



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 271 247**

51 Int. Cl.:
A61K 31/155 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
C07C 279/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02723339 .4**
86 Fecha de presentación : **27.02.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1377282**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.2004**

54 Título: **Aril-N-cianoguanidinas y métodos relacionados con ellas.**

30 Prioridad: **27.02.2001 US 272368 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

73 Titular/es: **MIGENIX Corp.**
12780 High Bluff Drive, Suite 210
San Diego, California 92130, US

72 Inventor/es: **Ghosh, Soumitra y**
Szabo, Tomas, R.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Aril-N-cianoguanidinas y métodos relacionados con ellas.

5 La presente invención se refiere generalmente a compuestos y métodos para tratar artritis y enfermedades relacionadas, y para tratar enfermedades asociadas con una función mitocondrial alterada y, más particularmente a compuestos de aril-N-cianoguanidina y sus derivados.

Antecedentes de la invención

10 Numerosas enfermedades crónicas debilitantes del sistema esquelético en los vertebrados, incluyendo la artritis y las enfermedades artríticas relacionadas, se caracterizan por degradación de un tejido cartilaginoso avascular especializado, conocido como cartílago articular, que contiene células dedicadas a producir cartílago, los condrocitos articulares. Al contrario que otros condrocitos, tales como los condrocitos de la placa de crecimiento epifisaria, presentes
15 en los extremos de los huesos largos en desarrollo (por ejemplo, los condrocitos endocondrales o costocondrales), los condrocitos articulares residen y mantienen el cartílago articular que no tiene vasculatura. De esta forma, careciendo de aporte de sangre como fuente de oxígeno, se cree que los condrocitos articulares generan energía metabólica, por ejemplo producción de ATP bioenergético, predominantemente mediante respiración anaerobia (por ejemplo, glicosilación), y no mediante fosforilación oxidativa mitocondrial aeróbica (Stefanovich-Racic *et al.*, *J Cell Physiol.* 159:274-80, 1994). Debido a que, incluso bajo condiciones aeróbicas, los condrocitos articulares pueden consumir poco oxígeno, y por ello parecen diferir de una amplia variedad de tipos celulares de vertebrados (Stefanovich-Racic *et al.*, 1994), el papel de las mitocondrias en las enfermedades artríticas han sido ignoradas durante largo tiempo.

25 El sistema músculo-esquelético libera eficazmente energía mecánica útil y apoyo de carga en vertebrados tales como mamíferos, reptiles, pájaros y peces, pero es también capaz de sintetizar, procesar y organizar macromoléculas complejas para formar tejidos y órganos especializados en la realización de funciones mecánicas específicas. Las articulaciones son un importante subgrupo de estructuras especializadas del sistema músculo-esquelético, y existen muchos tipos diferentes de articulaciones en el organismo. Las articulaciones de movilidad libre (por ejemplo el tobillo, el codo, la cadera, la rodilla, el hombro, y las articulaciones de los dedos de manos, pies y muñecas), se conocen
30 como articulaciones sinoviales diartrodiales. Por el contrario, las articulaciones intervertebrales de la columna no son articulaciones diartrodiales, ya que éstas son fibrosas y no se mueven libremente, aunque proporcionan la flexibilidad requerida por la columna. Los extremos óseos que se articulan en la articulación diartrodial están recubiertos de una capa fina de tejido blando hidratado, conocido como cartílago articular. Cuarto, la articulación es estabilizada por, y su rango de movimiento se controla por, los ligamentos y tendones que pueden estar dentro y fuera de la cápsula articular.
35

Las capas limitantes de superficie de las articulaciones diartrodiales, es decir, la capa sinovial y la de cartílago articular, forman la cavidad articular que contiene el líquido sinovial. Así, en las articulaciones del esqueleto de los vertebrados, el líquido sinovial, el cartílago articular y el hueso en que se apoyan, forman un sistema de soporte suave,
40 casi sin fricción. Mientras que las articulaciones diartrodiales están sometidas a un enorme y variado intervalo de condiciones de carga, las superficies del cartílago sufren poco roce y desgarró (por ejemplo, degradación estructural) bajo circunstancias normales. Es más, la mayoría de las articulaciones de los seres humanos son capaces de funcionar eficazmente bajo altas cargas y situaciones de estrés, y a velocidades de operación muy bajas. Estas características de actuación demandan unos procesos de lubricación eficientes, para minimizar la fricción y el roce del cartílago en la articulación. Las roturas importantes del cartílago articular por procesos bioquímicos o biomecánicos dan lugar a la
45 artritis, que es por lo tanto definida generalmente como un fallo en el sistema de carga de peso de los vertebrados.

Los condrocitos articulares sintetizan y depositan los componentes de, y residen en, una matriz extracelular cartilaginosa tridimensional, que está compuesta mayoritariamente por dos clases principales de macromoléculas, el colágeno y los proteoglicanos. Los condrocitos articulares, de esta forma median la síntesis, ensamblaje, degradación y recambio de las macromoléculas que están contenidas en la matriz extracelular del cartílago (ECM o simplemente "matriz"). Las propiedades mecano-químicas de esta matriz contribuyen significativamente a la función biomecánica del cartílago *in vivo*.

55 La integridad estructural del cartílago articular es la base del funcionamiento óptimo de las articulaciones esqueléticas, tales como las encontradas en caderas, hombros, codos, tarsos y rodillas de los vertebrados. La alteración de la función de la articulación esquelética reduce dramáticamente la movilidad de un sujeto individual, tal como la implicada en la elevación desde una posición sentada, o al subir y bajar escaleras. Como se ha destacado anteriormente, para mantener la integridad estructural y funcional del cartílago articular, los condrocitos articulares sintetizan constantemente colágeno y proteoglicanos, los principales componentes del cartílago articular; los condrocitos también secretan el líquido sinovial que reduce la fricción. Esta elaboración constante por los condrocitos articulares de las macromoléculas de la ECM del cartílago y del líquido sinovial, provee al cartílago articular de un mecanismo de reparación para la mayoría del roce mecánico que puede ser causado por la fricción entre los extremos del hueso. Sin embargo, dicha biosíntesis mantenida de los componentes del cartílago genera una demanda constante de sus precursores, o bloques
60 de construcción, de estas macromoléculas y de los componentes del líquido sinovial. La falta de estos precursores dará lugar a defectos en la estructura y la función de las articulaciones esqueléticas. Esta deficiencia ocurre frecuentemente cuando los niveles de actividad son muy elevados, o cuando el tejido cartilaginoso se traumatiza.

Los meniscos de la rodilla, y otras estructuras similares tales como los discos de la articulación témporomandibular y el labrum del hombro, son estructuras fibrocartilaginosas especializadas que son vitales para la función articular normal. Ellos ayudan al cartílago articular a distribuir la carga a lo largo de la articulación, ayudan a los ligamentos y los tendones a estabilizar las articulaciones y juegan un papel principal en la absorción del choque, y pueden además ayudar a lubricar la articulación. La lesión de estas estructuras puede dar lugar a una función articular alterada, y a una degeneración del cartílago articular. La eliminación quirúrgica de estas estructuras fibrocartilaginosas, por ejemplo, después de desgarros en el cartílago aparentemente irreparables, puede dar como resultado el inicio precoz de artrosis. Los meniscos, discos y labrum son estructuras de fibrocartilago hidratadas compuestas primariamente por colágeno tipo III, con pequeñas cantidades de otros colágenos y también están presentes los proteoglicanos (incluyendo agregán y proteoglicanos más pequeños, no agregantes). Estas estructuras fibrocartilaginosas contienen una población escasa de células residentes que, al igual que los condrocitos en el cartílago articular, son responsables de la síntesis y el mantenimiento de esta matriz extracelular.

Las articulaciones diartrodiales permiten movimientos del cuerpo comunes, incluyendo movimientos de los miembros asociadas con funciones motoras (por ejemplo, ambulatorias) y otras actividades de la vida diaria. El fracaso de las superficies articulares (es decir, del cartílago articular) significa un fracaso en estas características biomecánicas para proporcionar sus funciones centrales, tales como el movimiento ambulatorio y otros movimientos del cuerpo, la liberación de energía mecánica y el soporte de la carga.

En términos biomédicos, el fracaso de las articulaciones diartrodiales lleva a alteraciones artríticas, la más frecuente de las cuales es la artrosis, o enfermedad articular degenerativa, o la condrocalcinosis. Otras formas de artritis incluyen la artritis reumatoide, la artritis reumatoide juvenil, la espondilitis anquilosante, el síndrome de Reiter, la artritis psoriásica, el lupus eritematoso, la gota, las artritis infecciosas y la condrocalcinosis (véase, por ejemplo, Guinad *et al.*, "Disorders of the joints and connective tissue", Section 14, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Octava Ed., Thorn *et al.*, eds, McGraw-Hill, New York, NY, 1977, pags. 2048-80) y, en un contexto veterinario, displasias tales como la displasia de cadera canina. Las enfermedades artríticas pueden también incluir, o pueden ser el resultado de, traumatismos físicos (por ejemplo, daño físico agudo que lesiona los tejidos articulares, o el síndrome de movimiento repetitivo), o enfermedades de la dieta (por ejemplo raquitismo u otras enfermedades de deficiencias dietéticas), que dan como resultado un daño articular.

Con mucho, las enfermedades artríticas mas prevalentes son la artritis reumatoide (RA) y la artrosis (OA). La RA, que se cree que es una enfermedad autoinmune, es el resultado en parte de una inflamación de la membrana sinovial. En humanos, el pico de inicio de esta enfermedad ocurre en adultos de más de 30 años de edad (típicamente en sus treinta o cuarenta), y afecta a las mujeres tres veces más frecuentemente que a los hombres. En casos extremos, la inflamación crónica erosiona y distorsiona las superficies articulares y el tejido conectivo, lo que da como resultado una deformidad articular importante y dolor constante. Además la RA frecuentemente lleva a OA, que colabora todavía más en la destrucción de la articulación. La enfermedad artrítica más frecuente, la OA, se caracteriza por cambios degenerativos en la superficie del cartílago articular. Las alteraciones en la estructura fisicoquímica del cartílago lo hacen menos resistente a las fuerzas compresivas y tensiles. Finalmente, ocurre la erosión completa, dejando al hueso subcondral expuesto y susceptible al desgarramiento. Las articulaciones de las rodillas y las manos son las más frecuentemente afectadas, y también pueden afectarse una o más de las articulaciones vertebrales, las caderas, los tobillos y los hombros. En ambas, la RA y la OA, la degeneración de las articulaciones que soportan carga tales como las caderas y las rodillas puede ser especialmente debilitante y frecuentemente requiere cirugía para aliviar el dolor y para aumentar la movilidad.

No existen medios actualmente para parar o revertir los cambios degenerativos que ocurren en la RA, la OA y las enfermedades artríticas relacionadas. Al mismo tiempo, aproximadamente 37 millones de americanos buscan alivio sintomático en forma de fármacos de prescripción. En tales casos, los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDS) son los que más frecuentemente se prescriben. Aunque estos compuestos frecuentemente alivian o palian los síntomas artríticos, frecuentemente tienen efectos secundarios no deseados, por ejemplo, náuseas y úlceras gastrointestinales. Otros compuestos comúnmente prescritos para el tratamiento de las enfermedades artríticas son los corticosteroides, tales como la triamcinolona, la prednisolona y la hidrocortisona. Estos fármacos también tienen efectos secundarios indeseables, particularmente cuando se requiere su utilización a largo plazo, y además pueden estar contraindicados en muchos pacientes. Además de las dificultades para determinar las dosis efectivas, se han descrito un número de reacciones adversas durante el tratamiento intra-articular con éstos y otros esteroides. Como resultado, el uso de tratamiento con corticosteroides en el manejo de las enfermedades artríticas está actualmente siendo reevaluado.

Como una alternativa a las medidas sintomáticas y paliativas para tratar la OA y la RA descritas anteriormente, la reparación mecánica de las articulaciones artríticas, cuando es posible, incluye la cirugía ortopédica para reemplazar las articulaciones con una prótesis artificial, o con un injerto biológico. Con más de treinta millones de americanos padeciendo de estas enfermedades invalidantes, dicha cirugía supone un reto médico y económico enorme, y no sin sus propios riesgos y contraindicaciones.

Como se ha remarcado anteriormente, la artrosis, también conocida como enfermedad articular degenerativa, es uno de los tipos más comunes de artritis. Se caracteriza por la rotura del cartílago dentro de la articulación, ocasionado roce doloroso de un hueso de la articulación contra otro hueso, y llevando a una pérdida de movilidad de la articulación afectada. La artrosis puede ser desde muy leve a muy grave, y más frecuentemente afecta a personas de mediana edad

y mayores. En particular, la OA afecta frecuentemente las articulaciones de las manos y las de carga, tales como las rodillas, caderas, pies y espalda. Aunque la edad es un factor de riesgo principal, en el momento actual la etiología y la patogénesis de esta enfermedad permanecen ampliamente desconocidas. Muchos factores ambientales y otras condiciones independientes se han asociado con un riesgo aumentado de desarrollar artrosis, incluyendo obesidad, lesión previa y/o menisectomía (por ejemplo, lesiones relacionadas con el deporte u otras lesiones accidentales), actividades relacionadas con la ocupación, que incluyen lesiones repetitivas en la rodilla, el tabaquismo, las hormonas sexuales, las enfermedades ginecológicas y otros factores metabólicos. La condrocalcinosis es otra forma de enfermedad articular degenerativa relacionada con la artrosis, en la que ocurre una calcificación anormal en el cartílago articular.

Para el porvenir, está claro que ninguna de las terapias farmacológicas actuales corrige el defecto bioquímico subyacente en las enfermedades artríticas tales como la RA y la OA. Tampoco ninguno de estos tratamientos actualmente disponibles mejora todas las anomalías fisiológicas en las enfermedades artríticas tales como la actividad anormal de los condrocitos articulares, la degradación del cartílago, la erosión articular y la deformidad articular grave. Además, los fracasos del tratamiento son comunes con estos agentes, de tal forma que frecuentemente es necesaria la terapia con múltiples fármacos.

Claramente existe una necesidad de mejorar la terapéutica dirigida a corregir los defectos bioquímicos y/o metabólicos responsables de la artritis. La presente invención proporciona composiciones y métodos que son útiles para tratar una enfermedad artrítica asociada con una función mitocondrial alterada, y ofrece otras ventajas relacionadas.

Según una teoría no limitante, y como se describe en la solicitud co-pendiente, que tiene el N° de Serie de EE. UU. 09/661.848, algunas o todas las enfermedades artríticas como aquí se proporcionan, pueden representar ejemplos de enfermedad asociada con una función mitocondrial alterada.

Como antecedentes, las mitocondrias son la principal fuente de energía en las células de organismos superiores, y estas organelas proporcionan regulación bioquímica directa e indirecta de un amplio marco de procesos celulares respiratorios, oxidativos y metabólicos (como revisión, véase Emster y Schatz, *J Cell Biol* 91:227s-255s, 1981). Éstos incluyen la actividad de cadena de transporte de electrones (ETC), que dirige la fosforilación oxidativa para producir energía metabólica en forma de trifosfato de adenosina (ATP), y que también remarca un papel central de las mitocondrias en la homeostasis del calcio intracelular. Además de su papel en los procesos metabólicos, las mitocondrias también están implicadas en la secuencia de suicidio celular programado conocido como "apoptosis" (Green y Reed, *Science* 281:1309-12, 1998; Susin *et al.*, *Biochim et Biophys Acta* 1366:151-65, 1998).

La actividad mitocondrial defectuosa, incluyendo pero no limitándose, al fracaso de cualquier etapa del elaborado y multicomplejo ensamblaje mitocondrial, conocido como cadena de transporte de electrones (ETC), puede dar como resultado: (i) disminución de la producción de ATP, (ii) aumento en la generación de radicales libres altamente reactivos (por ejemplo, superóxido, radicales peroxinitrito e hidroxilo, y peróxido de hidrógeno), (iii) alteraciones en la homeostasis del calcio intracelular, y (iv) la liberación de factores (tales como el citocromo c, y el "factor inductor de apoptosis"), que inicia o estimula la cascada de la apoptosis. Debido a estos cambios bioquímicos, la disfunción mitocondrial tiene el potencial de ocasionar daño diseminado a células y tejidos.

Un número de enfermedades y alteraciones, se piensa que son causadas por, o que están asociadas con, alteraciones en el metabolismo de las mitocondrias, y/o con la inducción o supresión inapropiadas de funciones relacionadas con las mitocondrias, tales como las que llevan a la apoptosis. Estas incluyen, como ejemplo, enfermedades neurodegenerativas crónicas tales como la enfermedad de Alzheimer (AD) y la enfermedad de Parkinson (PD); enfermedades autoinmunes; diabetes mellitas, incluyendo el Tipo I y el Tipo II; enfermedades asociadas con las mitocondrias, incluyendo, pero no limitándose a distrofia muscular congénita con anomalías estructurales en las mitocondrias, miopatía infantil fatal con depleción grave de mtDNA y la miopatía benigna de "comienzo tardío", con reducción moderada en el mtDNA, el síndrome MELAS (encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y accidente cerebro-vascular) y el síndrome MIDD (diabetes mitocondrial y sordera); el síndrome MERFF (síndrome de epilepsia mioclónica con fibras rojo-rasgadas); la artritis; el síndrome NARP (Neuropatía; Ataxia; Retinitis Pigmentaria); el síndrome MNGIE (Miopatía y oftalmoplegia externa; Neuropatía, Gastro-intestinal; Encefalopatía); el síndrome LHON (Leber's; Hereditaria; Óptica; Neuropatía); la enfermedad de Kearns-Sayre; el síndrome de Pearson; la PEO (Oftalmoplegia Externa Progresiva); el síndrome de Wolfram DIDMOAD (Diabetes Insípida, Diabetes Mellitas, Atrofia Óptica, Sordera); el síndrome de Leigh; la distonía, la esquizofrenia; y las enfermedades hiperproliferativas, tales como el cáncer, los tumores y la psoriasis.

Según las teorías generalmente aceptadas de la función mitocondrial, la actividad respiratoria ETC apropiada requiere el mantenimiento de un potencial electroquímico ($\Delta\psi_m$), en la membrana mitocondrial interna, por un mecanismo químico-osmótico acoplado. Las condiciones que disipan o colapsan este potencial de membrana, incluyendo pero no limitándose, a fracasos en cualquier etapa de la ETC, pueden de esta forma prevenir la biosíntesis de ATP y activar o frenar la producción de una fuente de energía bioquímica vital. La actividad mitocondrial alterada o defectuosa puede también dar como resultado un colapso mitocondrial catastrófico que ha sido denominado "transición de permeabilidad mitocondrial" (MPT). Además, las proteínas mitocondriales tales como el citocromo c y el "factor inductor de apoptosis", pueden disociarse o ser liberados de las mitocondrias debido a la MPT (o a la acción de proteínas mitocondriales tales como Bax), y puede inducir proteasas conocidas como caspasas y/o estimular otros eventos en la apoptosis (Murphy, *Drug Dev Res* 46:18-25, 1999).

La actividad mitocondrial defectuosa puede alternativamente o adicionalmente dar como resultado la generación de radicales libres altamente reactivos, que tienen la capacidad potencial de lesionar células y tejidos. Estos radicales libres pueden incluir especies de oxígeno reactivas (ROS), tales como el superóxido, los radicales peroxinitrito e hidroxilo, y potencialmente otras especies reactivas que pueden ser tóxicas para las células. Por ejemplo, la inducción de la peroxidación lipídica por los radicales libres de oxígeno es un mecanismo patogénico bien establecido en la lesión del sistema nervioso central (CNS), tal como la que se encuentra en un número de enfermedades degenerativas, y en la isquemia (es decir, accidente cerebro-vascular). (La participación mitocondrial en la cascada de la apoptosis se cree también que es un evento clave en la patogénesis de la muerte neuronal).

Hay, además, al menos dos consecuencias deletéreas de la exposición a radicales libres de oxígeno que se originan de la disfunción mitocondrial, que impactan adversamente a las propias mitocondrias. En primer lugar, la lesión mediada por los radicales libres puede inactivar una o más de la miríada de proteínas de la ETC. En segundo lugar, la lesión mediada por los radicales libres puede dar como resultado un colapso mitocondrial catastrófico que se ha denominado “permeabilidad de transición”. Según las teorías generalmente aceptadas de la función mitocondrial, la actividad respiratoria apropiada de la ETC, requiere el mantenimiento de un potencial electroquímico en la membrana mitocondrial interna por un mecanismo quimio-osmótico acoplado. La actividad oxidativa de los radicales libres puede disipar este potencial de membrana, previniendo de esta forma la biosíntesis de ATP y/o poniendo en marcha eventos mitocondriales en la cascada apoptótica. De esta forma, mediante la modulación de éstos y otros efectos de la oxidación de los radicales libres sobre la estructura y función mitocondriales, la presente invención proporciona composiciones y métodos para proteger las mitocondrias, que no se proporcionan por la mera determinación de la peroxidación lipídica inducida por los radicales libres.

Por ejemplo, la transición de la permeabilidad mitocondrial rápida, probablemente incluye cambios en la proteína transmembrana mitocondrial interna adenilato traslocasa, que da como resultado la formación de un “poro”. Si este poro es un conducto distinto o simplemente una fuga diseminada en la membrana, está sin resolver. De cualquier modo, debido a que la transición de la permeabilidad está potenciada por la exposición de radicales libres, sería más posible que ocurriera en las mitocondrias de células de pacientes que tienen enfermedades asociadas a mitocondrias, que están crónicamente expuestos a dichos radicales libres reactivos.

La función mitocondrial alterada (por ejemplo, aumento o disminución de una forma estadísticamente significativa relativa a un control apropiado, tal como un individuo libre de enfermedad), característica de las enfermedades asociadas a mitocondria, puede también estar relacionada a una pérdida del potencial electroquímico de la membrana mitocondrial, por mecanismos diferentes de la oxidación por radicales libres, y dicha permeabilidad de transición puede resultar del efecto directo o indirecto de los genes mitocondriales, sus productos génicos o moléculas mediadoras aguas abajo relacionadas y/o genes extramitocondriales, sus productos génicos o mediadores relacionados aguas abajo, o de otras causas conocidas o desconocidas. La pérdida del potencial mitocondrial de esta forma, puede ser un evento crítico en la progresión de las enfermedades degenerativas o asociadas a mitocondrias.

La diabetes mellitus es una enfermedad común, degenerativa, que afecta al 5-10% de la población en países desarrollados. La propensión para desarrollar diabetes mellitus se ha referido como de herencia materna, lo que sugiere una implicación genética mitocondrial (Alcolado, JC y Alcolado R, *Br Med J* 302:1178-80, 1991; Reny, SL, *International J Epidem* 23:886-90, 1994). La diabetes es una enfermedad heterogénea con un fuerte componente genético; los gemelos monozigotos son altamente concordantes y hay una elevada incidencia de la enfermedad entre los familiares de primer grado de los individuos afectados.

A nivel celular, el fenotipo degenerativo que puede ser característico de la diabetes mellitus de comienzo tardío, incluye indicadores de función respiratoria mitocondrial alterada, por ejemplo secreción de insulina alterada, disminución de la síntesis de ATP y aumento de los niveles de especies de oxígeno reactivas. Algunos estudios han mostrado que la diabetes mellitus puede ser precedida por, o asociada con, ciertas enfermedades relacionadas. Por ejemplo, se estima que cuarenta millones de individuos en los EE. UU. padece una alteración de la tolerancia a la glucosa (IGT) de comienzo tardío. Los pacientes con IGT fracasan en la respuesta a la glucosa con un aumento de la secreción de insulina. Un pequeño porcentaje de individuos con IGT (5-10%) progresan a diabetes deficiente en insulina no dependiente de insulina (NIDDM) cada año. Algunos de estos individuos progresan además a diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM). Estas formas de diabetes mellitus, NIDDM e IDDM, se asocian con una disminución de la liberación de insulina por las células pancreáticas beta y/o una disminución en la respuesta final del órgano a la insulina. Otros síntomas de la diabetes mellitus y condiciones que preceden o se asocian con la diabetes mellitus incluyen la obesidad, las patologías vasculares, las neuropatías periféricas y sensoriales, la ceguera y la sordera.

Debido al fuerte componente genético de la diabetes mellitus, el genoma nuclear ha sido el principal foco de investigación para mutaciones genéticas causales. Sin embargo, a pesar de intensos esfuerzos, los genes nucleares que se segregan con la diabetes mellitus son conocidos solo por mutaciones raras en el gen de la insulina, el gen del receptor de la insulina, el gen de la deaminasa de adenosina y el gen de la glucoquinasa. Según esto, los defectos mitocondriales, que pueden incluir pero no necesitan limitarse a defectos relacionados con el genoma mitocondrial no nuclear, que reside en el DNA mitocondrial, podrían contribuir significativamente a la patogénesis de la diabetes mellitus (Anderson, *Drug Dev Res* 46:67-79, 1999).

La enfermedad de Parkinson (PD) es una enfermedad neurodegenerativa, progresiva, crónica, asociada a mitocondrias, caracterizada por la pérdida y/o la atrofia de neuronas que contienen dopamina, en la *pars compacta* de la

5 *substantia nigra* del cerebro. Al igual que la enfermedad de Alzheimer (AD), la PD también afecta a los ancianos. Se caracteriza por bradiquinesia (movimiento lento), rigidez y temblor de reposo. Aunque el tratamiento con L-Dopa reduce los temblores en la mayoría de los pacientes temporalmente, finalmente los temblores se vuelven más y más incontrolables, haciendo difícil o imposible para los pacientes incluso alimentarse por sí mismos o cumplir con sus propias necesidades de higiene básica.

10 Se ha demostrado que la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) induce parkinsonismo en animales y en seres humanos, en parte a través de sus efectos sobre las mitocondrias. La MPTP se convierte a su metabolito activo, MPP⁺, en las neuronas con dopamina; después se concentra en las mitocondrias. El MPP⁺ después inhibe selectivamente la enzima mitocondrial NADH:ubiquinona oxido-reductasa ("Complejo I"), llevando a un aumento en la producción de radicales libres, a una reducción en la producción de trifosfato de adenosina, y finalmente, a la muerte de las neuronas con dopamina.

15 El Complejo I mitocondrial está compuesto por 40-50 subunidades; la mayoría están codificadas por el genoma nuclear y siete por el genoma mitocondrial. Como el parkinsonismo puede inducirse por la exposición a toxinas mitocondriales que afectan a la actividad del Complejo I, parecería posible que los defectos en las proteínas del Complejo I pudieran contribuir a la patogénesis de la PD, ocasionando una deficiencia bioquímica similar en la actividad del Complejo I. Es más, se han descrito defectos en la actividad del Complejo I mitocondrial en la sangre y el cerebro de pacientes con PD (Parker *et al.*, *Am J Neurol* 26:719-23, 1989; Swerdlow y Parker, *Drug Dev Res* 46:44-50, 1999).

20 Teorías similares se han avanzado para relaciones análogas entre defectos mitocondriales y otras enfermedades neurológicas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la neuropatía óptica hereditaria de Leber, la esquizofrenia, el síndrome de "encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y accidente cerebro-vascular" (MELAS), y el "síndrome de epilepsia mioclónica con fibras rojo rasgadas" (MERRF).

25 Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer (AD), es una enfermedad neurodegenerativa crónica, progresiva, que se caracteriza por pérdida y/o atrofia de neuronas en determinadas regiones del cerebro, y que se acompaña por depósitos extracelulares de β -amiloide y por la acumulación intracelular de ovillos neurofibrilares. Es únicamente una enfermedad humana, y afecta a más de 13 millones de personas en todo el mundo. También es una enfermedad especialmente trágica. Muchos individuos que han vivido vidas normales, productivas, son afectados lentamente por la AD según se hacen mayores, y la enfermedad gradualmente les quita la memoria y otras facultades mentales. Eventualmente, cesan de reconocer a la familia y a sus seres queridos, y frecuentemente requieren cuidado continuado hasta su eventual muerte.

35 Existe evidencia de que algunos defectos en la fosforilación oxidativa dentro de las mitocondrias, son al menos causas parciales de los casos esporádicos de AD. La enzima citocromo c oxidasa (COX), que forma parte de la cadena de transporte de electrones (ETC) mitocondrial, está presente en cantidades normales en los pacientes con AD; sin embargo, la actividad catalítica de esta enzima en los pacientes con AD y en los cerebros de pacientes con AD en la autopsia, se ha encontrado anormalmente baja. Esto sugiere que la COX en los pacientes con AD es defectuosa, llevando a una disminución en la actividad catalítica, que de alguna forma causa o contribuye a los síntomas que son característicos de la AD.

45 Una característica patológica de la AD es la muerte de poblaciones neuronales seleccionadas en determinadas regiones del cerebro. Se presume que la muerte celular en la AD es apoptótica, ya que se han visto signos de muerte celular programada (PCD), y no se han encontrado indicadores de gliosis y necrosis activas (Smale *et al.*, *Exp Neurol* 133:225-30, 1995; Cotman *et al.*, *Molec Neurobiol* 10:19-45, 1995). Las consecuencias de la muerte celular en la AD, la pérdida neuronal y sináptica, están cercanamente asociadas con el diagnóstico clínico de AD, y se correlacionan de forma elevada con el grado de demencia en la AD (DeKosky *et al.*, *Ann Neurol* 27(5):467-64, 1990).

50 Se piensa que la disfunción mitocondrial es crítica en la cascada de eventos que lleva a la apoptosis en diversos tipos celulares (Kroemer *et al.*, *FASEB J* 9:1277-87, 1995), y puede ser una causa de muerte celular apoptótica en neuronas del cerebro de AD. La alteración de la fisiología mitocondrial puede estar entre los eventos más precoces en la PCD (Zamzami *et al.*, *J Exp Med* 182:367-77, 1995; Zamzami *et al.*, *J Exp Med* 181:1661-72, 1995), y los elevados niveles de especies de oxígeno reactivas (ROS) que resultan de dicha función mitocondrial alterada pueden iniciar la cascada apoptótica (Ausserer *et al.*, *Mol Cell Biol* 14:5032-42, 1994). En diversos tipos celulares, incluyendo las neuronas, la reducción en el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), precede a la degradación del DNA nuclear que acompaña a la apoptosis. En sistemas libres de células, las fracciones enriquecidas mitocondriales, pero no nucleares, son capaces de inducir apoptosis nuclear (Newmeyer *et al.*, *Cell* 70:353-64, 1994). La perturbación de la actividad respiratoria mitocondrial que lleva a estados metabólicos celulares alterados, tales como la elevación intracelular de ROS, puede ocurrir en enfermedades asociadas a mitocondrias, y puede además inducir eventos patogénicos a través de mecanismos de apoptosis.

65 Las mitocondrias oxidativamente estresadas pueden liberar un factor soluble preformado que puede inducir condensación cromosómica, un evento que precede a la apoptosis (Marchetti *et al.*, *Cancer Res* 56:2033-38, 1996). Además, los miembros de la familia Bcl-2 de productos génicos anti-apoptosis están localizados dentro de la membrana externa mitocondrial (Monaghan *et al.*, *J Histochem Cytochem* 40:1819-25, 1992), y estas proteínas parecen proteger las membranas del estrés oxidativo (Korsmayer *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1271:63, 1995). La localización de Bcl-2 en esta membrana parece ser indispensable para la modulación de la apoptosis (Nguyen *et al.*, *J Biol Chem* 269:16521-

24, 1994). Así, los cambios en la fisiología mitocondrial pueden ser mediadores importantes de la apoptosis. Hasta el grado en que la muerte celular apoptótica sea un hecho prominente en la pérdida neuronal en la AD, la disfunción mitocondrial puede ser crítica para la progresión de la enfermedad y puede también ser un factor que contribuya en otras enfermedades asociadas a mitocondrias.

Defectos focales en el metabolismo de la energía en las mitocondrias, con aumentos acompañantes en el estrés oxidativo, pueden asociarse con AD. Se ha establecido que el metabolismo de la energía está alterado en el cerebro de la AD (Palmer *et al.*, *Brain Res* 645:338-42, 1994; Pappolla *et al.*, *Am J Pathol* 140:621-28, 1992; Jeandel *et al.*, *Gerontol* 35:275, 1989; Balazs *et al.*, *Neurochem Res* 19:1131-37, 1994; Mecocci *et al.*, *Ann Neurol* 36:747-51, 1994; Gsell *et al.*, *J Neurochem* 64:1216-23, 1995). Por ejemplo, se han descrito deficiencias regionales específicas en el metabolismo de la energía en los cerebros de pacientes con AD en un número de estudios de tomografía de emisión de positrones (Kuhl *et al.*, *J Cereb Blood Flow Metab* 7:S406, 1987; Grady *et al.*, *J Clin Exp Neuropsychol* 10:576-96, 1988; Haxby *et al.*, *Arch Neurol* 47:753-60, 1990; Azari *et al.*, *J Cereb Blood Flow Metab* 13:438-47, 1993). Los defectos metabólicos en el neocórtex ténporo-parietal de los pacientes con AD, aparentemente preceden a una disminución cognitiva durante varios años. Los fibroblastos de la piel de los pacientes con AD presentan una disminución en la utilización de glucosa, que lleva a la formación de productos finales de la glicosilación (Yan *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7787-91, 1994). El tejido cerebral de cerebros con AD postmortem muestra una actividad disminuida de las enzimas mitocondriales piruvato deshidrogenasa (Sheu *et al.*, *Ann Neurol* 17:444-49, 1985) y α -cetoglutarato deshidrogenada (Mastrogiacono *et al.*, *J Neurochem* 6:2007-14, 1994), que son ambas enzimas clave en el metabolismo de la energía. Estudios de resonancia magnética funcional de espectroscopia han demostrado un aumento de los niveles de fosfato inorgánico, en relación con la fosfocreatina, en el cerebro de AD, lo que sugiere una acumulación de precursores producida a partir de una disminución de la producción de ATP por las mitocondrias (Pettegrew *et al.*, *Neurobiol of Aging* 15:117-32, 1994; Pettegrew *et al.*, *Neurobiol of Aging* 16:973-75, 1995). Además, se ha descrito un aumento de los niveles de piruvato, pero no los de glucosa o lactato, en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con AD, consistente con los defectos en la actividad de la cadena de transporte de electrones (ETC) mitocondrial del cerebro (Pametti *et al.*, *Neurosci Lett* 199:231-33, 1995).

Los signos de lesión oxidativa son hechos prominentes en la patología de la AD y, como se ha remarcado previamente, las especies reactivas de oxígeno (ROS) son mediadores críticos de la degeneración neuronal. Es más, los estudios de autopsias muestran que los marcadores de proteína, DNA y peroxidación lipídica están aumentados en el cerebro de pacientes con AD (Palmer *et al.*, *Brain Res* 645:338-42, 1994; Pappolla *et al.*, *Am J Pathol* 140:621-28, 1992; Jeandel *et al.*, *Gerontol* 35:275-82; Balazs *et al.*, *Arch Neurol* 4:864, 1994; Mecocci *et al.*, *Ann Neurol* 36:747-51, 1994; Smith *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10540-43, 1991). En el tejido del hipocampo de pacientes con AD, pero no de testigos, está aumentada la formación de carbonilo indicativa de que la oxidación de proteínas está aumentada en el citoplasma neuronal, y en el núcleo de las neuronas y de la glía (Smith *et al.*, *Nature* 382:120-21, 1996). Los ovillos neurofibrilares también parecen ser lugares prominentes de oxidación de proteínas (Scheweers *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8463, 1995; Blass *et al.*, *Arch Neurol* 4:864, 1990). Bajo condiciones estresadas y no estresadas, la incubación del tejido cortical de cerebros con AD tomados de autopsia, demuestra un aumento de la producción de radicales libres en relación con testigos que no tienen AD. Además, la actividad de las enzimas antioxidantes críticas, particularmente las catalasas, están reducidas en la AD (Gsell *et al.*, *J Neurochem* 64:1216-23, 1995), lo que sugiere que el cerebro de AD es vulnerable a un aumento de la producción de ROS. Así, el estrés oxidativo puede contribuir significativamente a la patología de las enfermedades asociadas a mitocondrias tales como la AD, en las que pueden estar presentes la disfunción mitocondrial y/o la elevación de ROS.

Cada vez mayor evidencia apunta al papel fundamental de la disfunción mitocondrial en las enfermedades neurodegenerativas crónicas (Beal, *Biochim Biophys Acta* 1366:211-23, 1998), y estudios recientes implican a la mitocondria en la regulación de eventos que llevan a la muerte celular necrótica y apoptótica (Susin *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1366:151-68, 1998). Las mitocondrias estresadas (por ejemplo, mediante radicales libres, elevado calcio intracelular, pérdida de ATP, entre otros), pueden liberar factores solubles preformados que pueden iniciar la apoptosis a través de una interacción con los apoptosomas (Marchetti *et al.*, *Cancer Res* 56:2033-38, 1996; Li *et al.*, *Cell* 91:479-89, 1997). La liberación de factores solubles preformados por las mitocondrias estresadas, como el citocromo c, puede ocurrir como consecuencia de un número de eventos. En cualquier evento, se piensa que la magnitud del estrés (ROS, niveles de calcio intracelular, etc) influencia los cambios en la fisiología mitocondrial que finalmente determina si la muerte celular ocurre a través de la vía de la necrosis o de la apoptosis. Hasta el grado en que la muerte celular por apoptosis sea un hecho prominente en las enfermedades degenerativas, la disfunción mitocondrial puede ser un factor crítico en la progresión de la enfermedad.

En contraste con las enfermedades neurodegenerativas crónicas, la muerte celular que sigue al accidente cerebrovascular ocurre de una forma aguda. Una gran cantidad de literatura actual documenta la importancia de la función mitocondrial en la muerte celular que sigue a la lesión de isquemia/repercusión que acompaña al accidente cerebrovascular, el fallo cardíaco y la lesión traumática en el cerebro. El apoyo experimental continúa acumulándose para un papel central de un metabolismo de la energía defectuoso, una alteración en la función mitocondrial que lleva a un aumento de la producción de radicales de oxígeno y a una homeostasis del calcio intracelular alterada, y a una participación mitocondrial activa en la cascada apoptótica en la patogénesis de la neurodegeneración aguda.

Un accidente cerebro-vascular ocurre cuando una región del cerebro pierde la perfusión, y las neuronas mueren agudamente o de una forma retrasada como resultado de este evento isquémico agudo. Después del cese de flujo sanguíneo en el cerebro, la concentración tisular de ATP cae a niveles indetectables en minutos. En el núcleo del

infarto, la ausencia de producción de ATP mitocondrial produce una pérdida de la homeostasis iónica, llevando a una lisis celular osmótica y a la muerte necrótica. Un número de cambios secundarios pueden también contribuir a la muerte celular que sigue a la caída del ATP mitocondrial. La muerte celular en la lesión neuronal aguda se irradia desde el centro de un infarto donde las neuronas mueren primariamente por necrosis, a la penumbra, donde las neuronas sufren apoptosis, hasta la periferia, donde el tejido todavía no está dañado (Martin *et al.*, *Brain Res Bull* 46:281-309, 1998).

Mucha de la lesión a las neuronas en la penumbra está producida por la citotoxicidad inducida por el glutamato liberado durante la lisis celular del foco del infarto, especialmente cuando se exagera por un fallo bioenergético de las mitocondrias por la privación de oxígeno (MacManus y Linnik, *J Cerebral Flow Metab* 17:815-32, 1997). El activador inicial en la citotoxicidad es el masivo influjo de Ca^{2+} , primariamente a través de los receptores NMDA, que da como resultado una ingestión aumentada del Ca^{2+} al interior de las mitocondrias (revisado por Dykens, "Free radicals and mitochondrial dysfunction in excitotoxicity and neurodegenerative diseases" en "*Cell Death and Diseases of the Nervous System*", VE Koliatis y RR Rafan, eds., Humana Press, New Jersey, pags. 45-68, 1999). La sobrecarga de Ca^{2+} colapsa el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), e induce un aumento de la producción de especies de oxígeno reactivas (Dykens, *J Neurochem* 63:584-91, 1994; Dykens, "Mitochondrial radical production and mechanisms of oxidative cytotoxicity" en *The Oxygen Paradox*, KJA Davies y F Ursini, eds., Cleup Press, U of Padova, pags. 453-67, 1995). Si son suficientemente importantes, el colapso de la $\Delta\Psi_m$ y el secuestro intracelular de Ca^{2+} , pueden inducir la abertura de un poro en la membrana mitocondrial interna a través de un proceso llamado transición de permeabilidad mitocondrial (MPT), liberando indirectamente citocromo c y otras proteínas que inician la apoptosis (Bernardi *et al.*, *J Biol Chem* 267:2934-39, 1994; Zoratti y Szabo, *Biochim Biophys Acta* 1241:139-76, 1995; Ellerby *et al.*, *J Neurosci* 17:6165-78, 1997). Consistente con estas observaciones, la citotoxicidad inducida por glutamato puede inhibirse previniendo la ingestión mitocondrial de Ca^{2+} o bloqueando la MPT (Budd y Nichols, *J Neurochem* 66:403-11, 1996; White y Raynolds, *J Neurosci* 16:5688-97, 1996; Li *et al.*, *Brain Res* 753:133-40, 1997).

Mientras que la apoptosis mediada por mitocondrias puede ser crítica en las enfermedades degenerativas, se piensa que enfermedades tales como el cáncer implican un crecimiento no regulado y no deseado (hiperproliferación) de células que de alguna forma han escapado al mecanismo que normalmente pone en marcha la apoptosis de tales células no deseables. La expresión aumentada de la proteína anti-apoptótica, Bcl-2 y de sus homólogas, está implicada en la patogénesis de numerosos cánceres humanos. La Bcl-2 actúa inhibiendo la muerte celular programada, y la sobreexpresión de Bcl-2, y de la proteína relacionada Bcl-xL, bloquean la liberación mitocondrial de citocromo c de las mitocondrias, y la activación de la caspasa 3 (Yang *et al.*, *Science* 275:1129-32, 1997; Kluck *et al.*, *Science* 275:1132-36, 1997; Kharbanda *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6939-42, 1997). En contraste, la sobreexpresión de Bcl-2 y Bcl-xL protege contra la disfunción mitocondrial que precede a la apoptosis nuclear que se induce por agentes quimioterapéuticos. Además, la resistencia adquirida contra múltiples drogas, se asocia con la inhibición de la liberación del citocromo c, que es dependiente de la sobreexpresión de Bcl-xL (Kojima *et al.*, *J Biol Chem* 273:16647-50, 1998). Como las mitocondrias se han implicado en la apoptosis, es de esperar que los agentes que interactúan con los componentes mitocondriales, afecten a la capacidad celular de desarrollar apoptosis. Así, los agentes que inducen o promueven apoptosis en las células hiperproliferativas, es de esperar que sean útiles para tratar enfermedades hiperproliferativas y enfermedades tales como el cáncer.

Así, la alteración de la función mitocondrial tiene un gran potencial para un amplio espectro de estrategias terapéuticas, para diseñar fármacos para tratar enfermedades asociadas con una función mitocondrial alterada, incluyendo (por medio de una teoría no limitante), ciertas enfermedades artríticas, enfermedades degenerativas y enfermedades hiperproliferativas. También según una teoría no limitante, dependiendo de la enfermedad o alteración para el cual se busca el tratamiento, tales fármacos pueden ser, por ejemplo, agentes protectores de las mitocondrias, agentes anti-apoptóticos o agentes pro-apoptóticos.

Claramente existe una necesidad de compuestos que limiten o prevengan el daño a las organelas, células o tejidos que resulta directa o indirectamente de una disfunción mitocondrial, por ejemplo, el daño por radicales libres generados intracelularmente. En particular, como las mitocondrias son organelas esenciales para producir energía metabólica, los agentes que protegen las mitocondrias contra dicho daño (por ejemplo, lesión oxidativa por radicales libres), serán especialmente útiles. Tales agentes pueden ser adecuados para el tratamiento de enfermedades degenerativas incluyendo las enfermedades asociadas a las mitocondrias. Las aproximaciones existentes para identificar agentes que limiten el daño oxidativo, pueden no incluir la determinación de si dichos agentes pueden ayudar a proteger la estructura de la mitocondria y/o su función.

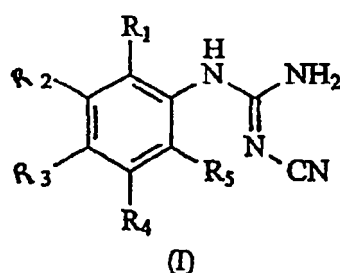
También existe una necesidad para compuestos y métodos que limiten o prevengan el daño a las células que ocurre directa o indirectamente como resultado de la necrosis y/o la apoptosis inadecuada. En particular, como las mitocondrias son mediadores de los eventos apoptóticos, los agentes que modulen los eventos proapoptóticos mediados por mitocondrias, serán especialmente útiles. Dichos agentes pueden ser adecuados para el tratamiento de eventos degenerativos agudos, tales como los accidentes cerebro-vasculares. Dada la limitada ventana terapéutica para bloquear la muerte necrótica en el núcleo de un infarto, puede ser particularmente deseable desarrollar estrategias terapéuticas para limitar la muerte neuronal, previniendo la disfunción mitocondrial en las regiones no necróticas de un infarto. Los agentes y métodos que mantienen la integridad mitocondrial durante la isquemia transitoria y la posterior onda de excitotoxicidad, es de esperar que sean nuevos agentes neuroprotectores, con utilidad para limitar la lesión neuronal relacionada con el accidente cerebro-vascular.

También hay una necesidad de compuestos y métodos que inhiban el crecimiento o aumenten la muerte de células y tejidos que han escapado de las apropiadas señales de apoptosis, así como de agentes citotóxicos que produzcan la muerte de células no deseables (por ejemplo, de cáncer), iniciando la cascada de la apoptosis. En particular, como las mitocondrias son mediadores de eventos apoptóticos, los agentes que estimulen los eventos pro-apoptóticos mediados por las mitocondrias, serán especialmente útiles. Tales agentes pueden ser adecuados para el tratamiento de las enfermedades hiperproliferativas, tales como el cáncer o la psoriasis.

La presente invención cumple con estas necesidades y proporciona otras ventajas relacionadas. Los expertos en la técnica reconocerán otras ventajas y beneficios de la invención, después de leer la descripción.

Resumen de la invención

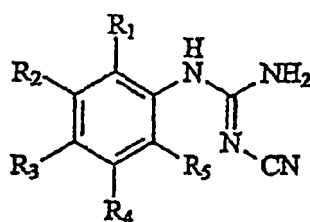
Dicho brevemente, la presente invención se dirige al tratamiento de una enfermedad artrítica y/o al tratamiento de una enfermedad asociada con una alteración de la función mitocondrial, mediante la administración a un animal de sangre caliente con esa necesidad, una cantidad efectiva de un compuesto que tiene la siguiente estructura general (I):



incluyendo los estereoisómeros, profármacos y sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que, desde R_1 hasta R_5 se definen más adelante.

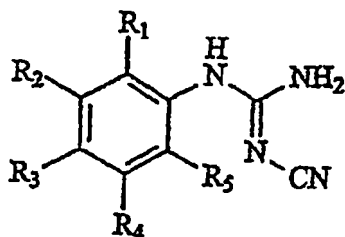
En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que contiene un compuesto aril N-cianoguanidina de la estructura (I), y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Según otras realizaciones, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad artrítica, mediante la administración de una cantidad efectiva de dicha composición farmacéutica a un animal con esa necesidad. Según todavía otras realizaciones, se proporciona un método para tratar una enfermedad asociada con una función mitocondrial alterada, que comprende la administración e una cantidad efectiva de dicha composición farmacéutica a un animal con esa necesidad.

Estos y otros aspectos de la presente invención serán evidentes en referencia a la siguiente descripción detallada. Además, se incluyen varias referencias aquí, que describen en mayor detalle ciertos aspectos de esta invención. Se proporciona un compuesto que tiene una estructura



o un estereoisómero, o derivados de grupos funcionales de alcohol y amina acetato, formato o benzoato, o sus sales farmacéuticamente aceptables, en los que R_3 es morfolinilo; y R_1 , R_2 , R_4 y R_5 son lo mismo o diferente, e individualmente hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alquilo, alcoxi, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heterocicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido; o R_4 tomado junto con R_5 , y además tomado junto con los respectivos átomos de carbono a los que estos grupos están ligados, forman un arilo fusionado o un heterociclo sustituido o no sustituido.

La presente invención también proporciona un compuesto que tiene la estructura



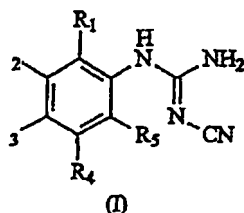
o un esteroisómero, o derivados de grupos funcionales de alcohol y amina acetato, formato o benzoato, o sus sales farmacéuticamente aceptables, en los que R_1 , R_2 y R_3 son lo mismo o diferente, e individualmente hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alquilo, alcoxi, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heterocicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido; y R_4 tomado junto con R_5 , y además tomado junto con los respectivos átomos de carbono a los que estos grupos están ligados, forman un arilo fusionado o un heterociclo sustituido o no sustituido.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra la capacidad de un compuesto representativo para bloquear la inhibición mediada por SIN-1 de la respiración mitocondrial en células TC28.

Descripción detallada de la invención

También se describen compuestos, composiciones y métodos que son útiles en el tratamiento de enfermedades artríticas y/o enfermedades asociadas con una función mitocondrial alterada. Más específicamente, los compuestos que tienen la siguiente estructura (I):



o un esteroisómero, profármaco o sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que

R_1 , R_2 , R_4 y R_5 son lo mismo o diferente, e individualmente hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alquilo, alcoxi, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heterocicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido; o R_3 tomado junto con R_4 , o R_4 tomado junto con R_5 , y además tomado junto con los respectivos átomos de carbono a los que estos grupos están ligados, forman un arilo fusionado o un heterociclo sustituido o no sustituido.

Los términos anteriores tienen los siguientes significados:

“Alquilo” significa una cadena lineal o ramificada, cíclica o no cíclica, saturada o no saturada, alifática, de hidrocarburos, que contiene entre 1 y 10 átomos de carbono, mientras que el término “alquilo inferior” tiene el mismo significado que el alquilo, pero contiene entre 1 y 6 átomos de carbono. Cadenas de alquilo lineales saturadas representativas incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo o n-hexilo; mientras que alquilos ramificados saturados incluyen isopropilo, *sec*-butilo, isobutilo, *tert*-butilo o isopentilo. Alquilos cíclicos saturados representativos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, $-CH_2$ ciclopropilo, $-CH_2$ ciclobutilo, $-CH_2$ ciclopentilo o $-CH_2$ ciclohexilo; mientras que alquilos cíclicos no saturados incluyen ciclopentenilo y ciclohexenilo. Los alquilos cíclicos, también denominados “anillos homocíclicos”, incluyen anillos di- y poli-homocíclicos tales como decalino y adamantilo. Los alquilos no saturados contienen al menos un puente doble o triple entre átomos de carbono adyacentes (denominados como un “alquenilo” o “alquinilo”, respectivamente). Alquilenilos de cadena lineal y ramificada representativos incluyen etilenilo, propilenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutilenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-

2-butenilo ó 2,3-dimetil-2-butenilo; mientras que alquínulos de cadena recta o ramificada representativos incluyen acetilenilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo ó 3-metil-1-butinilo.

“Arilo” significa un resto carbocíclico aromático tal como el fenilo o naftilo.

“Arilalquilo” significa un alquilo que tiene al menos un átomo de hidrógeno alquilo reemplazado con un resto arilo, tal como bencilo, $-\text{CH}_2(1 \text{ ó } 2\text{-naftilo})$, $-(\text{CH}_2)_2\text{fenilo}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{fenilo}$ ó $-\text{CH}(\text{fenil})_2$.

“Heteroarilo” significa un anillo heterocíclico aromático de 5 a 10 miembros, y que tiene al menos un heteroátomo seleccionado de nitrógeno, oxígeno o azufre, y que contiene al menos 1 átomo de carbono, incluyendo sistemas de anillos tanto mono- como bicíclicos. Heteroarilos representativos incluyen furilo, benzofuranilo, tiofenilo, benzotiofenilo, pirrolilo, indolilo, isoindolilo, azaindolilo, piridilo, quinolinilo, isoquinolinilo, oxazolilo, isooxazolilo, benzoxazolilo, pirazolilo, imidazolilo, bencimidazolilo, tiazolilo, benzotiazolilo, isotiazolilo, piridacinilo, pirimidinilo, piracinilo, triacinilo, cinnolinilo, ptalacinilo o quinazolinilo.

“Heteroarilalquilo” significa un alquilo que tiene al menos un átomo de alquilo hidrógeno reemplazado por un resto heteroarilo, tal como $-\text{CH}_2\text{piridinilo}$ o $-\text{CH}_2\text{pirimidinilo}$.

“Heterociclo” (también denominado aquí como “anillo heterociclo”) significa un anillo heterociclo de 5 a 7 miembros monocíclico, o de 7 a 14 miembros policíclico, que está o bien saturado, o bien es aromático, y que contiene de 1 a 4 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre, y en el que los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado, incluyendo anillos bicíclicos en los que cualquiera de los heterociclos anteriores están fusionados a un anillo de benceno, así como anillos heterocíclicos tricíclicos (y superiores). El heterociclo puede estar ligado a través de cualquier heteroátomo o átomo de carbono. Los heterociclos incluyen heteroarilos como se definieron anteriormente. Así, además de los heteroarilos aromáticos listados previamente, los heterociclos también incluyen morfolinilo, pirrolidinonilo, pirrolidinilo, piperidinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidroprimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo o tetrahidrotiopiranilo.

“Heterocicloalquilo” significa un alquilo que tiene al menos un átomo de alquilo hidrógeno reemplazado con un heterociclo, tal como $-\text{CH}_2\text{morfolinilo}$.

El término “sustituido” significa cualquiera de los grupos anteriores (por ejemplo alquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heterociclo, heterocicloalquilo, etc.), en el que al menos un átomo de hidrógeno está reemplazado con un sustituto. En el caso de un sustituto ceto (“=O”), se reemplazan dos átomos de hidrógeno. Cuando sustituyen, los “sustitutos” incluyen halógeno, hidroxilo, ciano, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, alquilo, alcoxi, alquiltío, haloalquilo, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heteroarilalquilo, heteroarilalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, $-\text{NR}_a\text{R}_b$, $-\text{NR}_a\text{C}(=\text{O})\text{R}_b$, $-\text{NR}_a\text{C}(=\text{O})\text{NR}_b$, $-\text{NR}_a\text{C}(=\text{O})\text{OR}_b$, $-\text{NR}_a\text{SO}_2\text{R}_b$, $-\text{OR}_a$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}_a$, $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}_a$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_a\text{R}_b$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}_a\text{R}_b$, $-\text{SH}$, $-\text{SR}_a$, $-\text{SOR}_a$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{R}_a$, $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{R}_a$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{OR}_a$, donde R_a y R_b son lo mismo o diferente, e independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heteroarilalquilo, heteroarilalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heterocicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido. Por ejemplo, el alquilo sustituido incluye trifluorometilo.

“Halógeno” significa flúor, cloro, bromo y yodo.

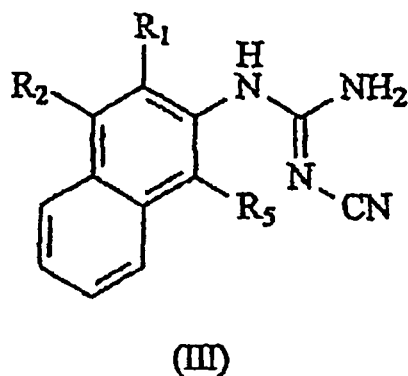
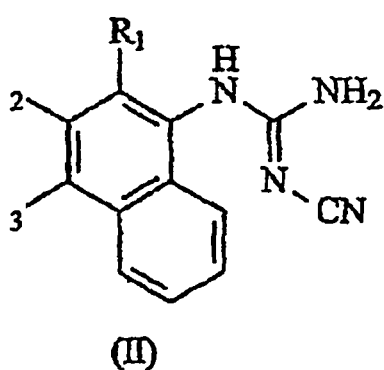
“Haloalquilo” significa un alquilo que tiene al menos un átomo de hidrógeno reemplazado con un halógeno, tal como trifluorometilo.

“Alcoxi” significa un resto alquilo ligado a través de un puente de oxígeno (es decir, $-\text{O}$ -alquilo), tal como metoxi, etoxi.

En una descripción más específica, al menos dos de R_1 a R_5 son hidrógeno, y en otra descripción, al menos tres de R_1 a R_5 son hidrógeno, y todavía en otra descripción al menos cuatro de R_1 a R_5 son hidrógeno.

En otra descripción más, al menos uno de R_1 a R_5 es un heterociclo, tal como morfolinilo.

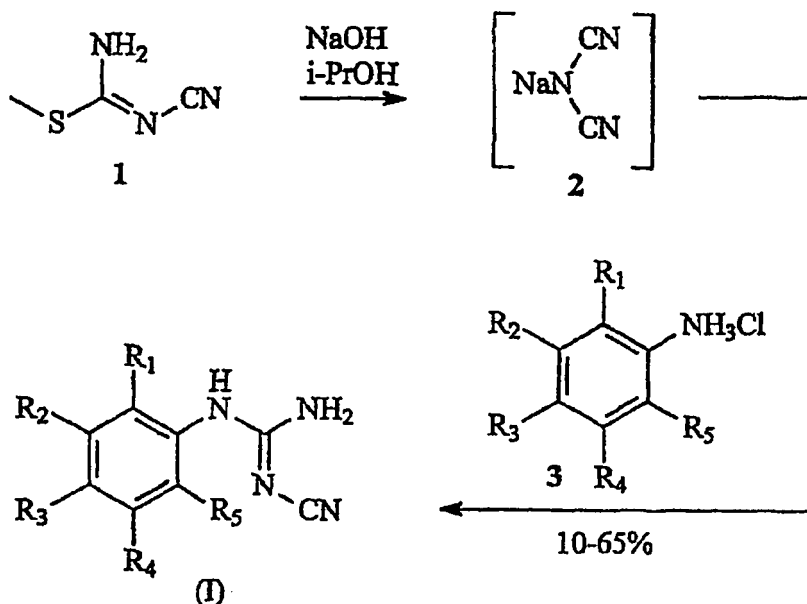
En todavía otra descripción, R_3 tomado junto con R_4 , o R_4 tomado junto con R_5 , y además tomados juntos con el respectivo átomo de carbono a los que estos grupos están ligados, forman un arilo fusionado o un heterociclo sustituido o no sustituido. Por ejemplo, en el caso de un arilo sustituido o no sustituido, los compuestos representativos tienen la siguiente estructura (II), cuando R_4 y R_5 tomados juntos forman un arilo fusionado, y la estructura (III), cuando R_3 y R_4 tomados juntos forman un arilo fusionado:



donde la parte de arilo fusionado de la estructura (II) o (III) puede estar opcionalmente sustituida por uno o más sustitutos como se definieron anteriormente.

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse por técnicas conocidas de síntesis orgánica, incluyendo los métodos descritos en más detalle en los Ejemplos. En general, los compuestos de esta invención pueden prepararse mediante el siguiente Esquema de Reacción:

Esquema de Reacción



En el Esquema de Reacción anterior, la N-ciano-S-metilisotiurea 1 se disuelve en i-PrOH, seguido de la adición de NaOH. La solución resultante se calienta y después se enfría para generar la sal intermedia, la dicianamida de sodio 2. Esta sal intermedia se añade después a la analina 3 apropiadamente sustituida, en HCl. La mezcla de reacción se calienta, se enfría y después se evapora para proporcionar un compuesto de la estructura (I) como un producto crudo, que después puede purificarse para proporcionar un compuesto de la estructura (I) que tiene la pureza deseada.

Como se ha destacado anteriormente, los parámetros clínicos y los criterios para determinar la presencia o el riesgo de una enfermedad artrítica están bien establecidos (por ejemplo, Gilliland *et al.*, "Disorders of the joints and connective tissue", Section 14, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Octava Ed., Thorn *et al.*, eds, McGraw-Hill, New York, NY, 1977, pags. 2048-2080), como lo están los criterios para determinar la presencia o el riesgo de un número de otras enfermedades asociadas con una función mitocondrial alterada, como también se proporcionan aquí (por ejemplo, para AD, McKhann *et al.*, *Neurology* 34:939, 1984; DeKosky *et al.*, *Ann Neurology* 27(5):467-64, 1990; para la diabetes, Gavin *et al.*, *Diabetes Care* 22(suppl. 1):S5-S19, 1999; -otros criterios diagnósticos para enfermedades asociadas con una función mitocondrial alterada serán familiares para los generalmente expertos en la técnica, y basados en la descripción actual). Una "función mitocondrial alterada" puede referirse a cualquier condición o estado, incluyendo aquellos que pueden, según una teoría no limitante, acompañar a una enfermedad artrítica, donde cualquier estructura o actividad que está directa o indirectamente relacionada con una función mitocondrial se ha cambiado de una forma estadísticamente significativa, en relación a un testigo o estándar. La función mitocondrial alterada puede tener su origen en estructuras o eventos extramitocondriales, así como en estructuras o eventos mitocondriales, en interacciones directas entre genes mitocondriales y extramitocondriales y/o sus productos génicos, o en cambios estructurales o

funcionales que ocurren como resultado de las interacciones entre productos intermedios que pueden formarse como resultado de dichas interacciones, incluyendo metabolitos, catabolitos, sustratos, precursores o cofactores.

Adicionalmente, una función mitocondrial alterada puede incluir una alteración de la actividad respiratoria, metabólica o cualquier otra actividad bioquímica o biofísica, en algunas o todas las células de una fuente biológica. Como ejemplos, la actividad ETC marcadamente alterada puede estar relacionada con una función mitocondrial alterada, como puede ser la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS), o la deficiente fosforilación oxidativa. Como otros ejemplos, la alteración del potencial de membrana mitocondrial (por ejemplo, Documento PCT/US99/22261; Documento PCT/US00/17380), la alteración de la regulación mitocondrial de la homeostasis del calcio intracelular (por ejemplo, la Patente de EE UU N° 6.140.067), la inducción de vías de apoptosis y la formación de especies entrecruzadas químicas y bioquímicas atípicas dentro de una célula, por mecanismos enzimáticos o no enzimáticos, también pueden verse como indicativos de una función mitocondrial alterada. Estos y otros ejemplos de función mitocondrial alterada se describen en mayor detalle más adelante.

Sin desear estar ligado a una teoría, una función mitocondrial alterada que puede ser característica de una enfermedad artrítica o de otra enfermedad asociada con función mitocondrial alterada, como aquí se proporciona, puede también estar relacionada con la pérdida del potencial electromecánico de la membrana mitocondrial por mecanismos distintos de la oxidación de radicales libres, por ejemplo por defectos en las vías y transportadores de la membrana transmitocondrial, tales como el transportador mitocondrial nucleótido adenina, o el transportador malato-aspartato, por flujo intracelular de calcio, por defectos en la biosíntesis de ATP, por alteración de la asociación con la porina mitocondrial (también conocida como, por ejemplo, canal de aniones dependiente de voltaje, VDAC) de las hexoquinas u otras enzimas, o por otros eventos. Tal colapso del potencial de la membrana interna mitocondrial puede ser el resultado de efectos directos o indirectos de genes, productos de genes o de moléculas mediadoras relacionadas aguas abajo mitocondriales, y/o de genes, productos de genes o mediadores relacionados aguas abajo extramitocondriales, o por otras causas conocidas o no conocidas.

Como antecedentes, las mitocondrias funcionales contienen productos de genes codificados por genes mitocondriales situados en el DNA mitocondrial (mtDNA), y por genes extramitocondriales (por ejemplo, genes nucleares), no situados en el genoma circular mitocondrial. El mtDNA de 16,5 kb codifica 22 tRNA, dos RNA ribosomales (rRNA) y 13 enzimas de la cadena de transporte de electrones (ETC), el elaborado sistema de ensamblaje multi-complejo mitocondrial en el que, por ejemplo, tiene lugar la fosforilación oxidativa respiratoria. La inmensa mayoría de las proteínas estructurales y funcionales mitocondriales están codificadas por genes extramitocondriales y en la mayoría de los casos, presumiblemente nucleares. Según esto, los genes mitocondriales y extramitocondriales pueden interactuar directamente, o indirectamente a través de productos de genes y sus intermediarios aguas abajo, incluyendo metabolitos, catabolitos, sustratos, precursores o cofactores. Las alteraciones en la función mitocondrial, por ejemplo la alteración en la actividad de transporte de electrones, la fosforilación oxidativa defectuosa o el aumento de la producción de radicales libres, pueden por lo tanto emerger como resultado de un mtDNA defectuoso, un DNA extramitocondrial defectuoso, productos de genes mitocondriales o extramitocondriales defectuosos, intermediarios aguas abajo defectuosos, o una combinación de éstos y otros factores.

Según ciertas realizaciones de la presente invención, cuando se relacionan con una enfermedad artrítica y/o una enfermedad asociada con una función mitocondrial alterada, la determinación de la función mitocondrial alterada (por ejemplo, aumento o disminución de una forma estadísticamente significativa en relación a un testigo), puede implicar la monitorización de la homeostasis intracelular de calcio y/o las respuestas celulares a las perturbaciones de esta homeostasis, incluyendo la regulación fisiológica y patofisiológica del calcio. En particular, según estas realizaciones, una respuesta celular a un calcio intracelular elevado en una muestra biológica de un sujeto conocido o sospechoso de padecer una enfermedad asociada con una función mitocondrial alterada, se compara con la respuesta en una muestra biológica de un sujeto de control. El intervalo de respuestas celulares a la elevación del calcio intracelular es muy amplio, como lo es el intervalo de métodos y reacciones para la detección de dichas respuestas. Muchas respuestas celulares específicas son conocidas para los habitualmente expertos en la técnica; estas respuestas dependerán de los tipos particulares de células presentes en una muestra biológica seleccionada. Como ejemplos no limitantes, las respuestas celulares a una elevación del calcio intracelular incluyen la secreción de productos secretorios específicos, exocitosis de componentes preformados particulares, aumento en el metabolismo del glucógeno y proliferación de células (véase, por ejemplo, Clapham, *Cell* 80:259, 1995; Cooper, *The Cell - A Molecular Approach*, 1997 ASM Press, Washington, DC; Alberts B, Bray D, *et al.*, *Molecular Biology of the Cell*, 1995 Garland Publishing, NY).

Como un breve recordatorio, las alteraciones normales del Ca^{2+} mitocondrial se asocian con una regulación metabólica normal (Dykens, 1998 en *Mitochondria & Free Radicals in Neurodegenerative Diseases*, Beal, Howell y Bodis-Wolner, Eds., Wiley-Liss, New York, págs. 29-55; Radi *et al.*, 1998 en *Mitochondria & Free Radicals in Neurodegenerative Diseases*, Beal, Howell y Bodis-Wolner, Eds., Wiley-Liss, New York, págs. 57-89; Gunter y Pfeiffer, *Am J Physiol* 27:C755, 1991; Gunter *et al.*, *Am J Physiol* 267:313, 1994). Por ejemplo, los niveles fluctuantes de Ca^{2+} libre mitocondrial pueden ser los responsables de la regulación del metabolismo oxidativo en respuesta a una utilización aumentada de ATP, a través de la regulación alostérica de enzimas (revisado por Crompton *et al.*, *Basic Res Cardiol* 88:513-23, 1993) y el vehículo glicerofosfato (Gunter *et al.*, *J Bioenerg Biomembr* 26:471, 1994).

La función mitocondrial normal incluye la regulación de los niveles de calcio libre citosólico, mediante el secuestro del exceso de Ca^{2+} dentro de la matriz mitocondrial. Dependiendo del tipo celular, la concentración citosólica de Ca^{2+} es típicamente 50-100 nM: En células que funcionan normalmente, cuando los niveles de Ca^{2+} alcanzan 200-300 nM,

las mitocondrias comienzan a acumular Ca^{2+} como una función de equilibrio entre el influjo a través de un uniportador de Ca^{2+} en la membrana mitocondrial interna y el reflujo de Ca^{2+} a través de transportadores tanto dependientes de Na^+ como independientes de Na^+ . En ciertas instancias, tal perturbación de la homeostasis del calcio intracelular es un hecho de las enfermedades asociadas con una función mitocondrial alterada, sin tener en cuenta si la disfunción regulatoria del calcio es causa de, o consecuencia de, una función mitocondrial alterada.

Los niveles elevados de calcio mitocondrial pueden acumularse como respuesta a una elevación inicial en el calcio libre citosólico, como se describió previamente. Dichas concentraciones elevadas de calcio mitocondrial, en combinación con un ATP reducido u otras condiciones asociadas con la patología mitocondrial, puede llevar al colapso del potencial de la membrana interna mitocondrial (véase Gunter *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1366:5, 1998; Rottenberg y Marbach, *Biochim Biophys Acta* 1016:87, 1990). Generalmente, el nivel extramitocondrial (citosólico) de Ca^{2+} en una muestra biológica es mayor que el presente dentro de la mitocondria. En el caso de una enfermedad asociada con una función mitocondrial alterada, los niveles de calcio mitocondrial o citosólico pueden variar desde los intervalos anteriores, y puede estar en el intervalo, por ejemplo, de desde alrededor de 1 nM hasta alrededor de 500 nM, más típicamente desde alrededor de 10 nM hasta alrededor de 100 μM , y generalmente de desde alrededor de 20 nM hasta alrededor de 1 μM , donde “alrededor” indica $\pm 10\%$. Se conocen una variedad de indicadores de calcio en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, por ejemplo, fura-2 (McCormack *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 973:420, 1989); mag-fura-2; BTC (Patente de EE UU N° 5.501.980); fluo-3, fluo-4 y fluo-5N (Patente de EE UU N° 5.049.673); rhod-2; benzotiaz-2 (todos los cuales están disponibles de Molecular Probes, Eugene, OR). Estos y otros medios para monitorizar el calcio intracelular están contemplados para determinar la presencia de una función mitocondrial alterada (véase, por ejemplo, PCT/US01/01500).

Así, para determinar una función mitocondrial alterada que se manifiesta como una respuesta celular a una elevación del calcio intracelular, los compuestos que inducen el aumento de las concentraciones citoplasmáticas y mitocondriales de Ca^{2+} , incluyendo los ionóforos de calcio, son bien conocidos para los expertos en la técnica, así como lo son los métodos para medir el calcio intracelular (véase, por ejemplo, Gunter y Gunter, *J Bioenerg Biomembr* 26:471, 1994; Gunter *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1366:5, 1998; McCormack *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 973:420, 1989; Orrenius y Nicotera, *J Neural Transm Suppl* 43:1, 1994; Leist y Nicotera, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 132:79, 1998; y Haugland, 1996, *Handbook of Fluorescent Probes and research Chemicals- Sexta Ed.*, Molecular Probes, Eugene, OR). Según esto, una persona experta en la técnica puede fácilmente seleccionar un ionóforo adecuado (u otro compuesto que de como resultado un aumento en las concentraciones de Ca^{2+} citoplasmático y/o mitocondrial), y unos medios apropiados para detectar el calcio intracelular, que puedan utilizarse para identificar una función mitocondrial alterada, de acuerdo con la descripción actual y con métodos bien conocidos.

El influjo de Ca^{2+} al interior de la mitocondria parece ser mayoritariamente dependiente, y puede ser completamente dependiente, del potencial electroquímico transmembrana negativo ($\Delta\Psi$), establecido en la membrana interna mitocondrial por transferencia de electrones, y dicho influjo deja de ocurrir en ausencia de $\Delta\Psi$ incluso cuando se impone un gradiente de concentración de Ca^{2+} ocho veces mayor (Kapus *et al.*, 1991 *FEBS Let* 282:61). Según esto, las mitocondrias pueden liberar Ca^{2+} cuando el potencial de membrana se disipa, como ocurre con desligadores como 2,4-dinitrofenol y carbonil-cianuro-p-trifluoro-metoxifenilhidrazona (FCCP). Así, según ciertas realizaciones de la presente invención, el colapso de $\Delta\Psi$ puede potencialmente producirse por influjos de calcio libre citosólico al interior de la mitocondria, así como puede ocurrir bajo ciertas condiciones fisiológicas, incluyendo las encontradas por células de un sujeto que tiene una enfermedad artrítica. La detección de dicho colapso puede conseguirse por una variedad de métodos como se proporcionan aquí.

En ciertas realizaciones relacionadas de la invención, el potencial de la membrana mitocondrial alterado (por ejemplo, aumentado o disminuido de una forma estadísticamente significativa en relación a un testigo), puede ser un indicador de una función mitocondrial alterada. Típicamente, el potencial de la membrana mitocondrial puede determinarse según métodos que son familiares para los expertos en la técnica, incluyendo la detección y/o la medida de compuestos detectables tales como indicadores fluorescentes, sondas ópticas y/o electrodos PH sensibles e ión-selectivos (véase, por ejemplo, Emster *et al.*, *J Cell Biol* 91:227s, 1981; y las referencias allí citadas; véase también Haugland, 1996 *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemical- Sexta Ed.* Molecular Probes, Eugene, OR, pags. 266-274 y 589-594). Por ejemplo, como medio de ilustración, las sondas fluorescentes 2-,4-dimetilaminostiril-N-metil piridino (DASPM) y los ésteres de tetrametilrodamina (tales como, por ejemplo metil éster de tetrametilrodamina, TMRM; etil éster de tetrametilrodamina, TMRE), o los compuestos relacionados (véase, por ejemplo, Haugland, 1996, *arriba*), pueden cuantificarse después de su acumulación en la mitocondria, un proceso que es dependiente de, y proporcional a, el potencial de membrana mitocondrial (véase, por ejemplo, Murphy *et al.*, 1998, en *Mitochondria & Free Radicals in Neurodegenerative Diseases*, Beal, Howell y Bodis-Wollner, Eds., Wiley-Liss, New Cork, pags. 159-186, y las referencias allí citadas; y *Molecular Probes On-line Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, en <http://www.probes.com/handbook/toc/html>). Otros compuestos fluorescentes detectables que pueden utilizarse en la invención incluyen rodamina 123, hexil éster de rodamina B, DiOC₆(3), JC-1 [Yoduro de 5,5',6,6'-Tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbencimidazol-carbocianina] (véase Patente de EE UU N° 5.049.673; todos los compuestos precedentes están disponibles de Molecular Probes, Eugene, Oregón) y la rodamina 800 (Lambda Physik, GMBH, Göttingen, Alemania; véase Sakanoue *et al.*, *J Biochem* 121:29, 1997). Los métodos para monitorizar el potencial de la membrana mitocondrial también se describen en la Solicitud de EE UU N° 09/161.172.

El potencial de membrana mitocondrial puede también medirse por métodos no fluorescentes, por ejemplo, utilizando TTP (ión de tetrafenilfosfonio), y un electrodo sensible a TTP (Kamo *et al.*, *Membrana Biol* 49:105, 1979;

Porter y Brand, *Am J Physiol* 269:R1213, 1995). Los expertos en la técnica serán capaces de seleccionar compuestos detectables apropiados u otros medios apropiados para medir el $\Delta\Psi$ m. Como ejemplo, pero no como limitación, la TMRM es de alguna forma preferible a la TMRE porque, después del flujo desde las mitocondrias, la TMRE proporciona una señal residual levemente mayor en el retículo endoplásmico y en el citoplasma que la TMRM.

Como otro ejemplo, el potencial de membrana puede ser adicionalmente o alternativamente calculado a partir de medidas indirectas de la permeabilidad mitocondrial a solutos cargados detectables, utilizando volumen de matriz y/o determinación de redox del nucleótido piridina, combinadas con cuantificación espectrofotométrica o fluorimétrica. La medida del potencial de membrana dependiente del intercambio-difusión de un sustrato a través de la membrana mitocondrial interna puede también proporcionar una medida indirecta del potencial de membrana (Véase, por ejemplo, Quinn, 1976, *The Molecular Biology of Cell Membranes*, University Park Press, Baltimore, Maryland, pags. 200-217, y las referencias allí citadas).

La exquisita sensibilidad a las extraordinarias acumulaciones de Ca^{2+} que resultan de la elevación del calcio intracelular, como se describió anteriormente, puede también caracterizar una enfermedad asociada con una función mitocondrial alterada. Adicionalmente, una variedad de agentes pertinentes fisiológicamente, incluyendo el hidropéroxido y los radicales libres, pueden actuar sinérgicamente con el Ca^{2+} para inducir el colapso de $\Delta\Psi$ (Novgorodov *et al.*, *Biochem Biophys Acta* 1058:242, 1991; Takeyama *et al.*, *Biochem J* 294:719, 1993; Guidox *et al.*, *Arch Biochem Biophys* 306:139, 1993). Según esto, los ejemplos de métodos para determinar una función mitocondrial alterada que se manifiesta en las respuestas celulares a una elevación del calcio intracelular, o como un potencial de membrana mitocondrial alterado, incluyen los ensayos de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$ m) (descritos en la Solicitud de Patente de EE UU copendiente, con N° de Serie 60/140.433), y los ensayos de transición de permeabilidad mitocondrial (MPT) (descritos en la Solicitud de Patente de EE UU copendiente, con N° de Serie 09/161.172).

Una función mitocondrial alterada también puede determinarse comparando una respuesta celular a un estímulo de inducción de apoptosis ("apoptogénico") en una muestra biológica de (i) un sujeto que se cree que tiene riesgo para una enfermedad asociada a una función mitocondrial alterada, y (ii) un sujeto de control. El intervalo de las respuestas celulares a varios estímulos apoptogénicos conocidos es amplia, como lo es el intervalo de métodos y reactivos para la detección de dichas respuestas. Está por lo tanto dentro de la contemplación de la presente invención, determinar una enfermedad asociada con una función mitocondrial alterada, comparando una respuesta celular a un estímulo apoptogénico, donde dicha respuesta es un indicador de una función mitocondrial alterada como aquí se proporciona.

Como se ha destacado anteriormente, la disfunción mitocondrial y/o los elevados niveles de ROS relacionados, pueden iniciar precozmente eventos que llevan a la apoptosis en varios tipos celulares (Kroemer *et al.*, *FASEB J* 9:1277-87, 1995; Zamzami *et al.*, *J Exp Med* 182:367-77, 1995; Zamzani *et al.*, *J Exp Med* 181:1661-72, 1995; Ausserer *et al.*, *Mol Cell Biol* 14:5032-42, 1994). En varios tipos celulares, la reducción en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$ m) precede a la degradación de DNA nuclear que acompaña a la apoptosis. En sistemas libres de células, las fracciones enriquecidas en mitocondrias, pero no las nucleares, son capaces de inducir apoptosis nuclear (Newmeyer *et al.*, *Cell* 70:353-64, 1994). La perturbación de la actividad respiratoria mitocondrial que lleva a estados metabólicos celulares alterados, tales como una elevación de ROS intracelular, puede ocurrir en una enfermedad asociada con una función mitocondrial alterada y puede posteriormente inducir eventos patogénicos a través de mecanismos apoptóticos.

Las mitocondrias estresadas oxidativamente pueden liberar un factor soluble preformado, que puede inducir condensación cromosómica, un evento que precede a la apoptosis (Marchetti *et al.*, *Cancer Res* 56:2033-38, 1996). Además, miembros de la familia Bcl-2 de productos génicos anti-apoptóticos están localizados dentro de la membrana mitocondrial externa (Monaghan *et al.*, *J Histochem Cytochem* 40:1819-25, 1992), y estas proteínas parecen proteger las membranas del estrés oxidativo (Korsmayer *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1271:63, 1995). La localización de Bcl-2 en esta membrana parece ser indispensable para la modulación de la apoptosis (Niguyen *et al.*, *J Biol Chem* 269:16521-24, 1994). Así, los cambios en la fisiología de la mitocondria pueden ser importantes mediadores de la apoptosis.

Una función mitocondrial alterada, como puede utilizarse para identificar un riesgo para una enfermedad asociada con una función mitocondrial alterada en un sujeto, según la presente invención, puede de esta forma disminuir el dintel para la inducción de apoptosis por un apoptógeno. Una variedad de apoptógenos son conocidos para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo Green *et al.*, *Science* 281:1309, 1998; y las referencias allí citadas), y puede incluir, como ejemplos y no como limitación, apoptógenos que, cuando se añaden a las células bajo condiciones apropiadas, con las que los expertos en la técnica serán familiares, requieren receptores específicos tales como el factor de necrosis tumoral, FasL, glutamato, NMDA, IL-1, IL-3, corticosterona, o receptores de mineralocorticoides o glucocorticoides. Los apoptógenos también pueden incluir herbimicina A (Manzini *et al.*, *J Cell Biol* 138:449-69, 1997); paracuat (Constantini *et al.*, *Toxicology* 99:1-2, 1995); etilén glicoles; inhibidores de proteína quinasas tales como, por ejemplo estaurosporina, callostina C, fenetil éster de ácido cafeico, cloruro de queleritrina, genisteína; 1-(5-isoquinolinesulfonil)-2-metilpiperacina; N-[2-((p-bromocinamil)amino)etilo]-5-5-isoquinolinesulfonamida; KN-93; quercitina; derivados de d-eritro-esfingosina, radiación UV; ionóforos tales como, por ejemplo ionomicina, valinomicina y otros ionóforos conocidos en la técnica; inductores de MAP quinasas tales como, por ejemplo, anisomicina y anandamina; bloqueantes del ciclo celular tales como, por ejemplo afidicolina, colcemid, 5-fluoracilo y homoharringtonina; inhibidores de la acetil colinesterasa tales como, por ejemplo, berberina; anti-estrógenos tales como, por ejemplo tamoxifeno; pro-oxidantes, tales como, por ejemplo hidropéroxido de *tert*-butilo, peroxinitrilo, peróxido de hidrógeno y donantes de óxido nítrico, incluyendo pero no limitándose a L-arginina, 5,5'-dinitrosoditiol, N-hidroxi-L-arginina,

S-nitroso-N-acetilpenicilamina, S-nitrosoglutation, NOR-1, NOR-3, NOR-4, 4-fenil-3-furoxancarbonitrilo, 3-morfolinonidnonimina, nitroprusiato sódico y estreptoizotocina; agentes depleccionadores de glutatión tales como, por ejemplo ácido etacrínico (Meister, *Biochim Biophys Acta* 1271:35, 1995); radicales libres tales como por ejemplo, óxido nítrico, iones metálicos inorgánicos, tales como, por ejemplo cadmio; inhibidores de la síntesis de DNA tales como, por ejemplo, actinomicina D; intercaladores de DNA tales como, por ejemplo doxorubicina, sulfato de bleomicina, hidroxiaurea, metotrexate, mitomicina C, camptotecina, y daunorubicina; inhibidores de la síntesis proteica tales como, por ejemplo cicloheximida, puomicina, y rapamicina; agentes que afectan a la formación o la estabilidad de los microtúbulos, tales como, por ejemplo: vinblastina, vincristina, colchicina, 4-hidroxifenilretinamida, y paclitaxel; y otros inductores de MPT tales como, por ejemplo, proteína Bax (Jurgenmeier *et al.*, *PNAS* 95:4997-5002, 1998); calcio y fosfato inorgánico (Kroemer *et al.*, *Ann Rev Physiol* 60:619, 1998).

Las células en una muestra biológica que son sospechosas de estar desarrollando apoptosis pueden examinarse para cambios morfológicos, de permeabilidad, u otros cambios que son indicadores de un estado apoptótico. Por ejemplo, como ilustración, la apoptosis en muchos tipos celulares pueden producir una apariencia morfológica alterada, tal como la formación de burbujas en la membrana plasmática, cambios de la forma celular, pérdida de las propiedades de adhesión al sustrato, u otros cambios morfológicos que pueden ser fácilmente detectables por una persona experta en la técnica, por ejemplo utilizando un microscopio de luz. Como otro ejemplo, las células que están desarrollando apoptosis pueden exhibir fragmentación y desintegración de cromosomas, que pueden ser aparentes por microscopía y/o a través del uso de tinciones específicas de DNA o específicas de cromatina, que son conocidos en la técnica, incluyendo tinciones fluorescentes. Dichas células pueden también exhibir unas propiedades de permeabilidad de membrana plasmática alterada, como puede ser fácilmente detectada a través del uso de tinciones vitales (por ejemplo yoduro de propidio, azul tripán), o mediante la detección de la salida de lactato deshidrogenada al espacio extracelular. Estos y otros medios para detectar células apoptóticas mediante criterios morfológicos, permeabilidad de la membrana plasmática alterada, y otros cambios relacionados serán aparentes para los expertos en la técnica.

Alternativamente, donde el indicador de una función mitocondrial alterada es una respuesta celular a un apoptógeno, las células en una muestra biológica pueden analizarse para la translocación de la fosfatidilserina (PS) de la membrana celular, desde la capa interna a la externa de la membrana plasmática, que puede detectarse, por ejemplo, midiendo la unión de la capa externa por la proteína específica de PS, anexina (Martin *et al.*, *J Exp Med* 182:1545, 1996; Fadck *et al.*, *J Immunol* 148:2207, 1992). En todavía otro método para determinar una función mitocondrial alterada, monitorizando una respuesta celular a un apoptógeno, la respuesta celular al apoptógeno se determina mediante un ensayo para inducción de actividad proteasa específica en cualquier miembro de una familia de proteasas activadas por apoptosis, conocidas como caspasas (véase, por ejemplo, Green *et al.*, *Science* 281:1309, 1998). Los expertos en la técnica serán fácilmente familiares con los métodos para determinar la actividad caspasa, por ejemplo mediante determinación de la escisión mediada por caspasa de sustratos proteicos específicamente reconocidos. Estos sustratos pueden incluir, por ejemplo, poli-(ADP-ribosa)polimerasa (PARP), u otros péptidos o proteínas naturales o sintéticos escindidos por las caspasas que se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Ellerby *et al.*, *J Neurosci* 17:6165, 1997). El péptido sintético Z-Tir-Val-Ala-Asp-AFC (SEQ ID NO: 1), en el que Z indica un resto benzoil-carbonilo, y AFC indica 7-amino-4-trifluorometilcoumarina (Kluck *et al.*, *Science* 275:1132, 1997; Nicholson *et al.*, *Nature* 376:37, 1995), es uno de tales sustratos. Otro ejemplo de sustratos incluye proteínas nucleares tales como U1-70kDa y DNA-PKcs (Rosen y Casciola-Rosen, *J Cell Biochem* 64:50, 1997; Cohen, *Biochem J* 326:1, 1997).

Como se ha descrito previamente, la membrana interna mitocondrial puede exhibir una permeabilidad altamente selectiva y regulada para muchos pequeños solutos, pero es impermeable a moléculas grandes (>-10 kDa) (Véase, por ejemplo, Quinn, 1976, *The Molecular Biology of Cell Membranes*, University Park Press, Baltimore, Maryland). En las células que están desarrollando apoptosis, sin embargo, el colapso del potencial de la membrana mitocondrial puede estar acompañado por un aumento en la permeabilidad que permite la difusión de macromoléculas a través de la membrana mitocondrial. Así, en otro método para analizar una respuesta celular a un apoptógeno, la detección de una proteína mitocondrial, por ejemplo el citocromo c o una proteína del espacio intermembrana, que ha escapado de las mitocondrias en las células apoptóticas, puede proporcionar evidencia de una respuesta a un apoptógeno que puede determinarse fácilmente (Liu *et al.*, *Cell* 86:147, 1996). Dicha detección del citocromo c puede realizarse espectrofotométricamente, inmunoquímicamente, o mediante otros métodos bien establecidos para determinar la presencia de una proteína específica.

Por ejemplo, la liberación de citocromo c de células estimuladas con estímulos apoptóticos (por ejemplo, ionomina, un ionóforo de calcio bien conocido), puede monitorizarse mediante una variedad de métodos inmunológicos. La espectrometría de masas asistida por matriz de ionización desorción de láser tiempo-de-vuelo (Matriz-assisted laser desorption ionization time-of-flight) (MALDI-TOF), asociada con captura de afinidad, es particularmente adecuada para tales análisis, ya que el apo-citocromo c y el holo-citocromo c pueden distinguirse sobre la base de sus pesos moleculares únicos. Por ejemplo, el sistema Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization (SELDI™) (Ciphergen, Palo Alto, California), puede utilizarse para detectar el citocromo c liberado de las mitocondrias en células tratadas con apoptógeno. En esta aproximación, un anticuerpo específico contra citocromo c inmovilizado en un sustrato sólido, se utiliza para capturar el citocromo c presente en un extracto celular soluble. La proteína capturada es después recogida en una matriz de una molécula de absorción de energía (EAM) y se desabsorbe de la superficie del soporte sólido utilizando excitación de láser pulsado. La masa molecular de la proteína se determina por su tiempo de vuelo al detector del espectrómetro de masas SELDI™.

Una persona experta en la técnica apreciará fácilmente que puede haber otras técnicas adecuadas para cuantificar la apoptosis, y dichas técnicas, utilizadas con el propósito de determinar una función mitocondrial alterada, como se manifiesta en una respuesta celular a un estímulo apoptogénico, están dentro del alcance de los métodos proporcionados por la presente invención.

La detección de la producción de radicales libres en una muestra biológica puede también emplearse para determinar la presencia de una función mitocondrial alterada, en una muestra biológica de un sujeto. Aunque las mitocondrias son una fuente primaria de radicales libres en sistemas biológicos (véase, por ejemplo, Murphy *et al.*, 1998 en *Mitochondria and Free Radicals in Neurodegenerative Diseases*, Beal, Howell y Bodis-Wollner, Eds., Wiley-Liss, New York, Cork, págs 159-186, y las referencias allí citadas), la invención no debería así limitarse, y la producción de radicales libres puede ser un indicador de una función mitocondrial alterada, sin tener en cuenta el lugar de la fuente subcelular particular. Por ejemplo, numerosas vías intracelulares bioquímicas que llevan a la formación de radicales, a través de la producción de metabolitos tales como peróxido de hidrógeno, óxido nítrico o radical superóxido, por medio de reacciones catalizadas por enzimas tales como las oxidasas ligadas a flavina, la superóxido dismutasa o la sintetasa de óxido nítrico, son bien conocidas en la técnica, como lo son los métodos utilizados para detectar tales radicales (véase, por ejemplo, Kelver, *Crit Rev Toxicol* 23:21, 1993; Halliwell B *et al.*, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 1989, Clarendon Press, Oxford, Reino Unido; Davies, KJA *et al.*, *The Oxygen Paradox*, Cleup Univ Press, Padua, Italia). Una función mitocondrial alterada, tal como el fracaso en cualquier etapa de la ETC, puede también llevar a la generación de radicales libres altamente reactivos. Como se ha resaltado anteriormente, los radicales resultantes de una función mitocondrial alterada incluyen especies reactivas de oxígeno (ROS), por ejemplo, radicales superóxido, peroxinitrilo e hidroxilo, y potencialmente otras especies reactivas que pueden ser tóxicas para las células. Según esto, en ciertas realizaciones preferidas de la invención, un indicador de una función mitocondrial alterada puede ser una especie de radical libre detectable, presente en una muestra biológica. En ciertas realizaciones particularmente preferidas, el radical libre detectable será un ROS.

Los métodos para detectar un radical libre que puede ser útil como indicador de una función mitocondrial alterada son conocidos en la técnica, y dependerán del radical particular. Típicamente, un nivel de producción de radical libre en una muestra biológica puede determinarse según los métodos con los que los expertos en la técnica sean fácilmente familiares, incluyendo la detección y/o medida de: productos de glicosilación incluyendo pentosidina, carboximetilisina y pirrolina; productos de lipoxidación incluyendo glioxal, malondialdehído y 4-hidroxinonenal; sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS; véase, por ejemplo, Steinbrecher *et al.*, *Proc Nat Acad Sci USA* 81:3883, 1984; Wolf, *Br Med Bull* 49:642, 1993) y/o otros medios de detección química tales como el atrapamiento de radicales hidroxilo por salicilato (por ejemplo, Guiselli *et al.*, *Meths Mol Biol* 108:89, 1998; Halliwell *et al.*, *Free Radic Res* 27:239, 1997) o formación de aductos específicos (véase, por ejemplo, Macocci *et al.*, *Ann Neurol* 34:609, 1993; Giulivi *et al.*, *Meths Enzymol* 233:363, 1994), incluyendo la formación de malondialdehído, la nitrosilación de proteínas, la oxidación de DNA, incluyendo la oxidación de DNA mitocondrial, los aductos 8'-OH-guanosina (por ejemplo, Beckman *et al.*, *Mutant Res* 424:51, 1999, la oxidación de proteínas, la modificación carbonilo de proteínas (por ejemplo, Baynes *et al.*, *Diabetes* 40:405, 1991; Baynes *et al.*, *Diabetes* 48:1, 1999), las sondas de resonancia de spin electrones (ESR), la voltametría cíclica, los indicadores fluorescentes y/o quimioluminiscentes (véase también por ejemplo, Greenwald, RA (ed), *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, 1985, CRC Press, Boca Raton, FL; Acworth y Balley, (eds.), *Handbook of Oxidative Metabolism*, 1995, ESA, Inc., Chelmsford, MA; Yla-Herttuala *et al.*, *J Clin Invest* 84:1086, 1989; Velazques *et al.*, *Diabetes Medicine* 8:752, 1991; Belch *et al.*, *Int Arcgiol* 14:385, 1995; Sato *et al.*, *Biochem Med* 21:104, 1979; Traversa *et al.*, *Diabetología* 41:265, 1998; Haugland, 1996 *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals-Sexta Ed.*, Molecular Probes, Eugene, OR, págs. 483-502, y las referencias allí citadas). Por ejemplo, como ilustración, la oxidación de las sondas fluorescentes diclorodihidrofluoresceína diacetato y su derivado carboxilado carboxidiclorodihidrofluoresceína diacetato (véase, por ejemplo, Haugland, 1996, arriba), pueden cuantificarse después de la acumulación en células, un proceso que es dependiente de, y proporcional a, la presencia de especies de oxígeno reactivas (véase también, por ejemplo, *Molecular Probes On-line Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, en <http://www.probes.com/hadbook/toc.html>). Otros compuestos fluorescentes detectables que pueden utilizarse en la invención, para la detección de producción de radicales libres incluyen los derivados dihidrorrodamina y dihidrorrosamina, el ácido cis-perinárico, los derivados resorufino, la lucigenina y cualquier otro compuesto adecuado que puede ser conocido para los expertos en la técnica.

Así, como también se ha descrito anteriormente, el daño mediado por radicales libres puede inactivar una o más de la miríada de proteínas de la ETC, y haciendo eso, puede desacoplar el mecanismo quimiosmótico mitocondrial responsable de la fosforilación oxidativa y de la producción de ATP. Los indicadores de una función mitocondrial alterada que son factores de biosíntesis de ATP, incluyendo la determinación de la producción de ATP, se describen en mayor detalle, por ejemplo, en el Documento PCT/US00/25317 y en la Patente de EE UU N° 6.140.067. El daño mediado por radicales libres a la integridad funcional mitocondrial es solo un ejemplo de los múltiples mecanismos asociados con una función mitocondrial alterada que pueden dar como resultado un colapso del potencial electroquímico mantenido en la membrana mitocondrial interna. Los métodos para detectar cambios en el potencial de la membrana mitocondrial interna están descritos anteriormente, y en la solicitud de patente de EE UU co-pendiente número 09/161.172.

Las muestras biológicas pueden comprender cualquier tejido o preparación celular en la que al menos puede detectarse un indicador candidato de una función mitocondrial alterada, y puede variar de naturaleza de acuerdo a esto, dependiendo del indicador(es) particular que se va a comparar. Así, como será aparente para los expertos en la técnica con la descripción aquí incluida, en ciertas realizaciones altamente preferidas, las muestras biológicas comprenden células o preparaciones celulares que contienen mitocondrias, y en ciertas otras realizaciones preferidas, las muestras

biológicas pueden comprender partículas submitocondriales. Las muestras biológicas pueden proporcionarse mediante la obtención de una muestra de sangre, un espécimen de biopsia, un explante de tejido, un cultivo orgánico y cualquier otro tejido o preparación celular de un sujeto o una fuente biológica. El sujeto o fuente biológica puede ser un animal humano o no humano, un cultivo celular primario o un cultivo de una línea celular adaptada, incluyendo líneas celulares modificadas genéticamente que pueden contener secuencias de ácidos nucleicos recombinantes integradas o episomales, líneas celulares inmortalizadas o inmortalizables, líneas celulares de células somáticas híbridas o de citoplasma híbrido ("cíbridas"), líneas celulares diferenciadas o diferenciables, o líneas celulares transformadas. En realizaciones particularmente preferidas, el sujeto o fuente biológica es un vertebrado humano o no humano, y en otras realizaciones particularmente preferidas el sujeto o fuente biológica es un cultivo celular primario derivado de un vertebrado o una línea celular adaptada a cultivo, como aquí se proporciona. Como un ejemplo y medio de ilustración, en ciertas realizaciones la invención se contempla una muestra biológica que puede ser un tejido o preparación celular de un no vertebrado, que ha sido manipulado artificialmente, por ejemplo a través de ingeniería genética recombinante, para contener uno o más genes, productos de genes o similares, derivados de vertebrados, tales como componentes moleculares mitocondriales y/o factores de biosíntesis de ATP, como se proporcionan, por ejemplo en el Documento PCT/US00/25317 y en la Patente de EE UU N° 6.140.067. Por ejemplo, un número de líneas celulares de levaduras e insectos pueden reconstituirse fácilmente con componentes derivados de vertebrados heterólogos, según los métodos establecidos con los que los expertos en la técnica serán familiares, para generar un modelo de sistema para una enfermedad asociada con una función mitocondrial alterada como aquí se proporciona.

En ciertas otras realizaciones particularmente preferidas de la invención, el sujeto o fuente biológica puede ser un sujeto sospechoso de tener o de estar en riesgo para tener una enfermedad artrítica y/o una enfermedad asociada con una función mitocondrial alterada, y en ciertas realizaciones preferidas de la invención, el sujeto o fuente biológica puede ser conocida por estar libre de el riesgo o la presencia de tal enfermedad. En ciertas otras realizaciones preferidas, en las que es deseable determinar si o no un sujeto o fuente biológica cae dentro de los parámetros indicativos de una enfermedad artrítica, pueden utilizarse los signos y síntomas de una enfermedad artrítica que son aceptados por los expertos en la técnica, para designar a un sujeto o fuente biológica, por ejemplo los signos clínicos referidos en *Primer on the Rheumatic Diseases* (7ª Edición, JH Klippel (ed), 1997, The Arthritis Foundation, Atlanta, GA), y las referencias allí citadas, u otros métodos conocidos en la técnica del diagnóstico de una enfermedad artrítica. De forma similar, los parámetros clínicos indicativos de ciertas otras enfermedades asociadas con una función mitocondrial alterada como aquí se proporciona, son conocidos en la técnica y se han discutido anteriormente.

En ciertas realizaciones de la invención, las muestras biológicas de un sujeto o una fuente biológica en la que se ha detectado al menos una función mitocondrial alterada, pueden compararse antes y después de hacer contactar al sujeto o la fuente biológica con una composición de la estructura (I), tal como un agente aril N-cianoguanidino como aquí se proporciona, por ejemplo, para identificar una función mitocondrial candidata en la que el agente es capaz de efectuar un cambio, relativo al nivel de la función mitocondrial antes de la exposición del sujeto o fuente biológica al agente.

En una realización más preferida de la invención, el contenido de la muestra biológica en la que se determina una función mitocondrial alterada, comprende un condrocito, y todavía más preferiblemente, un condrocito articular. Los condrocitos pueden obtenerse, por ejemplo, de tejido cartilaginoso maduro normal. Por ejemplo, las Patentes de EE UU N° 4.846.835 y N° 5.041.138, describen el aislamiento de condrocitos mediante digestión del cartílago articular en una solución de colagenasa, seguido de la expansión mitótica de los condrocitos *in vitro*. En otra realización preferida de la invención, la muestra biológica que contiene al menos un indicador candidato de una función mitocondrial alterada, puede comprender una vesícula de matriz (MV) derivada de un condrocito (por ejemplo, Anderson, *Rheum Dis Clin North AMER* 14:303, 1988; Doyle, *J Pathol* 136:199, 1982; Doherty, *Hosp. Pract Off Ed* 29:93, 1994), por ejemplo, una MV preparada según uno cualquiera de una serie de procedimientos establecidos (por ejemplo, Jonson *et al.*, *J Bone Miner Res* 14:883, 1999), o mediante otras técnicas con las que serán familiares los expertos en la técnica.

El inicio de la calcificación de la matriz por los condrocitos, así como por los osteoblastos, parece estar mediada por la liberación de fragmentos celulares limitados a membrana, conocidos como vesículas de matriz (MVs). Los componentes de la MV, incluyendo una variedad de enzimas, modifican la matriz extracelular, y los interiores de la MV sirven como un ambiente de refugio para la formación de cristales de hidroxapatita (Anderson, *Clin Orthopaed Rel Res* 314:266-80, 1995; Boskey *et al.*, *Calcio Tissue Int* 60:309-15, 1997; Boskey, *Connect Tissue Res* 35:357-63, 1996; y Goldberg, *Prog Histochem Cytochem* 31:1-187, 1996). Los métodos para preparar MVs están descritos aquí, y otros métodos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Jonson *et al.*, *J Bone Miner Res* 14:883-92, 1999, y la Patente de EE UU N° 5.656.450).

Las mitocondrias y las SMPs pueden prepararse por una variedad de métodos (véase, por ejemplo, Fleischer *et al.*, *Methods Enzymol* 31:292-99, 1974; Pedersen *et al.*, *Methods Cell Biol* 20:411-81, 1978; Della-Cioppa *et al.*, *Mol Cell Endocrinol* 48:111-20, 1986; y Lauquin *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 460:331-45, 1977). Por ejemplo, para preparar mitocondrias y/o SMPs, puede utilizarse el siguiente procedimiento. Se centrifugan lisados celulares a 600 x g durante 10 minutos a 4°C, y este primer sobrenadante se retira y se deja a un lado. El centrifugado (pellet), que contiene material de membrana plasmática, se lava con 100 µl de MBS (manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, Tris-HCl, pH 7.4 50 mM, y EDTA 10 mM) y se centrifuga a 600 x g durante 10 minutos a 4°C, para producir un segundo sobrenadante. El primer y segundo sobrenadantes se combinaron y se centrifugan a 14000 x g durante 15 minutos a 4°C; el centrifugado (pellet) resultante representa una fracción mitocondrial que se resuspende en MBS para preparar las mitocondrias. Dichas mitocondrias pueden incubarse con 0,25 mg/ml de digitonina (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis,

IN) durante 2 minutos, y sonicarse durante 3 minutos al 50% del ciclo de trabajo, en un sonicador cup-hom, para producir partículas submitocondriales (SMPs).

Según esto, una muestra biológica tal como se proporciona aquí puede, en ciertas realizaciones preferidas, comprender un condrocito, MVs derivadas de condrocitos, y/o partículas submitocondriales (SMP) derivadas de condrocitos, en los que se pueden comparar los niveles de uno o más indicadores de una función mitocondrial alterada.

En otra realización preferida de la invención, la muestra biológica, que contiene al menos un indicador candidato de una función mitocondrial alterada, puede comprender sangre completa, y puede, en otra realización preferida, comprender una fracción cruda de la capa espumosa de sangre completa, que es conocida en la técnica por contener además una fracción particulada de sangre completa enriquecida en plaquetas y en células sanguíneas nucleadas (por ejemplo, células sanguíneas blancas tales como linfocitos, monocitos y granulocitos incluyendo neutrófilos, eosinófilos y basófilos), y sustancialmente depleccionada de eritrocitos. Los expertos en la técnica sabrán como preparar tal fracción de capa espumosa, que puede prepararse, por ejemplo, mediante sedimentación de densidad diferencial de los componentes de la sangre bajo condiciones definidas, incluyendo el uso de un medio de separación dependiente de densidad, o mediante otros métodos. En otras realizaciones preferidas, la muestra biológica que contiene al menos un indicador de una función mitocondrial alterada, puede comprender una fracción de subpoblaciones de células sanguíneas, enriquecida purificada o aislada, tal como, por ejemplo, linfocitos, leucocitos polimorfonucleares, granulocitos y similares. Los métodos para la preparación selectiva de subpoblaciones de células hematopoyéticas particulares son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Immunology*, JE Coligan *et al.*, (Eds.), 1988, John Wiley & Sons, NY).

Según ciertas realizaciones de la invención, el tipo celular particular o el tipo de tejido del que se obtiene la muestra biológica, puede influenciar aspectos cualitativos o cuantitativos de al menos un indicador candidato de una función mitocondrial alterada contenido en ella, en relación al correspondiente indicador candidato de una función mitocondrial alterada obtenido de un tipo de célula o tejido diferente de una fuente biológica común. Está por lo tanto dentro de la contemplación de la invención cuantificar al menos un indicador candidato de función mitocondrial alterada en muestras biológicas de diferentes tipos de células o tejidos, ya que puede hacer que las ventajas de la invención sean más útiles para una indicación particular, por ejemplo, una enfermedad artrítica o una enfermedad asociada con una función mitocondrial alterada como aquí se proporciona, y además para un particular grado de progresión de una enfermedad artrítica conocida o sospechada (o una enfermedad asociada con una función mitocondrial alterada), en un sujeto vertebrado. Los tipos de células o tejidos relevantes serán conocidos para los expertos en dichas enfermedades.

Por ejemplo, como aquí se proporciona, los condrocitos del cartílago articular pueden representar un tipo de célula particularmente preferido en el contexto de una enfermedad artrítica, y también lo pueden ser otros tipos celulares presentes en los procesos de desarrollo, estabilización, mantenimiento y reparación de la articulación, tales como la homeostasis del cartílago, la cicatrización de un injerto de hueso o ligamento, la resorción del tejido cicatricial, o el remodelado del tejido conectivo, por ejemplo, las células óseas, los osteoblastos, osteoclastos, células del estroma de la médula ósea, miocitos, células de los nervios motores/placa terminal, células inflamatorias y/o sinoviocitos.

Para determinar si una alteración mitocondrial puede contribuir a un estado particular de enfermedad, puede ser útil construir un modelo de sistema para análisis diagnóstico y para escrutinio de agentes terapéuticos candidatos, en los que la carga genética mitocondrial puede mantenerse constante, mientras que el genoma mitocondrial se modifica. Se conoce en la técnica como depleccionar el DNA mitocondrial de las células en cultivo para producir células p^0 , previniendo de esta forma la expresión y la replicación de genes mitocondriales e inactivando la función mitocondrial. Es además conocido en la técnica como repoblar dichas células p^0 con mitocondrias derivadas de células extrañas, para estudiar la contribución del genotipo mitocondrial del donante al fenotipo respiratorio de las células recipientes. Tales células híbridas citoplásmicas, que contienen DNA genómico y mitocondrial de diferentes orígenes biológicos, son conocidas como cíbridas. Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 95/26973 y la Patente de EE UU N° 5.888.498 y las referencias allí citadas.

En ciertas otras realizaciones, la invención proporciona un método para tratar a un paciente que tiene una enfermedad artrítica, administrando al paciente una composición que comprende un agente que tiene la estructura (I), que mejora sustancialmente (por ejemplo, altera para acercarlo al estado del testigo o al estado asintomático de una forma estadísticamente significativa), al menos un criterio clínico para tener o estar en riesgo de tener una enfermedad artrítica (véase, por ejemplo, *Primer on the Rheumatic Diseases*, 7ª Edición, JH Klippel (ed.), 1997 The Arthritis Foundation, Atlanta, GA). La invención también proporciona un método de tratar a un paciente que tiene una enfermedad asociada con una función mitocondrial alterada, administrando al paciente una composición que contiene un agente que tiene la estructura química (I) que mejora sustancialmente (por ejemplo, altera para acercarlo al estado del testigo o al estado asintomático de una forma estadísticamente significativa), al menos un criterio clínico para tener o estar en riesgo de tener dicha enfermedad, como se conoce en la técnica y se proporciona aquí. Aquellos expertos en la técnica podrán determinar fácilmente si un cambio en dicho criterio clínico trae ese nivel más cerca de un valor normal y/o beneficia clínicamente al sujeto. Así, un agente preferido proporcionado por la presente invención puede incluir un agente capaz de restaurar completa o parcialmente dicho nivel.

Según esto, en ciertas realizaciones preferidas como aquí se proporcionan, una composición farmacéutica adecuada para tratar una enfermedad artrítica y/o para tratar una enfermedad asociada con una función mitocondrial alterada, comprende un agente de la estructura (I), por ejemplo, un agente aril N-cianoguanidino. En el caso de las enfermedades

artríticas, dichos agentes pueden utilizarse para prevenir o tratar enfermedades artríticas, tales como la artrosis o las enfermedades articulares degenerativas, y para promover la curación del cartílago lesionado, por ejemplo, el cartílago dañado por traumatismo o por una alteración de movimiento repetitivo. Sin querer ligarse a ninguna teoría particular, algunos de dichos agentes pueden tener actividad como antioxidantes, y presumiblemente actúan previniendo o disminuyendo los efectos del daño a la mitocondria producido por el estrés oxidativo (para una revisión, véase, por ejemplo, Kowaltowski *et al.*, *Free Radical Biol Med* 26:463-471, 1999). Estos y/o otros agentes pueden actuar para prevenir la muerte celular programada (apoptosis), que puede contribuir al desarrollo de la artrosis (Blanco *et al.*, *Arthritis & Rheumatism* 41:284-289, 1998), y/o de otras enfermedades asociadas con una función mitocondrial alterada como aquí se proporciona, o puede ejercer efectos clínicamente beneficiosos a través de otros mecanismos.

Así, dentro de esas y otras realizaciones relacionadas, una composición que contiene la estructura (I) (por ejemplo, un agente aril N-cianoguanidino), tal como los que se proporcionan aquí, se administra a un paciente en una cantidad terapéuticamente efectiva. Una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad calculada para conseguir el efecto deseado. Será aparente para los expertos en la técnica que la vía de administración puede variar con el tratamiento particular. Las rutas de administración pueden ser invasivas o no invasivas. Las rutas de administración no invasivas incluyen la oral, bucal/sublingual, rectal, nasal, tópica (incluyendo la transdérmica y la oftálmica), vaginal, intravesical y pulmonar. Las rutas de administración invasivas incluyen la intrarterial, intravenosa, intradérmica, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intratecal e intraocular.

La dosis requerida puede variar con el tratamiento particular y la vía de administración. En general, las dosis para los compuestos de esta invención tales como los agentes aril N-cianoguanidino de la estructura (I) como se describen aquí, estarán entre alrededor de 1 y alrededor de 5 miligramos del compuesto por kilogramo de peso corporal del animal hospedante por día; frecuentemente estarán entre alrededor de 100 μ g y alrededor de 5 mg, pero pueden variar hasta alrededor de 50 mg del compuesto por kg de peso corporal por día. La administración terapéutica se realiza generalmente bajo la guía de un médico, y las composiciones farmacéuticas contienen el agente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estos vehículos son bien conocidos en la técnica, y típicamente contienen sales no tóxicas y soluciones de tampón. Tales vehículos pueden comprender soluciones de tampón como solución salina tamponada fisiológicamente, solución salina tamponada con fosfato, carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa, manitol o dextranos, aminoácidos tales como glicina, antioxidantes, agentes quelantes tales como EDTA o glutatión, adyuvantes y conservantes. Las sales no tóxicas aceptables incluyen sales de adición de ácido o complejos de metal, por ejemplo con zinc, hierro, calcio, bario, magnesio, aluminio o similares (que se consideran como sales de adición para el propósito de esta solicitud). Ejemplos ilustrativos de tales sales de adición de ácido son cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, sulfato, fosfato, tannato, oxalato, fumarato, gluconato, alginato, maleato, acetato, citrato, benzoato, succinato, malato, ascorbato o tartrato. Si el ingrediente activo se va a administrar en forma de tableta, la tableta puede contener un ligador, tal como tragacanto, almidón de maíz o gelatina; un agente desintegrante, tal como el ácido alginico; y un lubricante, tal como el estearato de magnesio. Si se desea la administración en forma líquida, pueden utilizarse edulcorantes o saborizantes, y se puede efectuar la administración intravenosa en solución salina isotónica o tamponada con fosfato.

En una realización de la invención, las composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos de esta invención están contenidas dentro de liposomas. Los liposomas son esferas microscópicas que tienen un núcleo acuoso rodeado por una o más capas externas, hechas de lípidos colocados en una configuración de bicapa (véase, por ejemplo, Chonn *et al.*, *Current Op Biotech* 6:698, 1995). El potencial terapéutico de los liposomas como agentes de liberación de fármacos fue reconocida hace casi treinta años (Sessa *et al.*, *J Lipid Res* 9:310, 1968). Los liposomas incluyen "liposomas estabilizados estéricamente", una expresión que, como aquí se utiliza, se refiere a un liposoma que contiene uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan a los liposomas, dan como resultado una vida media en la circulación aumentada, en relación a los liposomas que carecen de tales lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estabilizados estéricamente son aquellos en los que parte de la porción lípida que forma la vesícula del liposoma (A) comprende uno o más glicolípidos, tal como el monosialogangliósido G_{M1} , o (B) es derivado con uno o más polímeros hidrófilos, tal como el resto polietilén-glicol (PEG). Sin querer atarse a una teoría particular, se piensa en la técnica que, la menos para los liposomas estabilizados estéricamente que contienen gangliósidos, esfingomielina o lípidos derivados de PEG, la vida media circulatoria aumentada de estos liposomas estabilizados estéricamente se deriva de una disminución en la ingestión por las células del sistema retículoendotelial (RES) (Allen *et al.*, *FEBS Letters* 223:42, 1987; Wu *et al.*, *Cancer Research* 53:3765, 1993).

Son conocidos en la técnica varios liposomas que comprenden uno o más glicolípidos. Papahadjopoulos *et al.*, (*Ann NY Acad Sci* 507:64, 1987), refrieron la capacidad del monosialogangliósido G_{M1} , el galactocerebrósido sulfato y el fosfatidilinositol para mejorar la vida media de los liposomas. Estos hallazgos fueron ampliados por Gabizon *et al.*, (*Proc Natl Acad Sci USA* 85:6949, 1988). Las Patentes de EE UU N° 4.837.028 y de WO 88/04924, ambas de Allen *et al.*, describen liposomas que contienen (1) esfingomielina y (2) gangliósido G_{M1} o un éster de galactocerebrósido sulfato. La Patente de EE UU N° 5.543.152 (Webb *et al.*) describe liposomas que contienen esfingomielina. Los liposomas que contienen 1,2-*sn*-dimiristolfosfatidilcolina se describen en el Documento WO 97/13499 (Lim *et al.*).

Varios liposomas que contienen lípidos derivados de uno o más polímeros hidrófilos, y los métodos para su preparación, son conocidos en la técnica. Sunamoto *et al.*, (*Bull Chem Soc Jpn* 53:2778, 1980), describieron liposomas que contienen un detergente no iónico, 2C₁₂15G, que contiene un resto PEG. Illum *et al.*, (*FEBS Letters* 167:79, 1984), resaltaron que las partículas de poliestireno con cubierta hidrófila de glicoles poliméricos, da como resultado una vida media sanguínea significativamente aumentada. Los fosfolípidos sintéticos modificados por la unión de grupos carbo-

xílicos de polialquilén glicoles (por ejemplo PEG), están descritos por Sears (Patentes de EE UU N° 4.426.330 y N° 4.534.899). Klivanov *et al.*, (*FEBS Letts* 268:235, 1990), describieron experimentos que demuestran que los liposomas que contienen fosfatidiletanolamina (PE) derivada con PEG o estearato de PEG, tienen un aumento significativo en la vida media de la circulación sanguínea. Blume *et al.*, (*Biochimica et Biophysica Acta* 1029:91, 1990), ampliaron dichas observaciones a otros fosfolípidos derivados de PEG, por ejemplo DSPE-PEG, formado por la combinación de distearoil-fosfatidil-etanolamina (DSPE) y PEG. Los liposomas que tienen restos PEG unidos covalentemente en sus superficies externas, se describen en la Patente Europea N° 0 445 131 B1 y en el Documento WO 90/04384 de Fisher. Las composiciones de liposomas que contienen 1-20 moles por cien de PE derivada con PEG, y los métodos para su utilización, han sido descritos por Woodle *et al.*, (Patentes de EE UU N° 5.013.556 y N° 5.356.633) y Martin *et al.*, (Patente de EE UU N° 5.213.804 y la Patente Europea N° EP 0 496 813 B1). Los liposomas que contienen un número de otros conjugados lípido-polímero se describen en el Documento WO 91/05545 y en la Patente de EE UU N° 5.225.212 (ambos de Martin *et al.*) y en el Documento WO 94/20073 (Zalipsky *et al.*). Los liposomas que contienen lípidos ceramida modificados por PEG se describen en el Documento WO 96/10391 (Choi *et al.*). Las Patentes de EE UU N° 5.540.935 (Miyazaki *et al.*) y N° 5.556.948 (Tagawa *et al.*) describen liposomas que contienen PEG que pueden ser modificados además con restos funcionales en sus superficies.

Los compuestos de la presente invención (por ejemplo, composiciones de la estructura (I) tales como los agentes aril N-cianoguanidino), como se proporcionan en la presente invención también incluyen sus profármacos. Como aquí se utilizan, un "profármaco", es cualquier vehículo unido covalentemente que libera *in vivo* el fármaco activo parental, cuando dicho profármaco se administra a un sujeto vertebrado. Los profármacos de un compuesto dado se preparan modificando los grupos funcionales presentes en el compuesto, de tal forma que las modificaciones son escindidas, en manipulación de rutina o *in vivo*, para producir el compuesto parental. Los profármacos incluyen compuestos en los que grupos hidroxilo o amino se unen a cualquier grupo del compuesto parental a través de un puente que, cuando el profármaco se administra a un sujeto, se escinde para formar un hidroxilo o amino libre, respectivamente. Ejemplos representativos de profármacos incluyen derivados de grupos funcionales alcohol y amina de acetato, formato y benzoato.

Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (AR Gennaro, ed, 1985). Por ejemplo, pueden utilizarse solución salina estéril y solución salina tamponada con fosfato a pH fisiológico. En la composición farmacéutica pueden proporcionarse conservantes, estabilizadores, tinciones e incluso agentes saborizantes. Por ejemplo, pueden añadirse como conservantes benzoato sódico, ácido sórbico y ésteres de ácido *p*-hidroxibenzoico. Además pueden utilizarse agentes anti-oxidantes y suspensores. Opcionalmente, para ciertas rutas de administración, puede incluirse en la formulación un anestésico.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención pueden prepararse mediante métodos bien conocidos en la técnica, tal como haciendo reaccionar las formas base o ácido libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico. Las sales adecuadas en este contexto pueden encontrarse en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 17ª Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1985.

Como ejemplo, las sales adecuadas farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención, incluyen sales de adición de ácido que pueden, por ejemplo, formarse mezclando una solución del compuesto según la invención con una solución de un ácido aceptable, tal como ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido *p*-toluensulfónico, ácido málico, ácido maleico, ácido metanosulfónico, ácido succínico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido carbónico, ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Las sales pueden formarse por métodos convencionales, tales como haciendo reaccionar la forma base libre del producto con uno o más equivalentes del ácido apropiado en un disolvente o medio en el que la sal es insoluble, o en un disolvente tal como agua, que es eliminada *in vacuo* o mediante congelación en seco o mediante intercambio de aniones de una sal existente por otro anión, sobre una resina de intercambio iónico adecuada. Como ejemplo, las sales adecuadas farmacéuticamente aceptables del compuesto de esta invención incluyen sales de adición de ácido que pueden, por ejemplo, formarse mezclando una solución del compuesto según la invención, con una solución de un ácido aceptable tal como ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido *p*-toluensulfónico, ácido málico, ácido maleico, ácido metanosulfónico, ácido succínico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido carbónico, ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Las sales pueden formarse por métodos convencionales, tales como haciendo reaccionar la forma base libre del producto con uno o más equivalentes del ácido apropiado en un disolvente o medio en el que la sal es insoluble, o en un disolvente tal como agua, que es eliminada *in vacuo* o mediante congelación en seco o mediante intercambio de aniones de una sal existente por otro anión, sobre una resina de intercambio iónico adecuada.

Las composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos de la invención como aquí se describe, pueden estar de cualquier forma que permita que la composición sea administrada a un paciente. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de un sólido, líquido o gas (aerosol). Las típicas rutas de administración incluyen, sin limitación, oral, tópica, parenteral (por ejemplo sublingualmente o bucalmente), sublingual, rectal, vaginal e intranasal. El término parenteral como aquí se utiliza incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal, intratecal, intracavernosa, intrameatal, intrauretral o técnicas de infusión. La composición farmacéutica se formula de tal forma que permite a los ingredientes activos allí contenidos, que estén biodisponibles después de la administración de la composición a un paciente. Las composiciones que se administrarán a un paciente toman la

forma de una o más unidades de dosis, donde, por ejemplo, una tableta puede ser una unidad de dosis única, y un contenedor de uno o más compuestos de la invención en forma de aerosol puede contener una pluralidad de unidades de dosis.

Para la administración oral, puede estar presente un excipiente y/o un ligador. Ejemplos de los mismos son la sacarosa, caolín, glicerina, dextrinas de almidón, alginato sódico, carboximetilcelulosa y etilcelulosa. Agentes colorantes y saborizantes. Puede utilizarse una cubierta dura. La composición puede estar en forma de un líquido, por ejemplo, un elixir, sirope, solución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser para administración oral o para liberación mediante inyección, como dos ejemplos. Cuando el propósito es la administración oral, las composiciones preferidas contienen, además de uno o más compuestos de la estructura (I), uno o más de un agente edulcorante, conservantes, tintes/colorantes y aumentadores del sabor. En una composición con el propósito de administración mediante inyección, pueden incluirse uno o más de un surfactante, conservante, agente humidificante, agente dispersante, agente de suspensión, solución de tampón, estabilizador y agente isotónico.

Una composición farmacéutica líquida como aquí se utiliza, tanto en la forma de una solución como de una suspensión, puede incluir uno o más de los siguientes adyuvantes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferiblemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro sódico isotónico, aceites fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos, que pueden servir como disolvente o medio de suspensión, polietilén glicoles, glicerina, propilén glicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como bencil alcohol o metil parabén; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; soluciones de tampón como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para ajustar la tonicidad, tal como cloruro sódico o dextrosa. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis hechos de cristal o plástico. La solución salina fisiológica es un adyuvante preferido. Una composición farmacéutica inyectable es preferiblemente estéril.

Una composición líquida con el propósito de administración parenteral u oral debería contener una cantidad de un compuesto de la estructura (I), de tal forma que se obtenga una dosis adecuada. Típicamente, esta cantidad es al menos 0,01% del peso de un compuesto de la invención en la composición. Cuando el propósito es la administración oral, esta cantidad puede variar para estar entre 0,1 y alrededor de 70% del peso de la composición. Las composiciones orales preferidas contienen entre alrededor del 4% y alrededor del 50% del compuesto de la invención. Las composiciones y preparaciones preferidas se preparan de tal forma que una unidad de dosis parenteral contiene entre 0,01 y 1% por peso del compuesto activo.

La composición farmacéutica puede tener el propósito de administración tópica, en cuyo caso, el vehículo puede comprender adecuadamente una base de solución, emulsión, ungüento o gel. La base, por ejemplo, puede contener uno o más de los siguientes: petrolatum, lanolina, polietilén glicoles, cera de abeja, aceite mineral, diluyentes como agua y alcohol, y emulsionantes y estabilizantes. Los agentes engrosantes pueden estar presentes en una composición farmacéutica para administración tópica. Si el propósito es la administración transdérmica, la composición puede incluir un parche transdérmico o un aparato de iontoforesis. Las formulaciones tópicas pueden contener una concentración del compuesto de la invención de desde alrededor de 0,1 hasta alrededor de 10% (peso/volumen) (peso por unidad de volumen).

La composición farmacéutica puede tener el propósito de administración rectal, en forma, por ejemplo, de un supositorio que se disolverá en el recto y liberará el fármaco. La composición para administración rectal puede contener una base oleaginosa como excipiente adecuado no irritante. Dichas bases incluyen lanolina, manteca de cacao y polietilén glicol.

En ciertos métodos preferidos de la invención, el (los) compuesto(s) de la invención pueden administrarse a través de inserto(s), bola(s), formulación(es) de liberación temporal, parche(s), o formulación(es) de liberación rápida. Será evidente para los habitualmente expertos en la técnica, que la dosis óptima de el (los) agente(s) puede depender del peso y las condiciones físicas del paciente; de la gravedad y duración de la condición física que se va a tratar; de la forma particular del ingrediente activo, la manera de administración y de la composición empleada. Deberá entenderse que el uso de compuestos de la presente invención en quimioterapia puede incluir dicho agente unido a otro compuesto, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o policlonal, una proteína o un liposoma, que ayude a la liberación de dicho compuesto.

Estas y otras ventajas relacionadas serán apreciadas por los expertos en la técnica. Los siguientes ejemplos se ofrecen como vía de ilustración.

Ejemplos

Ejemplo 1

Síntesis general de compuestos representativos

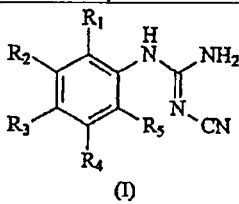
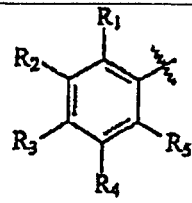
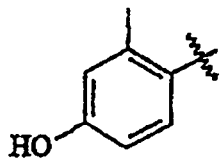
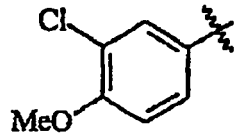
N-Ciano-S-metilisotiurea (1,38 g, 12,0 mmol), se disolvió en i-PrOH (18,0 ml). A esta solución en agitación, se añadió NaOH acuoso (2,0 M, 6,0 ml), y la mezcla de reacción resultante se calentó a 100°C durante 30 minutos. La solución se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, y se añadieron partes de 2,0 ml (cada una conteniendo ca 1,0

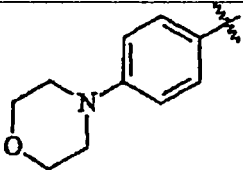
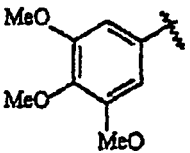
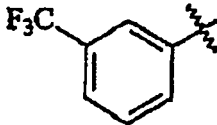
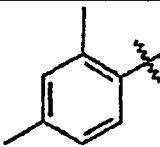
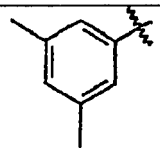
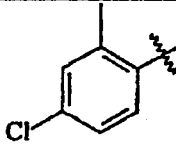
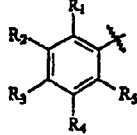
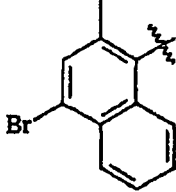
mmol de la sal intermedia putativa, dicianamida sódica), a una solución de anilina (1,0 mmol) apropiada, en $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ (1,0 M, 1,0 ml). La mezcla de reacción se calentó a 100°C durante 60 minutos con agitación.

Después de enfriarse hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción se evaporó bajo presión reducida, proporcionando el producto crudo de la estructura (I). Antes de la purificación, cada mezcla cruda se disolvió en MeOH (10 ml), se sonicó para romper los sólidos, y se filtró a través de filtros de membrana PTFE de 0,20 micras. Se llevó a cabo RP-HPLC preparativa en un sistema de HPLC automatizado Gilson 215, siendo cada derivado purificado en tres lotes (3,3 ml de volumen de inyección) sobre una columna Betasil™ C18 (150 x 20 mm, 5 μ partículas, 100 Å poros, Keystone Scientific, Inc., Bellefonte, PA). El producto se eluyó utilizando un gradiente de MeCN:TFA (10000:5) en H_2O :TFA (10000:5) a una tasa de flujo de 15 ml/min. Las fracciones apropiadas se analizaron para la presencia del producto deseado mediante LC/MS. Las fracciones combinadas se concentraron y se co-evaporaron repetidamente con MeOH (3 x 5,0 ml). Los análisis LC/MS y NMR se utilizaron para confirmación de la estructura. Los rendimientos estaban en el intervalo de 10-65%.

Los compuestos representativos fabricados con este procedimiento, junto con los correspondientes datos analíticos, se resumen en la siguiente Tabla 1:

TABLA 1

Compuestos representativos			
 <p>(I)</p>			
Comp.		ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculado/observado)	$^1\text{H-NMR}$
(1)		191,1/191,2	(d_6 -DMSO) 9,35 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 6,94 (m, 1H), 6,68 (b, 2H), 6,62 (s, 1H), 6,56 (m, 1H)
(2)		225,0/225,2	(d_6 -DMSO) 8,97 (s, 1H), 7,45 (m, 1H), 7,19 (m, 1H), 7,09 (d, 1H), 6,99 (b, 2H), 3,82 (s, 3H)

(3)		246,1/246,3	(d ₆ -DMSO) 8,85 (s, 1H), 7,18 (m, 2H), 6,92 (d, 2H), 6,83 (m, 2H), 3,73 (dd, 4H), 3,07 (dd, 4H)
(4)		251,1/251,2	(d ₆ -DMSO) 8,99 (s, 1H), 6,95 (b, 2H), 6,65 (s, 2H), 3,73 (s, 6H), 3,62 (s, 3H)
(5)		229,1/229,2	(d ₆ -DMSO) 9,37 (s, 1H), 7,80 (s, 1H), 7,62 (d, 1H), 7,53 (t, 1H), 7,44 (d, 1H)
(6)		189,1/189,2	(CDCl ₃) 7,19 (s, 1H), 7,09 (m, 3H), 5,46 (b, 2H), 2,38 (s, 3H), 2,26 (s, 3H)
(7)		189,1/189,2	(CDCl ₃) 7,53 (s, 1H), 6,94 (s, 1H), 6,87 (s, 2H), 5,68 (b, 2H), 2,32 (s, 6H)
(8)		209,1/209,2	(d ₆ -DMSO) 8,54 (s, 1H), 7,31 (m, 2H), 7,22 (m, 1H), 7,02 (b, 2H), 2,17 (s, 3H)
Comp.		ESI-MS [M+H] ⁺ (calculado/observado)	¹ H-NMR
(9)		289,0/289,2	(d ₆ -DMSO) 9,22 (s, 1H), 8,18 (d, 1H), 7,98 (d, 1H), 7,88 (d, 1H), 7,72 (m, 2H), 7,46 (m, 1H), 7,14 (b, 2H)

Ejemplo 2

Síntesis a gran escala representativa del compuesto (1)

N-ciano-*S*-metilisotiurea (576 mg, 5,00 mmol) se disolvió en *i*-PrOH (7,5 ml). A esta solución en agitación se añadió NaOH acuoso (2,0 M, 2,5 ml), y la mezcla de reacción resultante se calentó a 100°C durante 30 minutos. La solución se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. A esta solución dicianamida se añadió una solución de 4-hidroxi-2-metilalanina (616 mg, 5,00 mmol) en HCl_(aq) (1,0 M, 5,0 ml). La mezcla de reacción se calentó a 100°C durante 60 minutos, y después de enfriarla hasta temperatura ambiente, se evaporó hasta secarse. Al producto crudo, se le añadió un peso equivalente de gel de sílice y MeOH (10 ml/g de producto crudo). Después de agitarlo durante varios minutos, el MeOH se eliminó mediante evaporación rotatoria, y el sílice/producto crudo se libró todavía más del MeOH mediante evaporación del diclorometano añadido (DCM, 10 ml/g de producto crudo). Esta etapa de co-evaporación se repitió tres veces. La mezcla de sílice/producto crudo se colocó en el extremo superior de una flash-SGC equilibrada con DCM/MeOH (95:5). La elución con un gradiente paso a paso de MeOH en DCM (5-10%), proporcionó el Compuesto (1) como un sólido marrón claro después de secarse bajo vacío elevado. Rendimiento: 482 mg (50,7%).

Ejemplo 3

Ensayo de actividad de condrocitos

Los condrocitos de costilla juvenil inmortalizados TC28 (a.k.a. "T/C-28") fueron proporcionados por la Dra. Mary Goldring (Harvard Medical School, Boston MA). Las células TC28 se mantuvieron en un cultivo monocapa en medio DMEM/Ham's F12 (1:1) suplementado con FCS al 10%, L-glutamina al 1%, 100 unidades/ml de Penicilina y 50 mg/ml de Estreptomicina (Omega Scientific, Tarzana, CA) y se cultivaron a 37°C con CO₂ al 5%. Adicionalmente, para estudiar mejor los condrocitos en un estado más fisiológico no adherente, en algunos experimentos las células TC28 se transfirieron a placas de 6 pocillos que habían sido recubiertas previamente durante 18 horas a 22°C con una solución del inhibidor de la adhesión celular poli-2-hidroxietil metacrilato (poliHEME) al 10% en etanol al 95%, seguido de dos lavados en PBS. Después se añadió a los pocillos medio completo DMEM/Ham's F12, y las células se estudiaron durante 72 horas en cultivo (Folkman J y Moscona A: Role of cell shape in growth control, *Nature* 273:345-349, 1978; Reginato A, Iozzo R, Jiménez S: Formation of Nodular Structures Resembling Mature Articular Cartilage in Long-Term Primary Cultures of Human Fetal Epiphyseal Chondrocytes on a Hydrogel Substrate, *Arthritis Rheum* 37:1338-1349, 1994). La expresión de colágeno tipo II y agrecano se confirmaron utilizando RT-PCR, que verificaba el mantenimiento del fenotipo de los condrocitos.

Los efectos protectores de los condrocitos de los compuestos representativos se analizaron *in vitro*. Los agonistas incluían un donante de óxido nítrico (NOC-12), un donante de peroxinitrilo (SIN-1) e IL-1 beta recombinante humana. El SIN-1 100 µM y el NOC-12 250 µM se utilizaron como estímulo tóxico para las células adherentes. En los experimentos en que se utilizaban células TC28 cultivadas en placas de poliHEME, el SIN-1 10 µM, el NOC 12 25 µM y la IL-1 a 10 ng/ml, se utilizaron como iniciadores de artrosis, en ausencia o presencia de 1 µM del compuesto representativo del Ejemplo 1. La citotoxicidad se estudió utilizando un ensayo de liberación de LDH estándar, y el ATP intracelular de los condrocitos se midió por un ensayo de luciferasa estándar.

El aumento de liberación de glicosaminoglicanos (GAG) por los condrocitos, es un hecho central de los condrocitos artrósicos, y se sabe que es potentemente estimulada por IL-1 que, como el NO y el peroxinitrilo es un factor patogénico principal en la artrosis. Así, la liberación de GAG también se estudió, en la que, para optimizar el ensayo de escrutinio, se llevó a cabo una digestión de los "nódulos" de cartílago formados en el sistema poliHEME, utilizando 300 µg/ml de papaína en fosfato sódico 20 mM, EDTA 1 mM y DTT (pH 6,8) 2 mM. La digestión de las proteínas interferentes conseguida de esta forma, permitía que la liberación de GAG fuera más fácilmente detectable, y la liberación de GAG se cuantificó mediante el ensayo colorimétrico estándar de unión a tinción, azul de dimetilen (DMB). Brevemente, el extracto de células digerido previamente se combinó con DMB 46 µM, glicina 40 mM, y NaCl (pH 3,0) 40 mM, e inmediatamente se leyó a 525 nm, y se comparó con una curva estándar generada con muestras de condroitin sulfato 1-50 µg/ml (Farndale R, Buttle D, Barrett A: Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylen blue, *Biochimica et Biophysica Acta* 883: 173-177, 1986; Sztrolowics R, White R, Poole R, Mort J, Roughley P: Resistance of small leucine-rich repeat proteoglycans to proteolytic degradation during interleukin-1 stimulated cartilage catabolism. *Biochem J* 339: 571-577, 1999). Los resultados de este experimento se presentan en la Tabla 2:

TABLA 2

% de disminución en la liberación de GAG			
Compuesto	NOC-12	IL-1b	SIN-1
(1)	27,4	36,8	47,7
(2)	50,1	40,9	23,6
(3)	28,0	29,1	21,9
(4)	17,2	1,5	11,3
(5)	14,2	30,7	35,0
(6)	11,0	2,4	1,6
(7)	46,2	56,6	42,3
(8)	32,3	43,8	55,2

Ejemplo 4

Otros ensayos utilizando el compuesto (1)

Ensayo de viabilidad celular

1 x 10⁵ células TC28 (medio DMEM/F12 con FCS al 10%, glutamina al 1%, P/S al 1%), se plantaron en cada pocillo de una placa de 96 pocillos para que se adhirieran durante la noche. Las células se lavaron una vez con PBS y el medio se cambió por otro que contenía solo FCS al 1%. Se añadió el Compuesto (1) a varias concentraciones a las células, como pre-tratamiento durante 1 hora. El medio se eliminó y se añadió compuesto fresco +/- el estímulo tóxico. Las células se incubaron entonces durante 24 horas a 37°C. después de la incubación, se recolectó el medio y se utilizó para análisis en el CytTox 96 Nonradioactive Cytotoxic Assay (Promega, Madison, WI). Brevemente, la liberación de LDH por las células muertas se cuantificó en una reacción enzimática durante 30 minutos, que daba como resultado la conversión de un tetrazolio saletín en un producto formazan rojo. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células muertas en relación con la liberación de LDH por las células de control.

Ensayo de ATP

5 x 10⁵ células TC28 se plantaron en platos de 60 mm para que se adhirieran durante la noche. Las células después se lavaron con PBS y el medio se cambió a un medio que contenía FCS al 1%. El Compuesto (1) se añadió como pre-tratamiento de las células durante 1 hora a 37°C. El medio se eliminó y se añadió compuesto nuevo +/- el estímulo tóxico, y las células se incubaron durante 24 horas a 37°C. Las células se rascaron suavemente en PBS y se lavaron, y después los pellets se congelaron rápidamente en hielo seco. Las células se extrajeron después en ácido perclórico 0,4 N y se incubaron en hielo durante 15 minutos. Las células se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se eliminó. Se añadió KHCO₃ 2,2 M al 24% (por volumen), para neutralizar la solución, y el precipitado se depositó mediante centrifugación. Este sobrenadante se mezcló con mezcla de ensayo de ATP del kit Sigma ATP Luciferase, y la reacción se contó durante 15 segundos (con un retraso inicial de 5 segundos), en triplicado. Los conteos se corrigieron para DNA total en el pellet celular (véase Tabla 3).

Los resultados de los Ensayos de Viabilidad Celular y de ATP descritos previamente, se presentan en la Tabla 3, que proporciona los valores de EC₅₀ (μM) aproximados, para la prevención de la muerte celular mediada por SIN-1 y NOC-12, y la depleción de ATP por el Compuesto (1). En estos ensayos, las células TC28 fueron pre-tratadas durante 1 hora, seguido de una exposición durante 24 horas al activador, en presencia del Compuesto (1).

TABLA 3

Preservación de Viabilidad Celular y Niveles de ATP en Presencia de Activadores de Artrosis				
	Viabilidad Celular		Depleción de ATP	
Activador	Noc12 ^a	Sin-1 ^b	Noc-12 ^a	Sin-1 ^b
EC ₅₀ (μM)	0,01	0,01	0,1	0,1
^a exposición a NOC-12: 250 μM. ^b exposición a SIN-1: 100 μM				

Síntesis de colágeno

La producción de colágeno se midió mediante la siguiente incorporación de ³H prolina, como describieron Johnson *et al.*, *Arthritis Rheum* 43:11560-70, 2000. Los resultados se presentan en la Tabla 4, que proporciona los valores EC₅₀ (μM) aproximados, para la prevención de la liberación de GAG (vía el Ejemplo 3), y la inhibición de la síntesis de colágeno (vía Jonson *et al.*) mediada por SIN-1, NOC-12 e IL-1, en condrocitos, por el Compuesto (1). En estos experimentos, las células TC28 en placas recubiertas de poliHEME fueron pre-tratadas durante 1 hora, seguido de la exposición al activador durante 72 horas en presencia del Compuesto (1).

Además, también se evaluaron las tasas de consumo de oxígeno por las células TC28 en cultivo monocapa, mediante los procedimientos de Jonson *et al.*, los resultados de los cuales se presentan en la Figura 1, que muestra que el Compuesto (1) bloqueó la inhibición de la respiración mitocondrial mediada por SIN-1 en células TC28. En este experimento, las células TC28 se trataron con SIN-1 500 μM durante 4 horas, +/- Compuesto (1) 10 μM: Estado 3/4 - tasa de respiración basal sin adición de sustrato; Estado 4 - tasa de respiración en presencia de oligomicina, 5 μM/ml; Estado 3U - tasa de respiración máxima no ligada al estado 3, debida a la adición del deslizador CCCP.

TABLA 4

Conservación de la Matriz en Condrocitos en Presencia de Activadores Pro-Artrósicos						
	Colágeno			Liberación de GAG		
Activador	Noc-12 ^a	Sin-1 ^b	IL-1 ^c	Noc-12 ^a	Sin-1 ^b	IL-1 ^c
EC ₅₀ (μM)	1	1	1	0,1	0,1	0,1
^a Exposición a NOC-12: 25 μM. ^b Exposición a SIN-1: 10 μM. ^c Exposición a IL-1: 10 ng/ml						

Métodos de Cultivo de Cartílago de Órgano Bovino

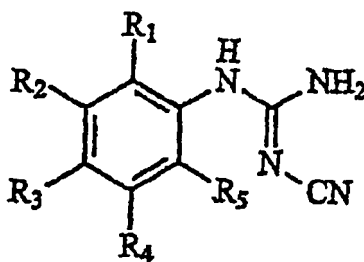
Se obtuvieron rodillas de bovino maduro y se removieron el cartílago de los cóndilos femorales y la cueva patelar en rodajas de grosor completo (1-3 mm). Se extrajeron núcleos circulares (6-7 mm de diámetro) del tejido. Los núcleos se lavaron dos veces con medio (FCS al 1%, P/S al 1%, glutamina al 1%, que contenía DMEM con elevada glucosa), y se colocaron en placas de 96 pocillos. Las rodajas se incubaron en medio (como anteriormente) a 37°C durante 48 horas para permitir la recuperación del proceso de aislamiento. Después del periodo de recuperación, el medio se eliminó y se añadió medio fresco con el Compuesto (1) a las rodajas durante un periodo de tratamiento de 6 horas. Después el medio se eliminó y se añadió Compuesto (1) fresco +/- IL-1 (a 10 ng/ml) y se incubó a 37°C durante 24 horas. El medio condicionado se recolectó y se analizó la liberación de GAG y NO. Finalmente, las rodajas se pesaron para corregir las pequeñas variaciones en el tamaño y en el grosor. Los resultados de este experimento se presentan en la Tabla 5, que proporciona los valores de EC₅₀ (μM) aproximados, para la prevención de la liberación de GAG y NO mediada por IL-1, en rodajas de cartílago bovino por el Compuesto (1).

TABLA 5

Prevención de la Degradación de la Matriz e Inhibición de la Liberación de NO en Rodajas de Cartílago Bovino en Respuesta a Estímulo con IL-1		
	Activación con IL-1	
	Liberación de GAG	Liberación de NO
EC ₅₀ (μM)	10	10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la estructura:



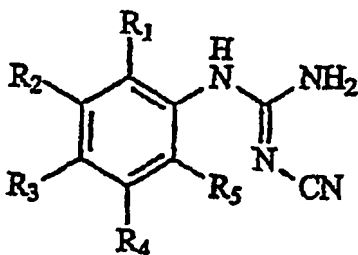
o un esteroisómero, derivado acetato, formato o benzoato de grupos funcionales alcohol y amina de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que

R₃ es morfolinilo; y

R₁, R₂, R₄ y R₅ son lo mismo o diferente, e individualmente hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alquilo, alcoxi, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heterocicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido.

o R₄ tomado junto con R₅, y además tomado junto con el respectivo átomo de carbono al cual estos grupos están ligados, forman un arilo fusionado o un heterociclo no sustituido o sustituido.

2. Un compuesto que tiene la estructura:



o un esteroisómero, derivado acetato, formato o benzoato de grupos funcionales alcohol y amina de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que

R₁, R₂ y R₃ son lo mismo o diferente, e individualmente hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alquilo, alcoxi, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heterocicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido.

R₄ tomado junto con R₅, y además tomado junto con el respectivo átomo de carbono al cual estos grupos están ligados, forman un arilo fusionado o un heterociclo no sustituido o sustituido.

3. El compuesto de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que R₁ es hidrógeno o alquilo.

4. El compuesto de la reivindicación 3, en el que R₁ es metilo.

5. El compuesto de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que R₂ es hidrógeno, halógeno, alcoxi o alquilo sustituido.

6. El compuesto de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que R₂ es hidrógeno.

7. El compuesto de la reivindicación 2, en el que R₃ es hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi o alquilo.

8. El compuesto de la reivindicación 2 en el que R₃ es heterociclo.

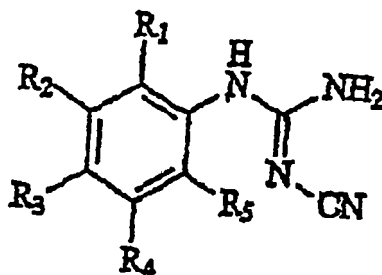
9. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R₄ es hidrógeno o alcoxi.

10. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R₅ es hidrógeno.

11. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R₄ tomado en conjunto con R₅, y además tomado en conjunto con el respectivo átomo de carbono a los que estos grupos están ligados, forma un grupo fenilo fusionado no sustituido.

12. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R₂, R₄ y R₅ son hidrógeno.

13. Un compuesto que tiene la estructura:



o un esteroisómero, derivado acetato, formato o benzoato de grupos funcionales alcohol y amina de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que

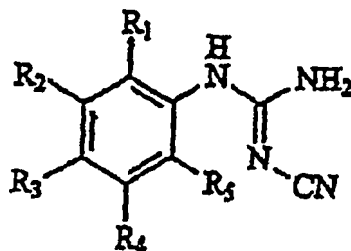
R₁ es metilo;

R₂, R₄ y R₅ son hidrógeno; y

R₃ es hidroxilo.

14. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15. Un compuesto que tiene la estructura:

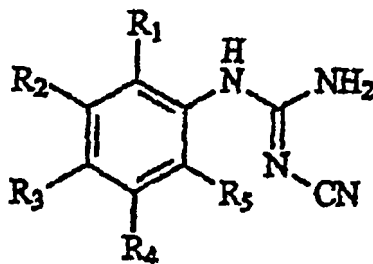


o un esteroisómero, derivado acetato, formato o benzoato de grupos funcionales alcohol y amina de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que

R₁, R₂, R₄ y R₅ son lo mismo o diferente, e individualmente hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alquilo, alcoxi, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heterocicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido.

o R₃ tomado junto con R₄, o R₄ tomado junto con R₅, y además tomado junto con el respectivo átomo de carbono al cual estos grupos están ligados, forman un anillo fusionado o un heterociclo no sustituido o sustituido, para utilizar en un método para tratar una enfermedad artrítica.

16. Un compuesto que tiene la estructura:



o un esteroisómero, derivado acetato, formato o benzoato de grupos funcionales alcohol y amina de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que

ES 2 271 247 T3

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 son lo mismo o diferente, e individualmente hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alquilo, alcoxi, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heterocicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido.

o R_3 tomado junto con R_4 , o R_4 tomado junto con R_5 , y además tomado junto con el respectivo átomo de carbono al cual estos grupos están ligados, forman un arilo fusionado o un heterociclo no sustituido o sustituido, para utilizar en un método para tratar una enfermedad asociada con una función mitocondrial alterada.

17. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, en el que R_1 es hidrógeno o alquilo.

18. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, en el que R_1 es metilo.

19. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, en el que R_2 es hidrógeno, halógeno, alcoxi, alquilo o alquilo sustituido.

20. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, en el que R_2 es hidrógeno.

21. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, en el que R_3 es hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi o alquilo.

22. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, en el que R_3 es heterociclo.

23. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, en el que R_3 es morfolinilo.

24. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, en el que R_4 es hidrógeno o alcoxi.

25. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, en el que R_5 es hidrógeno.

26. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, en el que R_4 tomado junto con R_5 , y además tomado junto con el respectivo átomo de carbono al que estos grupos están ligados, forman un grupo fenilo fusionado no sustituido o sustituido.

27. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, en el que R_2 , R_4 y R_5 son hidrógeno.

28. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, en el que R_1 es metilo y R_3 es hidroxilo.

FIGURA 1

RESPIRACIÓN CELULAR INTACTA

