadena lineal y ramificados, que generalmente tienen un número especificado de átomos de carbono (por ejemplo, alquilo C₁₋₃ se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a 3 átomos de carbono, alquilo C₁₋₆ se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, y así sucesivamente). Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, s-butilo, i-butilo, t-butilo, pent-1-ilo, pent-2-ilo, pent-3-ilo, 3-metilbut-1-ilo, 3-metilbut-2-ilo, 2-metilbut-2-ilo, 2,2,2-trimetile-1-ilo, n-hexilo y similares.

25 "Alquilenilo" se refiere a un radical divalente derivado de un alcano que puede ser de cadena lineal o ramificado, tal como se ejemplifica por medio de -CH₂CH₂CH₂CH₂-.

30 Los términos "cicloalquilo", por sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se indique lo contrario, una versión cíclica de "alquilo". Los ejemplos de cicloalquilo incluyen ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo y similares.

35 El término "alquenilo", tal como se utiliza en el presente documento, significa un radical hidrocarburo que tiene al menos un doble enlace que incluye, pero sin limitación, etenilo, propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo y similares.

40 El término "alquenileno" se refiere a un radical divalente derivado de un alquenilo que puede ser de cadena lineal o ramificado, que contiene uno o más enlaces dobles, tal como se ejemplifica por medio de -CH₂CH=CH- o -CH₂CH(CH₃)CH=CH-CH₂-.

El término "alquinilo", tal como se utiliza en el presente documento, significa un radical hidrocarburo que tiene al menos un triple enlace que incluye, pero sin limitación, etinilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo y similares.

45 El término "alquinileno" se refiere a un grupo hidrocarburo insaturado divalente que puede ser lineal o ramificado, que contiene uno o más enlaces triples carbono-carbono, tal como se ejemplifica por medio de etino-1,2-diilo.

50 "Arilo", empleado solo o en combinación con otros términos (por ejemplo, ariloxi, ariltioxi, arilalquilo), se refiere a hidrocarburos aromáticos monocíclicos totalmente insaturados y a hidrocarburos policíclicos que tienen al menos un anillo aromático, teniendo los grupos arilo tanto monocíclicos como policíclicos generalmente un número especificado de átomos de carbono que comprenden sus miembros de anillo (por ejemplo, arilo C₆₋₁₄ se refiere a un grupo arilo que tiene de 6 a 14 átomos de carbono como miembros del anillo). El grupo arilo puede estar unido a un grupo parental o a un sustrato en cualquier átomo del anillo y puede incluir uno o más sustituyentes que no son hidrógeno a menos que dicha unión o sustitución viole los requerimientos de valencia. Los ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo, bifenilo, ciclobutabencenilo, indenilo, naftalenilo, benzocicloheptenilo, bifenilenilo, fluorenilo, grupos derivados del catión cicloheptatrieno y similares.

"Arieno" se refiere a un radical divalente derivado de un grupo arilo.

60 El término "alcoxi", tal como se utiliza en el presente documento, significa un grupo O-alquilo en el que "alquilo" es tal como se ha definido anteriormente.

65 El término "aralquilo" o "arilalquilo" significa un grupo aril-alquilo en el que el arilo y el alquilo son tal como se han descrito anteriormente. Los aralquilos preferidos comprenden un grupo alquilo inferior unido al grupo arilo. Ejemplos no limitantes de grupos aralquilo adecuados incluyen feniletileno, 2-fenetilo y naftalenilmetilo. El enlace al resto parental es a través del alquilo.

"Cicloalquilo" se refiere a grupos hidrocarburo monocíclicos y bicíclicos saturados que generalmente tienen un número especificado de átomos de carbono que comprenden el anillo o los anillos (por ejemplo, cicloalquilo C₃₋₈ se refiere a un grupo cicloalquilo que tiene de 3 a 8 átomos de carbono como miembros del anillo). Los grupos hidrocarburo bicíclicos pueden incluir anillos aislados (dos anillos que no comparten átomos de carbono), anillos espiro (dos anillos que comparten un átomo de carbono), anillos fusionados (dos anillos que comparten dos átomos de carbono y el enlace entre los dos átomos de carbono comunes) y anillos puenteados (dos anillos que comparten dos átomos de carbono, pero no un enlace común). El grupo cicloalquilo puede estar unido a un grupo parental o a un sustrato en cualquier átomo del anillo, a menos que dicha unión viole los requerimientos de valencia. Además, el grupo cicloalquilo puede incluir uno o más sustituyentes que no son hidrógeno a menos que dicha sustitución viole los requerimientos de valencia.

Los ejemplos de grupos cicloalquilo monocíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares. Los ejemplos de grupos cicloalquilo bicíclicos fusionados incluyen biciclo[2.1.0]pentanilo (es decir biciclo[2.1.0]pentan-1-ilo, biciclo[2.1.0]pentan-2-ilo y biciclo[2.1.0]pentan-5-ilo), biciclo[3.1.0]hexanilo, biciclo[3.2.0]heptanilo, biciclo[4.1.0]heptanilo, biciclo[3.3.0]octanilo, biciclo[4.2.0]octanilo, biciclo[4.3.0]nonanilo, biciclo[4.4.0]decanilo y similares. Los ejemplos de grupos cicloalquilo puenteados incluyen biciclo[2.1.1]hexanilo, biciclo[2.2.1]heptanilo, biciclo[3.1.1]heptanilo, biciclo[2.2.2]octanilo, biciclo[3.2.1]octanilo, biciclo[4.1.1]octanilo, biciclo[3.3.1]nonanilo, biciclo[4.2.1]nonanilo, biciclo[3.3.2]decanilo, biciclo[4.2.2]decanilo, biciclo[4.3.1]decanilo, biciclo[3.3.3]undecanilo, biciclo[4.3.2]undecanilo, biciclo[4.3.3]dodecanilo y similares. Los ejemplos de grupos cicloalquilo espiro incluyen espiro[3.3]heptanilo, espiro[2.4]heptanilo, espiro[3.4]octanilo, espiro[2.5]octanilo, espiro[3.5]nonanilo y similares. Los ejemplos de grupos cicloalquilo bicíclicos aislados incluyen los derivados de bi(ciclobutano), ciclobutanociclohexano, ciclopentanociclohexano, bi(ciclohexano), etc.

"Fármaco", "sustancia farmacológica", "ingrediente farmacéutico activo", y similares se refieren a un compuesto (por ejemplo, compuestos de fórmula 1 y compuestos nombrados específicamente anteriormente) que pueden utilizarse para tratar a un sujeto con necesidad de tratamiento.

"Excipiente" se refiere a cualquier sustancia que puede influir en la biodisponibilidad de un fármaco, pero que, por lo demás, es farmacológicamente inactiva.

"Halo" y "halógeno" se pueden utilizar indistintamente y se refieren a flúor, cloro, bromo y yodo. Además, los términos tales como "fluoroalquilo" pretenden incluir monofluoroalquilo y polifluoroalquilo.

"Heteroarilo" se refiere a grupos aromáticos monocíclicos insaturados y a grupos policíclicos que tienen al menos un anillo aromático, teniendo cada uno de los grupos átomos de anillo compuestos por átomos de carbono y de 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente de entre nitrógeno, oxígeno y azufre. Tanto los grupos monocíclicos como los policíclicos tienen generalmente un número específico de átomos de carbono como miembros de anillo (por ejemplo, heteroarilo C₁₋₉ se refiere a un grupo heteroarilo que tiene de 1 a 9 átomos de carbono y de 1 a 4 heteroátomos como miembros del anillo) y pueden incluir cualquier grupo bicíclico en el que cualquiera de los heterociclos monocíclicos mencionados anteriormente esté fusionado con un anillo de benceno. El grupo heteroarilo puede estar unido a un grupo parental o a un sustrato en cualquier átomo del anillo y puede incluir uno o más sustituyentes que no son hidrógeno a menos que dicha unión o sustitución viole los requerimientos de valencia o dé como resultado un compuesto químicamente inestable. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen grupos monocíclicos tales como pirrolilo (por ejemplo, pirrol-1-ilo, pirrol-2-ilo y pirrol-3-ilo), furanilo, tiofenilo, pirazolilo, imidazolilo, isoxazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, tiazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,3,4-triazolilo, 1-oxa-2,3-diazolilo, 1-oxa-2,4-diazolilo, 1-oxa-2,5-diazolilo, 1-oxa-3,4-diazolilo, 1-tia-2,3-diazolilo, 1-tia-2,4-diazolilo, 1-tia-2,5-diazolilo, 1-tia-3,4-diazolilo, tetrazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo y pirazinilo.

Los ejemplos de grupos heteroarilo también incluyen grupos bicíclicos tales como benzofuranilo, isobenzofuranilo, benzotiofenilo, benzo[c]tiofenilo, indolilo, 3*H*-indolilo, isoindolilo, 1*H*-isoindolilo, indolinilo, isoindolinilo, bencimidazolilo, indazolilo, benzotriazolilo, cromanilo, 2-fenilcromanilo, 3-fenilcromanilo, 4-fenilcromanilo, cromen-4-onilo, 2-fenilcromen-4-onilo, 3-fenilcromen-4-onilo, cumarinilo, 3-fenilcumarinilo, 4-fenilcumarinilo, 1,8-bis[2-cromanil]-6-benzo[7]anuleonilo, 1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridinilo, 1*H*-pirrolo[2,3-*c*]piridinilo, 1*H*-pirrolo[3,2-*c*]piridinilo, 1*H*-pirrolo[3,2-*b*]piridinilo, 3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridinilo, 3*H*-imidazo[4,5-*c*]piridinilo, 1*H*-pirazolo[4,3-*b*]piridinilo, 1*H*-pirazolo[4,3-*c*]piridinilo, 1*H*-pirazolo[3,4-*c*]piridinilo, 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridinilo, 7*H*-purinilo, indolizínilo, imidazo[1,2-*c*]piridinilo, imidazo[1,5-*c*]piridinilo, pirazolo[1,5-*c*]piridinilo, pirrolo[1,2-*b*]piridazinilo, imidazo[1,2-*c*]pirimidinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, cinnolinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, ftalazinilo, 1,6-naftiridinilo, 1,7-naftiridinilo, 1,8-naftiridinilo, 1,5-naftiridinilo, 2,6-naftiridinilo, 2,7-naftiridinilo, pirido[3,2-*c*]pirimidinilo, pirido[4,3-*c*]pirimidinilo, pirido[3,4-*c*]pirimidinilo, pirido[2,3-*c*]pirimidinilo, pirido[2,3-*b*]pirazinilo, pirido[3,4-*b*]pirazinilo, pirimido[5,4-*c*]pirimidinilo, pirazino[2,3-*b*]pirazinilo y pirimido[4,5-*c*]pirimidinilo.

"Heterociclo" y "heterociclilo" pueden utilizarse indistintamente y se refieren a grupos monocíclicos o bicíclicos saturados o parcialmente insaturados que tienen átomos de anillo compuestos por átomos de carbono y de 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente de entre nitrógeno, oxígeno y azufre. Tanto los grupos monocíclicos como los bicíclicos generalmente tienen un número específico de átomos de carbono en su anillo o sus anillos (por

ejemplo, heterociclilo C_{2-5} se refiere a un grupo heterociclilo que tiene 2 a 5 átomos de carbono y 1 a 4 heteroátomos como miembros de anillo). Al igual que con los grupos cicloalquilo bicíclicos, los grupos heterociclilo bicíclicos pueden incluir anillos aislados, anillos espiro, anillos fusionados y anillos puenteados. El grupo heterociclilo puede estar unido a un grupo parental o a un sustrato en cualquier átomo del anillo y puede incluir uno o más sustituyentes que no son hidrógeno a menos que tal unión o sustitución viole los requerimientos de valencia o dé como resultado un compuesto químicamente inestable. Los ejemplos de grupos heterociclilo monocíclicos incluyen oxirano, tiarano, aziridinilo (por ejemplo, aziridin-1-ilo y aziridin-2-ilo), oxetano, tianilo, azetidino, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofenilo, piperidinilo, tetrahidropirano, tetrahidropiridinilo, piperidinilo, 1,4-dioxano, 1,4-oxatiano, morfolinilo, 1,4-ditiano, piperazinilo, 1,4-azatiano, oxepano, tiepanilo, azepano, 1,4-dioxepano, 1,4-oxatiepanilo, 1,4-oxaazepano, 1,4-ditiepanilo, 1,4-tiazepano, 1,4-diazepano, 3,4-dihidro-2H-pirano, 5,6-dihidro-2H-pirano, 2H-pirano, 1,2,3,4-tetrahidropiridinilo y 1,2,5,6-tetrahidropiridinilo

Sustancias "farmacéuticamente aceptables" se refiere a aquellas sustancias que se encuentren dentro del ámbito de un criterio médico razonable adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de sujetos sin que se produzca de forma indebida una toxicidad, una irritación, una respuesta alérgica y similares proporcionales a una relación beneficio-riesgo razonable y que sean eficaces para su uso previsto.

"Composición farmacéutica" se refiere a la combinación de una o más sustancias farmacológicas y uno o más excipientes.

El término "sulfonilo" se refiere a un radical $-S(O)_2R$ en el que R es un grupo alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo sustituido, arilo sustituido o heteroarilo sustituido tal como se definen en el presente documento. Los ejemplos representativos incluyen, pero sin limitación, metilsulfonilo, etilsulfonilo, propilsulfonilo, butilsulfonilo y similares.

El término "sulfinilo" se refiere a un radical $-S(O)R$ en el que R es un grupo alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo sustituido, arilo sustituido o heteroarilo sustituido tal como se definen en el presente documento. Los ejemplos representativos incluyen, pero sin limitación, metilsulfinilo, etilsulfinilo, propilsulfinilo, butilsulfinilo y similares.

El término "sujeto", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un mamífero humano o no humano. Los ejemplos de mamíferos no humanos incluyen animales de ganado tales como ovejas, caballos, vacas, cerdos, cabras, conejos, ciervos, avestruces y emús; y animales de compañía tales como gatos, perros, roedores y caballos.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" de un fármaco se refiere a la cantidad del fármaco que puede utilizarse para tratar a un sujeto y puede depender del peso y la edad del sujeto y de la vía de administración, entre otras cosas.

"Tratamiento" se refiere a revertir, aliviar, inhibir el progreso o prevenir un trastorno, enfermedad o afección a la que se aplica dicho término, o revertir, aliviar, inhibir el progreso o prevenir uno o más síntomas de dicho trastorno, enfermedad o afección.

"Tratamiento" se refiere al acto de "tratar", tal como se ha definido justa anteriormente.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "que comprende" significa "que consiste al menos parcialmente en". Cuando se interpreta cada enunciado de la presente memoria descriptiva que incluye el término "que comprende", también pueden estar presentes características distintas de las introducidas por el término. Los términos relacionados tales como "comprender" y "comprende" deben interpretarse de la misma forma.

Resto secuestrante de dicarbonilo

El resto secuestrante de dicarbonilo A comprende un grupo arilo sustituido o un grupo heteroarilo sustituido. Un resto secuestrante de dicarbonilo es un resto que forma un compuesto estable, tal como un compuesto de quinoxalina, con una molécula de dicarbonilo, convenientemente con una molécula de 1,2-dicarbonilo. El resto secuestrante de dicarbonilo se utiliza para secuestrar moléculas de dicarbonilo en sistemas biológicos, tales como las soluciones diluidas que se encuentran en las células. Para que el resto secuestrante de dicarbonilo forme un compuesto estable con una molécula de dicarbonilo en las condiciones que se encuentran en las células, el resto secuestrante de dicarbonilo debe ser suficientemente nucleófilo como para formar aductos espontáneamente con la molécula de dicarbonilo a bajas concentraciones en agua a la temperatura corporal. En las soluciones diluidas de sistemas biológicos, tales como las que se encuentran en las células, el primer paso para producir un compuesto estable con un compuesto de dicarbonilo es formar un hemiacetal, hemiaminal o hemitioacetal, que es una reacción reversible con el equilibrio a favor de los materiales de partida.

Convenientemente, el grupo arilo sustituido o el grupo heteroarilo sustituido comprende dos o más grupos sustituyentes seleccionados independientemente de entre $-NH_2$, $-NHR_1$, $-NR_1R_1$, $-^1X-NH_2$, $-^1X-NHR_1$, $-O-NH_2$, $-O-NHR_1$, $-^1X-O-NH_2$, $-^1X-O-NHR_1$, $-NR'-NHR'$, $-^1X-NR'-NHR'$ y $-NHCOR_1$.

Convenientemente, el grupo arilo sustituido o el grupo heteroarilo sustituido comprende de dos a nueve grupos sustituyentes. De forma más conveniente, el grupo arilo sustituido o el grupo heteroarilo sustituido comprende de dos a ocho grupos sustituyentes; de dos a siete grupos sustituyentes; de dos a seis grupos sustituyentes; o de dos a cinco grupos sustituyentes.

5 Convenientemente, el grupo arilo sustituido o el grupo heteroarilo sustituido comprende de dos a nueve grupos sustituyentes seleccionados independientemente de entre -OH, -OR₁, -NH₂, -NHR₁, -NR₁R₁, -¹X-NH₂, -¹X-NHR₁, -O-NH₂, -O-NHR₁, -¹X-O-NH₂, -¹X-O-NHR₁, -NR'¹-NHR', -¹X-NR'¹-NHR', -NHCOR₁ y -O-C(O)-R₁.

10 Por lo tanto, los grupos sustituyentes pueden comprender derivados de hidrazina tales como -NH-NH₂, -NH-NH(alquilo C₁₋₆), -N(alquil C₁₋₆)-NH₂, -N(alquil C₁₋₆)-NH(alquilo C₁₋₆), -¹X-NH-NH₂, -¹X-NH-NH(alquilo C₁₋₆), -¹X-N(alquil C₁₋₆)-NH₂ y -¹X-N(alquil C₁₋₆)-NH(alquilo C₁₋₆).

15 Convenientemente, el grupo arilo sustituido o el grupo heteroarilo sustituido comprende dos o más grupos sustituyentes seleccionados independientemente de entre -OH, -OR₁, -NH₂, -NHR₁, -NR₁R₁, -¹X-NH₂, -¹X-NHR₁, -NHCOR₁ y -O-C(O)-R₁.

20 Convenientemente, el grupo arilo sustituido o el grupo heteroarilo sustituido comprende dos o más grupos sustituyentes seleccionados independientemente de entre -NH₂, -NHR₁, -NR₁R₁, -¹X-NH₂, -¹X-NHR₁ y -NHCOR₁.

Convenientemente, el grupo arilo sustituido o el grupo heteroarilo sustituido comprende dos o más grupos sustituyentes seleccionados independientemente de entre -OH, -OR₁, -NH₂, -NHR₁, -NR₁R₁, -alquilen C₁₋₆-NH₂, -alquilen C₁₋₆-NHR₁, -NHCOR₁ y -O-C(O)-R₁.

25 De forma más conveniente, el grupo arilo sustituido o el grupo heteroarilo sustituido comprende dos o más grupos sustituyentes seleccionados independientemente de entre -OH, -OR₁, -NH₂ y alquilen C₁₋₆-NH₂.

De forma más conveniente, el grupo arilo sustituido o el grupo heteroarilo sustituido comprende dos o más grupos sustituyentes seleccionados independientemente de entre -NH₂ y -alquilen C₁₋₆-NH₂.

30 Convenientemente, el grupo arilo sustituido o el grupo heteroarilo sustituido comprende de uno a siete de los grupos sustituyentes opcionales; de uno a seis de los grupos sustituyentes opcionales; de uno a cinco de los grupos sustituyentes opcionales; de uno a cuatro de los grupos sustituyentes opcionales; de uno a tres de los grupos sustituyentes opcionales.

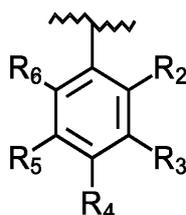
35 Convenientemente, el grupo arilo sustituido o el grupo heteroarilo sustituido comprende uno o más de los grupos sustituyentes opcionales seleccionados de entre -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆, -alquino C₂₋₆, -halógeno, -¹X-OH, -¹X-O-R₁, -CO₂H, -¹X-CO₂H, -CO₂R₁, -¹X-CO₂R₁, -C(O)NH₂, -C(O)NHR₁, -SO₂NH₂ y SO₂NHR₁.

40 Convenientemente, el grupo arilo sustituido o el grupo heteroarilo sustituido comprende uno o más de los grupos sustituyentes opcionales seleccionados de entre -alquilo C₁₋₆, -halógeno, -alquilen C₁₋₆-OH, -alquilen C₁₋₆-O-R₁, -CO₂H, -alquilen C₁₋₆-CO₂H, -CO₂R₁, -alquilen C₁₋₆-CO₂R₁, -alquilen C₁₋₆-O-C(O)-R₁, -CHO y -C(O)-R₁, -C(O)NH₂, -C(O)NHR₁, -SO₂NH₂ y SO₂NHR₁.

45 Convenientemente, el grupo arilo sustituido o el grupo heteroarilo sustituido comprende uno o más de los grupos sustituyentes opcionales seleccionados de entre -alquilo C₁₋₆, -halógeno, -alquilen C₁₋₆-OH, -alquilen C₁₋₆-O-R₁, -CO₂H, -CO₂R₁.

50 De forma más conveniente, R₁ es un -alquilo C₁₋₆. De forma más conveniente, R₁ se selecciona de entre metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, s-butilo, i-butilo y t-butilo.

De forma más conveniente, R₁ tiene la estructura de la fórmula 2:



Fórmula 2

55

en la que cada grupo R₂-R₆ se selecciona independientemente de entre -H, -alquilo C₁₋₆, -halógeno, -OH, -alquilen C₁₋₆-OH, -O-alquilo C₁₋₆, -alquilen C₁₋₆-O-alquilo C₁₋₆, -NH₂, -alquilen (C₁₋₆)-NH₂, -CO₂H y -CO₂-alquilo C₁₋₆.

De forma más conveniente, dos o más de R₂-R₆ son -H.

5

De forma más conveniente, R₂ y R₆ son -H.

De forma más conveniente, R₂ y R₆ son -H y R₃, R₄ y R₅ son -OH.

10 Convenientemente, A es un resto secuestrante de dicarbonilo que comprende un grupo arilo sustituido seleccionado de entre fenilo, bifenilo y naftalenilo sustituidos; o un grupo heteroarilo sustituido seleccionado de entre pirrolilo, furanilo, tiofenilo, pirazolilo, imidazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, cromanilo, 2-fenilcromanilo, 3-fenilcromanilo, 4-fenilcromanilo, cromen-4-onilo, 2-fenilcromen-4-onilo, 3-fenilcromen-4-onilo, cumarinilo, 3-fenilcumarinilo, 4-fenilcumarinilo y 1,8-bis[2-cromanil]-6-benzo[7]anuleonilo sustituidos.

15

De forma más conveniente, A es un resto secuestrante de dicarbonilo que comprende un grupo arilo sustituido seleccionado de entre fenilo y naftalenilo sustituidos; o un grupo heteroarilo sustituido seleccionado de entre piridinilo, cromanilo, 2-fenilcromanilo, 3-fenilcromanilo, 4-fenilcromanilo, cromen-4-onilo, 2-fenilcromen-4-onilo, 3-fenilcromen-4-onilo, cumarinilo, 3-fenilcumarinilo, 4-fenilcumarinilo y 1,8-bis[2-cromanil]-6-benzo[7]anuleonilo sustituidos.

20

De forma más conveniente, A es un resto secuestrante de dicarbonilo que comprende un grupo arilo sustituido seleccionado de entre fenilo y naftalenilo sustituidos; o un grupo heteroarilo sustituido seleccionado de piridinilo sustituido.

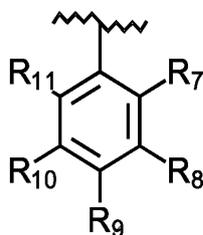
25

De forma más conveniente, el resto secuestrante de dicarbonilo A es un fenilo sustituido.

De forma más conveniente, el resto secuestrante de dicarbonilo A es un fenilo sustituido que comprende de dos a cinco grupos sustituyentes; de forma más conveniente, de dos a cuatro grupos sustituyentes; de forma más conveniente, de dos a tres grupos sustituyentes.

30

De forma más conveniente, el resto secuestrante de dicarbonilo A es un grupo arilo sustituido que comprende la fórmula 3:



35

Fórmula 3

en la que dos o más de R₇-R₁₁ se seleccionan independientemente de entre -OH, -OR₁, -NH₂, -NHR₁, -NR₁R₁, -alquilen C₁₋₆-NH₂, -alquilen C₁₋₆-NHR₁, -O-NH₂, -O-NHR₁, -alquilen C₁₋₆-O-NH₂, -alquilen C₁₋₆-O-NHR₁, -NHCOR₁, -O-C(O)-R₁, NR'-NHR', -alquilen C₁₋₆-NR'-NHR'; y

40

los grupos R₇-R₁₁ restantes se seleccionan independientemente de entre -H, -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆, -alquino C₂₋₆, -halógeno, -alquilen C₁₋₆-OH, -alquilen C₁₋₆-O-R₁, -CO₂H, -alquilen C₁₋₆-CO₂H, -CO₂R₁, -alquilen C₁₋₆-CO₂R₁, -alquilen C₁₋₆-O-C(O)-R₁, -CH(OH)-C(O)-R₁, -alquilen C₁₋₆-CH(OH)-C(O)-R₁, -CHO, -C(O)-R₁, -C(O)NH₂, -C(O)NHR₁, -SO₂NH₂ y SO₂NHR₁.

45

De forma más conveniente, dos o más de R₇-R₁₁ se seleccionan independientemente de entre -OH, -NH₂, -O-alquilo C₁₋₆, -NH(alquilo C₁₋₆), -alquilen C₁₋₆-NH₂, -alquilen C₁₋₆-NH(alquilo C₁₋₆).

50

De forma más conveniente, dos o más de R₇-R₁₁ se seleccionan independientemente de entre -OH, -O-alquilo C₁₋₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₆), -alquilen C₁₋₆-NH₂ y alquilen C₁₋₆-NH(alquilo C₁₋₆); y los grupos R₇-R₁₁ restantes se seleccionan independientemente de entre -H, -alquilo C₁₋₆, -alquilen C₁₋₆-OH, -alquilen C₁₋₆-O-alquilo C₁₋₆, -CO₂H, -CO₂-alquilo C₁₋₆, -CH(OH)-C(O)-alquilo C₁₋₆ y -CHO.

55

Convenientemente, de uno a tres de R₇-R₁₁ son -H.

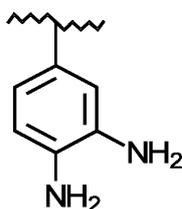
De forma más conveniente, dos o más de R₇-R₁₁ se selecciona independientemente de entre -OH, -O-alquilo C₁-C₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), -alquilen C₁-C₆-NH₂ y alquilen C₁-C₆-NH(alquilo C₁-C₆); y los grupos R₇-R₁₁ restantes se seleccionan independientemente de entre -H, -alquilo C₁-6, -alquilen C₁-6-OH y -alquilen C₁-6-O-alquilo C₁-6.

5 De forma más conveniente, R₇ = -H, R₁₀ = -H y R₁₁ = -H y R₈ y R₉ se seleccionan independientemente de entre -OH, -OR₁, -NH₂, -NHR₁, -alquilen C₁-6-NH₂, -alquilen C₁-6-NHR₁, -O-NH₂, -O-NHR₁, -alquilen C₁-6-O-NH₂, -alquilen C₁-6-O-NHR₁, -NHCOR₁ y -O-C(O)-R₁.

10 De forma más conveniente, R₇ = -H, R₁₀ = -H y R₁₁ = -H y R₈ y R₉ se seleccionan independientemente de OH, -O-alquilo C₁-C₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), -alquilen C₁-C₆-NH₂ y alquilen C₁-C₆-NH(alquilo C₁-C₆).

De forma más conveniente, R₇ = -H, R₁₀ = -H y R₁₁ = -H y R₈ y R₉ se seleccionan independientemente de entre -OH, -alquilen C₁-C₆-OH, -NH₂ y alquilen C₁-C₆-NH₂.

15 De forma más conveniente, R₇ = -H, R₈ = -NH₂, R₉ = -NH₂, R₁₀ = -H y R₁₁ = -H. Esto da como resultado un resto secuestrante de dicarbonilo A de fórmula 4:



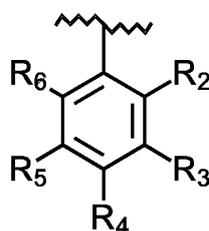
20 Fórmula 4

En un aspecto, el resto secuestrante de dicarbonilo A comprende un compuesto flavonoide o de teaflavina sustituido que comprende un grupo heteroarilo seleccionado de entre cromanilo, 2-fenilcromanilo, 3-fenilcromanilo, 4-fenilcromanilo, cromen-4-onilo, 2-fenilcromen-4-onilo, 3-fenilcromen-4-onilo, cumarinilo, 3-fenilcumarinilo, 4-fenilcumarinilo y 1,8-bis[2-cromanil]-6-benzo [7]anuleonilo sustituidos.

25 Se ha descrito la captura de especies tales como el glioxal y el metilglioxal con diversos compuestos flavonoides o de teaflavina [55] - [57].

30 De forma más conveniente, el compuesto flavonoide o de teflavina sustituido comprende uno o más grupos sustituyentes seleccionados independientemente de entre -OH, -OR₁, -NHCOR₁ y -O-C(O)-R₁; y opcionalmente puede comprender uno o más grupos sustituyentes seleccionados de entre -alquilo C₁-6, -halógeno, -alquilen C₁-6-OH, -alquilen C₁-6-O-R₁, -CO₂H, -CO₂R₁, -CH(OH)-C(O)-R₁ y -CHO, y

35 en los que R₁ es un -alquilo C₁-6 o tiene la fórmula 2:

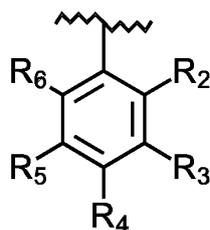


40 Fórmula 2

en la que el o cada grupo R₂-R₆ se selecciona independientemente de entre -H, -alquilo C₁-6, -halógeno, -OH y -O-alquilo C₁-6.

45 De forma más conveniente, el compuesto flavonoide sustituido comprende uno o más grupos sustituyentes seleccionados independientemente de entre -OH, -OR₁ y -O-C(O)-R₁; y opcionalmente puede comprender uno o más grupos sustituyentes seleccionados de entre -alquilo C₁-6, -alquilen C₁-6-OH, -alquilen C₁-6-O-R₁, -CO₂H y -CO₂R₁ y

en los que R₁ es un -alquilo C₁-6 o tiene la fórmula 2:



Fórmula 2

5 en la que el o cada grupo R₂-R₆ se selecciona independientemente de entre -H, -alquilo C₁₋₆ y -OH.

En algunos aspectos, A es un resto secuestrante de dicarbonilo que no incluye un resto benzoquinona.

Convenientemente, ¹X se selecciona de entre alquileno C₁₋₆ y alquenileno C₂₋₆.

10

De forma más conveniente, ¹X es un alquileno C₁₋₆.

La capacidad de un resto secuestrante de dicarbonilo para formar un compuesto estable con una molécula de dicarbonilo, tal como metilglioxal, podría evaluarse llevando a cabo un ensayo de competencia con un sistema de

15

detección [64] en el que el metilglioxal produzca un producto fluorescente que pueda detectarse por HPLC.

Resto enlazador

El resto enlazador -L- es divalente y puede ser cualquier grupo distanciador (espaciador) químicamente no activo que une el resto de direccionamiento mitocondrial al resto secuestrante de dicarbonilo, y permite que los dos restos permanezcan unidos entre sí cuando atraviesan el plasma y las membranas mitocondriales. En particular, -L- es estable en condiciones fisiológicas y debe ser farmacéuticamente aceptable.

20

Convenientemente -L- es un resto enlazador de fórmula 5:

25



Fórmula 5

30 en la que:

Z₁ y Z₂ se seleccionan independientemente de entre O, NR₁₂, NR₁₂-C(O), C(O)NR₁₂, O-C(O), C(O)-O y S;

35

Y se selecciona de entre O, NR₁₂, NR₁₂-C(O), C(O)NR₁₂, O-C(O), C(O)-O, S y arileno; en los que R₁₂ se selecciona de entre -H, -alquilo C₁₋₆ y -arilo;

X₁ se selecciona de entre alquileno C_{1-C_p}, alquenileno C_{2-C_p}, alquinileno C_{2-C_p} y cicloalquileno C_{3-C_p};

40

X₂ se selecciona de entre alquileno C_{1-C_q}, alquenileno C_{2-C_q}, alquinileno C_{2-C_q} y cicloalquileno C_{3-C_q};

cada uno de m, n, s y t se selecciona independientemente de entre 0 o 1;

en la que p + q = 30 y en la que X₁ y X₂ están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos funcionales seleccionados independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, haloalquilo, arilo, aminoalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, alquiltio, alquilsulfinilo, alquilsulfonilo, carboxialquilo, ciano, oxi, amino, alquilamino, aminocarbonilo, alcoxicarbonilo, ariloxicarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, aralquilaminocarbonilo, alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, aralquilcarbonilamino, alquilcarbonilo, heterociclocarbonilo, aminosulfonilo, alquilaminosulfonilo, alquilsulfonilo y heterociclosulfonilo, o los grupos sustituyentes de átomos de carbono adyacentes del grupo enlazador pueden tomarse conjuntamente con los átomos de carbono a los que están unidos para formar un carbociclo o un heterociclo.

50

Convenientemente, Z₁ es adyacente al resto secuestrante de dicarbonilo y Z₂ es adyacente al resto de direccionamiento mitocondrial.

55

De forma más conveniente, X₁ está sustituido con uno o más grupos funcionales seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo, arilo, alcoxicarbonilo, ariloxicarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarbonilamino y arilcarbonilamino.

De forma más conveniente, X_2 está sustituido con uno o más grupos funcionales seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo, arilo, alcocarbonilo, ariloxicarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarbonilamino y arilcarbonilamino.

5 De forma más conveniente, el resto enlazador es de fórmula 5, en la que:

Z_1 y Z_2 son tal como se han descrito anteriormente;

X_1 y X_2 son tal como se han descrito anteriormente;

10 Y se selecciona de entre $NR_{12}-C(O)$, $C(O)NR_{12}$ y $O-C(O)$;

R_{12} es tal como se ha descrito anteriormente;

15 $p = 12$;

$q = 5$;

m , n , s y t son tal como se han descrito anteriormente; y

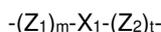
20 X_1 y X_2 están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos funcionales seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo, arilo, alcocarbonilo, ariloxicarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarbonilamino y arilcarbonilamino.

25 De forma más conveniente, X_1 se selecciona de alquileo C_1-C_p .

De forma más conveniente, X_2 se selecciona de alquileo C_1-C_p .

De forma más conveniente, m es 1.

30 De forma más conveniente, -L- es un resto enlazador de fórmula 6:



35 Fórmula 6

en la que Z_1 , m , Z_2 y t tienen los mismos significados que se han definido anteriormente, X_1 se selecciona de entre alquileo C_1-C_p , alquilenilo C_2-C_p , alquinileno C_2-C_p y cicloalquileo C_3-C_p y $C_p = 30$.

40 De forma más conveniente, -L- es un resto enlazador de fórmula 6 y Z_1 y Z_2 se seleccionan independientemente de entre O, NR_{12} , $NR_{12}-C(=O)$ y $C(=O)NR_{12}$.

De forma más conveniente, X_1 se selecciona de alquileo C_1-C_p .

45 De forma más conveniente, -L- es un resto enlazador de fórmula 6, en la que $C_p = 25$; de forma más conveniente, $C_p = 20$; de forma más conveniente, $C_p = 15$; de forma más conveniente, $C_p = 12$; de forma más conveniente, $C_p = 10$; de forma más conveniente, $C_p = 9$; de forma más conveniente, $C_p = 8$; de forma más conveniente, $C_p = 7$; de forma más conveniente, $C_p = 6$.

50 De forma más conveniente -L- es un resto enlazador de fórmula 7:



55 Fórmula 7

en la que Z_1 y m tienen los mismos significados que se han definido anteriormente y $C_p = 30$.

Convenientemente, Z_1 es adyacente al resto secuestrante de dicarbonilo y el alquileo C_1-C_p es adyacente al resto de direccionamiento mitocondrial.

60 De forma más conveniente, -L- es un resto enlazador de fórmula 7 y m es 1 y Z_1 se selecciona de entre O y $C(O)NR_{12}$.

De forma más conveniente, -L- es un resto enlazador de fórmula 7 y R_{12} se selecciona de entre -H y -alquilo C_1-C_6 .

65 De forma más conveniente, -L- es un resto enlazador de fórmula 7 y m es 1 y Z_1 es $C(O)NH$.

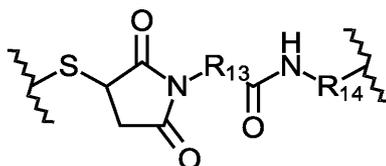
De forma más conveniente, -L- es un resto enlazador de fórmula 7 en la que $C_p = 25$; de forma más conveniente, $C_p = 20$; de forma más conveniente, $C_p = 15$; de forma más conveniente, $C_p = 10$; de forma más conveniente, $C_p = 9$; de forma más conveniente, $C_p = 8$; de forma más conveniente, $C_p = 7$; de forma más conveniente, $C_p = 6$.

5 De forma más conveniente, -L- es un resto enlazador de fórmula 7 y el alquileo C_1-C_p es un alquileo C_3-C_6 .

De forma más conveniente, -L- es un resto enlazador de fórmula 7, en la que m es 1, Z_1 se selecciona de entre O y C(O)NR₁₂; y el alquileo C_1-C_p se selecciona de un alquileo C_3-C_6 .

10 De forma más conveniente, -L- es un resto enlazador de fórmula 7, en la que m es 1, Z_1 es C(O)NH; y el alquileo C_1-C_p se selecciona de un alquileo C_3-C_6 .

En un aspecto, -L- es un resto enlazador de fórmula 8:



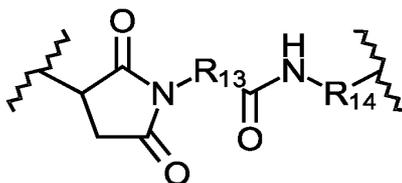
15

Fórmula 8

en la que R₁₃ es un alquileo C_1-C_6 y R₁₄ es un alquileo C_1-C_6 .

20

En un aspecto, -L- es un resto enlazador de fórmula 9:



25

Fórmula 9

en la que R₁₃ es un alquileo C_1-C_6 y R₁₄ es un alquileo C_1-C_6 .

De forma más conveniente, para la fórmula 8 o 9, R₁₃ es -CH₂-CH₂-CH₂-.

30

De forma más conveniente, para la fórmula 8 o 9, R₁₄ es -CH₂-CH₂-CH₂-.

Los restos enlazadores de fórmula 8 o 9 se describen en el documento US 2009/0099080.

35 Resto de direccionamiento mitocondrial

Se conocen en la técnica muchos restos de direccionamiento mitocondrial. Los compuestos que comprenden restos de direccionamiento mitocondrial se acumulan en altas concentraciones dentro de las mitocondrias después de su administración.

40

La acumulación de compuestos que comprenden restos de direccionamiento mitocondrial dentro de las mitocondrias puede estar impulsada, por ejemplo, por el potencial de membrana plasmática y/o los potenciales de membrana mitocondrial. Dicha acumulación a menudo puede describirse de forma adecuada mediante la ecuación de Nernst y, por ejemplo, para compuestos que comprenden un catión trifenilfosfonio puede ser 10 veces por potencial de membrana de 60 mV en condiciones biológicas típicas [25-27]. Como resultado, los compuestos que comprenden un resto de direccionamiento mitocondrial, tal como el catión trifenilfosfonio, pueden acumularse varios cientos de veces o más dentro de las mitocondrias *in vivo* suponiendo potenciales de plasma y de membrana mitocondrial de 30 mV y 160 mV, respectivamente [28, 29].

45

50 Convenientemente, el resto de direccionamiento mitocondrial B es un resto de direccionamiento mitocondrial catiónico o un péptido de direccionamiento mitocondrial.

En la técnica se conoce una serie de péptidos de direccionamiento mitocondrial. En el documento US 2009/0099080 se describen ejemplos adecuados.

Convenientemente, el resto de direccionamiento mitocondrial B es un resto de direccionamiento mitocondrial catiónico. Un resto de direccionamiento mitocondrial catiónico también se asociará con un anión farmacéuticamente aceptable.

5 Convenientemente, el anión se selecciona de entre acetato, clorhidrato/cloruro, bromhidrato/bromuro, yodhidrato/yoduro, bisulfato, sulfato, metilsulfonato, nitrato, fosfato, hidrogenofosfato, dihidrogenofosfato y sales de trifluoroacetato.

Convenientemente, el resto de direccionamiento mitocondrial B es un catión lipófilo.

10 Los cationes lipófilos son restos de direccionamiento mitocondrial adecuados porque pueden pasar fácilmente directamente a través de bicapas de fosfolípidos sin tener que superar grandes barreras de energía o requerir un mecanismo de absorción específico, y se acumulan sustancialmente dentro de las mitocondrias debido al elevado potencial de membrana.

15 Sin desear vincularse a ninguna teoría, se cree que los cationes lipófilos se recogen de un compartimento celular cargado positivamente y se llevan a un compartimento cargado negativamente hasta que se constituye un gradiente de concentración lo suficientemente elevado como para igualar el potencial electroquímico de las moléculas en los dos compartimentos. Por cada aumento de 60 mV en el potencial de membrana, se producirá una acumulación de aproximadamente diez veces del catión lipófilo dentro de las mitocondrias. Debido a que la membrana plasmática tiene un potencial negativo de 30-60 mV en el interior, los cationes lipófilos se acumularán de 5 a 10 veces en el citosol. Los cationes lipófilos presentes en el citosol se acumularán en las mitocondrias debido a que el potencial de membrana mitocondrial es típicamente de aproximadamente 140 a 180 mV.

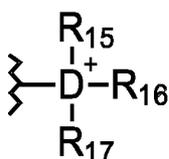
25 Convenientemente, el resto de direccionamiento mitocondrial B se selecciona de entre:

(i) restos de direccionamiento mitocondrial catiónicos que comprenden un catión de amonio o fosfonio cuaternario;

30 (ii) restos de direccionamiento mitocondrial catiónicos que comprenden un compuesto 1,4a,8-triaza-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1*H*-naftaleno; y

(iii) restos de direccionamiento mitocondrial catiónicos que comprenden un compuesto de rodamina.

35 De forma más conveniente B es (i) un resto de direccionamiento mitocondrial catiónico que comprende un catión de amonio o fosfonio cuaternario de fórmula 10:



Fórmula 10

40 en la que:

D es fósforo, nitrógeno o arsénico; y

45 cada uno de R₁₅, R₁₆ y R₁₇ se selecciona independientemente de entre alquilo, bencilo, arilo y heteroarilo sustituidos o no sustituidos.

De forma más conveniente, D es fósforo.

50 De forma más conveniente, cada uno de R₁₅, R₁₆ y R₁₇ se selecciona independientemente de entre alquilo, bencilo, fenilo, naftilo, furanilo, piridilo y tiofenilo sustituidos o no sustituidos.

55 De forma más conveniente, cuando cualquiera de R₁₅, R₁₆ y R₁₇ están sustituidos, los alquilo, bencilo, arilo o heteroarilo sustituidos están sustituidos con 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en -halógeno, -OH, -SH, -O-alquilo C₁₋₆, -S-alquilo C₁₋₆, -SPh, -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆, -alquino C₁₋₆, -hidroxialquilo C₁₋₆, -aminoalquilo C₁₋₆, -aralquilo C₆₋₁₈, -arilo C₆₋₁₂, -cicloalquilo C₃₋₈, -heteroarilo C₁₋₁₂ y -heterociclilo C₁₋₁₂.

60 Convenientemente, cuando uno o más de R₁₅, R₁₆ y R₁₇ se selecciona independientemente de entre alquilo sustituido o no sustituido, cada grupo alquilo se selecciona independientemente de un alquilo C₂₋₃₀ sustituido o no sustituido. De forma más conveniente, cada grupo alquilo se selecciona independientemente de un alquilo C₁₋₂₅ sustituido o no

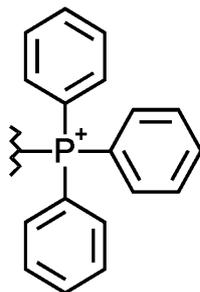
sustituido; de un alquilo C₁₋₂₀ sustituido o no sustituido; de un alquilo C₁₋₁₅ sustituido o no sustituido; de un alquilo C₁₋₁₀ sustituido o no sustituido.

De forma más conveniente cada uno de R₁₅, R₁₆ y R₁₇ son iguales.

De forma más conveniente cada uno de R₁₅, R₁₆ y R₁₇ es un grupo arilo no sustituido o sustituido. De forma más conveniente cada uno de R₁₅, R₁₆ y R₁₇ es un grupo arilo no sustituido.

De forma más conveniente cada grupo arilo es fenilo.

De forma más conveniente, B es un catión trifenilfosfonio (TPP), que tiene la fórmula 11:

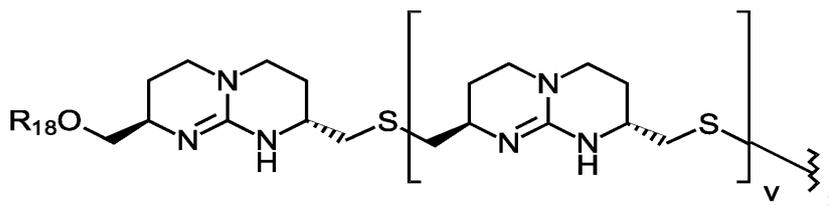


Fórmula 11

El gran radio hidrófobo del catión TPP le permite pasar fácilmente a través de la bicapa de fosfolípidos con respecto a otros cationes.

La funcionalidad del catión trifenilfosfonio (TPP) lipófilo es adecuada para dirigirse a las mitocondrias y se ha demostrado que dirige una amplia diversidad de antioxidantes, sondas y moléculas bioactivas a las mitocondrias en células, modelos animales y pacientes después de su administración intravenosa, oral o intraperitoneal [25-27]. La absorción se produce directamente a través de la bicapa de fosfolípidos y no requiere un vehículo proteico, mientras que el potencial de membrana determina el grado de acumulación en las mitocondrias.

De forma más conveniente, B es (ii) un resto de direccionamiento mitocondrial catiónico que comprende compuesto 1,4a,8-triaza-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-naftaleno de fórmula 12

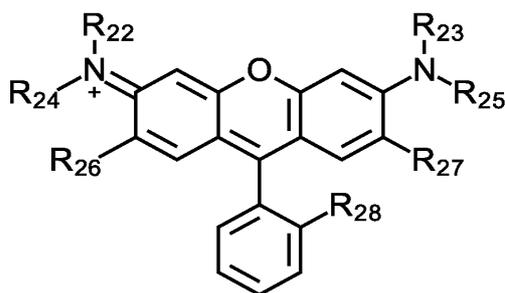


Fórmula 12

en la que R₁₈ es -H, -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₁₋₆, -alquino C₁₋₆, -alquilen C₁₋₆-halógeno, -arilo, -aril-alquilo C₁₋₆ o R₁₉R₂₀R₂₁Si en la que R₁₉, R₂₀ y R₂₁ se seleccionan independientemente de entre -alquilo C₁₋₆ y arilo; y v es 1, 2 o 3. Dichos restos de direccionamiento mitocondrial catiónicos se describen en el documento US 2009/099080.

Tal como se divulga en el documento US 2009/099080, los restos enlazadores de fórmula 9 son adecuados para su uso con restos de direccionamiento mitocondrial catiónicos de fórmula 12.

De forma más conveniente, B es (iii) un resto de direccionamiento mitocondrial catiónico que comprende un compuesto de rodamina de fórmula 13:



Fórmula 13

5 en la que R₂₂, R₂₃ y R₂₄ se seleccionan independientemente de entre -H y -alquilo C₁-C₆;

R₂₆ y R₂₇ se seleccionan independientemente de entre -H o -CH₃;

R₂₈ se selecciona de entre --CO₂R₂₉, -O-C(O)-R₂₉, -C(O)-NHR₂₉ y -NH-C(O)-R₂₉; y

10 uno de R₂₅ y R₂₉ es un enlace al enlazador L y al otro de R₂₅ y R₂₈ se selecciona de entre -H y -alquilo C₁-C₆.

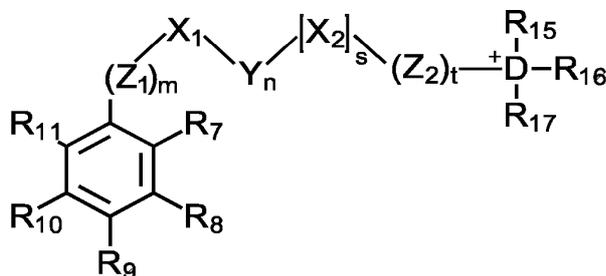
Una gran cantidad de derivados de rodamina tales como la rodamina 123, la rodamina B, la rodamina 6G, la rodamina 19, la rodamina 110 y la rodamina 116 están disponibles comercialmente de proveedores tales como Acos Organics, Aldrich y Fluka. La síntesis de derivados de rodamina también se ha revisado [54].

15

Compuestos adicionales de fórmula 1

Convenientemente, el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable de fórmula 1 es una sal de fórmula 14:

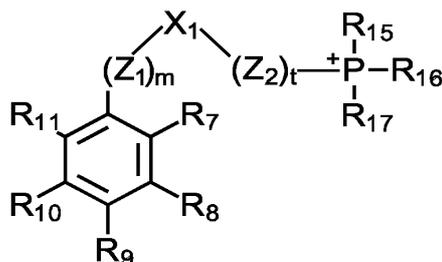
20



Fórmula 14

25 en la que R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₅, R₁₆, R₁₇, Z₁, X₁, Y, X₂, Z₂, D, m, n, s y t tienen los mismos significados que los descritos anteriormente. La sal de fórmula 14 puede comprender opcionalmente además un anión farmacéuticamente aceptable.

30 De forma más conveniente, el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable de fórmula 1 es una sal de fórmula 15:

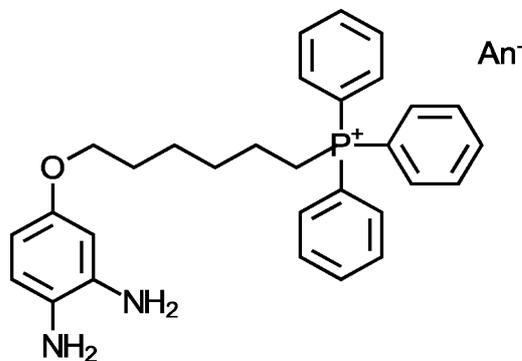


Fórmula 15

en la que R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₅, R₁₆, R₁₇, Z₁, X₁, Z₂, m y t tienen los mismos significados que los descritos anteriormente. La sal de fórmula 15 puede comprender opcionalmente además un anión farmacéuticamente aceptable.

De forma más conveniente, el compuesto de fórmula 1 es MitoG que tiene la estructura mostrada en la fórmula 16:

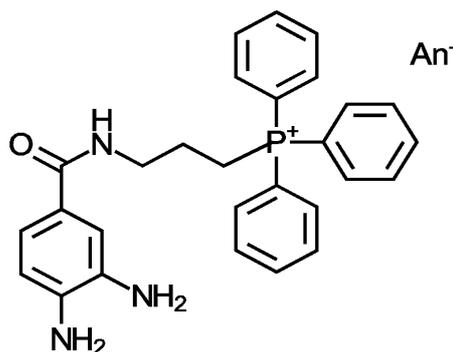
5



Fórmula 16

10 en la que An⁻ representa un anión farmacéuticamente aceptable opcional.

Otro ejemplo de un compuesto de fórmula 1 es MitoGamida, sal de (3-(3,4-diaminobenoilamino)propil)trifenilfosfonio, que tiene la estructura que se muestra en la fórmula 17:



15

Fórmula 17

20 en la que An⁻ representa un anión farmacéuticamente aceptable opcional.

20

Convenientemente, el anión An⁻ se selecciona de entre sales acetato, clorhidrato/cloruro, bromhidrato/bromuro, yodhidrato/yoduro, bisulfato, sulfato, metilsulfonato, nitrato, fosfato, hidrogenofosfato, dihidrogenofosfato y trifluoroacetato.

25 De forma más conveniente, el anión An⁻ es la sal cloruro.

Estas moléculas comprenden un grupo de direccionamiento mitocondrial, tal como un ion trifenilfosfonio (TPP), unido a través de un átomo de oxígeno a un grupo secuestrante, tal como una o-fenilendiamina, que reacciona selectivamente con metilgloxal y gloxal. Las fenilendiaminas sustituidas con alcoxi se han utilizado para detectar 1,2-dicarbonilos gracias a una reactividad mejorada debida al sustituyente alcoxi donador de electrones [28, 29]. Estas se han utilizado como agentes derivatizantes para la detección de dicarbonilos que reaccionan para formar productos de quinoxalina estables [12, 13, 28].

30

Se ha demostrado que compuestos tales como MitoG son protectores, tal como se muestra en la sección de ejemplos.

35

Los compuestos tales como MitoGamida también son protectores y muestran una mayor estabilidad.

Al diseñar los compuestos MitoG tales como las MitoGamidas, se consideraron las características requeridas para lograr los beneficios terapéuticos de la invención. Se identificó la necesidad de atraer electrones a una parte separada de la estructura molecular. Los inventores identificaron grupos moleculares que podrían sustituirse para ajustar la reactividad del grupo diamina. Las soluciones a este problema se proporcionan con los compuestos de fórmula 1. Las

40

soluciones preferidas incluyen la molécula de MitoGamida que proporciona beneficios que incluyen una mayor estabilidad.

5 Los compuestos de fórmula 1, que incluyen compuestos nombrados específicamente anteriormente, pueden formar sales farmacéuticamente aceptables. Estas sales incluyen sales de adición de ácidos (incluidos diácidos) y sales básicas. Las sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables incluyen sales no tóxicas derivadas de ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido fluorhídrico y ácidos fosforosos, así como sales no tóxicas derivadas de ácidos orgánicos, tales como ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos alcanodioicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, etc. Dichas sales incluyen sales acetato, adipato, aspartato, benzoato, besilato, bicarbonato, carbonato, bisulfato, sulfato, borato, camsilato, citrato, ciclamato, edisilato, esilato, formiato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hexafluorofosfato, hibenzato, clorhidrato/cloruro, bromhidrato/bromuro, yodhidrato/yoduro, isetionato, lactato, malato, maleato, maleato, maleato mesilato, metilsulfonato, naftilato, 2-napsilato, nicotinato, nitrato, orotato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato, hidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, piroglutamato, sacarato, estearato, succinato, tanato, tartrato, tosilato, trifluoroacetato y xinofoato.

20 Las sales básicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales no tóxicas derivadas de bases, que incluyen cationes metálicos, tales como un catión de un metal alcalino o alcalinotérreo, así como aminas. Los ejemplos de cationes metálicos adecuados incluyen sodio (Na^+) potasio (K^+), magnesio (Mg^{2+}), calcio (Ca^{2+}), zinc (Zn^{2+}) y aluminio (Al^{3+}). Los ejemplos de aminas adecuadas incluyen arginina, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietilamina, dietanolamina, dicitlohexilamina, etilendiamina, glicina, lisina, N-metilglucamina, olamina, 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol y procaína. Para una discusión sobre sales de adición de ácidos y sales básicas útiles, véase S. M. Berge et al., *J. Pharm. Sci.* (1977) 66: 1-19; véase también Stahl y Wermuth, *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use* (2002).

30 Las sales farmacéuticamente aceptables pueden prepararse utilizando diversos procedimientos. Por ejemplo, se puede hacer reaccionar un compuesto de fórmula 1 con un ácido apropiado o una base apropiada para dar la sal deseada. También se puede hacer reaccionar un precursor del compuesto de fórmula 1 con un ácido o una base para eliminar un grupo protector lábil a ácidos o bases o para abrir un grupo lactona o lactama del precursor. Además, se puede convertir una sal del compuesto de fórmula 1 en otra sal a través del tratamiento con un ácido apropiado o una base apropiada o mediante contacto con una resina de intercambio iónico. Después de la reacción, se puede aislar la sal por filtración si precipita de la solución, o por evaporación para recuperar la sal. El grado de ionización de la sal puede variar de completamente ionizado a casi no ionizado.

35 Los compuestos de fórmula 1 también pueden existir en formas no solvatadas y solvatadas. El término "solvato" describe un complejo molecular que comprende el compuesto y una o más moléculas de disolvente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, EtOH). El término "hidrato" es un solvato en el que el disolvente es agua. Los solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen aquellos en los que el disolvente puede estar sustituido isotópicamente (por ejemplo, D_2O , acetona- d_6 , DMSO- d_6).

45 Un sistema de clasificación actualmente aceptado para solvatos e hidratos de compuestos orgánicos es uno que distingue entre solvatos e hidratos de sitio aislado, de canal y coordinados con iones metálicos. Véase, por ejemplo, K. R. Morris (H. G. Brittain ed.) *Polymorphism in Pharmaceutical Solids* (1995). Los solvatos e hidratos de sitio aislado son aquellos en los que las moléculas de disolvente (por ejemplo, agua) están aisladas del contacto directo entre las mismas mediante moléculas intermedias del compuesto orgánico. En los solvatos de canal, las moléculas de disolvente se encuentran en canales reticulares en los que se encuentran al lado de otras moléculas de disolvente. En los solvatos coordinados con iones metálicos, las moléculas del disolvente están unidas al ion metálico.

50 Cuando el disolvente o el agua están fuertemente unidos, el complejo tendrá una estequiometría bien definida independiente de la humedad. Sin embargo, cuando el disolvente o el agua están débilmente unidos, como en los solvatos de canal y en los compuestos higroscópicos, el contenido de agua o disolvente dependerá de la humedad y de las condiciones de secado. En dichos casos, típicamente se observará una no-estequiometría.

55 Los compuestos de fórmula 1 también pueden existir como complejos de varios componentes (distintos de sales y solvatos) en los que el compuesto (fármaco) y al menos otro componente están presentes en cantidades estequiométricas o no estequiométricas. Los complejos de este tipo incluyen clatratos (complejos de inclusión fármaco-huésped) y cocrystalales. Estos últimos se definen típicamente como complejos cristalinos de constituyentes moleculares neutros que están unidos mediante interacciones no covalentes, pero también podrían ser un complejo de una molécula neutra con una sal. Los cocrystalales se pueden preparar por cristalización en estado fundido, por recristalización a partir de disolventes o por molienda física de los componentes conjuntamente. Véase, por ejemplo, O. Almarsson y M. J. Zaworotko, *Chem. Commun.* (2004) 17: 1889-1896. Para una revisión general de complejos de varios componentes, véase J. K. Haleblan, *J. Pharm. Sci.* (1975) 64 (8): 1269-88.

65 Procedimientos de síntesis

En este apartado se describen procedimientos para la síntesis química de compuestos de la presente invención. Estos procedimientos pueden modificarse y/o adaptarse de maneras conocidas para facilitar la síntesis de compuestos adicionales dentro del alcance de la presente invención. Las cantidades de reactivos dadas son orientativas. Las descripciones de los procedimientos y las operaciones generales de laboratorio, útiles para la preparación de los compuestos de la presente invención, se describen en Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry (5.^a edición, Ed. Furniss, B. S., Hannaford, A. J., Smith, P. W. G., Tatchell, A. R., Longmann, Reino Unido).

La síntesis de los compuestos de la presente invención puede tener tres etapas clave:

(i) formación del resto secuestrante de dicarbonilo;

(ii) unión del grupo enlazante al resto secuestrante de dicarbonilo; y

(iii) unión del grupo enlazante al resto de direccionamiento mitocondrial.

En algunos casos, el material de partida para la formación del resto secuestrante de dicarbonilo puede incluir parte o la totalidad del grupo enlazante. Cuando está incluido todo el grupo enlazante, se omite la etapa (ii).

Estas tres etapas pueden llevarse a cabo en cualquier orden, que dependerá de los procedimientos utilizados y de la naturaleza de cada uno de los tres grupos. Es posible que la formación del resto secuestrante de dicarbonilo se pueda interrumpir uniendo un precursor al grupo enlazante. Si es necesario, se pueden emplear grupos protectores para evitar cualquier reacción no deseada que tenga lugar durante la síntesis.

Formación del resto secuestrante de dicarbonilo: esta dependerá de la naturaleza del resto secuestrante de dicarbonilo, y generalmente puede estar basada en las rutas descritas para formar ese resto. A veces es conveniente sintetizar el resto secuestrante de dicarbonilo con un heteroátomo (O, S o NH) ya unido al resto secuestrante de dicarbonilo en la posición en la que se desea unir este resto al resto enlazador. Dicho heteroátomo puede ayudar a la unión del grupo enlazante al resto secuestrante de dicarbonilo. El resto secuestrante de dicarbonilo también puede sintetizarse con un grupo funcional presente, tal como un ácido carboxílico, que sea adecuado para una funcionalización adicional.

Unión del grupo enlazante al resto de direccionamiento mitocondrial: generalmente se prefiere llevar a cabo esta etapa calentando un precursor halogenado, preferentemente un precursor yodado o bromado (RBr o RI), o un precursor con un grupo saliente fuerte, tal como un mesilato, a veces en un disolvente apropiado con 2-3 equivalentes del precursor del resto de direccionamiento mitocondrial en atmósfera de argón durante un periodo de hasta varios días. R puede ser el grupo enlazante, el grupo enlazante ya unido al resto secuestrante de dicarbonilo, o el grupo enlazante unido a un precursor del resto secuestrante de dicarbonilo. Cuando se utiliza un precursor halogenado en la reacción, el compuesto producto se aísla después como su sal de bromuro o yoduro. Para realizar esta operación, se elimina el disolvente (si es necesario), después se tritura el producto repetidamente con un compuesto tal como dietiléter, hasta que queda un sólido. Este se puede disolver en un disolvente, por ejemplo, diclorometano, y precipitarse con dietiléter para eliminar el exceso de material sin reaccionar. Esto puede repetirse. La purificación puede implicar recristalización, por ejemplo, a partir de cloruro de metileno/dietiléter o cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con mezclas de diclorometano/etanol.

Unión del grupo enlazante al resto secuestrante de dicarbonilo: esta dependerá de la naturaleza del resto secuestrante de dicarbonilo. Un procedimiento para lograr esta unión es sintetizar el grupo enlazante como parte del resto secuestrante de dicarbonilo. En este caso, el grupo enlazante tendría convenientemente un grupo funcional al final del grupo enlazante que se unirá al resto de direccionamiento mitocondrial. Dicho grupo funcional puede ser, por ejemplo, un grupo saliente adecuado tal como un grupo mesilato que después podría reaccionar con el precursor del resto de direccionamiento mitocondrial. Alternativamente, si el resto secuestrante de dicarbonilo se ha sintetizado con un grupo funcional adecuado en su lugar (véase anteriormente), se puede hacer reaccionar con un resto precursor de direccionamiento mitocondrial-enlazador combinado utilizando un agente de acoplamiento o después de la activación de un asociado tal como haluro de sulfonilo o haluro de ácido. El resto precursor de direccionamiento mitocondrial-enlazador combinado tendría un grupo funcional apropiado en el enlazador, tal como una amina. Así, se puede utilizar una carbodiimida u otro agente de acoplamiento para formar una amida a partir de estos restos. Por ejemplo, en la síntesis de MitoGamida, el grupo secuestrante de dicarbonilo equipado con un ácido carboxílico se puede hacer reaccionar con una TPP-enlazador-amina utilizando un agente de acoplamiento para formar una amida. En teoría, un grupo secuestrante de dicarbonilo-amina podría reaccionar con TPP-enlazador-ácido carboxílico utilizando un agente de acoplamiento, siempre que la amina reaccionante sea más nucleófila que la unidad secuestrante de dicarbonilo, o esta última esté protegida. De forma similar, los cloruros de sulfonilo reaccionan rápidamente con aminas para formar sulfonamidas en presencia de bases relativamente débiles para eliminar el HCl, pudiendo necesitar nuevamente protección el grupo secuestrante para evitar que reaccione con el cloruro de sulfonilo.

Los compuestos de fórmula 1 pueden prepararse utilizando las técnicas descritas a continuación. Algunos de los esquemas y de los ejemplos pueden omitir detalles de reacciones comunes, incluidas oxidaciones, reducciones, etc., técnicas de separación (extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, trituración, cristalización y similares) y procedimientos analíticos, que son conocidos por expertos en la técnica de la química orgánica. Los detalles de dichas reacciones y técnicas se pueden encontrar en una serie de tratados, incluidos Richard Larock, Comprehensive Organic Transformations, A Guide to Functional Group Preparations, 2.^a ed (2010) y la serie de varios volúmenes editada por Michael B. Smith y otros, Compendium of Organic Synthetic Methods (1974 y siguientes.). Los materiales de partida y los reactivos pueden obtenerse de fuentes comerciales o pueden prepararse utilizando procedimientos de la literatura. Algunos de los esquemas de reacción pueden omitir productos secundarios resultantes de transformaciones químicas (por ejemplo, un alcohol resultante de la hidrólisis de un éster, CO₂ resultante de la descarboxilación de un diácido, etc.). Además, en algunos casos, los intermedios de reacción pueden utilizarse en etapas posteriores sin aislamiento o purificación (es decir, *in situ*).

A continuación, en algunos de los esquemas de reacción y de los ejemplos, determinación de compuestos se pueden preparar utilizando grupos protectores, que evitan reacciones químicas no deseadas en sitios reactivos. Los grupos protectores también se pueden utilizar para mejorar la solubilidad o modificar las propiedades físicas de un compuesto. Para una discusión sobre estrategias de grupos protectores, una descripción de materiales y procedimientos para instalar y eliminar grupos protectores, y una compilación de grupos protectores útiles para grupos funcionales comunes, incluidos aminas, ácidos carboxílicos, alcoholes, cetonas, aldehídos, etc. véase T. W. Greene y P. G. Wuts, Protecting Groups in Organic Chemistry, 4.^a edición, (2006) y P. Kocienski, Protective Groups, 3.^a edición (2005).

En general, las transformaciones químicas descritas a lo largo de la memoria descriptiva pueden llevarse a cabo utilizando cantidades sustancialmente estequiométricas de reactantes, aunque determinadas reacciones pueden beneficiarse del uso de un exceso de uno o más de los reactantes. Además, muchas de las reacciones descritas a lo largo de la memoria descriptiva pueden llevarse a cabo a, aproximadamente, temperatura ambiente (TA) y presión ambiental, pero en función de la cinética de la reacción, rendimientos, etc., algunas reacciones pueden realizarse a presiones elevadas o emplear temperaturas más altas (por ejemplo, condiciones de reflujo) o temperaturas más bajas (por ejemplo, de -78 °C a 0 °C). Cualquier referencia en la divulgación a un intervalo estequiométrico, un intervalo de temperatura, un intervalo de pH, etc., tanto si se utiliza o no expresamente la palabra "intervalo", también incluye los puntos finales indicados.

Muchas de las transformaciones químicas también pueden emplear uno o más disolventes compatibles, lo que puede influir en la velocidad de reacción y el rendimiento. En función de la naturaleza de los reactantes, uno o más disolventes pueden ser disolventes próticos polares (incluida el agua), disolventes apróticos polares, disolventes no polares o alguna combinación. Los disolventes representativos incluyen hidrocarburos alifáticos saturados (por ejemplo, n-pentano, n-hexano, n-heptano, n-octano); hidrocarburos aromáticos (por ejemplo, benceno, tolueno, xilenos); hidrocarburos halogenados (por ejemplo, cloruro de metileno, cloroformo, tetracloruro de carbono); alcoholes alifáticos (por ejemplo, metanol, etanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, 2-metil-propan-1-ol, butan-2-ol, 2-metil-propan-2-ol, pentan-1-ol, 3-metil-butan-1-ol, hexan-1-ol, 2-metoxi-etanol, 2-etoxi-etanol, 2-butoxi-etanol, 2-(2-metoxi-etoxi)-etanol, 2-(2-etoxi-etoxi)-etanol, 2-(2-butoxi-etoxi)-etanol); éteres (por ejemplo, dietiléter, diisopropiléter, dibutiléter, 1,2-dimetoxi-etano, 1,2-dietoxi-etano, 1-metoxi-2-(2-metoxi-etoxi)-etano, 1-etoxi-2-(2-etoxi-etoxi)-etano, tetrahidrofurano, 1,4-dioxano); cetonas (por ejemplo, acetona, metiletilcetona); ésteres (acetato de metilo, acetato de etilo); disolventes que contienen nitrógeno (por ejemplo, formamida, N,N-dimetilformamida, acetonitrilo, N-metil-pirrolidona, piridina, quinolina, nitrobenzoceno); disolventes que contienen azufre (por ejemplo, disulfuro de carbono, dimetilsulfóxido, 1,1-dióxido de tetrahidro-tiofeno) y disolventes que contienen fósforo (por ejemplo, triamida hexametilfosfórica).

Aplicaciones

Un aspecto clave de la invención es el bloqueo o la mejora del daño causado por la hiperglucemia. La invención encuentra aplicación en el tratamiento o la prevención de consecuencias posteriores de la hiperglucemia.

Una aplicación para un compuesto de fórmula 1, tal como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es su uso en la prevención o el tratamiento de la hiperglucemia.

La hiperglucemia puede producirse como un síndrome relacionado con la edad. La hiperglucemia puede producirse en septicemia y/o en ingresos de cuidados intensivos/sala de emergencias. La hiperglucemia puede producirse como una complicación del embarazo.

Por lo tanto, la prevención de la hiperglucemia puede ser importante para sujetos con un estado de salud que aumenta el riesgo de hiperglucemia en comparación con un sujeto sano normal que no presenta ese estado de salud. Convenientemente, se puede proporcionar un compuesto de fórmula 1, tal como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la prevención o el tratamiento de la hiperglucemia en un sujeto con un estado de salud seleccionado de entre septicemia, embarazo o un estado de salud que requiera un cuidado crítico.

Más específicamente, la invención se aplica en diabetes tal como diabetes hiperglucémica. La invención encuentra aplicación en el tratamiento o la prevención de las consecuencias posteriores de la hiperglucemia y la diabetes (tal como la diabetes hiperglucémica), por ejemplo, para prevenir o reducir el daño a los órganos y tejidos adecuados, tales como los ojos, el corazón, los riñones, el sistema nervioso y/o el páncreas.

5 La invención se aplica al tratamiento o la prevención del daño mitocondrial asociado con disfunción o desregulación del control glucémico, por ejemplo, daño mitocondrial asociado con la hiperglucemia.

10 De forma más conveniente, la invención se aplica al tratamiento o la prevención de las consecuencias moleculares de la hiperglucemia.

En un aspecto, la invención se refiere a un compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéutica del mismo, para su uso en la disminución de los efectos nocivos del envejecimiento en un sujeto.

15 En otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéutica del mismo, para su uso en la prevención o la reducción de toxicidad inducida por glicación.

20 En otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéutica del mismo, para su uso en la prevención o la reducción de depresión respiratoria, en particular depresión respiratoria inducida por dicarbonilo.

En otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéutica del mismo, para su uso para proteger contra la muerte celular, en particular para proteger contra la muerte celular inducida por glicación.

25 Un aspecto adicional de la invención proporciona un compuesto de fórmula 1, tal como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la conservación de órganos y tejidos para trasplantes quirúrgicos. En dicha aplicación, el compuesto de fórmula 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede administrarse convenientemente como un componente de un fluido de conservación de tejidos. En este aspecto, se puede conservar cualquier órgano y tejido adecuado para trasplantes quirúrgicos; los trasplantes de órganos ilustrativos incluyen los ojos (por ejemplo, la córnea), el corazón, el riñón, células nerviosas y el páncreas.

30 Un aspecto adicional de la invención proporciona un compuesto de fórmula 1, tal como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el almacenamiento de sangre. En dicha aplicación, el compuesto de fórmula 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede administrarse convenientemente como un componente de un fluido de conservación.

35 Convenientemente, la invención se aplica a mamíferos, de forma más conveniente a seres humanos.

40 La invención puede aplicarse a la degeneración retiniana. La degeneración retiniana se correlaciona con complicaciones diabéticas. La invención puede aplicarse de forma útil a cualquier otra complicación de la diabetes, específicamente diabetes hiperglucémica.

Administración

45 El compuesto de la invención puede administrarse en formas sólidas o líquidas, tales como comprimidos, polvos, cápsulas, gránulos, soluciones, suspensiones, elixires, emulsiones, geles, cremas o supositorios, incluidos supositorios rectales y uretrales.

Convenientemente, los compuestos de la invención pueden utilizarse para tratar seres humanos.

50 Convenientemente, la dosis para seres humanos se administra por vía oral.

Convenientemente, la dosis para seres humanos es una por día.

55 Convenientemente, la dosis para seres humanos se proporciona en forma de comprimido.

Los compuestos o las composiciones de la invención pueden administrarse mediante administración parenteral.

El compuesto de la invención puede administrarse por vía intravenosa.

60 El compuesto de la invención puede administrarse en una dosis de aproximadamente 20-40 mg por día. Convenientemente, la dosis para seres humanos es de aproximadamente 80 mg por día.

65 Se proporciona información de dosificación para un ser humano adulto promedio a menos que se indique lo contrario. La variación de la dosis se encuentra dentro de los conocimientos de un médico según las características del paciente que se está tratando, por ejemplo, edad, peso, sexo, etc.

El compuesto de la invención puede administrarse por vía intraocular.

El compuesto de la invención puede administrarse por vía intravenosa.

5 El compuesto de la invención puede administrarse por vía intraperitoneal.

El compuesto de la invención puede administrarse en forma de gotas para los ojos.

10 La administración puede realizarse a cualquier tejido u órgano adecuado, por ejemplo, los compuestos o las composiciones de la invención pueden administrarse al ojo, al corazón, al riñón, al sistema nervioso y/o al páncreas.

El compuesto de la invención puede administrarse en combinación con uno o más excipientes, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

15 Pueden encontrarse excipientes, vehículos y diluyentes adecuados en textos farmacéuticos estándar. Véase, por ejemplo, Handbook for Pharmaceutical Additives, 3.^a edición (ed. M. Ash e I. Ash), 2007 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, Nueva York, Estados Unidos) y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21.^a edición (ed. D. B. Troy) 2006 (Lippincott, Williams y Wilkins, Filadelfia, Estados Unidos), que se incorporan al presente documento por referencia.

20 Los excipientes para su uso en las composiciones de la invención incluyen, pero sin limitación, celulosa microcristalina, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato dicálcico y glicina, que pueden emplearse junto con diversos disgregantes tales como almidón (y preferentemente almidón de maíz, de patata o de tapioca), ácido algínico y determinados silicatos complejos, junto con aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, sacarosa, gelatina y goma arábiga. Además, a menudo son muy útiles agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio y talco para la fabricación de comprimidos. También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como materiales de carga en cápsulas de gelatina; materiales preferidos a este respecto también incluyen lactosa o azúcar de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular. Cuando se desean suspensiones acuosas y/o elixires para administración oral, el ingrediente activo puede combinarse con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, materia colorante o tintes y, si así se desea, también agentes emulsionantes y/o de suspensión, junto con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol, glicerina y diversas combinaciones similares de los mismos.

35 Los vehículos farmacéuticos incluyen diluyentes sólidos o materiales de carga, medios acuosos estériles y diversos disolventes orgánicos no tóxicos, y similares.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen gomas, almidones, azúcares, materiales celulósicos y mezclas de los mismos. El compuesto se puede administrar a un sujeto mediante, por ejemplo, el implante subcutáneo de un gránulo. La preparación también se puede administrar mediante la inyección intravenosa, intraarterial o intramuscular de una preparación líquida, la administración oral de una preparación líquida o sólida, o mediante aplicación tópica. La administración también se puede realizar mediante el uso de un supositorio rectal o un supositorio uretral.

45 Además, tal como se utiliza en el presente documento, los "vehículos farmacéuticamente aceptables" son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, tampón de fosfato 0,01-0,1 M y preferentemente 0,05 M o solución salina al 0,9%. Además, dichos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como el aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, que incluyen una solución salina y medios tamponados.

50 Los vehículos de uso parenteral farmacéuticamente aceptables incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, solución de lactato de Ringer y aceites fijos. Los vehículos de uso intravenoso incluyen reabastecedores de fluidos y nutrientes, reabastecedores de electrolitos tales como los basados en dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes de cotejo, gases inertes y similares.

55 Los vehículos farmacéuticamente aceptables para composiciones de liberación controlada o mantenida que pueden administrarse según la invención incluyen la formulación en depósitos lipófilos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites). La invención también comprende composiciones particuladas recubiertas con polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas) y el compuesto acoplado a anticuerpos dirigidos contra receptores, ligandos o antígenos específicos de tejido o acoplado a ligandos de receptores específicos de tejido.

60 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen compuestos modificados por la unión covalente de polímeros solubles en agua, tales como polietilenglicol, copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona o poliprolina. Se sabe que presentan semividas sustancialmente más largas en sangre después de la inyección intravenosa que los compuestos no modificados correspondientes (Abuchowski y Davis, Soluble Polymer-Enzyme Adducts, Enzymes as Drugs, Hochenberg y Roberts, ed., Wiley-

Interscience, Nueva York, N.Y., (1981), p. 367-383; y [65]). Dichas modificaciones también pueden aumentar la solubilidad del compuesto en solución acuosa, eliminar la agregación, mejorar la estabilidad física y química del compuesto y reducir en gran medida la inmunogenicidad y la reactividad del compuesto. Como resultado, la actividad biológica *in vivo* deseada se puede lograr mediante la administración de dichos aductos de polímero-compuesto con menor frecuencia o en dosis más bajas que con el compuesto no modificado.

Espectrometría de masas

La invención también encuentra aplicación como sonda de espectrometría de masas para la detección de dicarbonilos reactivos.

Estos procedimientos de espectrometría de masas permiten evaluar la importancia del daño mitocondrial causado por metilglioxal y glioxal. Por lo tanto, los compuestos de fórmula 1, por ejemplo, la molécula selectiva de mitocondrias MitoG, pueden utilizarse para evaluar cambios relativos en los niveles de estas especies dañinas dentro de las mitocondrias en células e *in vivo*.

El modo de acción de MitoG se muestra en la figura 1B. La capacidad de cuantificar la acumulación de los productos de quinoxalina a partir de la reacción *in situ* de MitoG con metilglioxal y glioxal brinda la oportunidad de evaluar cambios en los niveles de estos compuestos en las mitocondrias en células e *in vivo*. Esto puede realizarse mediante una extensión de un enfoque desarrollado recientemente para evaluar niveles de peróxido de hidrógeno mitocondrial *in vivo* mediante el uso de un compuesto reactivo de peróxido dirigido a mitocondrias, MitoB [30, 31]. En esta metodología, se formó un producto exomarcador de diagnóstico, MitoP, a partir de MitoB, y se determinaron sus niveles *ex vivo* por cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (CL-EM/EM) de homogeneizados de tejidos con respecto a patrones internos deuterados [30, 31]. La sensibilidad de dicho enfoque se ve significativamente mejorada por la carga positiva inherente del resto TPP que disminuye el umbral para la detección por espectrometría de masas (EM), lo que permite el análisis de femtomoles de compuesto/g de tejido en peso húmedo [30, 31]. Por lo tanto, los cambios relativos en los niveles de metilglioxal y glioxal dentro de las mitocondrias pueden evaluarse en función del grado de acumulación de los productos de reacción de MitoG-dicarbonil-quinoxalina (figura 1B). Por lo tanto, compuestos tales como MitoG proporcionan una sonda dirigida a mitocondrias para metilglioxal y glioxal que se puede utilizar para la evaluación de la producción de 1,2-dicarbonilo dentro de las mitocondrias en células e *in vivo*. Estos hallazgos son coherentes con la glicación mitocondrial que contribuye a la patología subyacente de hiperglucemia en diabetes y trastornos relacionados.

Cuando una característica de un aparato se describe como operable para proporcionar una función, se apreciará que esto incluye una característica del aparato que proporciona esa función o que está adaptada o configurada para proporcionar esa función.

Breve descripción de los dibujos

Se describirán ahora adicionalmente formas de realización de la presente invención con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 muestra el razonamiento y el mecanismo para la detección de dicarbonilos intramitocondriales. (A) MitoG, una trampa de glioxal y metilglioxal dirigida a mitocondrias, consiste en un resto TPP dirigido a mitocondrias y un grupo fenilendiamina que reacciona con 1,2-dicarbonilos. El resto TPP de MitoG conduce a su absorción en los tejidos donde se acumula dentro de las mitocondrias, impulsada por los potenciales de plasma y de membrana mitocondrial. (B) Dentro de las mitocondrias, MitoG puede reaccionar con glioxal o metilglioxal para formar los productos de quinoxalina éter de quinoxalina (QE) y éter de metilquinoxalina (MQE) (presente como dos isómeros, MQE1 y MQE2). Estos productos se pueden cuantificar por CL-EM/EM con respecto a patrones internos (IS) deuterados para proporcionar una medida de la cantidad de glioxal y metilglioxal libres presentes dentro de las mitocondrias en células e *in vivo*.

La figura 2 muestra las síntesis de MitoG, MQE y QE.

La figura 3 muestra la caracterización *in vitro* de MitoG, MQE y QE. (A) El espectro de barrido ultravioleta/visible (UV/Vis) de MitoG 100 μ M muestra la característica de sus restos TPP y 4-hexiloxifenileno-1,2-diamina (HP) componentes. (B) Espectros de barrido UV/Vis de MitoG, MQE y QE 100 μ M. (C) Espectros de excitación (emisión 433 nm) y espectros de emisión (excitación 344 nm) fluorescentes de MitoG, MQE y QE 10 μ M. MitoG no era fluorescente. MQE y QE tenían longitudes de onda de excitación y emisión máximas de 344 nm y 433 nm,

respectivamente. (D) Perfil de cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) de 10 nmoles de cada uno de MitoG, MQE y QE. Se observó absorbancia (rojo) a 220 nm y fluorescencia (azul) a longitudes de onda de excitación y emisión de 344 nm y 433 nm, respectivamente. (E) Espectros de barrido UV/Vis de MitoG 100 μM y metilglioxal o glioxal 1 mM en tampón KCl después de una incubación a 37 °C durante 2 h. (F) Espectros de excitación y emisión fluorescentes de MitoG 10 μM y metilglioxal 20 μM , o de MitoG 20 μM y glioxal 40 μM , en tampón KCl después de una incubación a 37 °C durante 2 h. (G) Se incubaron MitoG (5 mM) y metilglioxal 10 mM en 10 μl de tampón KCl a 37 °C durante 2 h, después se evaluó 1 μl de la mezcla mediante RP-HPLC. (H) La identidad del pico de producto se confirmó añadiendo a la mezcla de reacción 10 nmol de patrón MQE. Los experimentos con glioxal dieron resultados similares (datos no mostrados).

La figura 4 muestra la reacción *in vitro* de MitoG con metilglioxal y glioxal. (A) Las reacciones entre MitoG (100 μM) y 1,2-dicarbonilos (25 μM) a 37 °C vinieron seguidas de la formación de los productos de quinoxalina a 345 nm. (B) La detección fluorimétrica de la reacción entre MitoG y metilglioxal (40 μM cada uno), y entre MitoG y glioxal (200 μM cada uno) se observó mediante el seguimiento de los productos de quinoxalina en las longitudes de onda de excitación y emisión de 344 y 433 nm, respectivamente. Los cambios en la fluorescencia provocados por la formación de MQE y QE se cuantificaron a partir de curvas de calibración construidas representando la fluorescencia (longitudes de onda de excitación y emisión de 344 y 433 nm, respectivamente) frente a cantidades conocidas de quinoxalina y fueron lineales hasta al menos 20 μM .

La figura 5 muestra la absorción de MitoG por mitocondrias aisladas. Se dispuso un electrodo selectivo de TPP en una cámara agitada a 37 °C que contenía 1 ml de tampón KCl suplementado con 4 $\mu\text{g/ml}$ de rotenona. Después de la calibración con cinco adiciones de MitoG 1 μM (puntas de flecha), se añadieron RLM (1 mg de proteína/ml), seguido de succinato 10 mM y FCCP (cianuro de carbonilo p-trifluorometoxifenilhidrazona) 500 nM donde se indique. Este trazado es representativo de tres experimentos independientes.

La figura 6 muestra los efectos de MitoG sobre la función mitocondrial y celular. (A, B) Se incubaron RLM que respiraban en glutamato/malato a 37 °C con diversas concentraciones de MitoG durante 7 minutos en un electrodo de oxígeno para medir la respiración acoplada (A) antes de añadir ADP para medir la respiración fosforilante (B). Los datos son el porcentaje de las tasas de respiración de controles no tratados (líneas discontinuas). (C y D) Se incubaron células C2C12 (C) o BAEC [células endoteliales aórticas bovinas; Cell Applications Inc, San Diego, CA] (D) con MitoG durante 24 h y después se determinó la supervivencia celular utilizando el ensayo MTS. Los datos se expresan como porcentaje de los controles no tratados (línea discontinua). (E-H) Se incubaron BAEC con MitoG durante 2 h a 37 °C y a continuación se midió la tasa de consumo de oxígeno (OCR) celular después de las adiciones secuenciales de oligomicina, FCCP y antimicina A/rotenona utilizando un analizador Seahorse XF24. (E) OCR debida a la síntesis de ATP, (F) OCR debida a la fuga de protones, (G) capacidad de reserva y (H) consumo de oxígeno no mitocondrial. Los resultados son medias \pm S.E. de tres experimentos independientes. *, $P < 0,05$ o **, $P < 0,01$ con respecto a controles no tratados.

La figura 7 muestra la fragmentación de MQE y QE por espectrometría de masas en tándem. Los compuestos (1 μM en acetonitrilo al 20%) se infundieron, a 2 $\mu\text{l/min}$, en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. Los iones principales indicados de MQE y QE y sus correspondientes variantes d_{15} se fragmentaron para generar los iones hijo indicados.

La figura 8 muestra el análisis por CL-EM/EM de MQE y QE. (A) QE y ambas isoformas de MQE tienen iones parentales con relaciones m/z distintivas que se fragmentan para formar iones hijo característicos. (B) Curvas patrón basadas en los análisis de MQE y QE mediante análisis por CL-EM/EM con respecto a los IS deuterados correspondientes.

5

La figura 9 muestra la cuantificación de MQE y QE en células. (A) y (B) Se incubaron BAEC con MitoG 2 μ M durante 1 h y, a veces, se suplementaron con AG 10 mM o FCCP 2 μ M. Después se añadieron metilgloxal (A) o glioal (B), y después de 3 h adicionales de incubación, los niveles de MQE y QE en las capas celulares se determinaron por CL-EM/EM con respecto a IS deuterados. (C, D) Se incubaron BAEC en medios que contenían D-glucosa baja (5 mM) o alta (30 mM) con MitoG 2 μ M durante los periodos de tiempo indicados. Los niveles de MQE (C) y QE (D) en las capas celulares se determinaron por CL-EM/EM con respecto a IS deuterados. Los resultados son medias \pm S.E. de cuatro experimentos independientes. (E) Se incubaron BAEC durante 4 h en presencia de MitoG 2 μ M en medios que contenían D-glucosa 5 mM (baja), D-glucosa 30 mM (alta), D-glucosa 5 mM/L-glucosa 25 mM (L-glucosa) o D-glucosa 30 mM/aminoguanidinio 10 mM. Los niveles de MQE en las capas celulares se determinaron por CL-EM/EM con respecto a IS deuterados. Los niveles de MQE en las capas celulares se determinaron por CL-EM/EM con respecto a IS deuterados. (F) Se incubaron BAEC se incubaron en medios que contenían D-glucosa alta (30 mM) con MitoG 2 μ M durante 4 h con las concentraciones indicadas del inhibidor de la glioalasa I diéster ciclopentílico de bromobencilglutati3n. Los niveles de MQE y QE en las capas celulares se determinaron después por CL-EM/EM con respecto a IS deuterados. Los resultados son medias \pm S.E. de tres determinaciones. Los resultados son medias \pm S.E. de tres (A, B) o cuatro (C-E) experimentos independientes. *, $P < 0,05$ o **, $P < 0,01$, con respecto a controles no tratados (A, B) o indicados (C-E); ##, $P < 0,01$ con respecto a células tratadas con 1,2-dicarbonilo 250 μ M.

10

15

20

La figura 10 muestra la cuantificación de dicarbonilos mitocondriales *in vivo*. Los niveles de MQE (A) y QE (B) se cuantificaron en orina de ratones de tipo silvestre y Akita con respecto a creatinina y se compararon con los niveles de glucosa en sangre de estos ratones. Los datos a la derecha de los gráficos son las medias \pm S.E. de las dos condiciones. **, $P < 0,01$.

25

La figura 11 muestra la estabilidad de MitoG en condiciones oxidativas.

30

La figura 12 muestra la protección de MitoG contra la depresión respiratoria inducida por dicarbonilo y la muerte celular.

La figura 13 muestra un diagrama del modelo experimental de diabetes mellitus tipo I en ratones utilizado para estudiar los efectos de la MitoG-amida sobre complicaciones diabéticas en el corazón.

35

La figura 14 muestra una imagen típica de resonancia magnética (MRI) de un corazón de ratón.

La figura 15 muestra una medición típica del bucle de presión [mmHg]/volumen [μ l] (P/V) de un corazón de ratón.

40

La figura 16 muestra el efecto de estreptozotocina (STZ) y MitoGamida sobre el peso corporal, la glucosa en sangre y la frecuencia cardiaca.

La figura 17 muestra el efecto de estreptozotocina (STZ); y STZ y MitoGamida sobre los resultados medios del bucle de PV.

La figura 18 muestra el efecto de estreptozotocina (STZ); y STZ y MitoGamida sobre el volumen diastólico final (μ l); la fracción de eyección (%); la constante de tiempo diastólico ventricular izquierdo (Tau Weiss, ms), la rigidez diastólica ($1/\mu$ l) y la presión diastólica final (mmHg).

5 La figura 19 muestra el efecto de MitoGamida sobre el marcador de estrés oxidativo 4-hidroxinonenal (4HNE).

Descripción de las formas de realización

10 Aunque se han divulgado en detalle en el presente documento formas de realización ilustrativas de la invención, con referencia a los dibujos adjuntos, se entiende que la divulgación no se limita a la forma de realización precisa y que un experto en la técnica puede realizar diversos cambios y modificaciones en la misma. El alcance de la invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

15 Parte experimental

Materiales y procedimientos

Síntesis química

20 En la figura 2 se muestra un esquema de las síntesis de MitoG, éter de quinoxalina (QE) y los éteres de metilquinoxalina 1 y 2 (MQE1/MQE2). En resumen, se sintetizó 6-(4-aminofenoxi)hexanol (1) utilizando el procedimiento del que se informa [32]. La nitración de 1 se realizó tal como se describe [33] e involucró la conversión de 1 para dar la acetamida seguida de nitración con ácido nítrico concentrado para proporcionar 2. La desprotección proporcionó después la nitroanilina (3) con un rendimiento global del 48% de 1. El esqueleto básico de o-fenilendiamina se obtuvo por hidrogenación catalítica de la nitroanilina 3 sobre paladio sobre carbono. La diamina (4) sensible al aire y a la luz se protegió inmediatamente con grupos terc-butiloxicarbonilo (Boc) mediante tratamiento con dicarbonato de di-terc-butileno en tetrahidrofurano [34]. El alcohol primario se mesiló en 5 para proporcionar 6 y después se convirtió en el grupo funcional fosfonio por reacción con trifenilfosfina y yoduro de sodio en acetonitrilo. El producto 7 se obtuvo por precipitación a partir de éter y cromatografía en columna para proporcionar un sólido blanco con un rendimiento del 80%. Para obtener una muestra analítica robusta, se llevó a cabo un intercambio aniónico al tetrafenilborato mediante tratamiento de 7 con tetrafenilborato de sodio en diclorometano. La desprotección de los grupos amino para dar MitoG se realizó mediante tratamiento de 7 en 1,4-dioxano con ácido clorhídrico 9,8 M. Después se hizo reaccionar MitoG, o bien con glioxal para dar la quinoxalina QE o bien con metilglioxal para dar los dos productos de metilquinoxalina, MQE1 y MQE2, que se formaron en una proporción de 10:1 (por RMN de ^1H) aunque proporcionaron un único pico de HPLC. Los datos se indican para el isómero principal.

N-(4-(6-Hidroxihexiloxi)-2-nitrofenil)acetamida (2)

40 A una solución de 6-(4-aminofenoxi)hexan-1-ol 1 (2,12 g, 10,0 mmol) en ácido acético glacial (3,20 ml) y agua (2,40 ml) con hielo (3,70 g) a 0-5 °C se añadió anhídrido acético (1,20 ml) con agitación rápida. La mezcla cristalina resultante se disolvió mediante calentamiento en un baño de agua. La mezcla de reacción se enfrió después a aproximadamente 45 °C antes de la adición de ácido nítrico concentrado (1,10 ml) con agitación. La mezcla de reacción se calentó a 65 °C durante 10 min, se enfrió a temperatura ambiente, se dispuso en un baño de hielo durante 18 h, se diluyó con agua y se extrajo en diclorometano. La fase orgánica se secó (MgSO_4) y se evaporó al vacío para dar una mezcla de 2, junto con un acetato intermedio, como un aceite amarillo (2,98 g). La purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con dietiléter proporcionó 2 como un sólido cristalino amarillo (1,279 g, 43%).

50 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 10,03 (1H, s a, NH), 8,61 (1H, d, $J = 8$ Hz), 7,64 (1H, d, $J = 2$ Hz), 7,21 (1H, dd, $J = 2, 8$ Hz), 3,99 (2H, t, $J = 6$ Hz, CH_2O), 3,67 (2H, t, $J = 6$ Hz, CH_2OH), 2,26 (3H, s, Ac), 1,79-1,82 (2H, m), 1,58-1,64 (2H, m), 1,41-1,54 (4H, m), 1,30 (1H, s a, OH) ppm; ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): δ 168,8, 154,5, 137,1, 128,4, 123,9, 123,8, 109,2, 68,7 (CH_2O), 62,9 (CH_2OH), 32,7, 29,0, 25,9, 25,6, 25,5 ppm; MS m/z encontrado: 319,1261, calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}^+$, 319,1264.

6-(4-Amino-3-nitrofenoxi)hexan-1-ol (3)

55 Se añadió álcali de Claisen (0,45 ml) al producto bruto total de 2 (0,527 g, 1,78 mmol) y se calentó a 70 °C con agitación durante 15 min. Después se añadió agua caliente (0,45 ml) a la mezcla de reacción con agitación y se calentó durante otros 15 minutos. La mezcla de reacción se enfrió a 0-5 °C en un baño de hielo, se diluyó con agua y se extrajo en diclorometano. La fase orgánica se secó (MgSO_4) y se evaporó al vacío para dar un sólido naranja/rojo (0,390 g). La purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con dietiléter proporcionó 3 como un sólido naranja/rojo (0,236 g, 52%).

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7,53 (1H, d, $J = 2$ Hz), 7,06 (1H, dd, $J = 2,8$ Hz), 6,75 (1H, d, $J = 8$ Hz), 5,88 (2H, s ancho, NH_2), 3,92 (2H, t, $J = 6$ Hz, CH_2O), 3,66 (2H, t ancho, $J = 6$ Hz, CH_2OH), 1,76-1,81 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1,58-1,65 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 1,40-1,52 (4H, m), 1,30 (1H, s ancho, OH); RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 150,3, 139,9, 131,6, 127,1, 120,1, 107,2, 68,7 (CH_2O), 62,9 (CH_2OH), 32,7, 29,1, 25,9, 25,6; EM m/z encontrado: 277,1161, calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\cdot\text{Na}^+$: 277,1159; Microanálisis encontrado: C, 56,83, H, 6,94, N, 10,99, calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$: C, 56,68, H, 7,13, N, 11,02.

6-(3,4-Diaminofenoxi)hexan-1-ol (4)

Se añadió paladio sobre carbono (0,20 g) a una solución de nitroanilina (3) (2,22 g, 8,7 mmol) en etanol seco (200 ml) y la mezcla se agitó durante 18 h en atmósfera de hidrógeno. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite® y se evaporó al vacío para dar 4 como un sólido rojo (1,83 g, 93%). El producto bruto se utilizó sin purificación adicional.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 6,62 (1H, d, $J = 8$ Hz), 6,32 (1H, d, $J = 2$ Hz), 6,25 (1H, dd, $J = 2, 8$ Hz), 3,87 (2H, t, $J = 6$ Hz, CH_2O), 3,65 (2H, t, $J = 6$ Hz, CH_2OH), 1,72-1,77 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1,55-1,65 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 1,38-1,51 (4H, m); ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): δ 154,0, 137,1, 127,3, 118,4, 105,1, 103,8, 68,3 (CH_2O), 63,0 (CH_2OH), 32,8, 29,4, 26,0, 25,6; MS m/z encontrado: 225,1592, calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2^+$, 225,1596; Microanálisis encontrado: C, 64,15, H, 8,94, N, 12,29, calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$: C, 64,26, H, 8,99, N, 12,49.

4-(6-Hidroxihexiloxi)-1,2-fenilencarbamato de terc-butilo (5)

Se añadió dicarbonato de di-terc-butilo (0,48 g, 2,2 mmol) a una solución de 4 (0,16 g, 0,73 mmol) en tetrahidrofurano (5 ml) y se agitó en atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 18 h. Se añadió bicarbonato de sodio (0,31 g, 3,6 mmol) a la mezcla de reacción que se agitó durante otros 30 min. La mezcla de reacción se filtró y se evaporó al vacío para dar un aceite amarillo (0,621 g). La purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con 1% de trietilamina en dietiléter proporcionó 5 como un aceite amarillo (0,228 g, 74%).

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 7,29 (1H, s a), 7,14 (1H, m), 6,91 (1H, s a, NH), 6,59 (1H, dd, $J = 2, 8$ Hz), 6,35 (1H, s a, NH), 3,93 (2H, t, $J = 6$ Hz, CH_2O), 3,63 (2H, t, $J = 6$ Hz, CH_2OH), 1,72-1,78 (2H, m), 1,54-1,63 (2H, m), 1,50 (9H, s), 1,49 (9H, s), 1,36-1,47 (4H, m) ppm; ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): δ 157,6 (C4), 154,6, 153,3, 133,6 (C2), 126,7 (C6), 121,0 (C1), 110,8 (C5), 108,4 (C3), 80,8, 80,7, 68,1 (CH_2O), 62,9 (CH_2OH), 32,7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 29,2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 28,4, 28,3, 25,9, 25,5; MS m/z encontrado: 447,2451, calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_6\cdot\text{Na}^+$: 447,2466; Microanálisis encontrado: C, 62,50, H, 8,86, N, 6,35, calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_6$: C, 62,24, H, 8,86, N, 6,35.

Metanosulfonato de 6-(3,4-bis(terc-butoxicarbonilamino)fenoxi)hexilo (6)

Una solución de 5 (0,23 g, 0,53 mmol) y trietilamina (150 μl , 0,110 g, 1,06 mmol) se agitó en diclorometano anhidro (10 ml) a temperatura ambiente. Se añadió cloruro de metanosulfonilo (50 μl , 0,074 g, 0,64 mmol) y la reacción se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano, se lavó con agua y bicarbonato de sodio acuoso, se secó (MgSO_4) y se evaporó al vacío para dar 6 como un aceite amarillo (0,213 g, 80%). El producto bruto se usó sin purificación adicional.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 7,31 (1H, s a), 7,15 (1H, m), 6,89 (1H, s a, NH), 6,59 (1H, dd, $J = 2, 8$ Hz), 6,29 (1H, s a, NH), 4,23 (2H, t, $J = 8$ Hz, CH_2OMs), 3,94 (2H, t, $J = 6$ Hz, CH_2O), 2,99 (3H, s, Ms), 1,74-1,80 (4H, m), 1,46-1,51 (22H, m) ppm; ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): δ 157,6, 154,6, 153,3, 133-6, 126,8, 121,0, 110,8, 108,3, 80,8, 80,7, 70,0 (CH_2OMs), 67,9 (CH_2O), 37,4, 29,1, 29,0, 28,4, 28,3, 25,6, 25,3 ppm; MS m/z encontrado: 525,2240, calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}\cdot\text{Na}^+$: 525,2241.

Yoduro de 6-(3,4-bis(terc-butoxicarbonilamino)fenoxi)hexil)trifenilfosfonio (7)

Una solución de mesilato 6 (0,59 g, 1,17 mmol) y trifenilfosfina (0,34 g, 1,29 mmol) con yoduro de sodio (0,260 g, 1,76 mmol) en acetonitrilo seco (100 ml) se calentó a 80 °C con agitación durante 48 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el sólido blanco se retiró por filtración y se lavó con acetonitrilo. El disolvente se redujo después a aproximadamente 30 ml y se añadió éter (400 ml) lentamente con agitación para precipitar el producto. El éter se decantó del sólido oleoso y se repitió el proceso. Los sólidos oleosos se secaron a < 0,5 mmHg durante 1 h para dar un sólido amarillo (0,680 g). La purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con metanol del 5 al 15% en cloroformo proporcionó 7 como un sólido blanco (0,585 g, 63%).

^1H RMN (500 MHz, CD_2Cl_2): δ 7,84-7,80 (3H, m, Ar), 7,73-7,67 (12H, m, Ar), 7,54 (1H, s a, NH), 7,25 (1H, s a), 7,19 (1H, d, $J = 8$ Hz), 6,94 (1H, s a, NH), 6,55 (1H, dd, $J = 2, 8$ Hz), 3,91 (2H, t, $J = 6$ Hz, CH_2O), 3,31 (2H, m, CH_2P), 1,59-1,72 (6H, m), 1,26-1,47 (20H, m); ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): δ 157,3, 154,8, 153,8, 135,6 (d, $J_{\text{C4P}} = 3$ Hz, p -Ph), 133,9 (d, $J_{\text{C2P}} = 10$ Hz, o -Ph), 130,9 (d, $J_{\text{C3P}} = 13$ Hz, m -Ph), 126,9, 122,4, 118,5 (d, $J_{\text{CP}} = 86$ Hz, i -Ph), 110,7, 109,0, 80,5, 80,4, 68,1 (CH_2O), 30,2 (d, $J_{\text{C3P}} = 16$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 28,9, 28,4, 28,3, 25,6, 22,7 (d, $J_{\text{C2P}} = 4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 22,6 (d, $J_{\text{CP}} = 51$ Hz, CH_2P); ^{31}P RMN (162 MHz, CD_2Cl_2): δ 24,4 ppm; MS m/z encontrado: 669,3506, calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{H}_5\text{P}^+$: 669,3452;

Se preparó una muestra de la sal de tetrafenilborato de 7 para análisis por intercambio aniónico con tetrafenilborato de sodio en diclorometano. El producto se recrystalizó en etanol a -78 °C, se filtró y se secó al vacío a 40 °C durante 4 días para proporcionar tetrafenilborato de (6-(3,4-bis(terc-butoxicarbonilamino)fenoxi)hexil)trifenilfosfonio en forma de cristales blancos.

5 Microanálisis encontrado: C, 77,43, H, 7,35, N, 2,80, calculado para C₆₄H₇₀N₂O₅BP: C, 77,72, H, 7,13, N, 2,83; EM *m/z* encontrado: 669,3442, calculado para C₄₀H₅₀N₂H₅P⁺: 669,3452, encontrado: 319,1680, calculado para C₂₄H₂₀B⁻: 319,1664. Los espectros de RMN de ¹H y de ³¹P fueron coherentes con 7.

10 *Yoduro de (6-(3,4-bis(terc-butoxicarbonilamino)fenoxi)hexil)-D₁₅-trifenilfosfonio (d₁₅₋₇)*

De forma similar el mesilato (6) (290 mg) con yoduro de sodio (110 mg) y trifenilfosfina marcada con d₁₅ (100 mg) proporcionó d₁₅₋₇ como una goma blanquecina (0,274 g, 90%).

15 HPLC 13,24 min 99+% de pureza. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,25 (1H, s a), 7,16 (1H, bd, *J* = 8 Hz), 6,96 (1H, s a, NH), 6,57 (1H, dd, *J* = 2, 8 Hz), 6,38 (1H, s a, NH), 3,89 (2H, t, *J* = 6 Hz, CH₂O), 3,74 (2H, m, CH₂P), 1,59-1,72 (6H, m), 1,55 (6H, s) y 1,38-1,48 (14H, m). MS *m/z* encontrado: 684,396, calculado para C₄₀H₃₅D₁₅N₂O₅P⁺: 684,4393.

20 *Cloruro de (6-(3,4-diaminofenoxi)hexil)trifenilfosfonio (MitoG)*

Se añadió ácido clorhídrico (9,8 M, 1,0 ml) a una solución de 7 (0,050 g, 0,065 mmol) en 1,4-dioxano (1 ml) y se mantuvo a temperatura ambiente en atmósfera de argón durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (< 0,5 mmHg) para proporcionar MitoG como un sólido amarillo pálido (0,035 g, 98%).

25 HPLC 8,9 min 95% de pureza, ¹H RMN (500 MHz, (CD₃)₂SO): δ 7,86-7,90 (3H, m, Ar), 7,73-7,80 (12H, m, Ar), 6,39 (1H, d, *J* = 8 Hz), 6,12 (1H, d, *J* = 2 Hz), 5,92 (1H, dd, *J* = 2, 8 Hz), 4,47 (4H, s a, NH₂), 3,70 (2H, t, *J* = 6 Hz, CH₂O), 3,57 (2H, m, CH₂P), 1,45-1,58 (6H, m), 1,34-1,40 (2H, m); ¹³C RMN (125 MHz, (CD₃)₂SO): δ 151,6, 136,7, 134,8 (d, *J*_{C4P} = 3 Hz, *p*-Ph), 133,5 (d, *J*_{C2P} = 10 Hz, *o*-Ph), 130,2 (d, *J*_{C3P} = 12 Hz, *m*-Ph), 127,8, 118,5 (d, *J*_{CP} = 86 Hz, *i*-Ph), 115,5, 102,4, 101,9, 67,2 (CH₂O), 29,6 (d, *J*_{C3P} = 17 Hz, CH₂CH₂CH₂P), 28,6, 24,8, 21,7 (d, *J*_{C2P} = 4 Hz, CH₂CH₂P), 20,2 (d, *J*_{CP} = 50 Hz, CH₂P) ppm; ³¹P RMN (162 MHz, CD₂Cl₂): δ 23,8 ppm; MS *m/z* encontrado: 469,2404, calculado para C₃₀H₃₄N₂OP⁺: 469,2403.

30 *Cloruro de (6-(3,4-diaminofenoxi)hexil)-D₁₅-trifenilfosfonio (d₁₅-MitoG)*

35 De forma similar el yoduro de (6-(3,4-bis(terc-butoxicarbonilamino)fenoxi)hexil)-trifenilfosfonio (d₁₅₋₇) (0,021 g, 0,026 mmol) proporcionó d₁₅-MitoG como un sólido amarillo pálido. El producto bruto se utilizó sin purificación adicional.

HPLC: 9,0 min 89% de pureza. EM *m/z* encontrado: 484,3332, calculado para C₃₀H₁₉D₁₅N₂OP⁺: 484,3345.

40 *Trifluoroacetato de (6-(6-quinoxalini)hexil)trifenilfosfonio (QE)*

Se añadió trietilamina (50 µl) a una solución agitada de 8 (0,007 g, 14 µmol) en etanol (96%, 1 ml) en atmósfera de argón a temperatura ambiente. Después de 5 minutos, se añadió una solución de glioxal (40%, 50 µl) en etanol (96%, 0,5 ml) y la mezcla se agitó en atmósfera de argón durante 2 h. La mezcla de reacción se evaporó al vacío para dar el producto como una goma de color amarillo pálido. La purificación por cromatografía en columna en una columna de sílice SPE C18 (10 g), eluyendo por etapas con acetonitrilo en agua del 10 al 100% (TFA al 0,1%) proporcionó QE en la fracción del 50% como una goma marrón (5 mg, 68%).

45 HPLC 11,2 min 99+% de pureza; ¹H RMN (500 MHz, CD₂Cl₂): δ 8,72 (1H, d, *J* = 2 Hz), 8,68 (1H, d, *J* = 2 Hz), 7,96 (1H, d, *J* = 8 Hz), 7,77-7,84 (3H, m, Ar), 7,69-7,76 (12H, m, Ar), 7,40 (1H, dd, *J* = 2,8 Hz), 7,38 (1H, d, *J* = 2 Hz), 4,12 (2H, t, *J* = 6 Hz, CH₂O), 3,48 (2H, m, CH₂P), 1,85 (2H, m), 1,72 (4H, m), 1,56 (2H, m) ppm; ¹³C RMN (125 MHz, CD₂Cl₂): δ 160,6, 144,9, 144,6, 142,7, 139,6, 135,6 (d, *J*_{C4P} = 3 Hz, *p*-Ph), 134,0 (d, *J*_{C2P} = 10 Hz, *o*-Ph), 130,9 (d, *J*_{C3P} = 13 Hz, *m*-Ph), 130,7, 123,9, 118,4 (d, *J*_{CP} = 86 Hz, *i*-Ph), 107,5, 68,8 (CH₂O), 30,6 (d, *J*_{C3P} = 16 Hz, CH₂CH₂CH₂P), 29,0, 25,9, 23,5 (d, *J*_{CP} = 51 Hz, CH₂P), 22,9 (d, *J*_{C2P} = 4 Hz, CH₂CH₂P) ppm; ³¹P RMN (162 MHz, CD₂Cl₂): δ 23,8 ppm; MS *m/z* encontrado: 491,2238, calculado para C₃₂H₃₂N₂OP⁺: 491,2247.

50 *Trifluoroacetato de (6-(6-quinoxalini)hexil)-d₁₅-trifenilfosfonio (d₁₅-QE)*

55 De forma similar la diamina (d₁₅-MitoG) (0,036 g, 71 µmol) con glioxal (40%, 200 µl) proporcionó d₁₅-QE en la fracción del 50% como una goma marrón (14 mg, 37%).

HPLC 11,0 min 99+% de pureza; ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 8,79 (1H, d, *J* = 2 Hz), 8,74 (1H, d, *J* = 2 Hz), 8,05 (1H, d, *J* = 8 Hz), 7,43 (1H, dd, *J* = 2, 8 Hz), 7,38 (1H, d, *J* = 2 Hz), 4,12 (2H, t, *J* = 6 Hz, CH₂O), 3,38 (2H, m, CH₂P), 1,82 (2H, m), 1,66 (4H, m), 1,53 (2H, m) ppm; MS *m/z* encontrado: 506,3201, calculado para C₃₂H₁₇D₁₅N₂OP⁺: 506,3188.

60 *Trifluoroacetato de (6-(6-(2-metil-quinoxalini)hexil)trifenilfosfonio (MQE1/MQE2)*

De forma similar la reacción de MitoG (0,007 g, 14 μ mol) con metilglioxal (40%, 50 μ l) proporcionó las metilquinoxalinas (MQE1/MQE2) en la fracción del 50% como una goma marrón (5 mg, 68%).

5 HPLC: 11,1 min. ^1H RMN (500 MHz, CD_2Cl_2): δ 8,78 (1H, s), 8,04 (1H, d, $J = 8$ Hz), 7,77-7,84 (3H, m, Ar), 7,69-7,76 (12H, m, Ar), 7,55 (1H, d, $J = 2$ Hz), 7,44 (1H, dd, $J = 2, 8$ Hz), 4,16 (2H, t, $J = 6$ Hz, CH_2O), 3,14 (2H, m, CH_2P), 2,83 (3H, s, C-Me), 1,88 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1,75 (2H, m), 1,67 (2H, m) y 1,58 (2H, m) ppm; ^{13}C RMN (125 MHz, CD_2Cl_2): δ 161,91, 160,25 (c, $J_{\text{CF}} = 30$ Hz, CF_3CO), 152,74, 143,20, 141,10, 137,43, 135,80 (d, $J_{\text{C4P}} = 3$ Hz, p-Ph), 133,58 (d, $J_{\text{C2P}} = 10$ Hz, o-Ph), 130,92 (d, $J_{\text{C3P}} = 13$ Hz, m-Ph), 130,08, 123,83, 117,88 (d, $J_{\text{CP}} = 86$ Hz, i-Ph), 116,21 (d, $J_{\text{CF}} = 230$ Hz, CF_3) 105,01, 68,88 (CH_2O), 30,50 (d, $J_{\text{C3P}} = 16,0$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 28,71, 25,58, 23,20 (d, $J_{\text{CP}} = 51$ Hz, CH_2P), 22,69 (d, $J_{\text{C2P}} = 4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 21,06 (CMe) ppm; ^{31}P RMN (162 MHz, CD_2Cl_2): δ 23,8 ppm. MS m/z encontrado: 505,2419, calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}^+$: 505,2403.

15 *Trifluoroacetato de (6-(6-(2-metil-quinoxalinoxiloxi))hexil)-d₁₅-trifenilfosfonio (d₁₅-MQE1/MQE2)*

De forma similar d_{15} MitoG (0,036 g, 71 μ mol) con metilglioxal (40%, 200 μ l) proporcionó d_{15} -MQE1/MQE2 en la fracción del 50% como una goma marrón (16 mg, 43%).

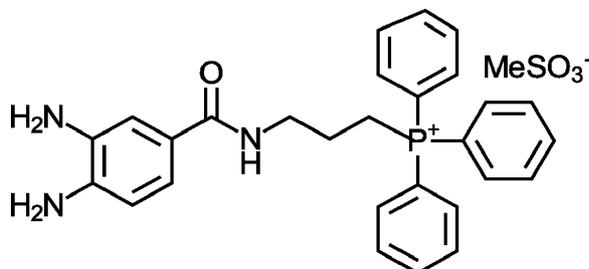
20 HPLC: 11,1 min 99%+. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 8,61 (2H, s a), 7,93 (1H, d, $J = 8$ Hz), 7,32 (1H, dd, $J = 2,8$ Hz), 7,31 (1H, s), 4,07 (2H, t, $J = 6$ Hz, CH_2O), 3,50 (2H, m, CH_2O), 2,75 (3H, s, CMe), 1,82 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1,66 (4H, m), 1,51 (2H, m) ppm; MS m/z encontrado: 520,3366, calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{19}\text{D}_{15}\text{N}_2\text{O}^+$: 520,3345.

4-Hexiloxibenceno-1,2-diamina (HP)

25 El compuesto de control (HP) se preparó tal como se ha descrito anteriormente para MitoG. Los compuestos están relacionados con el esquema de numeración utilizado en la figura 2 mediante la adición de la letra b. En resumen, se preparó *N*-(4-(6-hexiloxi)-2-nitrofenil)acetamida (2b) [62] a partir de la amina 4-(hexiloxi)anilina 1b [32] (1,57 g, 8,12 mmol) y proporcionó 2b como un aceite amarillo (2,05 g). La purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con diclorometano/dietiléter proporcionó 2b como un sólido amarillo (1,56 g, 75%). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 10,04 (1H, s a), 8,62 (1H, d, $J = 8$ Hz), 7,65 (1H, d, $J = 2$ Hz), 7,22 (1H, dd, $J = 2,8$ Hz), 3,99 (2H, t, $J = 6$ Hz, CH_2O), 2,26 (3H, s, Ac), 1,80 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1,46 (2H, m), 1,35 (4H, m) y 0,91 (3H, t, $J = 6$ Hz, CH_3) ppm. La reacción de 2b (0,42 g, 1,5 mmol) proporcionó después 4-(hexiloxi)-2-nitroanilina 3b y después 4-hexiloxi-1,2-fenilendiamina 4b [63] como un sólido rojo (0,224 g, 72%). Esta se utilizó directamente en la reacción siguiente. Mediante la misma la diamina 4b (0,34 g, 1,5 mmol) proporcionó 4-(hexiloxi)-1,2-fenilendicarbamato de 3,4-bis-terc-butilo 5b como un aceite amarillo (0,430 g, 71%). HPLC: 17,7 min >99% de pureza. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 7,31 (1H, s a), 7,16 (1H, m), 6,84 (1H, s a, NH), 6,62 (1H, dd, $J = 2,8$ Hz), 6,25 (1H, s a, NH), 3,93 (2H, t, $J = 6$ Hz, CH_2O), 1,75 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1,52 (9H, s), 1,50 (9H, s), 1,46 (2H, m), 1,33 (4H, m) y 0,90 (3H, t, $J = 6$ Hz, CH_3); MS m/z encontrado: 407,2618, calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_5$: 407,2546.

40 Para preparar 4-hexiloxibenceno-1,2-diamina (HP) se hizo reaccionar 5b (0,022 g, 0,054 mmol) con ácido clorhídrico para dar HP como un sólido de color amarillo pálido. HPLC: 9,67 min > 99% de pureza. ^1H RMN (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 7,19 (1H, d, $J = 8$ Hz), 6,54 (1H, d, $J = 2$ Hz), 6,37 (1H, dd, $J = 2,8$ Hz), 5,60 (4H, s a, NH_2), 3,95 (2H, t, $J = 6$ Hz, CH_2O), 1,79 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1,50 (2H, m), 1,41 (4H, m), 1,51 (3H, t, $J = 6$ Hz, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 159,24, 142,83, 125,17, 111,50, 104,30, 103,01, 67,87 (CH_2O), 31,44, 29,04, 25,61, 22,52 y 14,36 (CH_3) ppm; MS m/z encontrado: 209,1701, calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}^+$: 209,1654.

Mesilato de [3-(3',4'-diaminobenzoilamino)-prop-1-il]trifenilfosfonio (MitoG-amida)



50 Se agitó una solución de yoduro de (3-aminopropil)trifenilfosfonio (1,34 g, 3,0 mmol), ácido 2,4-diaminobenzoico (445 mg, 2,9 mmol) y diisopropilcarbodiimida (400 μ l, 2,6 mmol) en MeCN seco (10 ml) a 35 $^\circ\text{C}$ en atmósfera de Ar durante 48 h. Después de ello, el precipitado se lavó con MeCN (3 x 10 ml). El sólido se recogió y el disolvente residual se eliminó a alto vacío. El sólido marrón resultante (1,25 g) se recristalizó dos veces en etanol para proporcionar la sal de yoduro como un polvo marrón (790 mg, 53%). Una muestra del yoduro se disolvió en MeOH-H₂O (50:50) y se pasó a través de una columna de intercambio iónico (Amberlite IRA-400, contraión: mesilato) dos veces. El disolvente se eliminó a vacío proporcionando el mesilato de fosfonio como un sólido marrón amorfo (238 mg, 44%). δ_{H} (CD_3OD , 400

55

MHz): 7,92-7,87 (m, 3 x *p*-H PPh₃), 7,82-7,71 (12H, m, 6 x *o*-H PPh₃, 6 x *m*-H PPh₃), 7,21 (1H, d, *J* = 1,9 Hz, H-2'), 7,14 (1H, dd, *J* = 8,1, 2,0 Hz, H-6'), 6,68 (1H, d, *J* = 8,1 Hz, H-5'), 3,53 (2H, t, *J* = 6,4 Hz, NCH₂), 3,50-3,44 (2H, m, PCH₂), 2,70 (3H, s, CH₃SO₃) 2,02-1,92 (2H, m, CH₂CH₂CH₂). δ_C (CD₃OD, 125 MHz): 170,99 (C), 141,14 (C), 136,34 (d, *J* = 4 Hz, CH), 134,80 (d, *J* = 10 Hz, CH), 131,59 (d, *J* = 12 Hz, CH), 124,42 (C), 120,52 (CH), 119,78 (d, *J* = 86 Hz, C), 116,44 (CH), 115,55 (CH), 40,81 (d, *J* = 18 Hz, CH₂), 39,55 (CH₃), 24,03 (d, *J* = 4 Hz, CH₂), 20,68 (d, *J* = 52 Hz, CH₂) (un C presumiblemente coincidente con otra señal).

El inhibidor de glioxalasa I, diéster ciclopentílico de bromobencil-glutatión, se sintetizó por alquilación de glutatión [35], seguida de protección con Boc estándar, acoplamiento con ciclopentanol utilizando tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio [36], eliminación del ácido trifluoroacético (TFA) del grupo Boc y tratamiento con bicarbonato de sodio para dar la base libre. Se obtuvieron otros reactivos de Sigma-Aldrich, a menos que se indique lo contrario. Los espectros de ¹H, ¹³C y ³¹P se adquirieron en los espectrómetros Varian INOVA-400 o Varian INOVA-500. Los desplazamientos químicos se comunican campo abajo desde el TMS, con respecto a la señal residual del disolvente. Para los componentes de síntesis química de este trabajo, se registraron espectros de masas de alta resolución en un espectrómetro de masas de electropulverización Bruker microTOF y se llevó a cabo el análisis por HPLC en un Agilent HP1100: Columna Phenomenex Prodigy 250 x 3 mm, gradiente de elución 10% de acetonitrilo/agua (TFA al 0,1%) a 100% de acetonitrilo a lo largo de 12,5 min a 0,5 ml.min⁻¹ con detección a 210 y 254 nm.

Valoración de propiedades del compuesto

Los compuestos conjugados con TPP se prepararon como soluciones madre 10 mM en DMSO, se purgaron con argón y se almacenaron como partes alícuotas a -20 °C. Los espectros UV/visible y los análisis cinéticos se realizaron utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2501PC en una cubeta de 1 ml que contenía tampón KCl [KCl 120 mM, HEPES 10 mM y EGTA 1 mM, pH 7,2 (KOH)]. Los coeficientes de extinción molar se calcularon a partir de la absorbancia a la absorción máxima (λ_{máx}) para los compuestos para soluciones de concentración conocida. Las velocidades de reacción entre MitoG y 1,2-dicarbonilos se determinaron a partir de la pendiente lineal inicial durante los primeros 30 s en la λ_{máx} para la formación de la quinoxalina relevante. Los espectros de fluorescencia se obtuvieron en 2,5 ml de tampón KCl utilizando un fluorímetro Shimadzu RF-301PC con anchuras de ranura de 3 nm. Los ensayos cinéticos utilizaron longitudes de onda de excitación y emisión de 344 y 433 nm, respectivamente, los espectros de emisión utilizaron una longitud de onda de excitación de 344 nm y los espectros de excitación utilizaron una longitud de onda de emisión de 433 nm.

Se realizó una RP-HPLC utilizando una bomba Gilson 321 con una columna C18 (Jupiter 300 Å, Phenomenex) con una columna de protección Widespore C18 (Phenomenex). Se inyectaron muestras (1 ml) a través de un filtro PVDF de 0,22 μm (Millex, Millipore). Se utilizaron tampón de HPLC A [TFA al 0,1% en agua] y tampón de HPLC B (acetonitrilo al 90% y TFA al 0,1%) y se realizó un gradiente a 1 ml/min a temperatura ambiente tal como sigue: 0-2 min - 5% de B; 2-17 min - 5-100% de B; 17-19 min - 100% de B; 19-22 min - 100-5% de B. Los picos se detectaron por absorbancia a 220 nm (UV/Vis 151, Gilson) y por fluorescencia (longitudes de onda de excitación y emisión de 344 y 433 nm; RF-10AXL, Shimadzu). Los coeficientes de partición entre PBS y octan-1-ol se determinaron tal como se ha descrito anteriormente [37].

Preparación mitocondrial e incubaciones

Se prepararon mitocondrias de hígado de rata (RLM) a 4 °C en tampón STE [sacarosa 250 mM, Tris 5 mM y EGTA 1 mM, pH 7,4 (HCl)] por homogeneización y centrifugación diferencial. La concentración de proteína se determinó utilizando el ensayo de Biuret con respecto a albúmina de suero bovino (BSA) y fue típicamente de 40-60 mg/ml. Se utilizó un electrodo de oxígeno tipo Clark (Rank Brothers, Bottisham, Cambridge, Reino Unido) conectado a un sistema de adquisición de datos Powerlab 2/20 (AD Instruments, Australia) para medir las tasas de respiración y se calibró con agua saturada de aire (210 nmol de O₂/ml a 37 °C). Se suspendieron RLM (2 mg de proteína/ml) en KCl 120 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 1 mM y KH₂PO₄ 5 mM, pH 7,2 (KOH) en una cámara de electrodo termostatazada de 1 ml con agitación. Después se añadió MitoG y después de 5 minutos se añadieron glutamato y malato (5 mM de cada uno), seguidos 3 minutos más tarde de ADP 400 μM. Las tasas de consumo de oxígeno se determinaron a partir de las pendientes utilizando el gráfico v5.5.6. para Mac (AD Instruments, Australia). Se construyó un electrodo selectivo para el resto TPP de MitoG y se utilizó tal como se ha descrito anteriormente [38].

Cultivo de células

Todas las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada del 95% de aire y el 5% de CO₂ y los medios de cultivo utilizados se suplementaron con suero de ternera fetal (FCS) al 10% (v/v), 100 U/ml de penicilina y 100 μg/ml de estreptomycin. Se cultivaron células C2C12 (línea celular de mioblastos de ratón; Colección Europea de Cultivos de Células Animales) en medio de Eagle modificado por Dulbecco bajo en glucosa (1000 mg/l de D-glucosa) (DMEM; Invitrogen). Las células se mantuvieron en subconfluencia (< 80%) para evitar la diferenciación. Los BAEC (células endoteliales aórticas bovinas; Cell Applications Inc, San Diego, CA) se mantuvieron en medio esencial mínimo α (αMEM; Invitrogen) que contenía D-glucosa 5 mM. Todos los matraces de cultivo y las placas de ensayo utilizadas para los experimentos se recubrieron previamente con fibronectina ((25 μg/ml; Sigma) en solución salina equilibrada

de Hank (HBSS; Cell Applications) a 1-4 µg de fibronectina/cm². Después de 1 hora a TA, se eliminó el exceso de solución de recubrimiento, y después se sembraron matraces y placas con células para experimentos. Se utilizaron BAEC para experimentos en los pasajes 4-6.

5 Para evaluar la viabilidad celular, se sembraron células C2C12 o BAEC a una densidad de 10.000 células/pocillo y 40.000 células/pocillo, respectivamente, en placas de 96 pocillos. Después de una incubación durante la noche, el medio se reemplazó por medio nuevo que contiene compuestos de ensayo y se incubó durante 24 h. Para determinar la supervivencia celular, las células se lavaron dos veces con medio, después se añadió medio nuevo (100 µl por pocillo) y se mezcló con 20 µl de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio]/metosulfato de fenazina (MTS/PMS) (Promega, Estados Unidos). Después de 2 h, se leyó la absorbancia a 490 nm en un lector de placas (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices). Todos los tratamientos se realizaron en pocillos por triplicado.

15 Se utilizó el analizador de flujo extracelular Seahorse XF24 para evaluar la tasa de consumo de oxígeno (OCR) celular [39-41]. Se cultivaron células (40.000 BAEC/pocillo) y se sometieron a tratamiento experimental en placas de ensayo Seahorse XF24 V₇ que se recubrieron con fibronectina tal como se ha descrito anteriormente. El OCR se determinó de la forma siguiente: las células se lavaron dos veces en medio de ensayo [4,15 g/l de base DMEM, 1,85 g/l de NaCl, 1x glutamax (Invitrogen), piruvato sódico 1 mM, D-glucosa 5 mM, 15 mg/l de rojo de fenol, HEPES 20 mM y FCS al 0,4% (v/v), pH 7,4] y se incubaron en 630 µl de medio de ensayo durante 1 h a 37 °C en aire. Después de 20 minutos de equilibrio se determinó la OCR basal y después de 3 horas de incubación con MitoG se realizaron inyecciones secuenciales de oligomicina (1 µg/ml), FCCP (2 µM) y rotenona/antimicina A (4 µg/ml y 5 µM, respectivamente). Las OCR se normalizaron al número de células tal como se midió utilizando el ensayo de sulforrodamina B (SRB) de la forma siguiente: las células se fijaron (200 µl de ácido tricloroacético al 5% a 4 °C durante 1 h), se lavaron con agua (x3), se tiñeron durante 20 minutos con 50 µl de SRB al 0,4% (p/v) en ácido acético al 1% (v/v), se lavaron (3 x ácido acético al 1%) y el tinte SRB incorporado se solubilizó en 100 µl de base Tris 10 mM durante 5 min. Después se transfirieron 50 µl de cada muestra por duplicado a una placa de 96 pocillos, se mezclaron con 50 µl de base Tris sin tamponar 10 mM y se leyó la absorbancia a 565 nm en un lector de placas (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices). Se construyó una curva patrón sembrando un número conocido de células en pocillos por cuadruplicado y fijándolas y tiñéndolas en paralelo con pocillos de muestra. Para calcular la proporción del consumo de oxígeno atribuible a la fuga de protones y la capacidad de reserva, las OCR después de la inyección de oligomicina, FCCP y rotenona/antimicina A se expresaron como un porcentaje de la OCR basal total [42] [40].

35 Para evaluar la formación total de metilgloxal en las células mediante RP-HPLC, las capas celulares se lavaron en PBS (1 ml), se rasparon en 1,5 ml de PBS y se sedimentaron por centrifugación (16.000 g durante 2 minutos). El sedimento celular se resuspendió en 500 µl de tampón KCl, se añadieron 500 µl de ácido fórmico al 0,1%, se sedimentó la proteína por centrifugación como anteriormente, y se recogió el sobrenadante. El metilgloxal se derivatizó después para dar 2-metilquinoxalina mediante la adición de o-fenilendiamina 100 µM seguida de incubación a 37 °C durante 4 h. Las muestras se secaron al vacío y se evaluó la 2-metilquinoxalina tal como se ha descrito anteriormente [28]. En resumen, las muestras secas se resuspendieron en 1 ml de tampón HPLC [68% (v/v) de KH₂PO₄ 10 mM, pH 2,5, y 32% de acetonitrilo], se filtraron (PVDF de 0,22 µm; Millex, Millipore) y se separaron por RP-HPLC isocrática en el tampón HPLC anterior a un caudal de 2 ml/min a temperatura ambiente utilizando una bomba Gilson 321 con una columna C18 (Jupiter 300 Å, Phenomenex) y una columna de protección Wipore C18 (Phenomenex). Los picos se detectaron fluorométricamente (longitudes de onda de excitación y emisión de 352 y 385 nm, respectivamente; RF-10AXL, Shimadzu).

45 Para el análisis por CL-EM/EM de productos de reacción de MitoG, se incubaron células en matraces T25 (Nunc) con MitoG 2 µM a 37 °C. Las monocapas de células se lavaron (1 ml de PBS), se rasparon en 1,5 ml de PBS y se sedimentaron por centrifugación (16.000 g durante 2 min). El sedimento se volvió a suspender en 250 µl de acetonitrilo al 100%/enriquecido al 0,1% con patrones internos (IS) deuterados (100 pmol cada uno de *d*₁₅-MQE y *d*₁₅-QE), se agitó en vórtice y se centrifugó (2 x 16.000 g durante 15 min). Las muestras se secaron al vacío (Savant SpeedVac), se volvieron a suspender en 100 µl de acetonitrilo al 20%/ácido fórmico al 0,1%, se agitaron en vórtice, se centrifugaron (16.000 g durante 10 min), se transfirieron a viales de automuestreador silanizados [Chromacol N.^o de ref. 1.5HRRV (S)], se purgaron y se sellaron en atmósfera de argón y después se almacenaron a -80 °C hasta el análisis por CL-EM/EM. Cuando se especificó, las células se sometieron a un tratamiento de glucemia aguda y se incubaron en glucosa baja (D-glucosa 5 mM), glucosa alta (D-glucosa 30 mM) o en medio de control osmótico (D-glucosa 5 mM + L-glucosa 25 mM) durante 4 h.

Experimentos con ratones

60 El modelo de ratón Akita de diabetes tipo I (Ins2^{+/-} Akita^J) [43-45] se evaluó en la Universidad de Alabama, Estados Unidos. Todos los procedimientos se realizaron según "la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio", y se aprobaron por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Alabama en Birmingham. Se mantuvieron ratones macho Ins2^{+/-} Akita^J y de tipo silvestre (C57BL/6) (de 4 a 8 semanas de edad) de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, Estados Unidos) con comida de laboratorio y agua a voluntad hasta las 14 semanas de edad, cuando se usaron para experimentos. Para ello se administró MitoG (100 nmol en 100 µl de solución salina) mediante inyección en la vena de la cola. Después de 4 a 6 h, se sacrificaron los ratones y se tomaron muestras de

orina y se congelaron instantáneamente para su posterior análisis del contenido de MQE/QE. Los niveles de glucosa en sangre se midieron utilizando un medidor de glucosa en sangre Accu-Chek Advantage (Roche Diagnostics). Los niveles de creatinina en orina se determinaron en el Core Biochemical Assay Laboratory (Addenbrooke's Hospital, Cambridge, Reino Unido). Para extraer MQE y QE, se mezclaron 20 µl de orina con 500 µl de acetonitrilo al 60%/ácido fórmico al 0,1% y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Los extractos se enriquecieron con IS deuterados (100 pmol cada uno de d_{15} -MQE y d_{15} -QE), se agitaron en vórtice durante 30 segundos y se incubaron en hielo durante 30 minutos con agitación en vórtice cada 10 minutos y después se centrifugaron (16.000 g durante 10 min). Los sobrenadantes se recogieron, se filtraron (PVDF de 0,22 µm, Millex, Millipore) y se secaron al vacío (Savant SpeedVac). Las muestras secas se resuspendieron en 150 µl de acetonitrilo al 20%/ácido fórmico al 0,1% mediante agitación en vórtice durante 5 minutos, seguida de centrifugación a 16.000 g durante 10 minutos. Después, las muestras se transfirieron a viales de automuestreador silanizados [Chromacol N.º de ref. 1.5HRRV (S)], se lavaron y se sellaron en atmósfera de argón, y se almacenaron a -80 °C hasta el análisis por CL-EM/EM.

Análisis por CL-EM/EM

Los patrones de fragmentación de EM de compuestos de TPP se determinaron por infusión directa de compuestos [1 µM en acetonitrilo al 20% (v/v)] a 2 µl/min en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Waters Quattro Ultima). Se utilizó ionización por electropulverización en modo de ion positivo con los ajustes siguientes: voltaje de pulverización de fuente - 3 kV; voltaje de cono - 100 V; temperatura de la fuente de iones - 80 °C; energía de colisión - 50 V. Se utilizaron nitrógeno y argón como gases de cortina y de colisión, respectivamente.

Se llevaron a cabo análisis por CL-EM/EM utilizando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Waters Xevo TQ-S) con un sistema de CL Aquity de clase I (Waters) conectado. Las muestras se mantuvieron a 4 °C antes de la inyección mediante el automuestreador de 10 µl en una aguja de flujo continuo de 15 µl y RP-HPLC a 30 °C utilizando una columna de fenilhexilo Luna 5 µ (1 x 50 mm, 5 µm; Phenomenex) con una columna de protección de fenilhexilo (2 x 4 mm; Phenomenex). Los tampones utilizados fueron el tampón de EM A [0,1% (v/v) de ácido fórmico en agua] y el tampón de EM B [95% de acetonitrilo/0,1% de ácido fórmico (ambos v/v)]. Se realizó un gradiente a 50 µl/min del modo siguiente: 0-2 min - 5% de B; 2-3 min - 5-25% de B; 3-5 min - 25-75% de B; 5-7 min - 75-100% de B; 7-10 min - 100% de B; 10-12 min - 100-5% de B; 12-20 min - 5% de B. El eluyente se desvió para eliminarlo del espectrómetro de masas a 0-5 min y 16-20 min de tiempo de adquisición utilizando una válvula de desviación en línea. Para el análisis por EM se utilizó ionización por electropulverización en modo de ion positivo: voltaje de pulverización de fuente - 2,5 kV; voltaje de cono - 25 V; temperatura de la fuente de iones - 100 °C; energía de colisión - 38 V. Se utilizaron nitrógeno y argón como gases de cortina y de colisión, respectivamente. Se utilizó un seguimiento de reacción múltiple en modo de ion positivo para la detección de compuestos. Las transiciones utilizadas para la cuantificación fueron las siguientes: MQE, 506 > 262; d_{15} -MQE, 521 > 277; QE, 492 > 262 y d_{15} -QE, 507 > 277. Para cada experimento, se prepararon curvas patrón utilizando cantidades conocidas de MQE y QE, a las que se añadieron IS y se extrajeron en paralelo con las muestras. Los patrones y las muestras se cuantificaron utilizando el programa informático MassLynx 4.1 para determinar el área de pico para MQE, QE e IS, y las curvas patrón se utilizaron para determinar la cantidad de MQE y QE presente en las muestras.

Estadísticas

El análisis de datos se realizó con un entorno de software R para computación estadística y gráficos (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria). Todos los datos se analizaron utilizando pruebas en t o análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba post-hoc de Dunnett según corresponda, y se representaron como media \pm error estándar de la media (S.E.). Los valores de P iguales o inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados y discusión

Síntesis y caracterización de MitoG y sus productos de reacción

Las síntesis de MitoG, sus productos de quinoxalina pronosticados al reaccionar con metilgloxal y glixal, y sus versiones deuteradas se resumen en la figura 2. Los espectros de absorción UV/Vis de MitoG y sus restos TPP y fenilendiamina componentes se muestran en la figura 3A. Tal como se esperaba, el espectro de MitoG fue una suma de los de fenilendiamina, hexiloxifenilendiamina (HP) y una sal simple de alquilTPP. A medida que la o-fenilendiamina experimenta degradación oxidativa [2], y dado que existía un precedente en la literatura para la reactividad adicional de fenilendiaminas sustituidas con alcoxi, se evaluó la estabilidad de MitoG por RP-HPLC y se encontró que las soluciones madre eran estables en almacenamiento a -20 °C. Para evaluar su estabilidad en condiciones biológicamente relevantes, se midió la descomposición de soluciones diluidas de MitoG a 37 °C, y se observó una pérdida mínima en 4 h con una pérdida significativa en 24 h, por lo que MitoG es suficientemente estable para experimentos biológicos que duran hasta ~4 h.

Los productos esperados de la reacción de MitoG con metilgloxal (MQE) y glixal (QE) se sintetizaron y tienen espectros de absorción UV/Vis distintos de los de MitoG (figura 3B). Tanto QE como MQE eran fluorescentes, mientras que MitoG no lo era (figura 3C). Los tres compuestos se resolvieron mediante RP-HPLC (figura 3D) aunque los

regioisómeros de MQE (MQE1, MQE2; figura 1B) no se distinguieron. Tanto MQE como QE se mantuvieron estables después de una semana a 37 °C según se evaluó por RP-HPLC (datos no mostrados). Las propiedades de MitoG, MQE y QE se resumen en la tabla 1. Se concluyó que MitoG es lo suficientemente estable para experimentos biológicos que involucran la captura de glioxal y metilglioxal dentro de las mitocondrias en células e *in vivo* y los productos de reacción MQE y QE fueron firmemente estables para el aislamiento químico y posteriores análisis por CL-EM/EM.

Tabla 1

Tabla 1: Coeficientes de extinción molar y coeficientes de partición de MitoG, MQE y QE. Los datos son medias \pm SE de 3 determinaciones.

Compuesto	Coeficiente de extinción molar a la longitud de onda, λ ($M^{-1}cm^{-1}$)				Coeficiente de partición
	$\lambda = 267$ nm	$\lambda = 274$ nm	$\lambda = 299$ nm	$\lambda = 345$ nm	
MitoG	4069 \pm 206	3721 \pm 193	3679 \pm 188		2,4 \pm 0,1
MQE	6463 \pm 139	5509 \pm 127		7466 \pm 158	12,3 \pm 0,5
QE	5275 \pm 293	4557 \pm 245		6901 \pm 375	13,6 \pm 0,9

Reactividad de MitoG con glioxal y metilglioxal

MitoG reaccionó con metilglioxal y glioxal para formar productos con propiedades idénticas de absorción, de fluorescencia y de RP-HPLC (figuras 3E, F, G y H) a los de MQE o QE sintetizados y caracterizados independientemente (figuras 3B, C y D). La incubación de MitoG con los aldehídos biológicamente importantes y reactivos 4-hidroxinonenal (HNE) o acroleína seguido por análisis por RP-HPLC indicaron que si bien MitoG reaccionó, se formaron varios productos, algunos de los cuales eran inestables (datos no mostrados). Por lo tanto, la reacción de MitoG con estos aldehídos no es útil para el diagnóstico, a diferencia con la de 1,2-dicarbonilos, que genera productos estables y dominantes.

El progreso de la reacción entre MitoG y metilglioxal se pudo observar por espectrofotometría UV/Vis, pero la de MitoG con glioxal fue demasiado lenta (figura 4A). Sin embargo, ambas reacciones podrían evaluarse utilizando un procedimiento fluorométrico más sensible (figura 4B). La mayor reactividad del metilglioxal con respecto al glioxal con *o*-fenilendiaminas es coherente con la mayor toxicidad del metilglioxal [46-48]. El glioxal acuoso está presente predominantemente en forma de dihidrato, que es un tetraol no reactivo, mientras que el metilglioxal es predominantemente el monohidrato con solo el aldehído convertido en un 1,1-diol. Esto explica la mayor reactividad del metilglioxal, que requiere una sola deshidratación para generar el dicarbonilo altamente reactivo [61]. Las constantes de velocidad para las reacciones MitoG-metilglioxal y MitoG-glioxal fueron: $19 \pm 1 M^{-1}s^{-1}$ y $0,6 \pm 0,3 M^{-1} s^{-1}$ (medias \pm SE, $n = 3$) a 37 °C, respectivamente, en comparación con el valor comunicado de $1,7 \pm 0,3 M^{-1}s^{-1}$ para la reacción de metilglioxal con *o*-fenilendiamina a 25 °C [49]. Un experimento de velocidad competitivo para metilglioxal entre MitoG y *o*-fenilendiamina, supervisado por RMN de 1H (0,12 mM, DMSO, 25 °C), mostró que MitoG fue ~1,8 veces más reactivo que *o*-fenilendiamina, mientras que una competencia similar para el glioxal entre 4-metoxi-fenil-1,2-diamina y *o*-fenilendiamina mostró que la sustitución con 4-metoxi mejoró la reactividad ~3,8 veces. Conjuntamente, estos datos confirman que MitoG reacciona con 1,2-dicarbonilos para formar productos de diagnóstico estables y que el enlace de éter donador de electrones en MitoG mejora la reactividad en comparación con *o*-fenilendiamina no sustituida.

Acumulación de MitoG dentro de mitocondrias energizadas

Para ser una sonda selectiva de mitocondrias para 1,2-dicarbonilos en células e *in vivo*, el resto TPP de MitoG deberá promover su absorción dentro de las mitocondrias. Se midió la absorción de MitoG por mitocondrias aisladas utilizando un electrodo selectivo para el resto TPP de MitoG (figura 5). Después de la adición de MitoG para calibrar la respuesta del electrodo, la adición subsiguiente de mitocondrias condujo a una pequeña disminución en la concentración de MitoG debido a la adsorción esperada de MitoG a las mitocondrias no energizadas [38]. La adición del sustrato respiratorio, succinato, generó un potencial de membrana y condujo a la absorción sustancial de MitoG tal como se muestra por medio de una disminución en la concentración externa. La disipación del potencial de membrana con el desacoplador cianuro de carbonilo (FCCP) condujo a la liberación de MitoG de las mitocondrias. La absorción dependiente del potencial de membrana de MitoG en las mitocondrias fue de ~2 nmol/mg de proteína que, suponiendo un volumen de matriz mitocondrial de 0,5 μ l/mg de proteína [31], proporciona una concentración de MitoG dentro de las mitocondrias ~4 mM mientras que la concentración externa de MitoG fue ~2 μ M. Esta acumulación de MitoG de ~2000 veces indica que MitoG, como otros compuestos conjugados con TPP, se acumula selectivamente por las mitocondrias de una forma dependiente del potencial de membrana.

Para que MitoG sea útil, no deberá interrumpir la función mitocondrial ni causar toxicidad celular a las concentraciones utilizadas. Para analizar esto, se incubó MitoG con mitocondrias aisladas y se evaluó su efecto sobre la respiración en diferentes condiciones. Con MitoG 5 μM hubo un ligero aumento en la fuga de protones tal como se indica por medio de un aumento en la respiración acoplada (figura 6A). Esto se espera ya que los altos niveles de cationes TPP dentro de las membranas biológicas eventualmente causan una mayor fuga de protones. Por el contrario, los complejos de fosforilación oxidativa en sí mismos eran insensibles a MitoG hasta 5 μM ya que no había ningún efecto sobre la respiración de fosforilación (figura 6B). MitoG solo disminuyó la viabilidad de las células C2C12 y BAEC a concentraciones superiores a 10 y 50 μM , respectivamente (figuras 6C, D). Para evaluar el efecto de MitoG sobre la función mitocondrial dentro de las células, se midió la tasa de consumo de oxígeno (OCR) utilizando un analizador de flujo Seahorse XF24 (figura 6E-H). Las concentraciones de MitoG superiores a 10 μM disminuyeron ligeramente la OCR debido a la síntesis de ATP y las concentraciones más bajas en el intervalo de 2 - 5 μM mostraron una tendencia a un aumento de la OCR debido a la fuga de protones y una disminución de la capacidad de reserva respiratoria. Por lo tanto, se utilizó habitualmente una concentración de MitoG de 2 μM para la mayor parte de los experimentos con células.

Cuantificación de la reacción de MitoG con 1,2-dicarbonilos por CL-EM/EM

Para utilizar MitoG para examinar la concentración local de metilgloxal y gloxal, fue necesario medir las cantidades de los productos de reacción (MQE, QE) por CL-EM/EM con respecto a patrones internos deuterados [31]. Se determinaron las fragmentaciones de MQE y QE y sus versiones deuteradas durante la EM en tándem (figura 7), y fueron las esperadas para los compuestos de TPP [31]. Este patrón de fragmentación (para el catión trifenil-fósforo (figura 8A)) se utilizó para establecer un ensayo por CL-EM/EM para los productos de la reacción de MitoG con 1,2-dicarbonilos, y las curvas patrón típicas se muestran en la figura 8B. Se concluyó que los productos de reacción de MitoG pueden detectarse de forma muy sensible, facilitando el uso de MitoG para evaluar el metilgloxal y el gloxal mitocondrial en células e *in vivo*.

MitoG como sonda para metilgloxal y gloxal mitocondriales en células

Para que MitoG sea una sonda eficaz, deberá reaccionar con metilgloxal y gloxal dentro de un sistema biológico para proporcionar los productos de diagnóstico, MQE y QE, que después se pueden extraer y analizar mediante CL-EM/EM. Para evaluar si esto era posible en células, se preincubaron BAEC con MitoG durante 1 h, después se añadió metilgloxal o gloxal y después de otras 3 h las capas celulares se extrajeron y se analizaron por CL-EM/EM para evaluar las cantidades de MQE (figura 9A) y QE (figura 9B). Los niveles de ambos productos derivados de MitoG, MQE y QE, aumentaron inicialmente con la concentración de 1,2-dicarbonilos exógenos añadidos antes de mostrar saturación a concentraciones suprafisiológicas de 1,2-dicarbonilo, con las que MitoG se volvió limitante (figuras 9A y B). El tratamiento con el captador de 1,2-dicarbonilo, aminoguanidina (AG), o la disminución de la absorción mitocondrial de MitoG utilizando el desacoplador FCCP redujo las cantidades de MQE y QE detectadas (figuras 9A y B). Como hay presencia de algunos MitoG en el medio de cultivo, también habrá una contribución de la formación de MQE/QE en el sobrenadante que se acumulará posteriormente por las células. Estos hallazgos son coherentes con la reacción de MitoG con metilgloxal y gloxal dentro de las células para formar MQE/QE y que esta reacción se reduce por AG o al disminuir el grado de absorción de MitoG en las mitocondrias dentro de las células mediante disipación del potencial de membrana. Se concluyó que MitoG reacciona con metilgloxal o gloxal en un contexto biológico para formar MQE y QE y que estos productos pueden extraerse de las células y cuantificarse por CL-EM/EM.

A continuación se utilizó MitoG para determinar los niveles mitocondriales relativos de metilgloxal y gloxal en condiciones de hiperglucemia, una afección en la que se cree que contribuye la glicación perjudicial por 1,2-dicarbonilos. En primer lugar se confirmó que la hiperglucemia aumentó la producción de metilgloxal celular en nuestro sistema. Para realizar esto, se incubaron células BAEC en condiciones de glucosa alta (30 mM) y baja (5 mM) durante 4 h y después se midió la formación de metilgloxal por derivación con o-fenilendiamina para generar 2-metilquinoxalina, que se evaluó mediante RP-HPLC. Este análisis mostró que la hiperglucemia en BAEC efectivamente aumentó la formación de metilgloxal ~2 veces en comparación con los controles (datos no mostrados, n = 3). Para observar si MitoG podría evaluar un cambio en metilgloxal/gloxal mitocondrial en condiciones hiperglucémicas, la formación de MQE y QE se comparó a continuación en células después de la incubación con glucosa baja (5 mM) o alta (25 mM) durante 4 h (figuras 9C y D). Hay un aumento gradual en la cantidad de MQE detectado con el tiempo y esta aumenta sustancialmente al pasar de glucosa baja a alta, de forma acorde con el aumento de metilgloxal dentro de las mitocondrias en condiciones de hiperglucemia. Esta formación de MQE/QE fue bloqueada por el desacoplador FCCP (figuras 9C, D) y la formación de MQE también disminuyó por la trampa de metilgloxal AG (figura 9E). El aumento de MQE tras la hiperglucemia no se produjo cuando la alta concentración de D-glucosa se reemplazó por L-glucosa 25 mM no fisiológica (junto con D-glucosa 5 mM para mantener la viabilidad celular). Esto sugiere que el aumento en MQE causado por una alta concentración de D-glucosa requiere el metabolismo de la glucosa para generar metilgloxal, y no se debe a efectos no específicos de una alta concentración de carbohidratos en el medio de cultivo (figura 9E). La reacción entre MitoG y metilgloxal/gloxal también puede producirse fuera de las mitocondrias, con la posterior absorción de MQE/QE dentro de las mitocondrias. Sin embargo, como la reacción entre MitoG y los dicarbonilos es de segundo orden, se espera que la velocidad de formación de MQE/QE dentro de las mitocondrias sea ~500-1.000 veces superior que en otros compartimentos, incluso aunque las concentraciones de metilgloxal y

glioal fueran las mismas. Por lo tanto, estos datos son coherentes con la formación de MQE/QE que se produce principalmente dentro de las mitocondrias.

5 Cuando se incubaron BAEC en condiciones de glucosa alta en presencia del inhibidor de la glioalasa I diéster ciclopentílico de bromobencil-glutati6n [35], para suprimir la degradaci6n del glioal y el metilglioal, la cantidad de MQE y QE aument6 (figura 9F). Conjuntamente, estos datos indican que MitoG es una sonda eficaz para evaluar cambios en la producci6n mitocondrial de 1,2-dicarbonilo dentro de las c6lulas. Adem6s, estos hallazgos sugieren que la concentraci6n mitocondrial de metilglioal aumenta ~3 veces en condiciones de hiperglucemia. Por lo tanto, la glicaci6n mitocondrial por dicarbonilos reactivos elevados es un fuerte candidato para contribuir a la interrupci6n de la funci6n mitocondrial que tiene lugar durante una hiperglucemia patol6gica.

MitoG como sonda para niveles mitocondriales de metilglioal y glioal in vivo

15 Anteriormente se ha demostrado que la sonda de espectrometría de masas de per6xido de hidrógeno dirigida a mitocondrias MitoB se puede utilizar para evaluar la producci6n de per6xido de hidrógeno dentro de las mitocondrias en moscas de la fruta vivas [30, 31] y ratones [50]. A este respecto, el MitoB actúa como una sonda para generar el *exomarcador* MitoP [51], que es un compuesto de sonda ex6geno que cuando se administra a un animal experimental se convierte en un marcador de diagn6stico que puede evaluarse *ex vivo* y se utiliza para inferir la producci6n de especies reactivas dentro del organismo vivo [51]. Por lo tanto, a continuaci6n se realiz6 un estudio para ver si MitoG tambi6n podría utilizarse para generar los exomarcadores MQE y QE para evaluar la formaci6n de metilglioal/glioal dentro de las mitocondrias *in vivo*. El componente TPP de MitoG facilita este objetivo, ya que se sabe que despu6s de inyecci6n intravenosa los compuestos de TPP se distribuyen r6pidamente de la sangre a las mitocondrias dentro de los tejidos y despu6s se excretan lentamente durante varias horas a la orina y la bilis [27, 52, 53]. Por lo tanto, puede ser posible administrar MitoG a ratones y luego analizar la orina para ver si existe una producci6n elevada de los productos MQE/QE en determinadas condiciones, lo que indica un aumento de los dicarbonilos reactivos dentro de las mitocondrias *in vivo*.

30 Para realizar esto, se utiliz6 el modelo de rat6n Akita (*Ins2^{+/-} Akita^J*) en el que una mutaci6n en la proinsulina conduce a hiperglucemia cr6nica y complicaciones patol6gicas consecuentes similares a las encontradas en la diabetes tipo I. [43-45]. Para evaluar si hubo cambios en metilglioal/glioal mitocondrial en los ratones Akita en comparaci6n con el tipo silvestre, se administr6 MitoG (100 nmol) en forma de inyecci6n en la vena de la cola y despu6s de 4 a 6 h se aislaron muestras de orina y se midieron los contenidos de MQE y QE con respecto a la creatinina. Estos datos se muestran en funci6n de los niveles de glucosa en sangre para ratones individuales (figuras 10A y B). Tal como se esperaba, la glucosa en sangre fue mucho m6s alta en los ratones Akita que en los ratones de tipo silvestre, y este aumento en la glucosa en sangre se correlacion6 con un aumento significativo en los aductos MQE y QE MitoG, normalizados a creatinina (figuras 10A y B). Estos datos sugieren que MitoG se puede utilizar como sonda para la formaci6n de metilglioal y glioal en condiciones de hiperglucemia patol6gicamente relevante *in vivo*.

Estabilidad de MitoG

40 Se mezcl6 MitoG 100 μ M con 0,07 U de peroxidasa de r6bano picante (HRP) en una cubeta de 1 ml que contenía tamp6n de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) y per6xido de hidrógeno al 0,5% (p/v) a temperatura ambiente. Una cubeta de referencia y un blanco se configuraron de forma similar con DMSO en lugar de MitoG. Los espectros de barrido UV/Vis se tomaron despu6s de 1 minuto, 5 minutos y 10 minutos despu6s de un mezclado utilizando un espectrofot6metro (Shimadzu UV-2501PC). Los espectros de las mezclas que contienen MitoG se compararon con el espectro del blanco. Para determinar si alguna reacci6n observada podría prevenirse con el inhibidor de HRP, NaN_3 [58, 59], se establecieron incubaciones separadas como anteriormente pero que contienen adem6s 8 mg/ml de NaN_3 .

50 Se sabe que la degradaci6n oxidativa de *o*-fenilendiamina da como resultado la producci6n de metilglioal y glioal [60]. Esta degradaci6n oxidativa puede conducir a una sobreestimaci6n de los niveles de dicarbonilo en las muestras si se utiliza *o*-fenilendiamina para tratar de cuantificar los niveles de metilglioal y glioal en muestras biol6gicas. Para determinar si MitoG podría sufrir una degradaci6n oxidativa similar a metilglioal y glioal, se incub6 MitoG con HRP y per6xido de hidrógeno *in vitro*. Se tomaron espectros de barrido UV/Vis de la mezcla de reacci6n antes y despu6s de la adici6n de HRP. La HRP se utiliz6 como una peroxidasa representativa que podría catalizar una degradaci6n oxidativa en un entorno celular. Tal como se muestra en la figura 11, el pico de absorpci6n a $\lambda = 299$ nm debido a MitoG desaparece despu6s de la incubaci6n con HRP, mientras que aparece un nuevo pico a $\lambda = 430$ nm. Estos cambios se previenen mediante el inhibidor de HRP, NaN_3 . Estos resultados indican que MitoG se degrada en presencia de HRP para formar un producto que absorbe a $\lambda = 430$ nm.

60 Bas6ndose en las diferencias en el perfil de absorpci6n (comp6rese la figura 3B con la figura 11), este producto no es ni MQE ni QE, lo que sugiere que MitoG no sufre degradaci6n oxidativa para formar metilglioal y glioal. Por lo tanto, la reacci6n de MitoG con peroxidases no causar6 la formaci6n de metilglioal y glioal y, a diferencia de la *o*-fenilendiamina, no causar6 una sobreestimaci6n artificial de los niveles de dicarbonilo mitocondrial en muestras biol6gicas cuando se utiliza MitoG como sonda.

Protecci6n por MitoG contra la depresi6n respiratoria inducida por dicarbonilo y la muerte celular

Se incubaron RLM aisladas que respiraban en glutamato/malato con MitoG, metoxifenilendiamina (MP) o butilTPP durante 2 min, seguidos de metilglioal 0,5 mM o glioal 5 mM durante 5 min. Después se añadió ADP y la tasa de consumo de oxígeno se supervisó a 37 °C (véanse las figuras 12A y 12B). Se pretrataron células C2C12 con MitoG, metoxifenilendiamina (MP) o butilTPP durante 1 h antes de la exposición a metilglioal 1 mM o glioal 5 mM (véanse las figuras 12C y 12D). Después de una incubación durante la noche, se determinó la supervivencia celular utilizando el ensayo MTS. Se realizaron experimentos similares en BAEC pretratadas con MitoG, MP o butilTPP. Para todos los experimentos, las concentraciones de metilglioal y glioal utilizadas se eligieron en función de los resultados de los estudios realizados antes de los ensayos de protección. En estos estudios previos, se expusieron RLM o células a un intervalo de concentraciones de dicarbonilo, y se evaluaron las tasas de la respiración fosforilante o la supervivencia celular. Los resultados de estos experimentos anteriores se muestran en recuadros, y las concentraciones de dicarbonilo que habían causado depresión respiratoria significativa o muerte celular fueron elegidas para su uso en los ensayos de protección. Los datos de todos los grupos se normalizaron frente a los controles no tratados. Para RLM, la tasa de respiración mediante controles no tratados se consideró del 100%; para las células, se consideró que la supervivencia celular de los controles no tratados era del 100%. Los resultados se expresan como media \pm S.E. de tres experimentos independientes. MitoG actuó como protector contra la depresión respiratoria inducida por metilglioal y la muerte celular inducida por metilglioal y glioal en células C2C12 y BAEC. ButilTPP, MP y HP no actuaron significativamente como protectores en todos los experimentos. En la figura 12, los símbolos *, ** indican respectivamente que $P < 0,05$ o $P < 0,01$ con respecto a los grupos de solo dicarbonilo; y los símbolos +, ++ indican respectivamente que $P < 0,05$ o $P < 0,01$ con respecto a controles no tratados.

Para evaluar la utilidad de un enfoque dirigido a las mitocondrias contra la toxicidad inducida por glicación, se midió el consumo de oxígeno por RLM aisladas que se habían tratado con MitoG antes de la exposición a α , β -dicarbonilo. Tal como se muestra en la figura 12A, MitoG protegió contra la depresión respiratoria inducida por metilglioal en RLM aisladas de una forma dependiente de la dosis, pero no evitó el daño de glioal en este sistema (figura 12B). También se realizaron experimentos análogos en células cultivadas. Las células C2C12 o BAEC se pretrataron con MitoG durante 1 h, y después se expusieron a metilglioal o glioal exógeno. La supervivencia celular se evaluó después de una incubación durante la noche. En estos experimentos, MitoG actuó como protector contra ambos α , β -dicarbonilos, aumentando significativamente la supervivencia celular en ambos tipos de células (figura 12C-F). El butilTPP no tuvo ningún efecto significativo contra ninguno de los dicarbonilos, lo que indica que la protección observada con MitoG no se debió a efectos inespecíficos del resto TPP. Las concentraciones equimolares de los compuestos estructuralmente similares pero no dirigidos, MP y HP, proporcionaron menos protección que MitoG, lo que sugiere que la eliminación específica de dicarbonilos dentro de las mitocondrias es una estrategia terapéutica más eficaz que la eliminación indiscriminada de estos agentes glicantes.

Por lo tanto, se ha demostrado que MitoG mejora la depresión respiratoria inducida por metilglioal y la citotoxicidad inducida por metilglioal y glioal. Los derivados no dirigidos de fenilendiamina, MP y HP, no actuaron significativamente como protectores ni en mitocondrias aisladas ni en cultivos celulares. Por lo tanto, la protección por MitoG parece estar relacionada con la captación mitocondrial específica de estas especies reactivas de carbonilo.

Estudio de los efectos de la MitoG-amida sobre complicaciones diabéticas en el corazón

Para determinar los efectos de la MitoG-amida sobre complicaciones diabéticas en el corazón, se utilizó un modelo de diabetes tipo I bien establecido en ratones, basado en la destrucción de las células beta del páncreas mediante la administración de la toxina de células beta estreptozotocina (STZ; que puede obtenerse de Selleck Chemicals, Múnich, Alemania). Los ratones que eran ratones C57Bl6/J de 6-7 semanas de edad (> 20 g) recibieron STZ (50 mg/kg por inyección intraperitoneal) en 5 días consecutivos. La muerte de las células beta y la inducción de un nivel alto de glucosa en sangre asociado con la diabetes tipo I se confirmó mediante pruebas semanales de glucosa en sangre en una muestra de sangre de vena de la cola de ratones. Un nivel de glucosa en sangre > 17 mmol/l se consideró diabético. Para los experimentos, los ratones se dividieron en tres grupos: (a) control; (b) diabetes tipo I inducida por STZ; y (c) animales con diabetes tipo I inducida por STZ tratados con MitoG-amida (10 mg/kg de peso corporal una vez al día por sonda). Esto se repitió durante 12 semanas (figura 13). Al final del protocolo, los ratones se sometieron a una medición mediante toma de imágenes de resonancia magnética (MRI) cardíaca (figura 14) seguida de una medición de presión/volumen (P/V) basada en catéter ventricular izquierdo (figura 15). Las mediciones de MRI y del bucle P/V se realizaron el mismo día y las medidas de volumen de MRI se utilizaron como corrección para el bucle P/V.

Para la medición mediante toma de imágenes de resonancia magnética (MRI) cardíaca se realizó un protocolo estándar de MRI cardíaca con un sistema Bruker BioSpec 4.7T 24 h después de la cirugía. La anestesia se indujo con el 3% y se mantuvo con el 1,25% de isoflurano en oxígeno. La temperatura se supervisó con una sonda rectal y se mantuvo constante por medio de una manta de agua calentada, la respiración se controló utilizando una almohada conectada a un transductor piezoeléctrico. Las señales de electrocardiograma (ECG) se monitorizaron con electrodos de grafito neonatal (3M), colocados sobre las patas delantera izquierda y trasera derecha.

Se utilizó una jaula de 12 cm de diámetro para transmitir la señal y una bobina de matriz cardíaca de 4 canales para la recepción de la señal. El protocolo de tomas de imagen consistió en barridos de exploración seguidos de la toma

de imágenes rápida activada por ECG con cortes de precisión de estado estacionario (FISP) (tiempo de repetición/tiempo de eco TR/TE 6/2,4 ms 13-20 cuadros, campo de visión de 3,5 cm (FOV), matriz 256, espesor de corte de 1 mm, anchura de banda 64,1 kHz, ángulo de giro (FA) 20°, promedio de muestreo de 2 [número de excitaciones, NEX]), en el eje largo y en el eje corto para cubrir todo el corazón. En el procesamiento posterior, los volúmenes durante las diferentes fases del ECG se delinearon e integraron a lo largo de todo el corazón utilizando la regla de Simpson. Se obtuvieron parámetros funcionales globales, incluida la fracción de eyección, la fracción de sangre expulsada a la circulación durante un latido cardíaco.

Para la medición de presión/volumen (P/V), se realizó un cateterismo ventricular izquierdo a través de la arteria carótida derecha utilizando un catéter de presión 1.2 F (Scisense Inc., London, Canadá).

Los resultados del tratamiento a largo plazo de la diabetes tipo I inducida por STZ administrado con MitoGamida sobre el peso corporal, la glucosa en sangre y la frecuencia cardíaca se compararon con ratones y controles STZ tratados con placebo (figura 16). La glucosa en sangre se midió en sangre completa utilizando el sistema de supervisión de glucosa en sangre Ultra OneTouch® de Johnson and Johnson. La frecuencia cardíaca se midió durante el uso del catéter de bucle P/V y se registró. Esto demostró que el tratamiento con STZ condujo a una disminución en el peso corporal y un aumento en la glucosa en sangre, ninguno de los cuales se vio afectado por el tratamiento con MitoGamida. Además, ni el tratamiento con STZ ni con MitoGamida afectaron a la frecuencia cardíaca en los ratones, tal como se esperaba.

Estudio de los efectos de la MitoG-amida sobre la hiperglucemia en diabetes tipo I

Para evaluar el efecto de MitoGamida sobre los efectos perjudiciales bien conocidos de la hiperglucemia a largo plazo en diabetes tipo I, se midió la función cardíaca mediante MRI y mediante medición de bucle P/V (figura 17). Los ratones que eran ratones C57Bl6/J de 6-7 semanas de edad (> 20 g) recibieron STZ (50 mg/kg por inyección intraperitoneal) en 5 días consecutivos. La muerte de las células beta y la inducción de un nivel alto de glucosa en sangre asociado con la diabetes tipo I se confirmó mediante pruebas semanales de glucosa en sangre en una muestra de sangre de vena de la cola de ratones. Un nivel de glucosa en sangre > 17 mmol/l se consideró diabético. Para los experimentos, los ratones se dividieron en tres grupos: (a) control; (b) diabetes tipo I inducida por STZ; y (c) animales con diabetes tipo I inducida por STZ tratados con MitoG-amida (10 mg/kg de peso corporal una vez al día por sonda). Al final del protocolo, los ratones se sometieron a una medición por toma de imágenes de resonancia magnética (MRI) cardíaca seguida de una medición de presión/volumen (P/V) basada en el catéter ventricular izquierdo (tal como se ha descrito anteriormente).

La fracción de eyección sistólica y el volumen diastólico final se midieron por MRI según los procedimientos proporcionados en "Functional assessment of the mouse heart by MRI with a 1-min acquisition", Buonincontri, G.; Methner, C.; Krieg, T.; Carpenter, TA y Sawiak, SJ; NMR Biomed (2014), Vol. 27; páginas 733-7.

La constante de tiempo diastólico ventricular izquierdo (Tau Weiss) y la presión diastólica final se midieron a partir del sistema de bucle P/V utilizando un Transonic ADV500 con el programa informático LifeScribe2 correspondiente.

La rigidez diastólica se midió a partir de los bucles P/V corregidos por MRI.

A partir de esto, se descubrió que ni STZ ni MitoGamida tenían ningún efecto sobre la fracción de eyección sistólica. Tal como se esperaba, el tratamiento con STZ disminuyó el volumen diastólico final y la constante del tiempo diastólico ventricular izquierdo (Tau Weiss), pero estos no mejoraron con MitoGamida (figura 18). Sin embargo, el aumento esperado de la rigidez diastólica y la presión diastólica final en los ratones diabéticos se previno mediante MitoGamida (figura 18), lo que indica un efecto protector del compuesto. Las medidas de volumen de MRI se utilizaron como corrección para el bucle P/V. La rigidez diastólica corregida por MRI se obtiene ajustando una exponencial a la fase de llenado, que representa la curva de cumplimiento de una forma dependiente del volumen y la presión. La unidad es 1/ μ l. Las mediciones de rigidez diastólica son el parámetro más sensible para indicar daño miocárdico temprano inducido por la diabetes y es representativo de los cambios observados en pacientes con diabetes.

Finalmente, al final del análisis, los corazones se extirparon y se fijaron con formalina y se procesaron para histología y después se cortaron en rodajas de 10 μ m y se embebieron a la temperatura óptima de corte (OCT). Para evaluar el daño oxidativo al tejido, se utilizó un anticuerpo contra 4-hidroxiacetilcolina, un marcador de daño oxidativo (anticuerpo ab48506 HNE-J-2, 1:5 en tampón de bloqueo; que puede obtenerse de Abcam plc). Estos experimentos se realizaron tal como se describe por Kaludercic, N.; et al. (2014) "Monoamine oxidase B prompts mitochondrial and cardiac dysfunction in pressure overloaded hearts" Antioxidants & Redox Signaling, vol. 20, páginas 267-80, con la excepción de que se utilizó el segundo AB de cabra antirratón (Invitrogen F2761 disponible de Thermo Fischer Scientific Inc.) + fluoresceína (sondas moleculares, que pueden obtenerse de Sigma-Aldrich) y 10 μ M de tinción Hoechst 33342 (Sigma B2261, que puede obtenerse de Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente como la solución de anticuerpo secundario.

El grado de tinción se cuantificó y los datos se presentan en la figura 19. Estos datos indican que MitoGamida disminuyó el daño oxidativo en corazones que padecen complicaciones diabéticas.

Conclusiones

Se ha propuesto que la interrupción de la función mitocondrial desempeña un papel en las patologías asociadas con la hiperglucemia. Una ruta plausible por la cual esta puede producirse es a través de reacciones de glicación dañinas para los componentes mitocondriales por los reactivos 1,2-dicarbonilos metilgloxal y gloxal. Sin embargo, la importancia de esta ruta fue difícil de evaluar en células e *in vivo* debido a las incertidumbres sobre los niveles de metilgloxal y gloxal que se producen dentro de las mitocondrias durante la hiperglucemia. Para aliviar estos problemas, se ha desarrollado un enfoque de espectrometría de masas para medir los cambios en los niveles de estos 1,2-dicarbonilos reactivos dentro de las mitocondrias en células e *in vivo*.

En particular, se ha encontrado que la combinación de una *o*-fenilendiamina con un resto TPP condujo a una molécula que se acumuló dentro de las mitocondrias donde reaccionó con metilgloxal y gloxal para formar productos estables. Estos productos podrían extraerse de células y fluidos biológicos y analizarse por CL/EM/EM con respecto a patrones internos de isótopos estables. La selectividad de esta evaluación para metilgloxal y gloxal se basó en la identificación de los productos por espectrometría de masas en tándem, y esto se demostró adicionalmente mediante los cambios en sus niveles de inhibición farmacológica del sistema de glicoxalasa y por la adición de la trampa de dicarbonilo aminoguanidina. La capacidad del resto TPP para localizar compuestos en las mitocondrias en células e *in vivo* está bien establecida, lo que sugiere que la formación de MQE/QE tiene lugar principalmente debido a la reacción con metilgloxal/gloxal dentro de la matriz mitocondrial. Esto está respaldado por la inhibición de la formación de MQE/QE mediante la adición del desacoplador FCCP, que disminuye la absorción de MitoG en las mitocondrias. Además, como la reacción entre MitoG y metilgloxal/gloxal es de segundo orden, la concentración de ~1.000 veces de MitoG dentro de las mitocondrias significará que la velocidad de formación de MQE/QE será mayor dentro de las mitocondrias por un factor similar. Por lo tanto, la formación de MQE/QE dentro de una célula o un tejido se debe en gran medida a cambios en la cantidad de metilgloxal/gloxal dentro de las mitocondrias. Sin embargo, otras especies reactivas dentro de sistemas biológicos tales como óxido nítrico o aldehídos reactivos tales como 4-hidroxinonenal también pueden reaccionar con, y agotar, MitoG, aunque estas reacciones no producirán los productos de diagnóstico formados a partir de la reacción con gloxal/metilgloxal. Además, si bien este enfoque informará sobre la exposición mitocondrial de dicarbonilo, no indica la fuente celular del metilgloxal/gloxal, y puede producirse en gran medida en el citosol con la posterior difusión a las mitocondrias.

La capacidad de utilizar MitoG en ratones vivos para generar MQE/QE como exomarcadores para evaluar los cambios en los dicarbonilos que tuvieron lugar dentro de un modelo de diabetes tipo I fue un paso importante. Por lo tanto, este enfoque será útil para evaluar el papel de los dicarbonilos reactivos en el daño mitocondrial asociado con la diabetes y en el desarrollo de tratamientos específicos.

Los hallazgos de las figuras 9 y 10 muestran que la formación de MQE y QE a partir de MitoG aumentó drásticamente en condiciones de hiperglucemia tanto en células como *in vivo*, lo que indica que se produce un gran aumento en la cantidad de metilgloxal/gloxal en las mitocondrias en estas condiciones. Esto es coherente con la glicación mitocondrial debida a la acumulación de metilgloxal/gloxal en la matriz que contribuye a la alteración mitocondrial observada en hiperglucemia. Para concluir, se ha desarrollado un nuevo enfoque de espectrometría de masas dirigido a mitocondrias para evaluar niveles de dicarbonilos reactivos dentro de las mitocondrias en células e *in vivo*. Esto será útil para evaluar la contribución de estas especies dañinas a la disfunción mitocondrial en diabetes y envejecimiento. Además, se han desarrollado compuestos que reaccionan con metilgloxal/gloxal dentro de las mitocondrias en células e *in vivo* y así actúan como captadores para metilgloxal/gloxal.

Los resultados mostrados en la figura 18 para la rigidez diastólica y la presión diastólica final en los ratones diabéticos indicaron que MitoGamida proporcionó un efecto protector. Además, los resultados mostrados en la figura 19 indicaron que MitoGamida disminuyó el daño oxidativo en corazones que padece complicaciones diabéticas.

Referencias

- [1] Brownlee, M. Negative consequences of glycation. *Metabolism-Clin. Experiment.* 49:9-13; 2000.
- [2] Thornalley, P. J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug Metabol. Drug Interact.* 23:125-150; 2008.
- [3] Pun, P. B.; Murphy, M. P. Pathological significance of mitochondrial glycation. *Int. J. Cell Biol.* 2012:843505; 2012.
- [4] Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813-820; 2001.
- [5] Rabbani, N.; Thornalley, P. J. Glyoxalase in diabetes, obesity and related disorders. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22:309-317; 2011.
- [6] Phillips, S. A.; Thornalley, P. J. The Formation of methylglyoxal from triose phosphates - investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur. J. Biochem.* 212:101-105; 1993.
- [7] Casazza, J. P.; Felver, M. E.; Veech, R. L. The metabolism of acetone in rat. *J. Biol. Chem.* 259:231-236; 1984.

- [8] Lo, T. W. C.; Westwood, M. E.; McLellan, A. C.; Selwood, T.; Thornalley, P. J. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions - a kinetic and mechanistic study with N-alpha-acetylarginine, N-alpha-acetylcysteine, and N-alpha-acetyllysine, and bovine serum-albumin. *J. Biol. Chem.* 269:32299-32305; 1994.
- 5 [9] Chaplen, F. W.; Fahl, W. E.; Cameron, D. C. Evidence of high levels of methylglyoxal in cultured Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5533-5538; 1998.
- [10] Thornalley, P. J.; Battah, S.; Ahmed, N.; Karachalias, N.; Agalou, S.; Babaei-Jadidi, R.; Dawnay, A. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem. J.* 375:581-592; 2003.
- 10 [11] Thornalley, P. J.; Waris, S.; Fleming, T.; Santarius, T.; Larkin, S. J.; Winklhofer-Roob, B. M.; Stratton, M. R.; Rabbani, N. Imidazopurinones are markers of physiological genomic damage linked to DNA instability and glyoxalase 1-associated tumour multidrug resistance. *Nucl. Acids Res.* 38:5432-5442; 2010.
- [12] Kingkeohoi, S.; Chaplen, F. W. R. Analysis of methylglyoxal metabolism in CHO cells grown in culture. *Cytotechnology* 48:1-13; 2005.
- 15 [13] Dhar, A.; Desai, K.; Liu, J. H.; Wu, L. Y. Methylglyoxal, protein binding and biological samples: Are we getting the true measure? *J. Chromatog. B* 877:1093-1100; 2009.
- [14] Thornalley, P. J. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem. J.* 269:1-11; 1990.
- 20 [15] Morcos, M.; Du, X.; Pfisterer, F.; Hutter, H.; Sayed, A. A.; Thornalley, P.; Ahmed, N.; Baynes, J.; Thorpe, S.; Kukudov, G.; Schlotterer, A.; Bozorgmehr, F.; El Baki, R. A.; Stern, D.; Moehrlen, F.; Ibrahim, Y.; Oikonomou, D.; Hamann, A.; Becker, C.; Zeier, M.; Schwenger, V.; Miftari, N.; Humpert, P.; Hammes, H. P.; Buechler, M.; Bierhaus, A.; Brownlee, M.; Nawroth, P. P. Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 7:260-269; 2008.
- [16] Green, K.; Brand, M. D.; Murphy, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 1:S110-118; 2004.
- 25 [17] Yoon, Y.; Galloway, C. A.; Jhun, B. S.; Yu, T. Mitochondrial dynamics in diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* 14:439-457; 2011.
- [18] Newsholme, P.; Gaudel, C.; Krause, M. Mitochondria and diabetes. An intriguing pathogenetic role. *Adv. Exp. Med. Biol.* 942:235-247; 2012.
- 30 [19] Baynes, J. W.; Thorpe, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications - A new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48:1-9; 1999.
- [20] Rosca, M. G.; Mustata, T. G.; Kinter, M. T.; Ozdemir, A. M.; Kern, T. S.; Szweda, L. I.; Brownlee, M.; Monnier, V. M.; Weiss, M. F. Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. *Amer. J. Physiol.* 289:F420-F430; 2005.
- 35 [21] Ceriello, A.; Ilnat, M. A.; Thorpe, J. E. The "metabolic memory": is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94:410-415; 2009.
- [22] Ray, S.; Dutta, S.; Halder, J.; Ray, M. Inhibition of electron flow-through complex I of the mitochondrial respiratory-chain of Ehrlich ascites-carcinoma cells by methylglyoxal. *Biochem. J.* 303:69-72; 1994.
- [23] Biswas, S.; Ray, M.; Misra, S.; Dutta, D. P.; Ray, S. Selective inhibition of mitochondrial respiration and glycolysis in human leukaemic leucocytes by methylglyoxal. *Biochem. J.* 323 (Pt 2):343-348; 1997.
- 40 [24] Rosca, M. G.; Monnier, V. M.; Szweda, L. I.; Weiss, M. F. Alterations in renal mitochondrial respiration in response to the reactive oxoaldehyde methylglyoxal. *Am. J. Physiol.* 283:F52-59; 2002.
- [25] Murphy, M. P. Development of lipophilic cations as therapies for disorders due to mitochondrial dysfunction. *Expert Opin. Biol. Ther.* 1:753-764; 2001.
- 45 [26] Smith, R. A.; Hartley, R. C.; Cocheme, H. M.; Murphy, M. P. Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 33:341-352; 2012.
- [27] Smith, R. A. J.; Porteous, C. M.; Gane, A. M.; Murphy, M. P. Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:5407-5412; 2003.
- [28] Chaplen, F. W.; Fahl, W. E.; Cameron, D. C. Method for determination of free intracellular and extracellular methylglyoxal in animal cells grown in culture. *Anal. Biochem.* 238:171-178; 1996.

- [29] Yamaguchi, M.; Hara, S.; Nakamura, M. Determination of methylglyoxal in mouse blood by liquid chromatography with fluorescence detection *Anal. Chim. Acta* 221:163-166; 1989.
- 5 [30] Cochemé, H. M.; Logan, A.; Prime, T. A.; Abakumova, I.; Quin, C.; McQuaker, S. J.; Patel, J. V.; Fearnley, I. M.; James, A. M.; Porteous, C. M.; Smith, R. A. J.; Hartley, R. C.; Partridge, L.; Murphy, M. P. Using the mitochondria-targeted ratiometric mass spectrometry probe MitoB to measure H₂O₂ in living *Drosophila*. *Nat. Protocols* 7:946-958; 2012.
- 10 [31] Cochemé, H. M.; Quin, C.; McQuaker, S. J.; Cabreiro, F.; Logan, A.; Prime, T. A.; Abakumova, I.; Patel, J. V.; Fearnley, I. M.; James, A. M.; Porteous, C. M.; Smith, R. A. J.; Saeed, S.; Carre, J. E.; Singer, M.; Gems, D.; Hartley, R. C.; Partridge, L.; Murphy, M. P. Measurement of H₂O₂ within living *Drosophila* during aging using a ratiometric mass spectrometry probe targeted to the mitochondrial matrix. *Cell Metab.* 13:340-350; 2011.
- [32] Carrigan, C. N.; Bartlett, R. D.; Esslinger, C. S.; Cybulski, K. A.; Tongcharoensirikul, P.; Bridges, R. J.; Thompson, C. M. Synthesis and in vitro pharmacology of substituted quinoline-2,4-dicarboxylic acids as inhibitors of vesicular glutamate transport. *J. Med. Chem.* 45:2260-2276; 2002.
- [33] Fanta, P. E.; Tarbell, D. S. 2-Nitro-4-methoxyaniline. *Organic Synth.* 25:78-80; 1945.
- 15 [34] Barton, J. K.; Shao, F.; Elias, B.; Lu, W. Synthesis and characterization of iridium(III) cyclometalated complexes with oligonucleotides: insights into redox reactions with DNA. *Inorg. Chem.* 46:10187-10199; 2007.
- [35] Thornalley, P. J.; Edwards, L. G.; Kang, Y.; Wyatt, C.; Davies, N.; Ladan, M. J.; Double, J. Antitumour activity of S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in vitro and in vivo. Inhibition of glyoxalase I and induction of apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 51:1365-1372; 1996.
- 20 [36] Twibanire, J. D.; Grindley, T. B. Efficient and controllably selective preparation of esters using uronium-based coupling agents. *Org. Lett.* 13:2988-2991; 2011.
- [37] Kelso, G. F.; Porteous, C. M.; Coulter, C. V.; Hughes, G.; Porteous, W. K.; Ledgerwood, E. C.; Smith, R. A. J.; Murphy, M. P. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells - Antioxidant and antiapoptotic properties. *J. Biol. Chem.* 276:4588-4596; 2001.
- 25 [38] Asin-Cayuela, J.; Manas, A. R.; James, A. M.; Smith, R. A.; Murphy, M. P. Fine-tuning the hydrophobicity of a mitochondria-targeted antioxidant. *FEBS Lett.* 571:9-16; 2004.
- [39] Choi, S. W.; Gerencser, A. A.; Nicholls, D. G. Bioenergetic analysis of isolated cerebrocortical nerve terminals on a microgram scale: spare respiratory capacity and stochastic mitochondrial failure. *J. Neurochem.* 109:1179-1191; 2009.
- 30 [40] Dranka, B. P.; Benavides, G. A.; Diers, A. R.; Giordano, S.; Zelickson, B. R.; Reily, C.; Zou, L.; Chatham, J. C.; Hill, B. G.; Zhang, J.; Landar, A.; Darley-Usmar, V. M. Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radic. Biol. Med.* 51:1621-1635; 2011.
- [41] Hill, B. G.; Benavides, G. A.; Lancaster, J. R., Jr.; Ballinger, S.; Dell'Italia, L.; Jianhua, Z.; Darley-Usmar, V. M. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biol. Chem.* 393:1485-1512; 2012.
- 35 [42] Brand, M. D.; Nicholls, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* 435:297-312; 2011.
- [43] Yoshioka, M.; Kayo, T.; Ikeda, T.; Koizumi, A. A novel locus, *Mody4*, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes* 46:887-894; 1997.
- 40 [44] Izumi, T.; Yokota-Hashimoto, H.; Zhao, S.; Wang, J.; Halban, P. A.; Takeuchi, T. Dominant negative pathogenesis by mutant proinsulin in the Akita diabetic mouse. *Diabetes* 52:409-416; 2003.
- [45] Chacko, B. K.; Reily, C.; Srivastava, A.; Johnson, M. S.; Ye, Y.; Ulasova, E.; Agarwal, A.; Zinn, K. R.; Murphy, M. P.; Kalyanaraman, B.; Darley-Usmar, V. Prevention of diabetic nephropathy in *Ins2(+)(Akita)* mice by the mitochondria-targeted therapy MitoQ. *Biochem. J.* 432:9-19; 2010.
- 45 [46] Murata-Kamiya, N.; Kamiya, H. Methylglyoxal, an endogenous aldehyde, crosslinks DNA polymerase and the substrate DNA. *Nucl. Acids Res.* 29:3433-3438; 2001.
- [47] Murata-Kamiya, N.; Kamiya, H.; Kaji, H.; Kasai, H. Mutations induced by glyoxal and methylglyoxal in mammalian cells. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 3-4; 2000.
- [48] Pampati, P. K.; Suravajjala, S.; Dain, J. A. Monitoring nonenzymatic glycation of human immunoglobulin G by methylglyoxal and glyoxal: A spectroscopic study. *Anal. Biochem.* 408:59-63; 2011.

- [49] Fedoronko, M.; Konigstein, J.; Linek, K. Determination of dl-glyceraldehyde, dihydroxyacetone and methylglyoxal in a mixture. *J. Electroanalytical Chem. Interfacial Electrochem.* 14:357-367; 1967.
- 5 [50] Chouchani, E. T.; Methner, C.; Nadtochiy, S. M.; Logan, A.; Pell, V. R.; Ding, S.; James, A. M.; Cochemé, H. M.; Reinhold, J.; Lilley, K. S.; Partridge, L.; Fearnley, I.M.; Robinson, A. J.; Hartley, R. C.; Smith, R. A. J.; Krieg, T.; Brookes, P.S.; Murphy, M.P. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nat. Med.* 19: 753-759; 2013.
- 10 [51] Logan, A.; Cochemé, H. M.; Boon Li Pun, P.; Apostolova, N.; Smith, R. A. J.; Larsen, L.; Larsen, D. S.; James, A. M.; Fearnley, I. M.; Rogatti, S.; Prime, T. A.; Finichiu, P.; Dare, A.; Chouchani, E. T.; Pell, V. R.; Methner, C.; Quin, C.; McQuaker, S. J.; Krieg, T.; Hartley, R. C.; Murphy, M. P. Using exomarkers to assess mitochondrial reactive species in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* In press; 2013.
- [52] Porteous, C. M.; Logan, A.; Evans, C.; Ledgerwood, E. C.; Menon, D. K.; Aigbirhio, F.; Smith, R. A.; Murphy, M. P. Rapid uptake of lipophilic triphenylphosphonium cations by mitochondria in vivo following intravenous injection: implications for mitochondria-specific therapies and probes. *Biochim. Biophys. Acta* 1800:1009-1017; 2010.
- 15 [53] Li, Y.; Zhang, H.; Fawcett, J. P.; Tucker, I. G. Effect of cyclosporin A on the pharmacokinetics of mitoquinone (MitoQ10), a mitochondria-targeted antioxidant, in rat. *Asian J. Pharmaceut. Sci.* 5:106-113; 2010.
- [54] Beia, M; Afonso, C. A. M.; Martinho, J. M. G.; Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chem. Soc. Rev.*, 38, 2410-2433, 2009.
- [55] Wu C.H.; Yen G.C.; Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. *JAgric Food Chem.*, 53, 3167-73; 2005.
- 20 [56] Lo C.T.; Li S.; Tan D.; Pan M.H.; Ho C.T.; Trapping reactions of reactive carbonyl species with tea polyphenols in simulated physiological conditions. *Mol Nutr Food Res.*, 50, 1118-28; 2006.
- [57] Tan D.; Wang Y.; Lo C.Y.; Ho C.T.; Methylglyoxal: its presence and potential scavengers.
- [58] Brill, A.S.; Weinryb, I.; Reactions of horseradish peroxidase with azide. Evidence for a methionine residue at the active site. *Biochemistry*, 6, 3528-3535; 1967.
- 25 [59] Ortiz de Montellano, P.R.; David, S.K.; Ator, M.A.; Tew, D.; Mechanism-based inactivation of orseradish-peroxidase by sodium azide - Formation of meso-azidoporphyrin-IX; *Biochemistry*, 27, 5470-5476; 1988.
- [60] Thornalley, P.J.; Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems - Role in ageing and disease. *Drug Metabol Drug Interact*, 23, 125-150; 2008.
- 30 [61] Lo, T. W.; Westwood, M. E.; McLellan, A. C.; Selwood, T.; Thornalley, P. J. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N-alpha-acetylarginine, N-alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. *J. Biol. Chem.* 269:32299-32305; 1994.
- [62] Adachi, K.; Shishido, T.; Hirose, T. Benzotriazole derivatives. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 1977. Japanese Patent JP 52093771 A 19770806.
- [63] Tetraazaannulene cobalt complexes. In: Koho, J. K. T., ed.; 1983.
- 35 [64] Chaplen, F. W.; Fahl, W. E.; Cameron, D. C. Method for determination of free intracellular and extracellular methylglyoxal in animal cells grown in culture. *Anal. Biochem.* 238:171-178; 1996.
- [65] Katre, N. V.; Knauf, M. J.; Laird, W. J.; Chemical Modification of Recombinant Interleukin 2 by Polyethylene Glycol Increases its Potency in the Murine Meth A Sarcoma Model, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84: 1487-1491; 1987.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula 1:

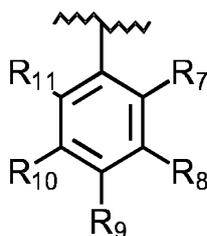
5 A-L-B

Fórmula 1

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

10

A es un resto secuestrante de dicarbonilo, siendo A un grupo arilo sustituido de fórmula 3:



Fórmula 3

15

en la que dos o más de R₇-R₁₁ se seleccionan independientemente de entre -NH₂, -NHR₁, -NR₁R₁, -alquilen C₁₋₆-NH₂, -alquilen C₁₋₆-NHR₁, -O-NH₂, -O-NHR₁, -alquilen C₁₋₆-O-NH₂, -alquilen C₁₋₆-O-NHR₁, -NHCOR₁, -NR'-NHR', -alquilen C₁₋₆-NR'-NHR'; y

20

los grupos R₇-R₁₁ restantes se seleccionan independientemente de entre -H, -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆, -alquino C₂₋₆, -halógeno, -alquilen C₁₋₆-OH, -alquilen C₁₋₆-O-R₁, -CO₂H, -alquilen C₁₋₆-CO₂H, -CO₂R₁, -alquilen C₁₋₆-CO₂R₁, -alquilen C₁₋₆-O-C(O)-R₁, -CH(OH)-C(O)-R₁, -alquilen C₁₋₆-CH(OH)-C(O)-R₁, -CHO, -C(O)-R₁, -C(O)NH₂, -C(O)NHR₁, -SO₂NH₂ y SO₂NHR₁; y

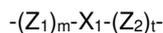
25

cada R₁ se selecciona independientemente de entre -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆ y -alquino C₂₋₆; y

cada R' se selecciona independientemente de entre -H y -alquilo C₁₋₆;

L es un resto enlazador de fórmula 6:

30



Fórmula 6

35

en la que Z₁ y Z₂ se seleccionan independientemente de entre O, NR₁₂, NR₁₂-C(O), C(O)NR₁₂, O-C(O), C(O)-O y S;

R₁₂ se selecciona de entre -H y -alquilo C₁₋₆;

m y t se seleccionan independientemente de entre 0 o 1;

40

X₁ se selecciona de entre alquilen C₁-C₃₀, alquilen C₂-C₃₀, alquino C₂-C₃₀ y cicloalquilen C₃-C₃₀; y

B es un resto de direccionamiento mitocondrial; siendo B un catión trifenilfosfonio.

45

2. Un compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la reivindicación 1, en la que dos o más de R₇-R₁₁ se seleccionan independientemente de entre -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₆), -alquilen C₁₋₆-NH₂ y -alquilen C₁₋₆-NH(alquilo C₁₋₆); y los grupos R₇-R₁₁ restantes se seleccionan independientemente de entre -H, -alquilo C₁₋₆, -alquilen C₁₋₆-OH y -alquilen C₁₋₆-O-alquilo C₁₋₆.

50

3. Un compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que -L- es un resto enlazador de fórmula 7:



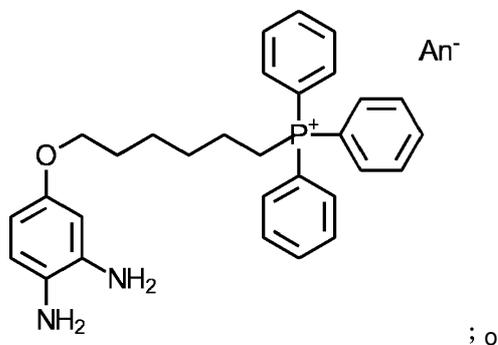
55

Fórmula 7.

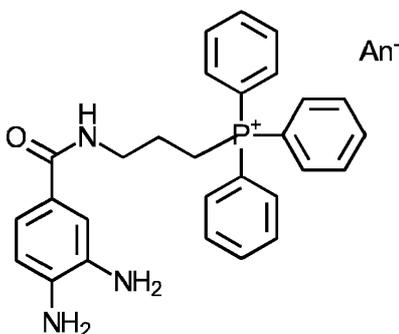
4. Un compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la reivindicación 3, en la que m es 1; Z₁ se selecciona de entre O y C(O)NR₁₂; y el alquileo C₁-C₃₀ se selecciona de un alquileo C₃-C₆.

5. Un compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, siendo el compuesto

(a)



10 (b)



en las que An⁻ representa un anión farmacéuticamente aceptable opcional.

15 6. Una composición farmacéutica que comprende: un compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

20 7. Un compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso como medicamento.

8. Un compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en el tratamiento de diabetes, preferentemente diabetes hiperglucémica.

25 9. Un compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en la conservación de órganos y tejidos para trasplantes quirúrgicos, o en el almacenamiento de sangre.

30 10. Un compuesto de fórmula 1, tal como se ha definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en la prevención o el tratamiento de hiperglucemia.

35 11. Un compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso como una sonda de espectrometría de masas.

12. Un procedimiento para marcar una molécula biológica para detección por espectrometría de masas que comprende poner en contacto dichas moléculas con un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

40 13. Un procedimiento según la reivindicación 12, en el que dicha molécula biológica comprende un grupo dicarbonilo.

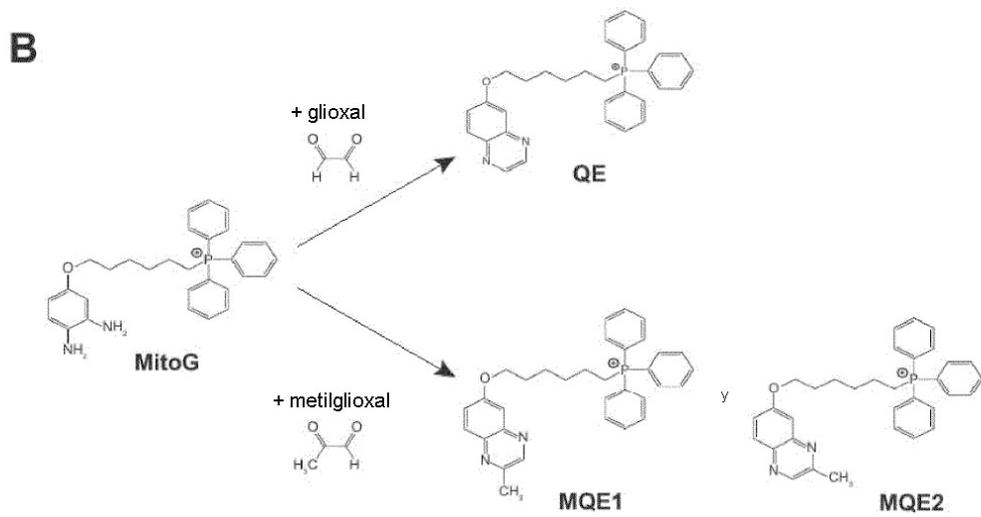
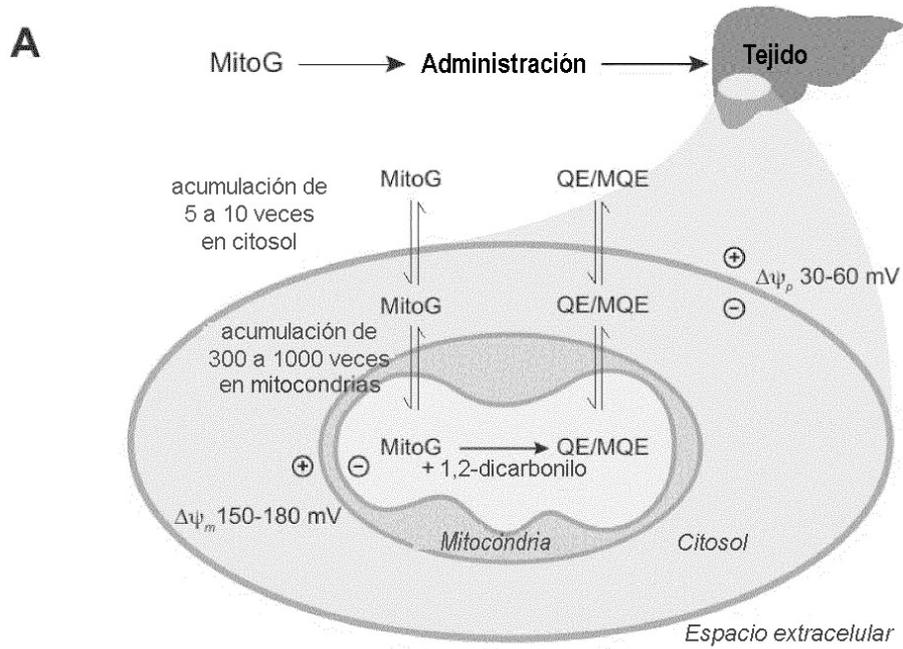


Figura 1

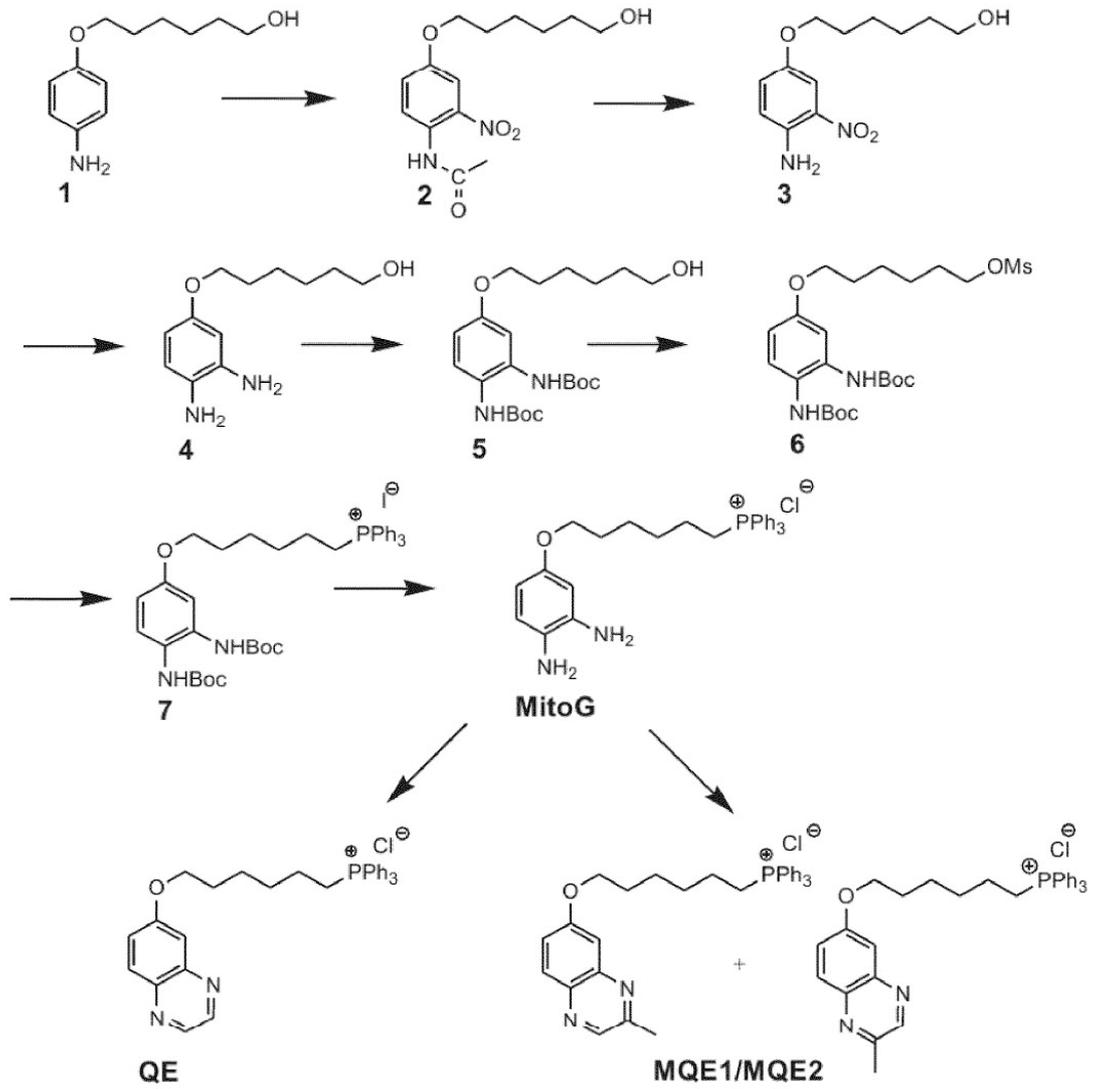


Figura 2

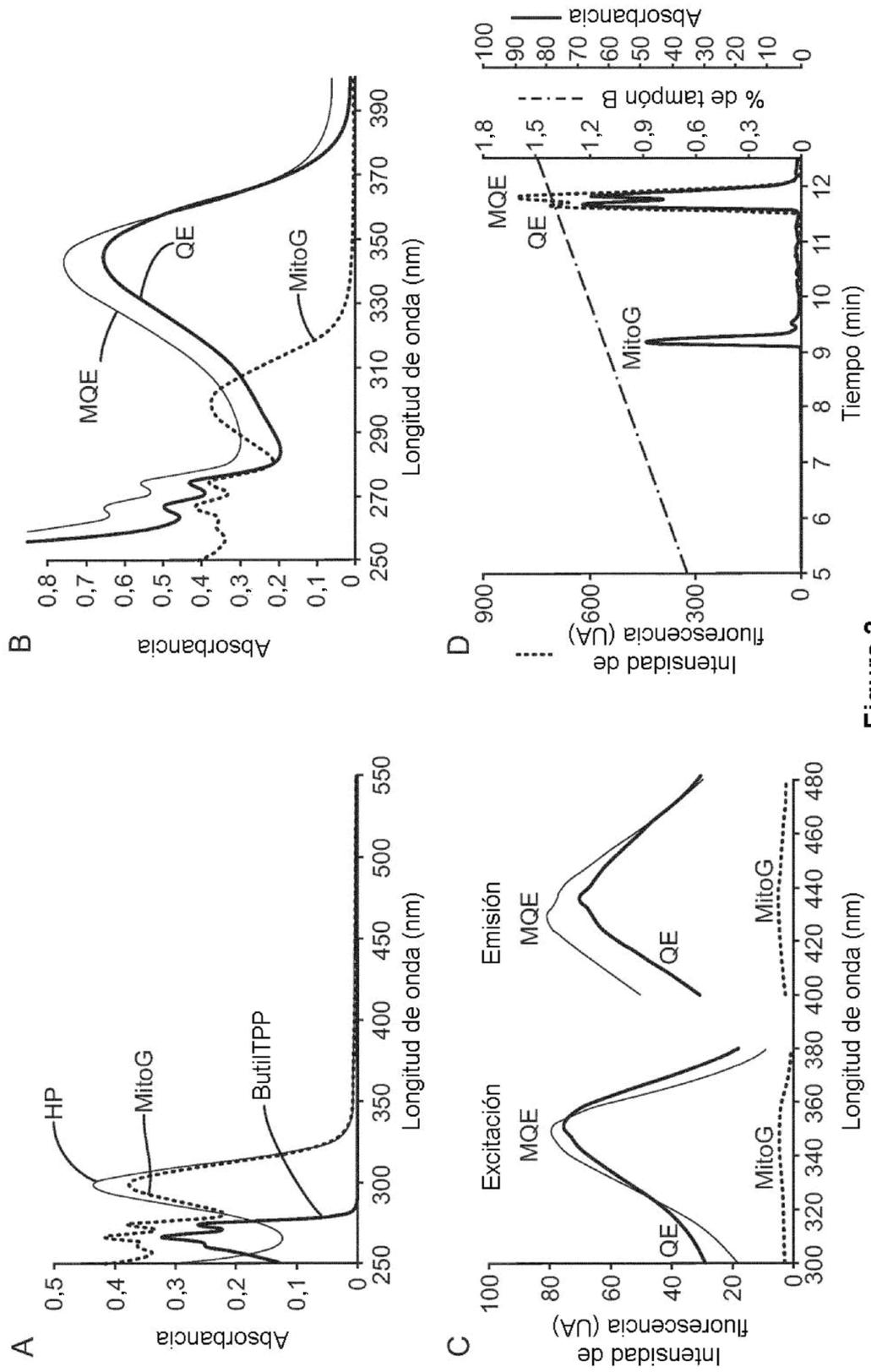


Figura 3

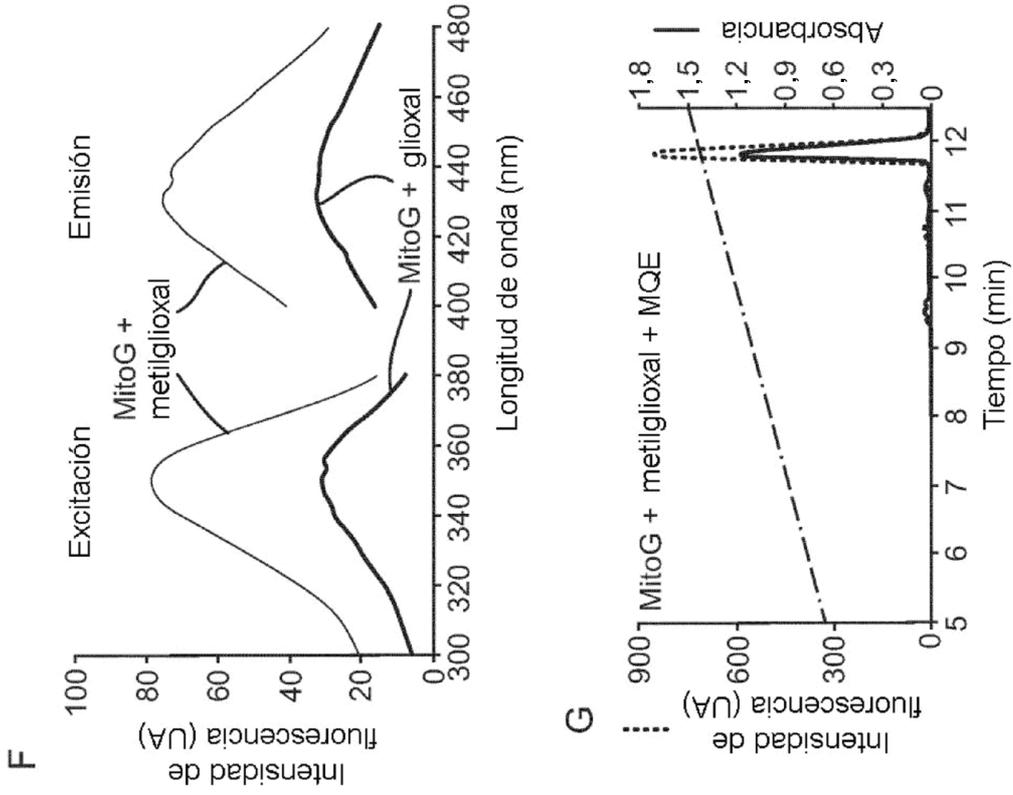


Figura 3 (continuación)

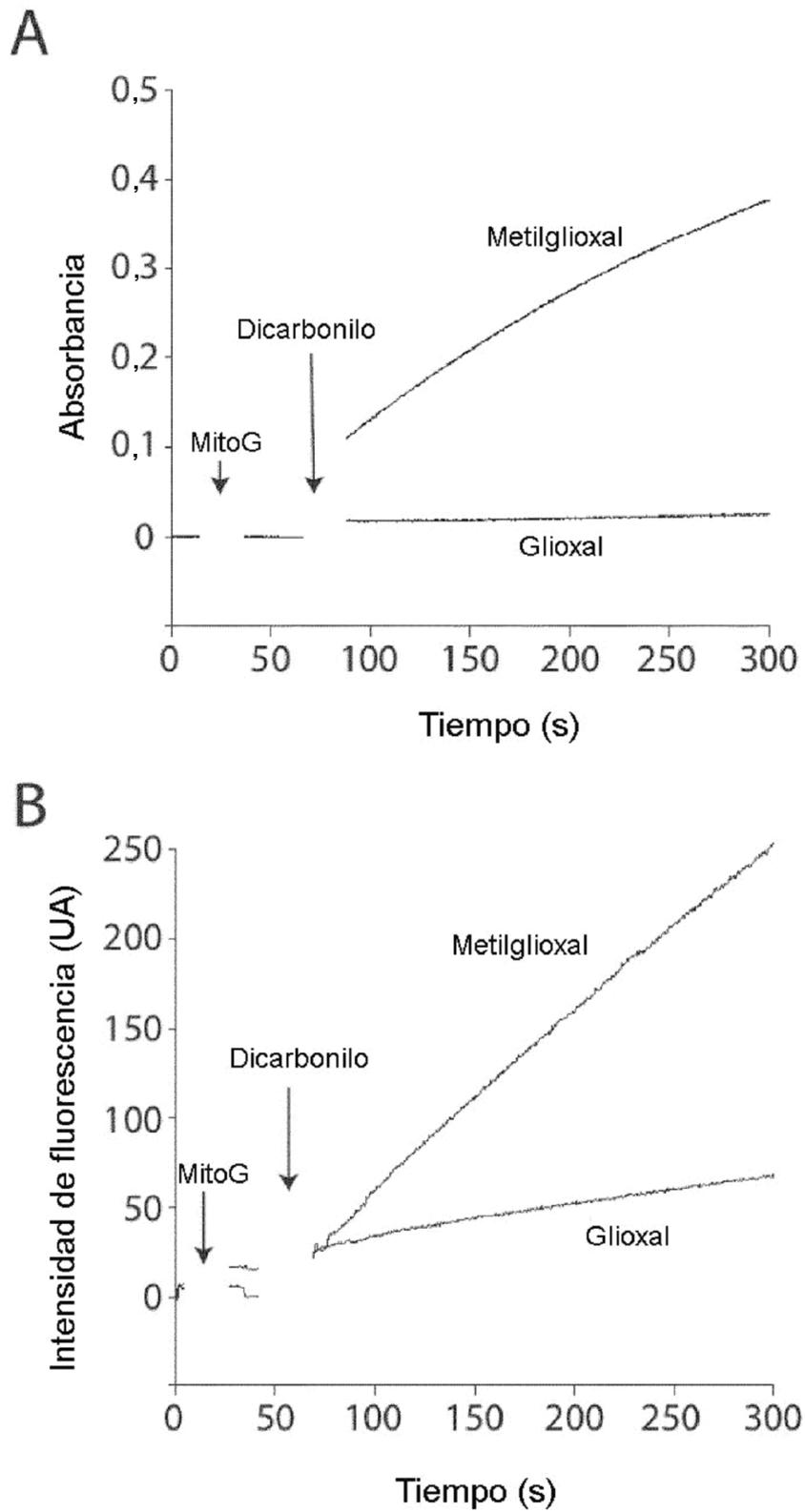


Figura 4

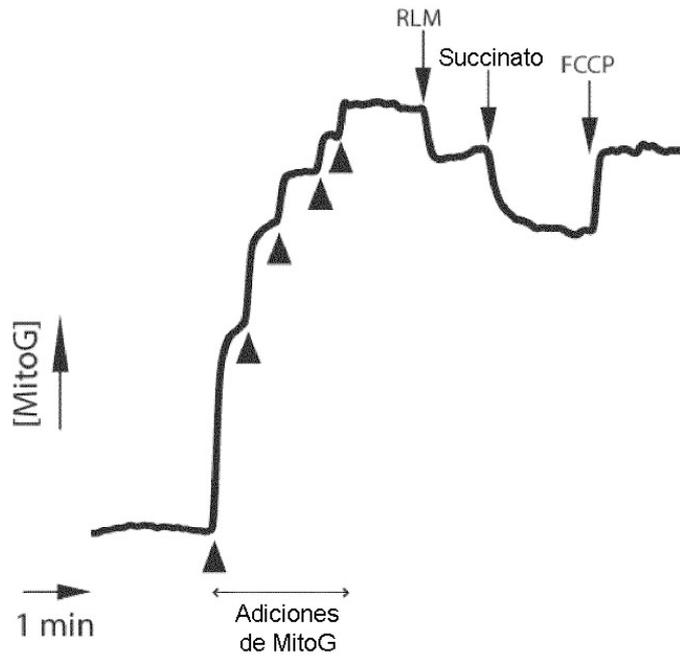


Figura 5

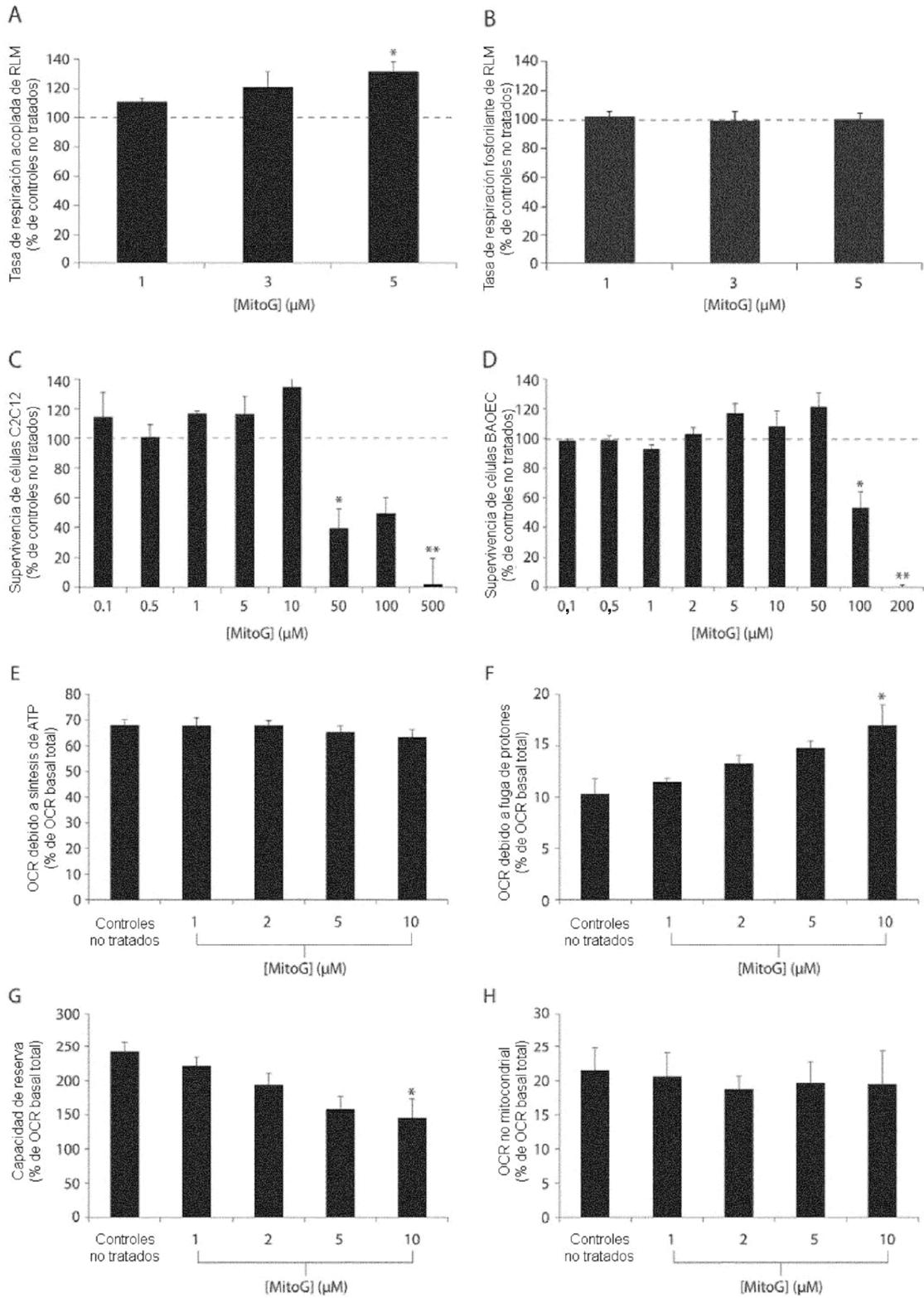


Figura 6

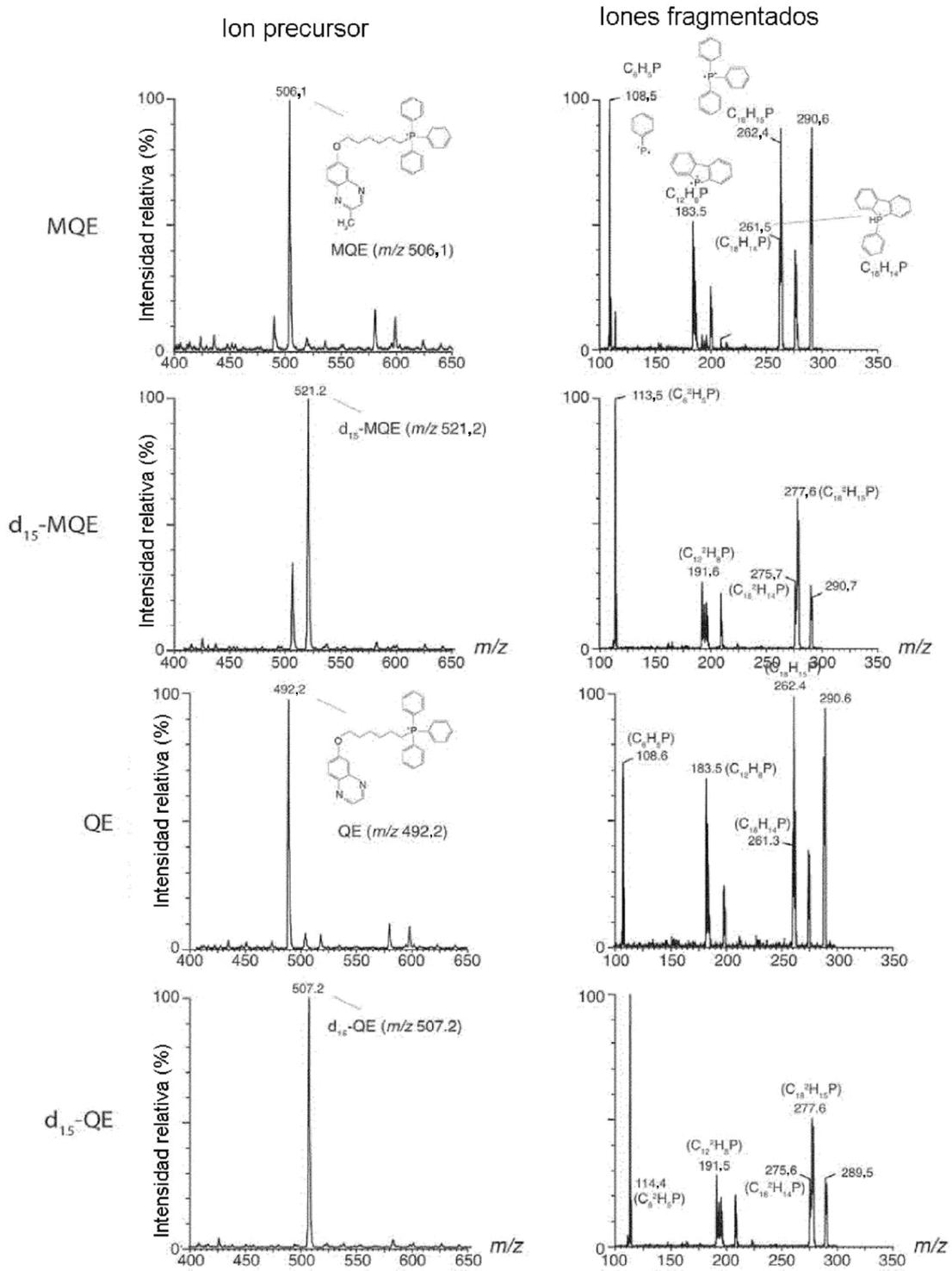


Figura 7

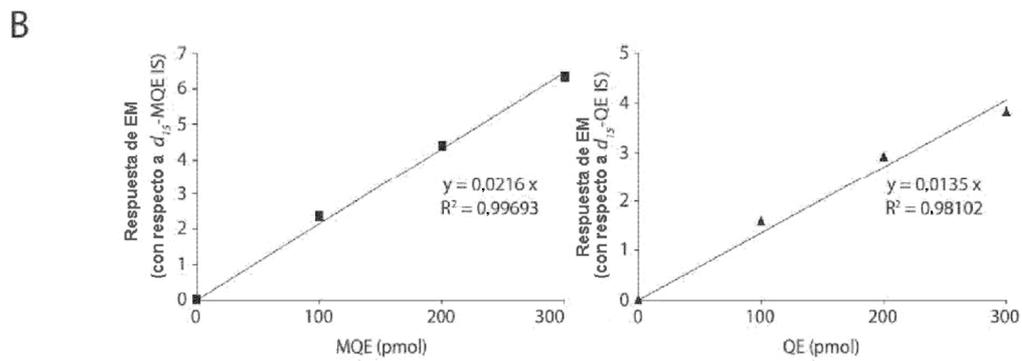
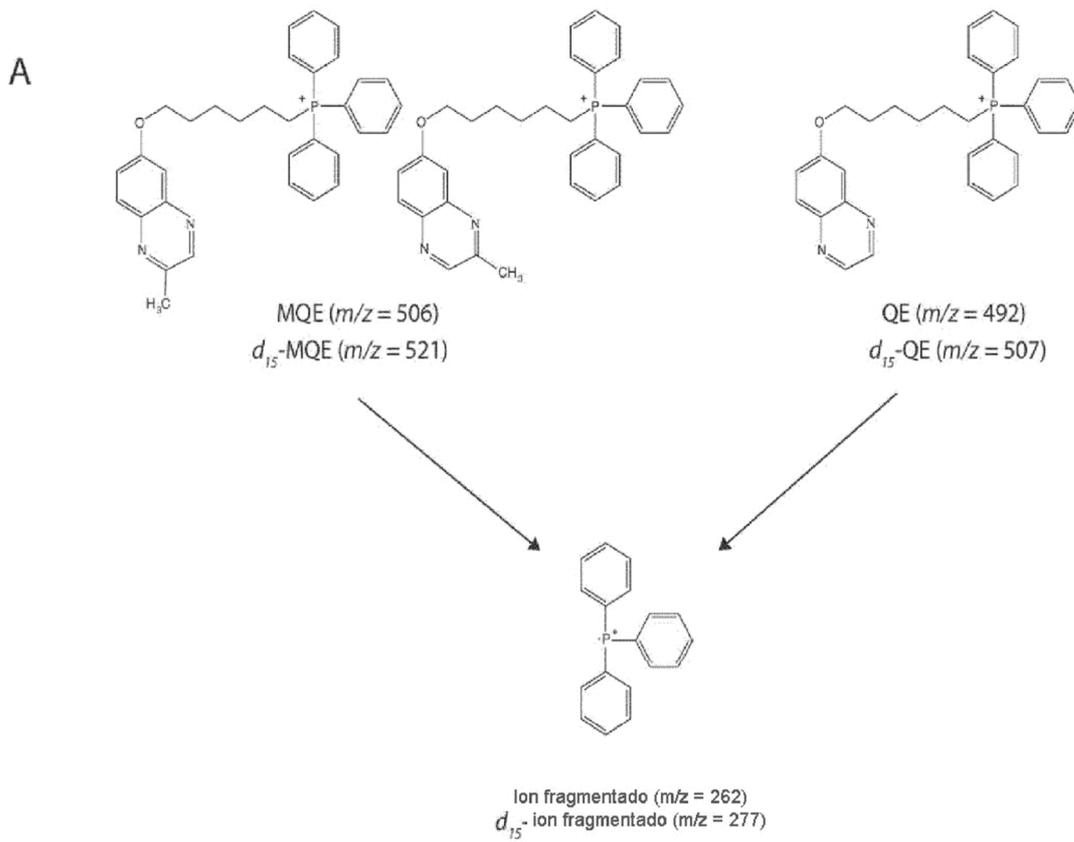


Figura 8

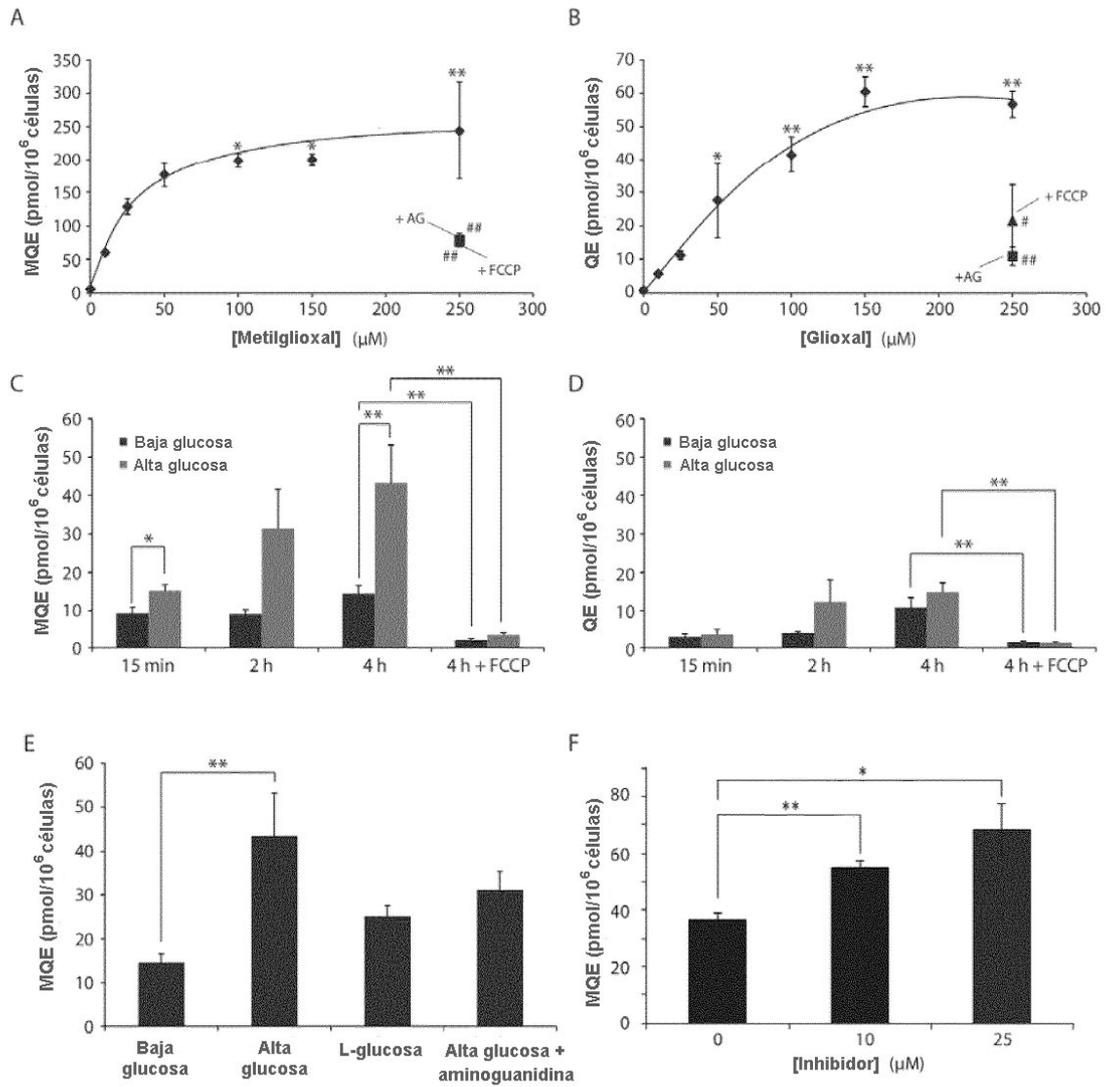


Figura 9

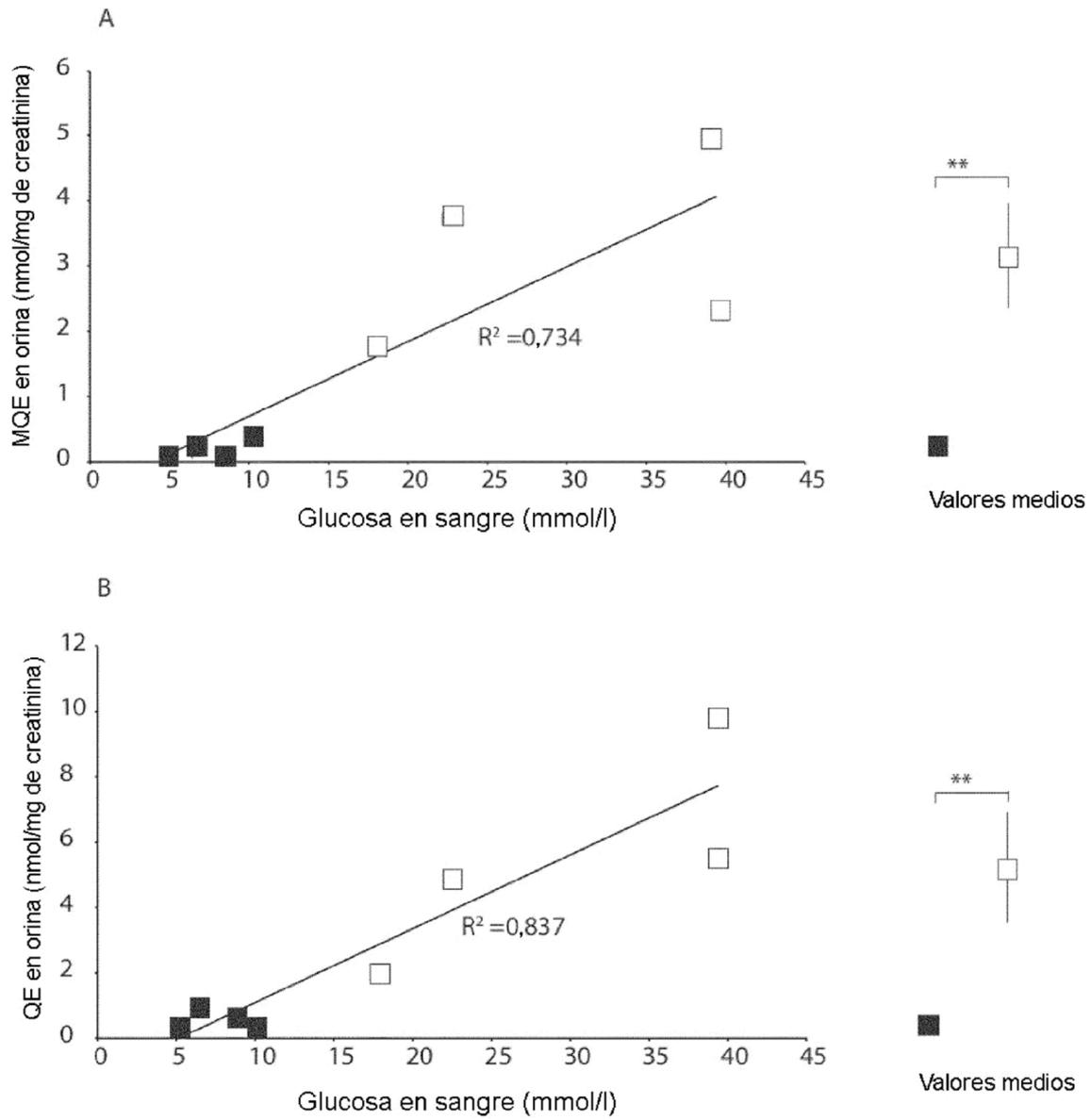


Figura 10

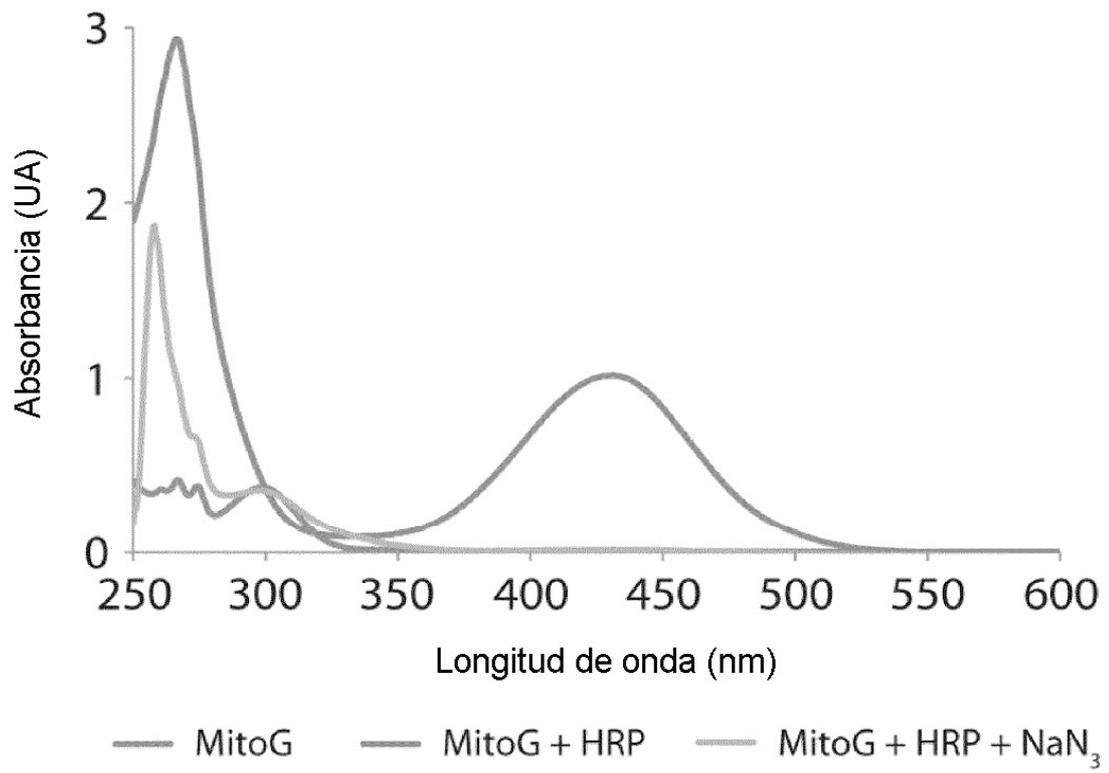


Figura 11

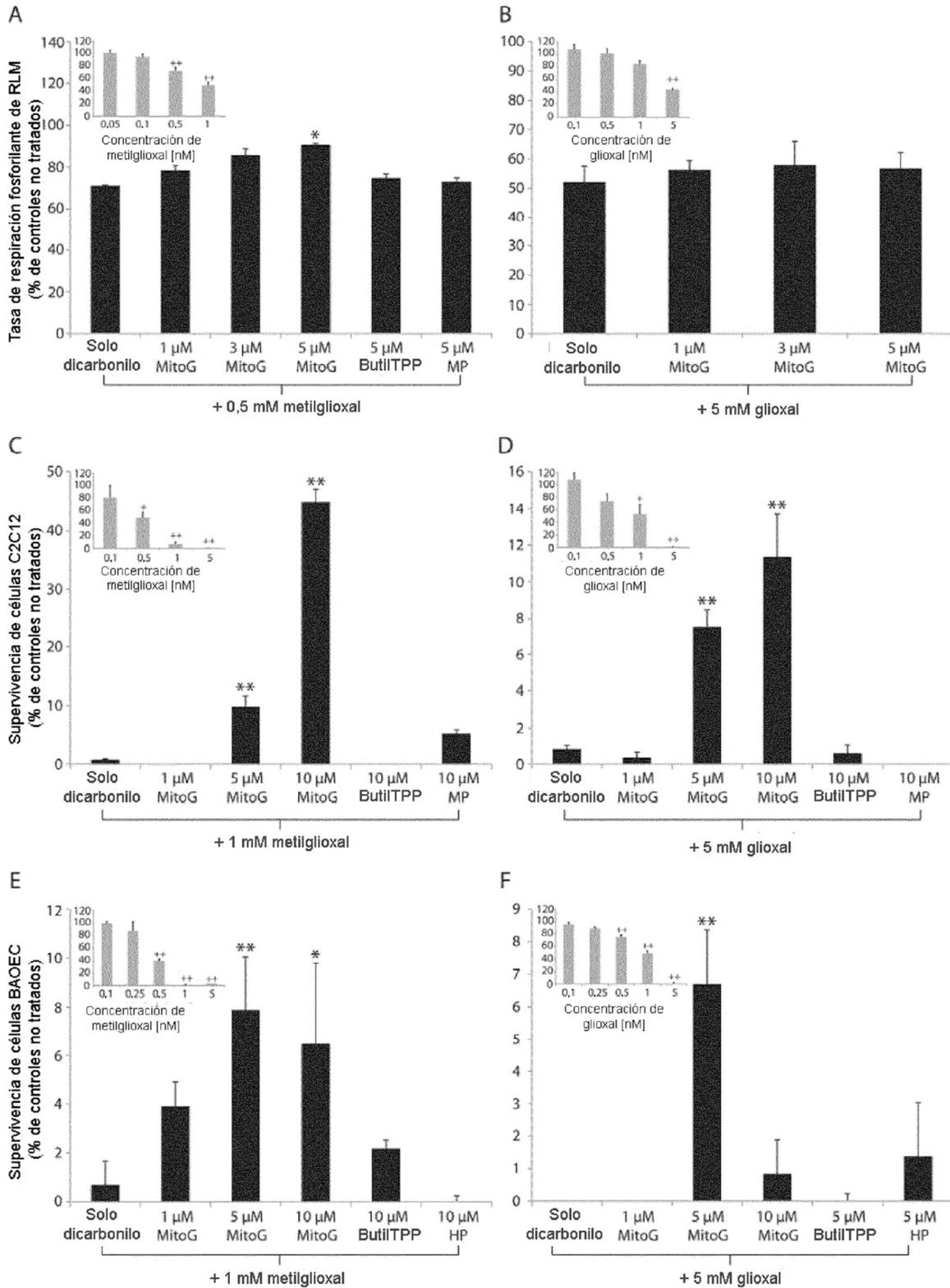


Figura 12

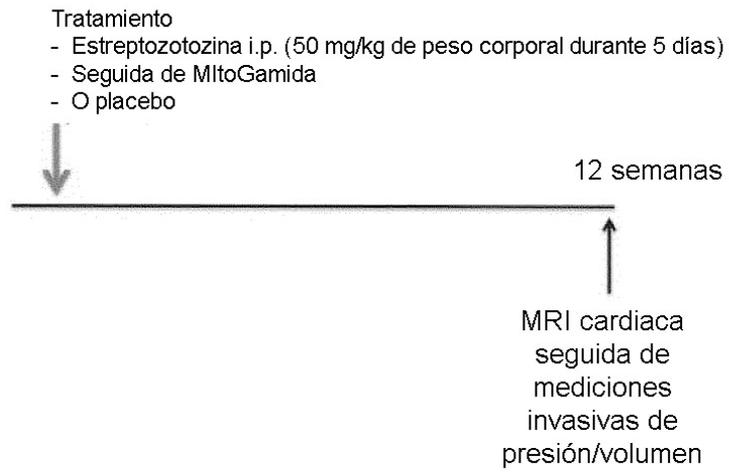


Figura 13



Figura 14

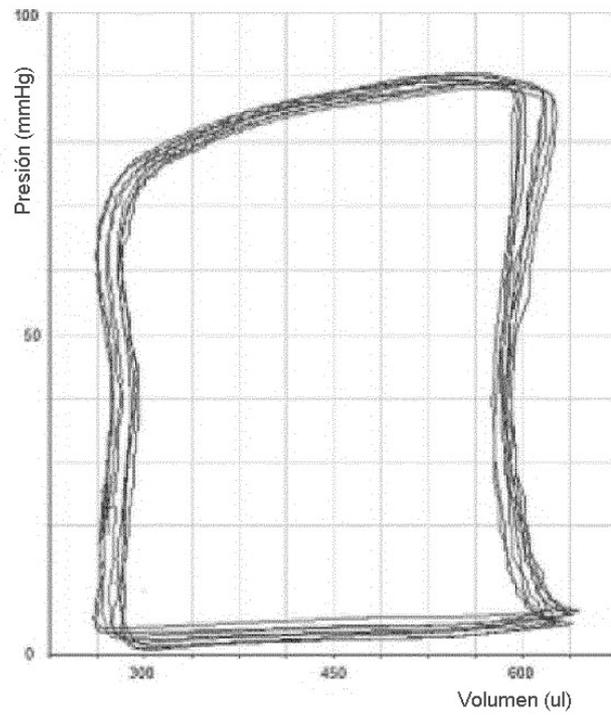


Figura 15

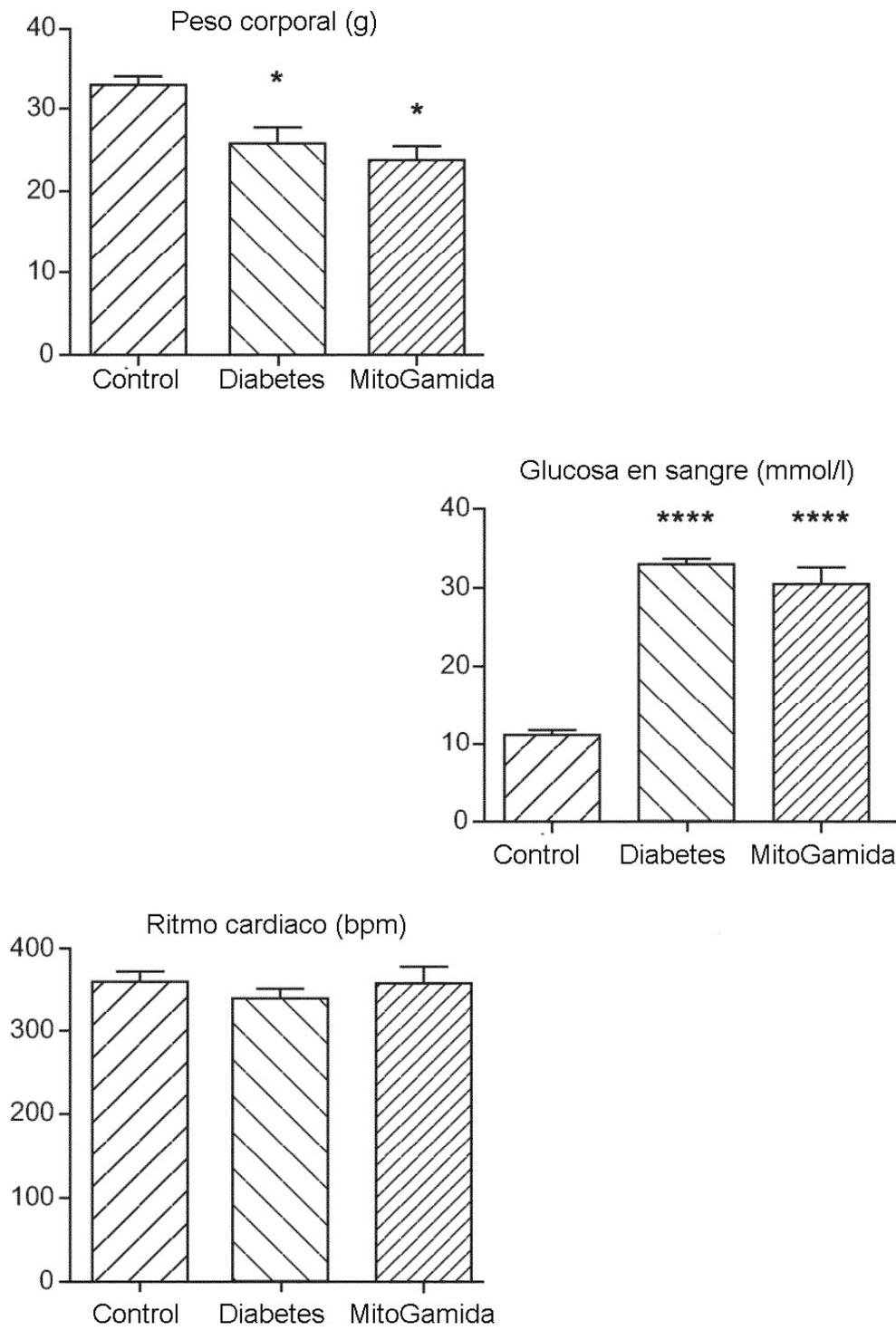


Figura 16

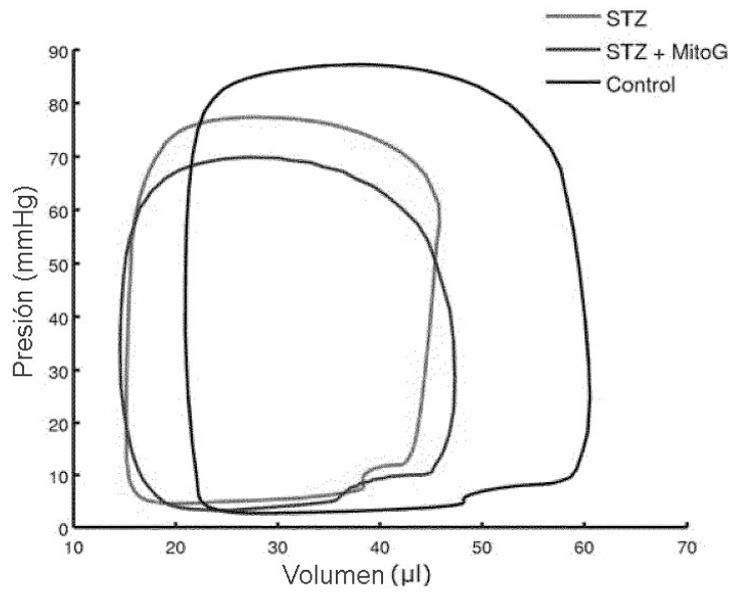


Figura 17

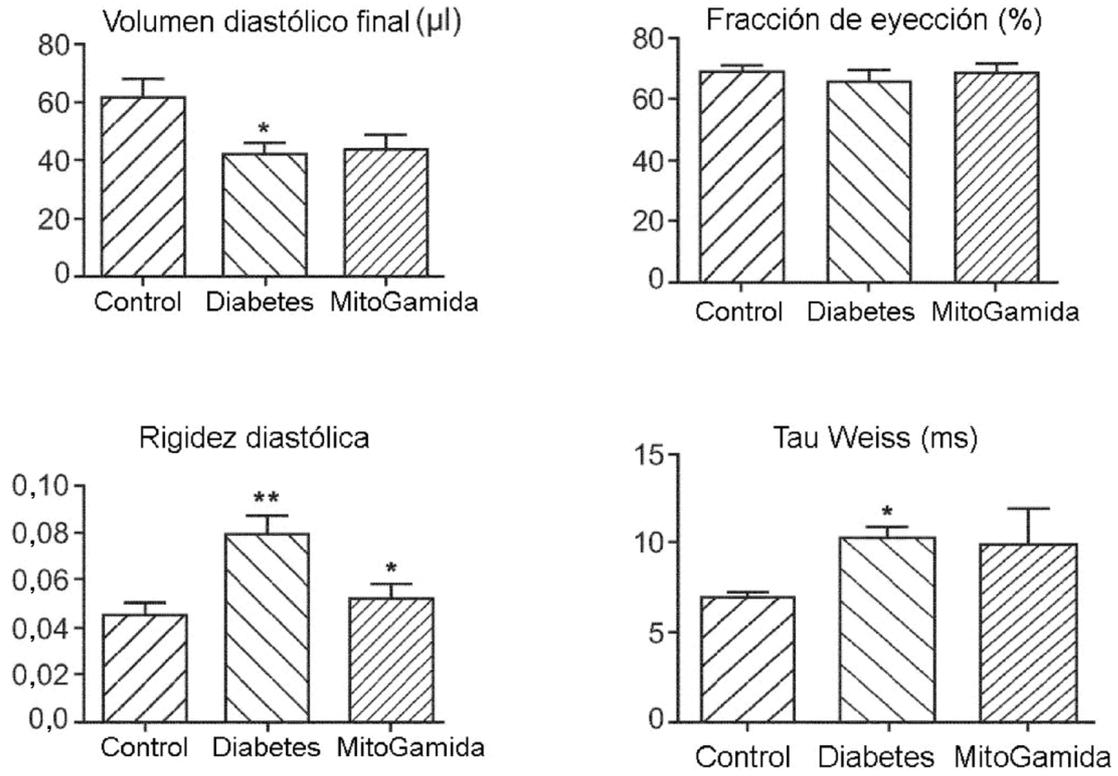


Figura 18

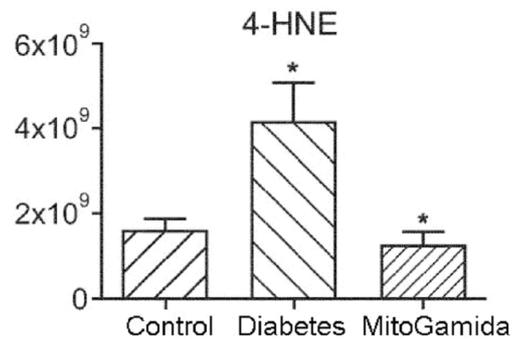


Figura 19