

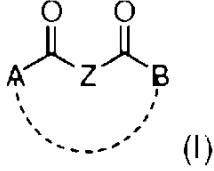
ÖZET

ÖZGÜN HÜCRE GEÇİRGEN SÜKSİNAT BİLEŞİKLERİ

Mevcut buluş özgün hücre geçirgen süksinatlar ve mitokondride ATP üretimini artırma amaçlı hücre geçirgen süksinat öncülleri sağlar.

İSTEMLER

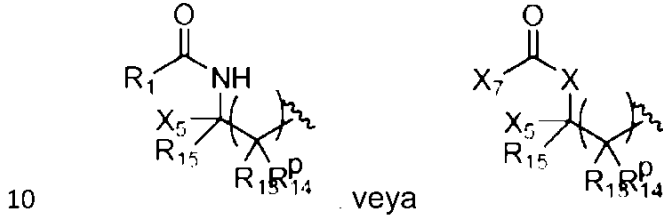
1. Mevcut buluşa göre bir bileşik, Formül I'e göre



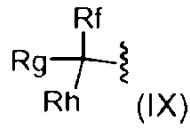
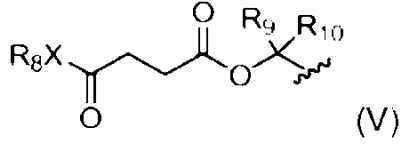
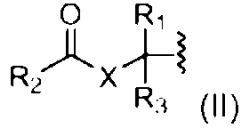
- veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu olup, özelliği; içerisinde A ve B arasındaki noktalı bağın bir kapalı halka yapısı oluşturmak üzere isteğe bağlı bir bağı belirtmesi ve içerisinde

Z ifadesinin $-CH_2-CH_2-$ veya $>CH(CH_3)$ arasından seçilmesi,

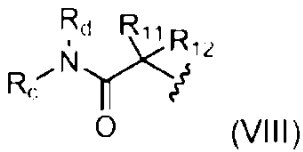
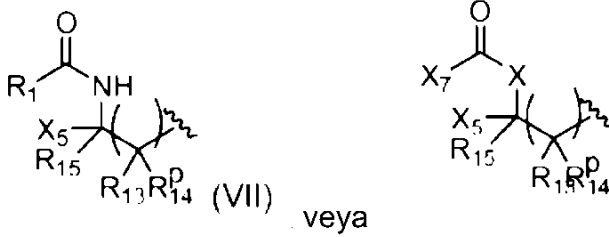
A ifadesinin $-SR$, $-OR$ ve NHR arasından seçilmesi, ve R ifadesinin aşağıdaki gibi olması:



B ifadesinin $-O-R'$, $-NHR''$, $-SR'''$ veya $-OH$ arasından seçilmesi; ve R' ifadesinin aşağıdaki formül II ila IX arasından seçilmesi:



R', R'' ve R''' ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya özdeş olması ve aşağıdaki Formül IV-VIII arasından seçilmesi:



5

R₁ ve R₃ ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya aynı olması ve H, Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül, O-asil, O-alkil, N-asil, N-alkil, X-asil, CH₂X-alkil, CH₂X-asil, F, CH₂COOH, CH₂CO₂alkil arasından seçilmesi,

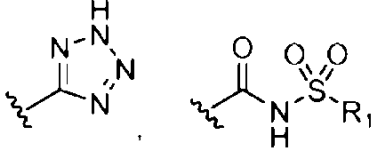
X ifadesinin O, NH, NR₆, S arasından seçilmesi,

10 R₂ ifadesinin Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül, C(O)CH₃, C(O)CH₂C(O)CH₃, C(O)CH₂CH(OH)CH₃ arasından seçilmesi,

p ifadesinin bir tamsayı olması ve 1 veya 2 olması

R₆ ifadesinin H, Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül, asetil, asil, propiyonil, benzoil veya formül II veya formül VIII arasından seçilmesi

X₅ ifadesinin -H, Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül, -COOH, - C(=O)XR₆, CONR₁R₃ arasından seçilmesi veya aşağıdaki formüle göre olması:



5

X₇ ifadesinin R₁, -NR₁R₃ arasından seçilmesi,

R₉ ifadesinin H, Me, Et veya O₂CCH₂CH₂COXR₈ arasından seçilmesi

R₁₀ ifadesinin Oasil, NHalkil, NHasil, veya O₂CCH₂CH₂COX₆R₈ arasından seçilmesi

10 X₆ ifadesinin O, NR₈, NR₆R₈ arasından seçilmesi, içerisinde R₆ ve R₈ ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya aynı olması ve H, alkil, Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül, asetil, asil, propiyonil, benzoil arasından seçilmesi veya formül II veya formül VIII'e göre olması,

15 R₁₁ ve R₁₂ ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya aynı olması ve H, Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül, asetil, propiyonil, benzoil, -CH₂X-alkil, - CH₂X-asil arasından seçilmesi, burada X ifadesinin O, NR₆ veya S olması,

R_c ve R_d ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya aynı olması ve CH₂X-alkil, CH₂X-asil arasından seçilmesi, burada X = O, NR₆ veya S olması,

20 R₁₃, R₁₄ ve R₁₅ ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya aynı olması ve H, Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül, -COOH, O-asil, O-alkil, N-asil, N-alkil, X-asil, CH₂X-alkil arasından seçilmesi;

R₁₃ ve R₁₄ veya R₁₃ ve R₁₅ üzerindeki ornatıkların köprü oluşturarak bir halkalı sistem oluşturması,

R_f, R_g ve R_h ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya aynı olması ve X-asil, - CH₂X-alkil, - CH₂X-asil ve R₉ arasından seçilmesi,

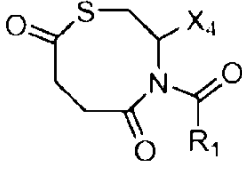
25 alkilin Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül arasından seçilmesi,

asilin formil, asetil, propiyonil, isopropiyonil, bütiril, tert-bütiril, pentanoil, benzoil
arasından seçilmesi,

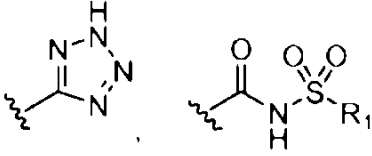
asil ve/veya alkilin isteğe bağlı olarak ornatılmış olabilmesi, ve

A ve B arasında noktalı bağ mevcut olduğunda, formül l'e göre bileşik aşağıdaki gibi

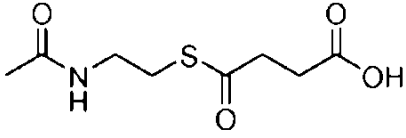
5 olup:



içerisinde X₄ ifadesinin -COOH, -C(=O)XR₆ arasından seçilmesi,

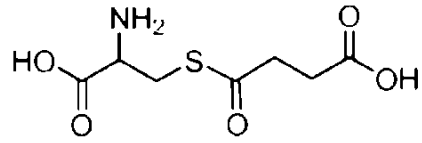
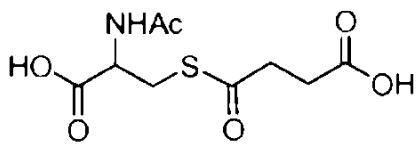


bileşiğin aşağıdakilerden biri olmaması koşulu bulunmasıdır:



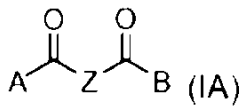
10

veya



veya

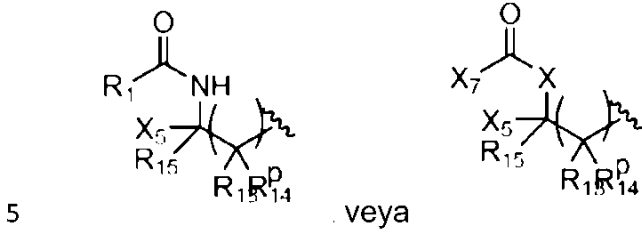
2. İstem 1'e göre, Formül IA'ya uygun bir bileşik



veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu olup, özelliği; içerisinde

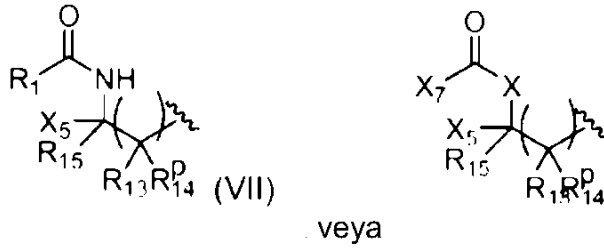
Z ifadesinin $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ olması,

A ifadesinin $-\text{SR}$, $-\text{OR}$ ve NHR arasından seçilmesi, ve R ifadesinin aşağıdaki gibi olması:



B ifadesinin $-\text{O-R}'$, $-\text{NHR}''$, $-\text{SR}'''$ veya $-\text{OH}$ arasından seçilmesi; ve

R' , R'' ve R''' ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya özdeş olması ve aşağıdaki formüllerden biri arasından seçilmesi:



10 R_1 ve R_3 ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya özdeş olması ve H, Me, Et, propil, O-Me, O-Et, O-propil arasından seçilmesi,

X ifadesinin O, NH, S arasından seçilmesi,

p ifadesinin bir tamsayı olması ve 1 olması,

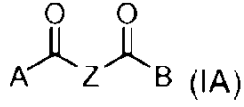
R_6 ifadesinin H, Me, Et arasından seçilmesi,

15 X_5 ifadesinin $-\text{H}$, Me, Et, $-\text{COOH}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{XR}_6$, CONR_1R_3 arasından seçilmesi

X_7 ifadesinin R_1 , $-\text{NR}_1\text{R}_3$ arasından seçilmesi,

R_{13} , R_{14} ve R_{15} ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya aynı olması ve H, Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül, $-\text{COOH}$, O-asil, O-alkil, N-asil, N-alkil, X-asil, CH_2X -alkil arasından seçilmesi; içerisinde alkil ve asilin yukarıda tanımlandığı gibi olmasıdır.

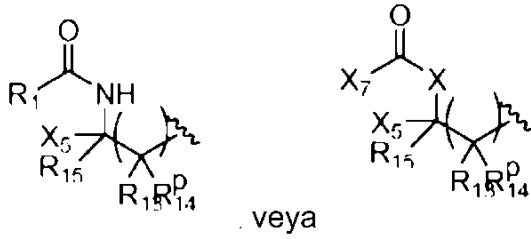
3. İstem 1 veya 2'ye göre, Formül IA'ya uygun bir bileşik



veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu olup, özelliği; içerisinde

Z ifadesinin $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ olması,

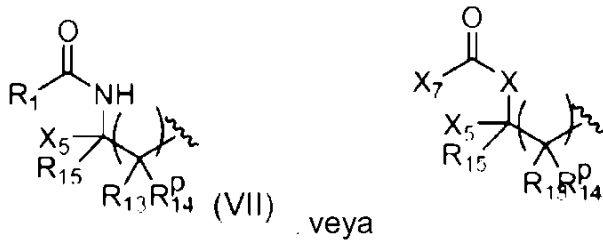
5 A ifadesinin $-\text{SR}$, $-\text{OR}$ ve NHR arasından seçilmesi, ve R ifadesinin aşağıdaki gibi olması:



B ifadesinin $-\text{O}-\text{R}'$, $-\text{NHR}''$, $-\text{SR}'''$ veya $-\text{OH}$ arasından seçilmesi; ve

R', R'' ve R''' ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya özdeş olması ve aşağıdaki

10 formüllerden biri arasından seçilmesi:



R₁ ve R₃ ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya özdeş olması ve H, Me, Et, propil, O-Me, O-Et, O-propil arasından seçilmesi,

X ifadesinin O, NH, S arasından seçilmesi,

15 p ifadesinin bir tamsayı olması ve 1 olması,

R₆ ifadesinin H, Me, Et arasından seçilmesi,

X₅ ifadesinin $-\text{H}$, Me, Et, $-\text{COOH}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}_6$, CONR_1R_3 arasından seçilmesi,

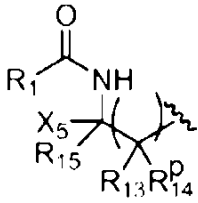
X_7 ifadesinin R_1 , $-NR_1R_3$ arasından seçilmesi,

R_{13} , R_{14} ve R_{15} ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya aynı olması ve H, Me, Et, $-COOH$ arasından seçilmesidir.

4. Yukarıdaki istemlerden herhangi birine göre bir bileşik olup, özelliği; içerisinde Z ifadesinin $-CH_2CH_2-$ ve A ifadesinin $-SR$ olmasıdır.

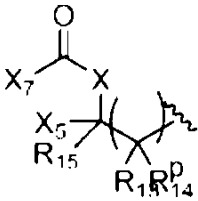
5. Yukarıdaki istemlerden herhangi birine göre bir bileşik olup, özelliği; içerisinde Z ifadesinin $-CH_2CH_2-$, A ifadesinin $-SR$ ve B ifadesinin OH veya SR''' olmasıdır.

6. Yukarıdaki istemlerden herhangi birine göre bir bileşik olup, özelliği; içerisinde Z ifadesinin $-CH_2CH_2-$, A ifadesinin $-SR$, B ifadesinin OH veya SR''' olması, burada R''' ifadesinin aşağıdaki gibi olmasıdır:



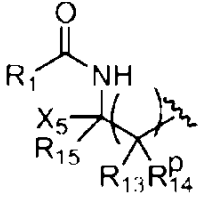
7. Yukarıdaki istemlerden herhangi birine göre bir bileşik olup, özelliği; içerisinde Z ifadesinin $-CH_2CH_2-$ ve A ifadesinin SR ve B ifadesinin OH olmasıdır.

8. İstem 1 ila 3'ten herhangi birine göre bir bileşik olup, özelliği; içerisinde Z ifadesinin $-CH_2CH_2-$, A ifadesinin NR , B ifadesinin OH ve R ifadesinin aşağıdaki gibi olması:

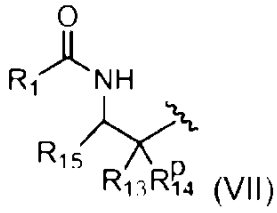


ve X ifadesinin S olmasıdır.

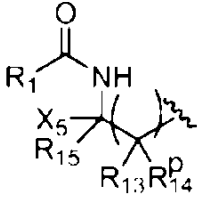
9. Yukarıdaki istemlerden herhangi birine göre bir bileşik olup, özelliği; içerisinde R ve/veya R''' ifadesinin aşağıdaki gibi olması:



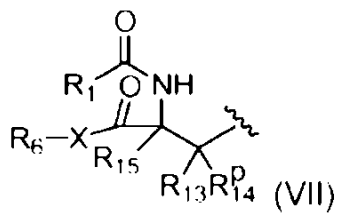
ve $p=1$ ve X_5 ifadesinin $-H$ olması, formül VII'nin aşağıdaki gibi olmasıdır:



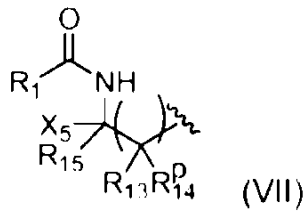
10. İstem 1 ila 8'den herhangi birine göre bir bileşik olup, özelliği; içerisinde R ve/veya R''' ifadesinin aşağıdaki gibi olması:



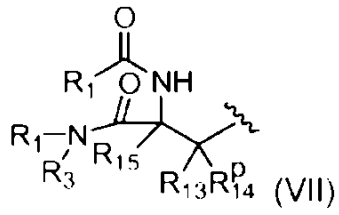
ve $p=1$ ve X_5 ifadesinin $COXR_6$ olması, formül VII'nin aşağıdaki gibi olmasıdır:



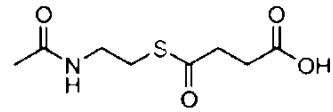
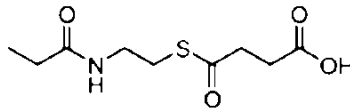
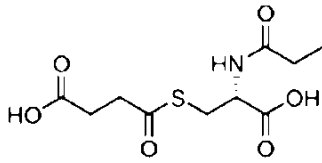
11. İstem 1 ila 8'den herhangi birine göre bir bileşik olup, özelliği; içerisinde R ve/veya R''' ifadesinin aşağıdaki gibi olması:

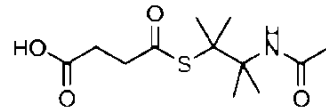
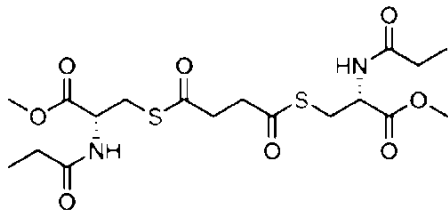
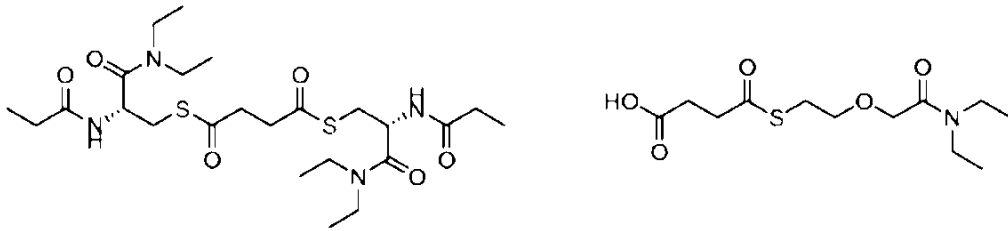
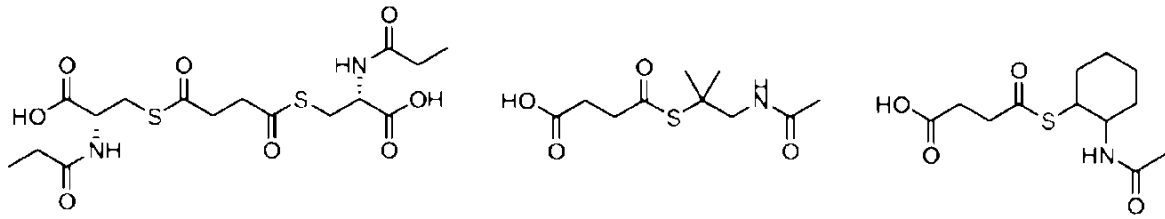


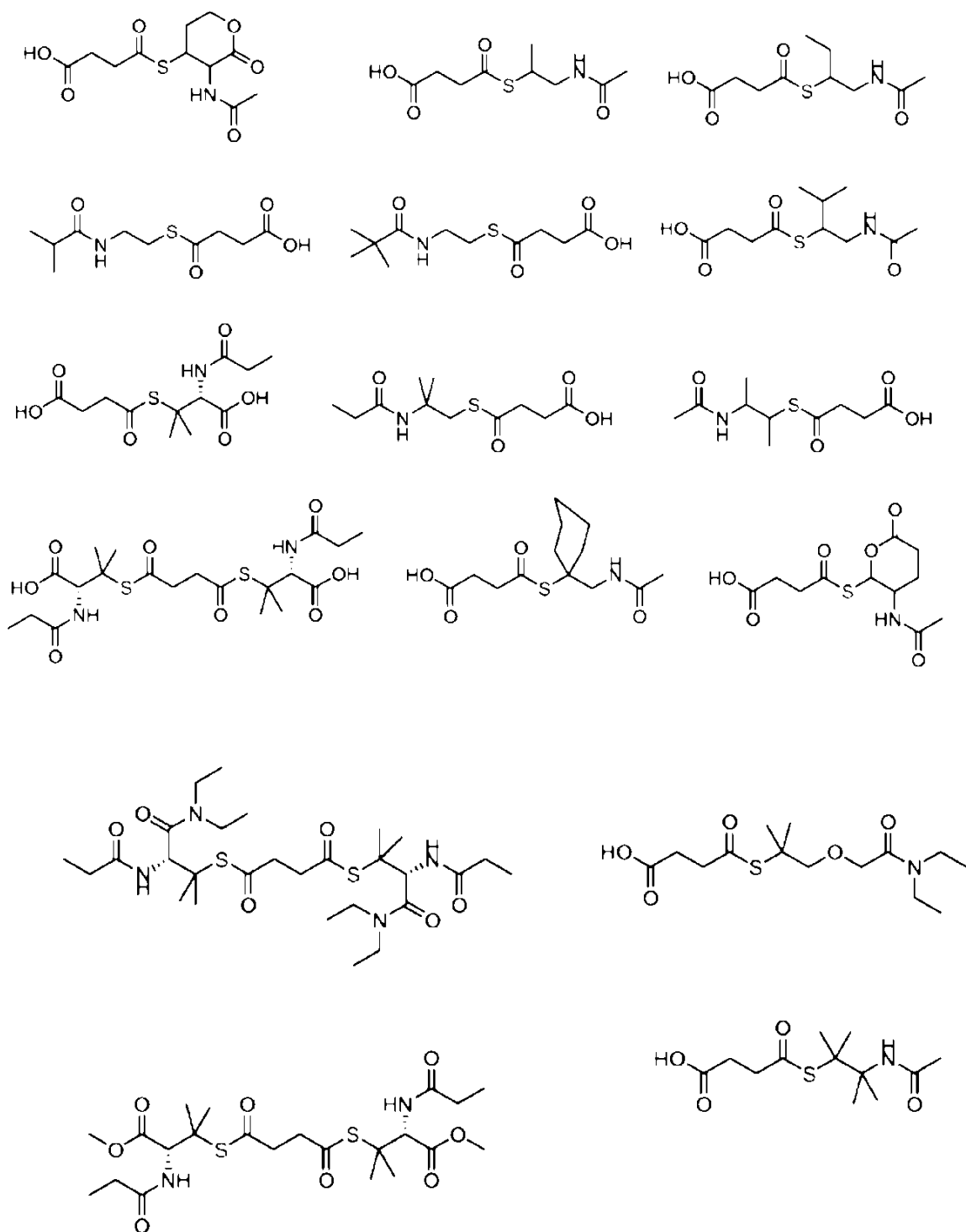
ve $p=1$ ve X_5 ifadesinin $CONR_1R_3$ olması, formül VII'nin aşağıdaki gibi olmasıdır:

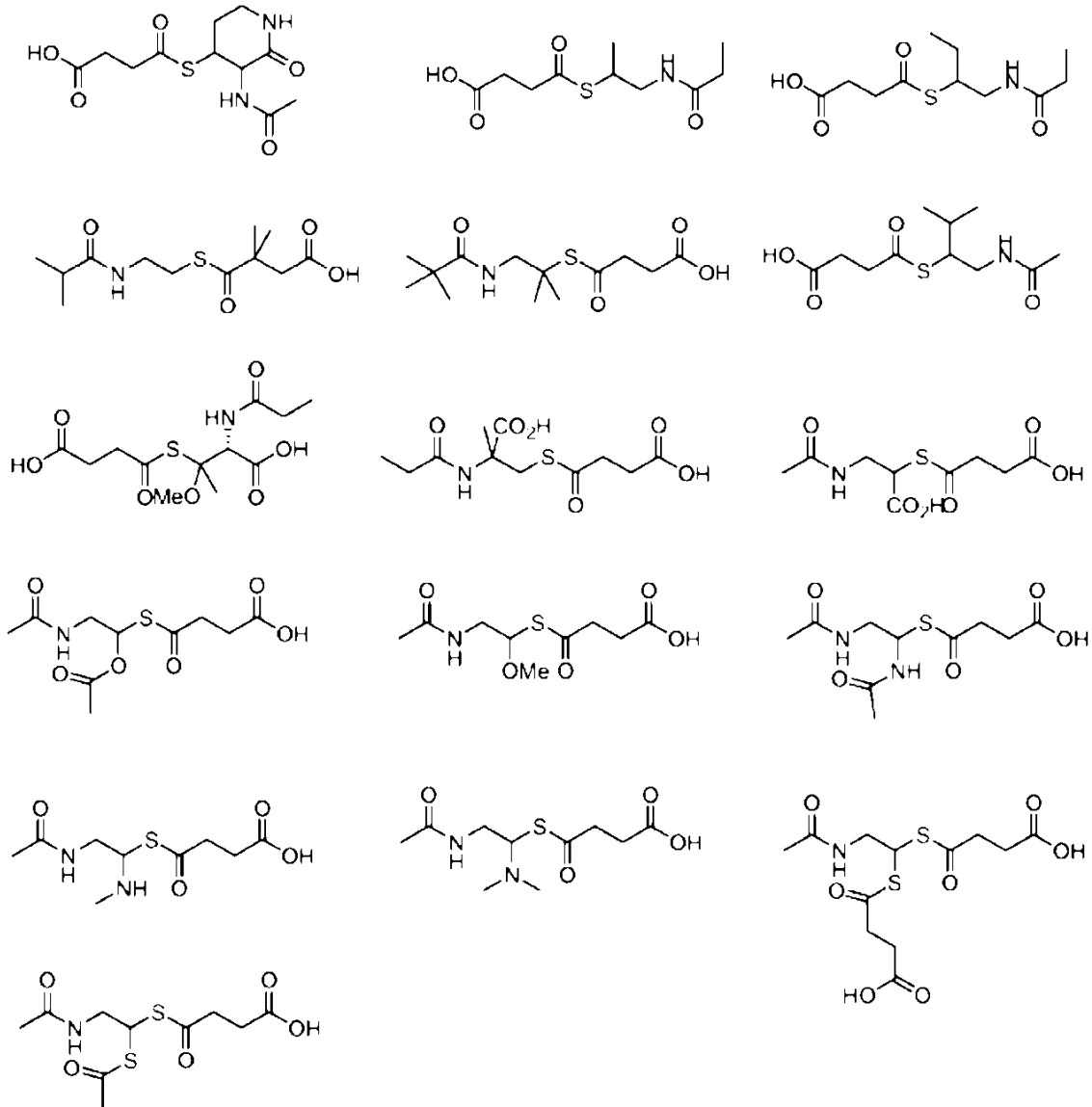


12. Yukarıdaki istemlerden herhangi birine göre bir bileşik olup, özelliği; içerisinde 5 bileşiğin aşağıdakilerin arasından seçilmesidir:









13. İstem 1 ila 12'den herhangi birine göre bir bileşik olup, özelliği; tıp alanında kullanıma yönelik olmasıdır.

14. İstem 1 ila 12'den herhangi birine göre bir bileşik olup, özelliği; kozmetik alanında kullanıma yönelik olmasıdır.

15. İstem 1 ila 12'den herhangi birine göre tanımlanan şekilde Formül I'in bir bileşimini ve farmasötik olarak veya kozmetik olarak kabul edilebilir eksipiyantları içeren bir bileşimdir.

TARİFNAME

ÖZGÜN HÜCRE GEÇİRGEN SÜKSİNAT BİLEŞİKLERİ

Buluşun Alanı

Mevcut buluş özgün hücre geçirgen süksinatlar ve mitokondride ATP üretimini artırma amaçlı hücre geçirgen süksinat öncülleri sağlar. Ökaryotik hücrede üretilen ve kullanılan ATP'nin büyük kısmı, yüksek enerjili elektronların Krebs döngüsüyle sağlandığı mitokondriyal oksidatif fosforilasyondan kaynaklanır. Krebs döngüsü ara ürünlerinin tamamı hücre zarından kolaylıkla geçmemekte olup, bunlardan birisi süksinattır. Yeni hücre geçirgen süksinatların sağlanması, hücre zarı üzerinde geçişi sağlamak için tasarlanmıştır ve böylece hücre geçirgen süksinatlar, mitokondriyal ATP çıktısını arttırmak için kullanılabilir.

Ayrıca mevcut buluş, hücre geçirgen süksinatlar veya süksinat eşdeğerlerini sağlamakta olup, bunlar hücre geçirgen olmalarının ve sitozolde süksinat salımı yapmalarının yanı sıra süksinat türevlerinin kimyasal veya enzimatik hidrolizinden kaynaklanan hidrolitik ürünler tarafından organizmaya potansiyel olarak ilave enerji sağlayabilir.

Mevcut buluş ayrıca, mevcut buluşun tıp ve/veya kozmetik alanında kullanım için gelişmiş özelliklere sahip olan bileşiklerinin hazırlanmasına yönelik metotlar sağlar. Özellikle, buluşun bileşikleri, mitokondriye bağlı bozuklukların önlenmesinde veya tedavisinde, mitokondriyal fonksiyonun muhafaza edilmesinde, mitokondriyal fonksiyonun güçlendirilmesinde, yani normalden daha fazla ATP üretilmesinde veya mitokondriyal solunum sistemindeki kusurların düzeltilmesinde yararlıdır.

Buluşun Arka Planı

Mitokondriler ökaryotik hücrede organellerdir. Hücrenin, bir enerji kaynağı olarak kullanılan adenosin trifosfat (ATP) kaynağının çoğunu üretirler. Böylece, mitokondri, ökaryotik hücrelerin hayatta kalması ve doğru hücre fonksiyon amacıyla enerji üretimi için vazgeçilmezdir. Enerji sağlamaya ek olarak, mitokondriler, hücre sinyalleme, hücre farklılaşması, hücre ölümü aynı zamanda hücre döngüsü ve hücre büyümesinin kontrolü gibi çeşitli başka proseslerde de rol oynar. Özellikle mitokondriler, hücre

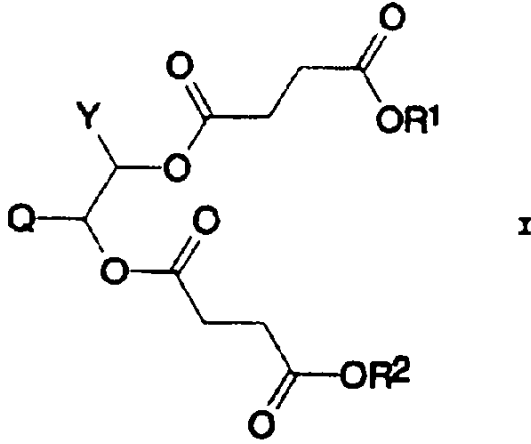
apoptozunun kritik düzenleyicileridir ve aynı zamanda nekroz gibi apoptotik olmayan hücre ölümünün çeşitli formlarında da önemli bir rol oynarlar.

5 Son yıllarda çeşitli hastalıklara mitokondriyal katkıları açıklayan birçok makale yayınlanmıştır. Bazı hastalıklar mitokondriyal veya nükleer genomdaki mutasyonlar veya silinmelerden kaynaklanabilirken, diğerleri mitokondriyal solunum sisteminin primer veya sekonder bozukluğundan veya mitokondriyal disfonksiyona bağlı diğer mekanizmalardan kaynaklanabilir. Günümüzde mitokondriyal hastalıkları iyileştirebilecek herhangi bir tedavi mevcut değildir.

10 Normal bir mitokondriyal fonksiyonun muhafaza edilmesinin veya restore edilmesinin veya hücrenin enerji üretiminin (ATP) artırılmasının kabul edilmiş önemi göz önünde bulundurulduğunda, aşağıdaki özelliklere sahip olan bileşiklerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır: Ana hücrenin hücre geçirgenliği, hücre içi süksinat veya süksinatın bir öncülünü serbest bırakma yeteneği, ana bileşiğin ve salgılanan ürünlerin düşük toksisitesi ve bir hastaya verilise uygun fizikokimyasal özellikler.

15 Süksinat bileşikleri, diğer aktif maddelerin ön ilaçları olarak hazırlanmış olup, örneğin WO 2002/28345 belgesinde, süksinik asit bis (2,2-dimetilpropioniloksimetil) ester, süksinik asit dibütiriloksimetil ester ve süksinik asit bis-(1-bütiriloksietil)ester tarif edilir. Bu bileşikler, formaldehit vermek için maddeler olarak hazırlanır ve mevcut bileşiklere farklı tıbbi kullanımlar amaçlanır. Formaldehit, WO 2002/28345'e ait bileşiklere maruz 20 kalan hücrelerdeki hem nükleer hem de mitokondriyal DNA için tespit edilebilen DNA'lı eklenme ürünleri oluşturabilir. Bu, bileşiğin mitokondriye teslimini belgelemektedir.

Önceki teknik bileşikleri arasında bir dizi poliol süksinatı tarif eden W09747584 bulunmaktadır.



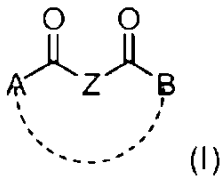
Burada verilen örnekte, Y ifadesi bir H veya alkil grubudur. Her bir süksinat bileşiği C(Y)-C(Q) yapısına sahip bir grup ile bağlanan çok sayıda süksinat parçası içerir ve her bir ester asidi bu nedenle bir O-C-C etil grubu biçiminde en az iki karbon atomu içeren bir parçaya doğrudan bağlanır. Açıklanan her bir bileşik birden fazla sayıda süksinat parçası içerir ve süksinat parçası O-C-X tipi bir parça ile korunmamakta olup, burada X ifadesi bir heteroatomdur.

Çeşitli süksinat ester bileşikleri teknikte bilinmektedir. Dietil süksinat, monometil süksinat ve dimetil süksinatın, aşağıda örneklenen analizlerde etkisiz olduğu ve buluşun kapsamının dışında kaldığı gösterilmiştir.

Ayrıca, US 5,871,755 belgesi, oksidatif strese karşı ajanlar olarak ve kozmetik amaçlı olarak kullanım için süksinamidlerin dehidroalanin türevleri ile ilgilidir.

Buluşun Açıklaması

Mevcut buluşa göre bir bileşik Formül I'de verilmiş

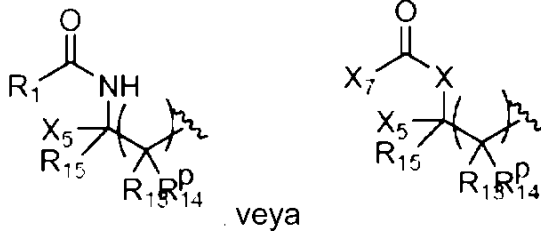


15

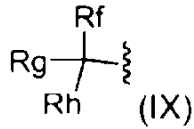
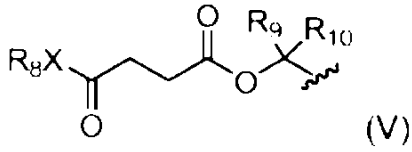
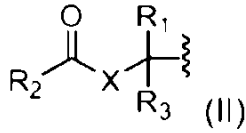
veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu olup, özelliği; içerisinde A ve B arasındaki noktalı bağın bir kapalı halka yapısı oluşturmak üzere isteğe bağlı bir bağ belirtmesi ve içerisinde

Z ifadesinin $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ veya $>\text{CH}(\text{CH}_3)$ arasından seçilmesi,

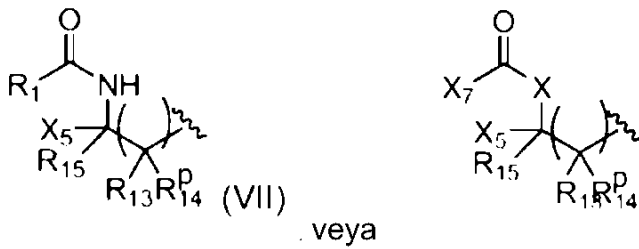
A ifadesinin $-\text{SR}$, $-\text{OR}$ ve NHR arasından seçilmesi, ve R ifadesinin aşağıdaki gibi olması:

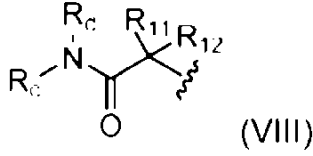


- 5 B ifadesinin $-\text{O-R}'$, $-\text{NHR}''$, $-\text{SR}'''$ veya $-\text{OH}$ arasından seçilmesi; ve R' ifadesinin aşağıdaki formül II ila IX arasından seçilmesi:



R', R'' ve R''' ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya özdeş olması ve aşağıdaki Formül IV-VIII arasından seçilmesi:





R₁ ve R₃ ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya aynı olması ve H, Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül, O-asil, O-alkil, N-asil, N-alkil, X-asil, CH₂X-alkil, CH₂X-asil, F, CH₂COOH, CH₂CO₂alkil arasından seçilmesi,

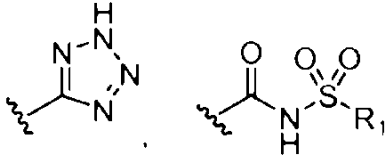
5 X ifadesinin O, NH, NR₆, S arasından seçilmesi,

R₂ ifadesinin Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül, C(O)CH₃, C(O)CH₂C(O)CH₃, C(O)CH₂CH(OH)CH₃ arasından seçilmesi,

p ifadesinin bir tamsayı olması ve 1 veya 2 olması

R₆ ifadesinin H, Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül, asetil, asil, propiyonil, 10 benzoil veya formül II veya formül VIII arasından seçilmesi

X₅ ifadesinin -H, Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül, -COOH, - C(=O)XR₆, CONR₁R₃ arasından seçilmesi veya aşağıdaki formüle göre olması:



X₇ ifadesinin R₁, -NR₁R₃ arasından seçilmesi,

15 R₉ ifadesinin H, Me, Et veya O₂CCH₂CH₂COXR₈ arasından seçilmesi

R₁₀ ifadesinin Oasil, NHalkil, NHasil, veya O₂CCH₂CH₂COX₆R₈ arasından seçilmesi

X₆ ifadesinin O, NR₈, NR₆R₈ arasından seçilmesi, içerisinde R₆ ve R₈ ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya aynı olması ve H, alkil, Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül, asetil, asil, propiyonil, benzoil arasından seçilmesi veya formül II veya formül

20 VIII'e göre olması,

R₁₁ ve R₁₂ ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya aynı olması ve H, Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül, asetil, propiyonil, benzoil, -CH₂X-alkil, -CH₂X-asil arasından seçilmesi, burada X ifadesinin O, NR₆ veya S olması,

5 R_c ve R_d ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya aynı olması ve CH₂X-alkil, CH₂X-asil arasından seçilmesi, burada X = O, NR₆ veya S olması,

R₁₃, R₁₄ ve R₁₅ ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya aynı olması ve H, Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül, -COOH, O-asil, O-alkil, N-asil, N-alkil, X-asil, CH₂X-alkil arasından seçilmesi;

10 R₁₃ ve R₁₄ veya R₁₃ ve R₁₅ üzerindeki ornatıkların köprü oluşturarak bir siklik sistem oluşturması ve böylece sikloalkil, heterosikloalkil, lakton veya laktamlar oluşturmasıdır.

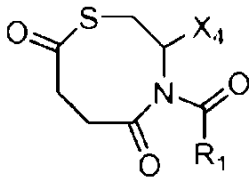
R_f, R_g ve R_h ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya aynı olması ve X-asil, -CH₂X-alkil, -CH₂X-asil ve R₉ arasından seçilmesi,

alkilin Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül arasından seçilmesi,

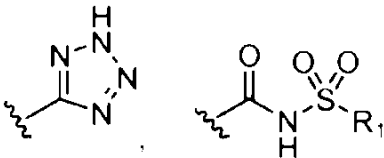
15 asilin formil, asetil, propiyonil, isopropiyonil, bütiril, tert-bütiril, pentanoil, benzoil, süksinil arasından seçilmesi,

asil ve/veya alkilin isteğe bağlı olarak ornatılmış olabilmesi, ve

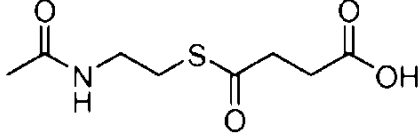
A ve B arasında noktalı bağ mevcut olduğunda, formül l'e göre bileşiğin aşağıdaki gibi olması:



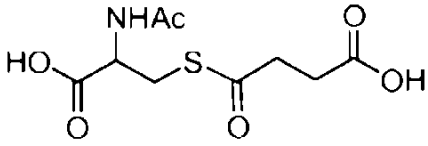
20 içerisinde X₄ ifadesinin -COOH, -C(=O)XR₆ arasından seçilmesi,



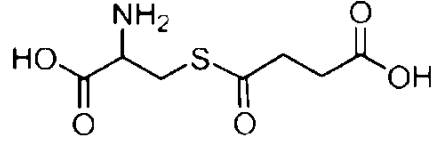
bileşiğin aşağıdakilerden biri olmaması koşulu bulunmasıdır:



veya



veya

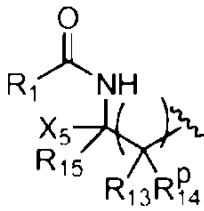


- 5 Formül I'in bileşikleri (ve bunların farmasötik olarak kabul edilebilir tuzları) buradan itibaren "buluşun bileşikleri", "buluşun bileşiği" veya "mevcut buluşun bileşikleri" olarak adlandırılacaktır.

Mevcut buluşun özellikle ilgi gösterilen bileşikleri, içerisinde Z ifadesinin - CH₂CH₂- ve A ifadesinin -SR olduğu bileşiklerdir.

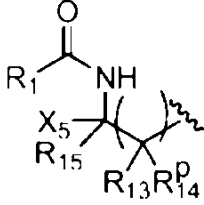
- 10 Mevcut buluşun özellikle ilgi gösterilen bileşikleri, içerisinde Z ifadesinin - CH₂CH₂-, A ifadesinin SR, ve B ifadesinin OH veya B ifadesinin SR^{'''} olduğu bileşiklerdir.

Mevcut buluşun özellikle ilgi gösterilen bileşikleri, içerisinde Z ifadesinin - CH₂CH₂-, A ifadesinin SR, B ifadesinin OH veya B ifadesinin SR^{'''} olduğu, içerisinde R^{'''} ifadesinin aşağıdaki gibi olduğu bileşiklerdir:

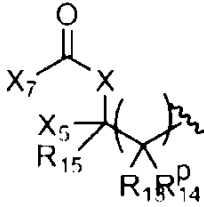


- 15 Mevcut buluşun özellikle ilgi gösterilen bileşikleri, içerisinde Z ifadesinin - CH₂CH₂- ve A ifadesinin -SR ve B ifadesinin OH olduğu bileşiklerdir.

Mevcut buluşun özellikle ilgi gösterilen bileşikleri, içerisinde Z ifadesinin -CH₂CH₂-, A ifadesinin SR, B ifadesinin OH veya B ifadesinin SR olduğu, içerisinde R ifadesinin aşağıdaki gibi olduğu bileşiklerdir:



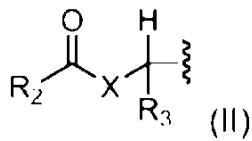
- 5 Mevcut buluşun özellikle ilgi gösterilen bileşikleri, içerisinde Z ifadesinin -CH₂CH₂-, A ifadesinin NR, B ifadesinin OH ve R ifadesinin aşağıdaki gibi olduğu:



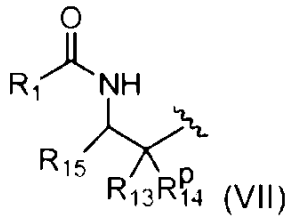
ve X ifadesinin S olduğu bileşiklerdir.

Tercihen ve formül II'ye göre, R₁ ve R₃ ifadelerinden en az biri -H olup, böylece formül II

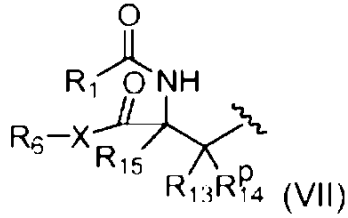
- 10 aşağıdaki gibi olur:



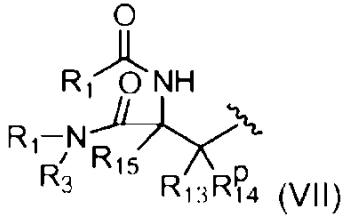
Tercihen ve formül VII'ye göre, p=1 ve X₅ ifadesi -H olup, böylece formül VII aşağıdaki gibidir:



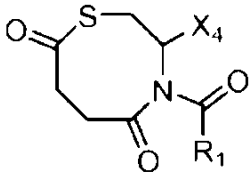
Tercihen ve formül VII'ye göre, $p=1$ ve X_5 ifadesi $COXR_6$ olup, böylece formül VII aşağıdaki gibidir:



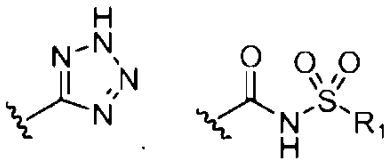
5 Tercihen ve formül VII'ye göre, $p=1$ ve X_5 ifadesi $CONR_1R_3$ olup, böylece formül VII aşağıdaki gibidir:



Formül I'e göre bir bileşik aşağıdaki gibi olabilmekte olup, özelliği;

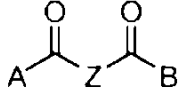


içerisinde X_4 ifadesinin $-COOH$, $-C(=O)XR_6$ arasından seçilmesi,



10

Özellikle, mevcut buluşa göre bir bileşik Formül IA ile verilmekte:



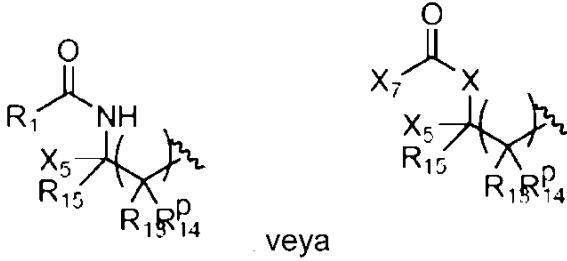
(IA)

ya da bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu olup, özelliği; içerisinde

Z ifadesinin $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ olması,

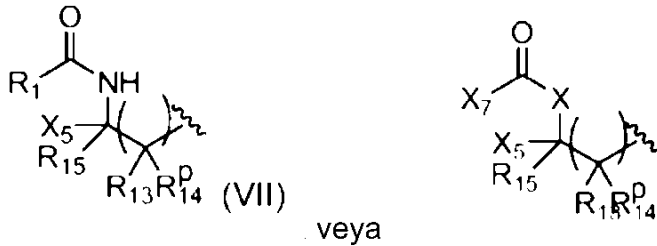
A ifadesinin $-\text{SR}$, $-\text{OR}$ ve NHR arasından seçilmesi, ve R ifadesinin aşağıdaki gibi

5 olması:



B ifadesinin $-\text{O}-\text{R}'$, $-\text{NHR}''$, $-\text{SR}'''$ veya $-\text{OH}$ arasından seçilmesi; ve

R' , R'' ve R''' ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya özdeş olması ve aşağıdaki formüllerden biri arasından seçilmesi:



10

R_1 ve R_3 ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya özdeş olması ve H, Me, Et, propil, O-Me, O-Et, O-propil arasından seçilmesi,

X ifadesinin O, NH, S arasından seçilmesi,

p ifadesinin bir tamsayı olması ve 1 olması,

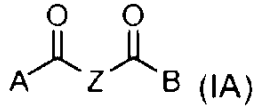
15 R_6 ifadesinin H, Me, Et arasından seçilmesi,

X₅ ifadesinin -H, Me, Et, -COOH, -C(=O)XR₆, CONR₁R₃ arasından seçilmesi

X₇ ifadesinin R₁, -NR₁R₃ arasından seçilmesi,

R₁₃, R₁₄ ve R₁₅ ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya aynı olması ve H, Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül, -COOH, O-asil, O-alkil, N-asil, N-alkil, X-asil, CH₂X-alkil
5 arasından seçilmesi; içerisinde alkil ve asilin yukarıda tanımlandığı gibi olmasıdır.

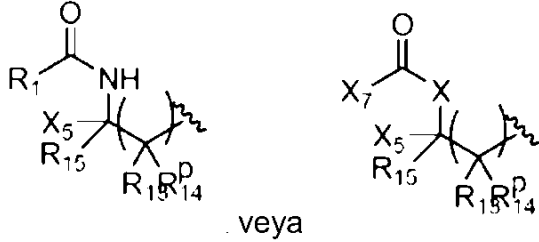
Özellikle ilgi çekici olan bir bileşik Formül IA ile verilmekte:



ya da bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu olup, özelliği; içerisinde

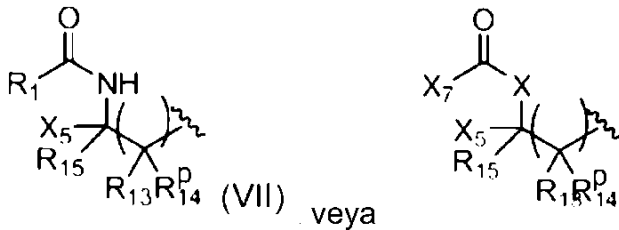
Z ifadesinin -CH₂-CH₂- olması,

10 A ifadesinin -SR, -OR ve NHR arasından seçilmesi, ve R ifadesinin aşağıdaki gibi olması:



B ifadesinin -O-R', -NHR'', -SR'''' veya -OH arasından seçilmesi; ve

R', R'' ve R'''' ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya özdeş olması ve aşağıdaki
15 formüllerden biri arasından seçilmesi:



R₁ ve R₃ ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya özdeş olması ve H, Me, Et, propil, O-Me, O-Et, O-propil arasından seçilmesi,

X ifadesinin O, NH, S arasından seçilmesi,

p ifadesinin bir tamsayı olması ve 1 olması,

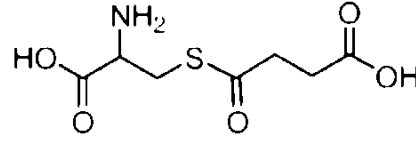
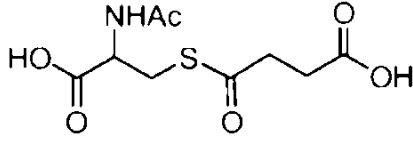
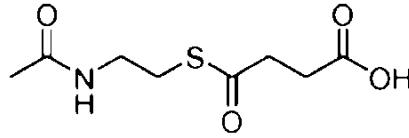
R₆ ifadesinin H, Me, Et arasından seçilmesi,

X₅ ifadesinin -H, Me, Et, -COOH, -C(=O)OR₆, CONR₁R₃ arasından seçilmesi,

5 X₇ ifadesinin R₁, -NR₁R₃ arasından seçilmesi,

R₁₃, R₁₄ ve R₁₅ ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya aynı olması ve H, Me, Et, -COOH arasından seçilmesidir.

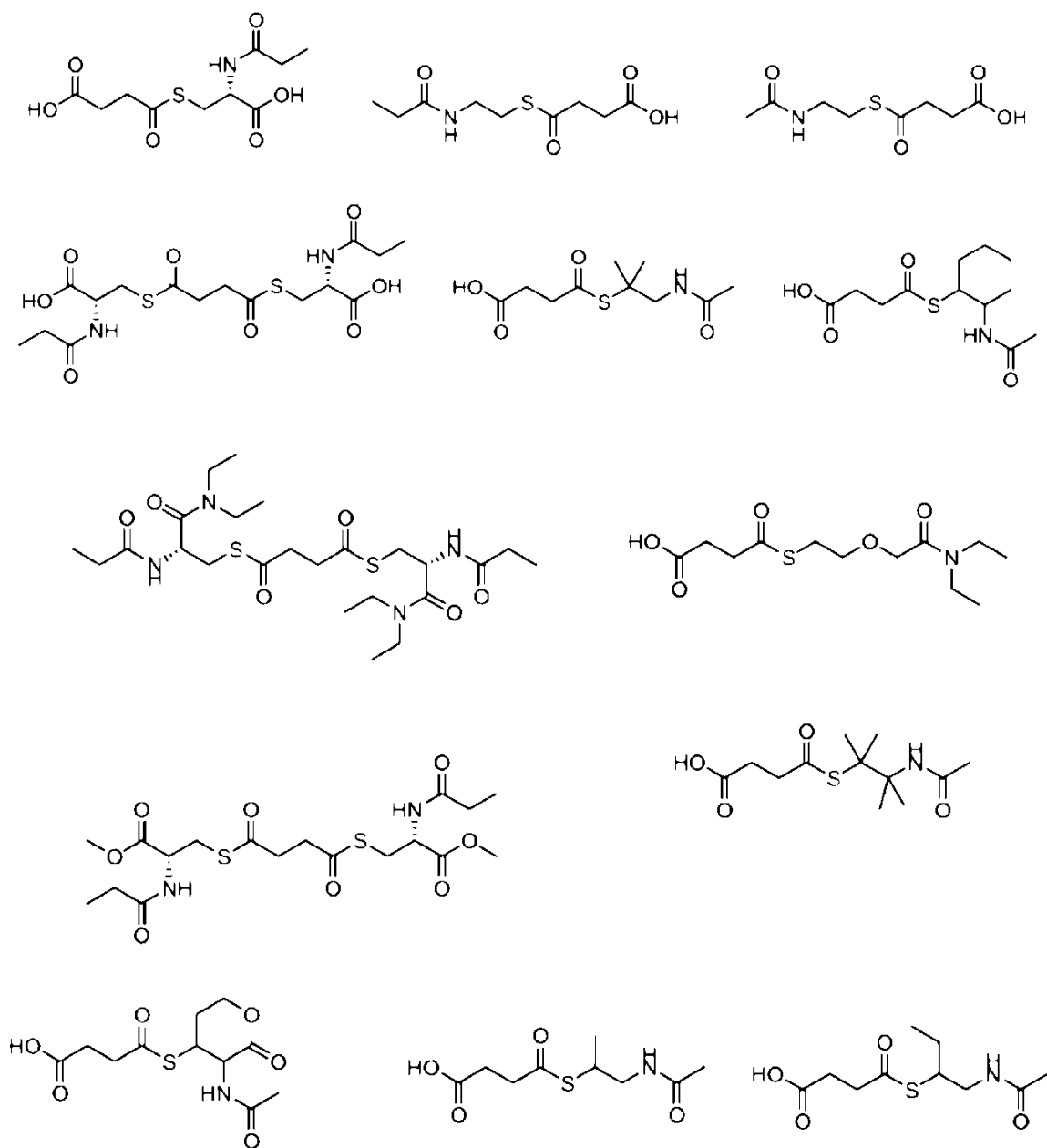
Aşağıdaki bileşik Moore ve ark., J. Biol. Chem., 1982, 257, ss. 10882-10892 belgesinden bilinmektedir.

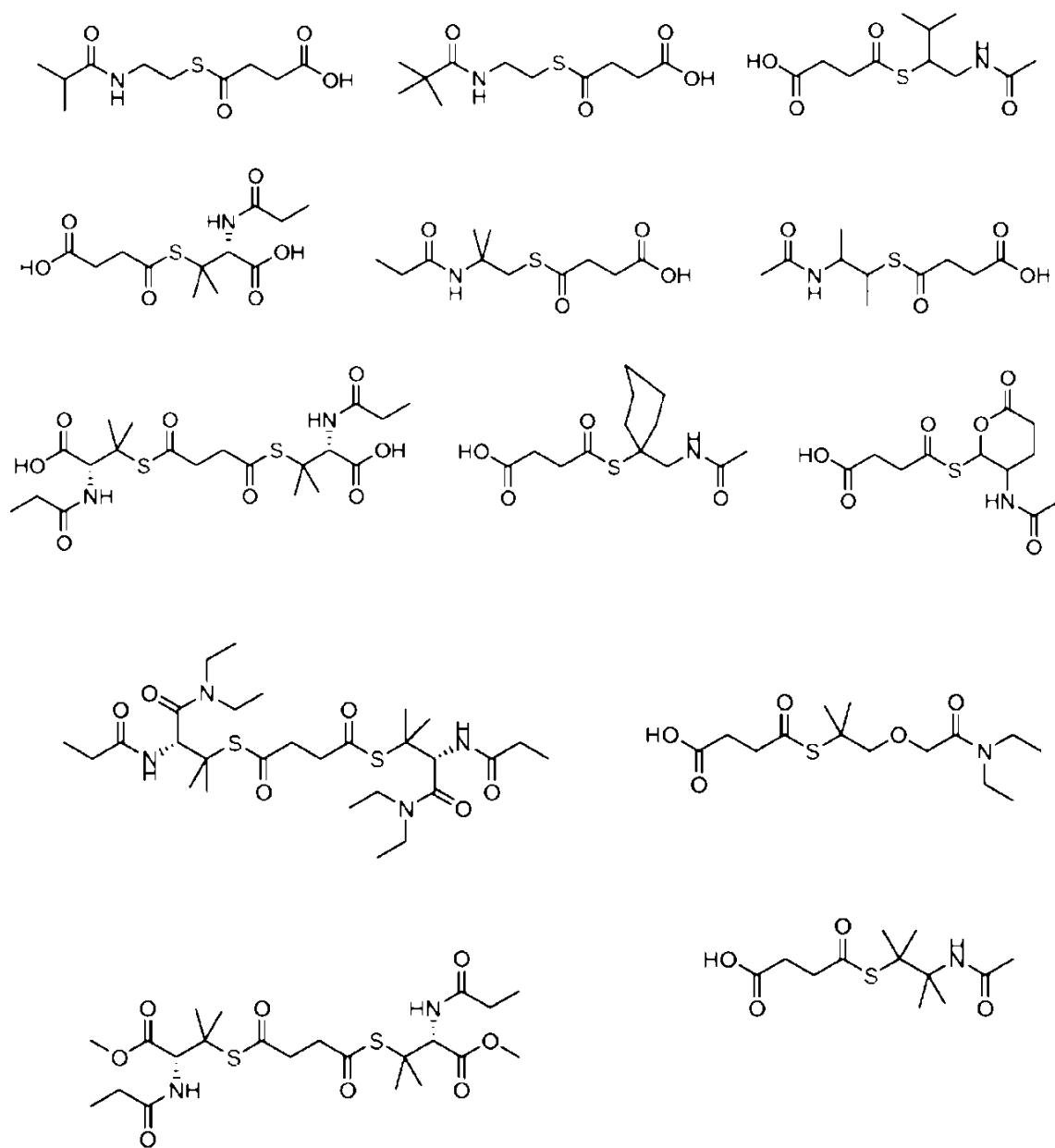


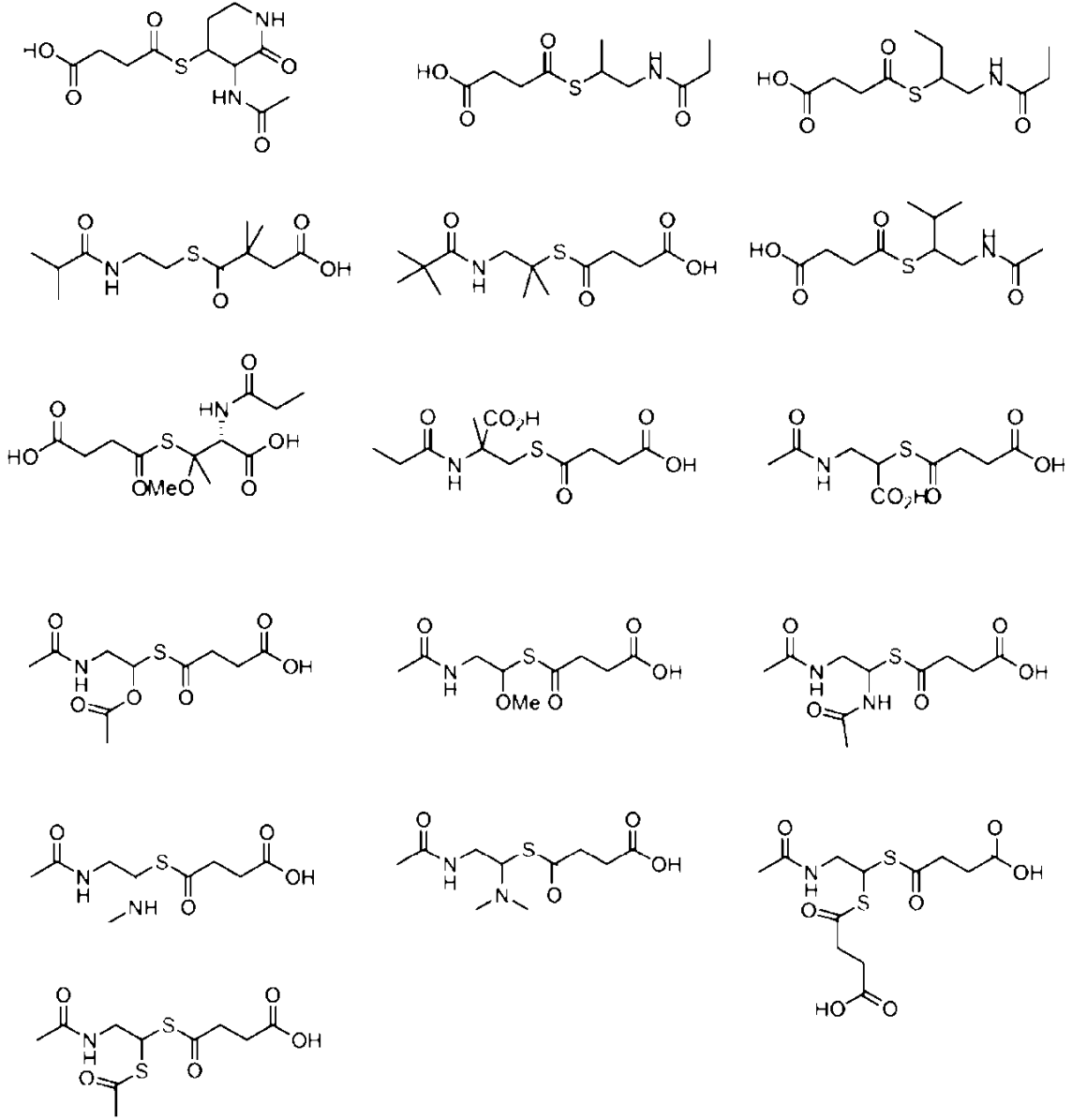
10

Bununla birlikte, mevcut buluş burada tartışılan mitokondrilerle ilişkili hastalıkların tedavisinde kullanıma yönelik olan veya burada tartışılan mitokondrilerle ilişkili hastalıklar için veya bunların tedavi için bir ilacın üretimine yönelik olan bu bileşikleri içerebilir veya içermeyebilir.

15 Mevcut buluşa göre spesifik bileşikler şunlardır:







Genel Kimya Metotları

- 5 Teknikte uzman kişi, mevcut buluşun bileşiklerinin herhangi bir bilinen şekilde, çeşitli yollarla hazırlanabileceğini takdir edecektir. Aşağıdaki yollar sadece formül (I) bileşiklerinin sentezi için kullanılacak bazı metotları göstermektedir. Mevcut buluşun bileşikleri süksinik asit, bir mono-korunmalı süksinik asit, bir mono-aktifleştirilmiş

metilmalonik asit, bir mono-korumalı metilmalonik asit veya bir mono-aktifleştirilmiş metilmalonik asit ile başlanarak yapılabilir.

Koruyucu gruplar arasında, sınırlandırma olmaksızın benzil ve tert-bütül bulunur. Karboniller için diğer koruyucu gruplar ve bunların kaldırılması 'Greene's Protective Groups in Organic Synthesis' (Wuts and Greene, Wiley, 2006) belgesinde ayrıntılı olarak açıklanmaktadır. Koruyucu gruplar, benzil esterleri için heterojen bir katalizör varlığında hidrojenasyon ve tert-butül esterler için organik veya mineral asitler, tercihen trifloroasetik asit veya seyreltik HCl ile işleme dahil olmak üzere teknikte uzman bir kişi tarafından bilinen metotlar ile kaldırılabilir.

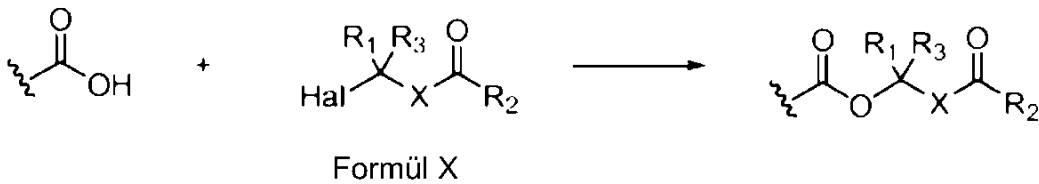
10 Aktifleştirici grupların arasında sınırlandırma olmaksızın karıştırılmış anhidritler ve asil klorürler bulunur.

Bu nedenle, Formül I'in bileşikleri simetrik ve dolayısıyla simetrik bir başlangıç malzemesi seçilir. Ya bir simetrik dikarboksilik asit seçilir ya da bir di-aktifleştirilmiş karboksilik asit seçilir. Tercihen seçilen bileşik süksinik asit veya süksinil klorürdür.

15 Formül I'in bileşiği asimetrik olduğunda, seçilen başlangıç malzemesi asimetriktir. Bu, "asitle korumalı asit", "asitle aktifleştirilmiş asit" ve "korumalı asitle aktifleştirilmiş asit"i içerir. Tercihen bu, süksinik asit mono-benzil ester, süksinik asit mono-tert bütül ester, 4-kloro-4-oksobütirik asidi içerir.

Alternatif olarak, formül I'in asimetrik bir bileşiği için, simetrik bir başlangıç malzemesi, tercih edilen süksinik asit seçilir ve daha az türevlendirici bir başlangıç malzemesi kullanılır. Aşağıdaki genel metotlar kapsayıcı değildir ve mevcut buluşun bileşiklerinin üretilmesi için başka metotların kullanılabilceği teknikte uzman kişiler tarafından takdir edilecektir. Bu metotlar birlikte veya ayrı ayrı kullanılabilir.

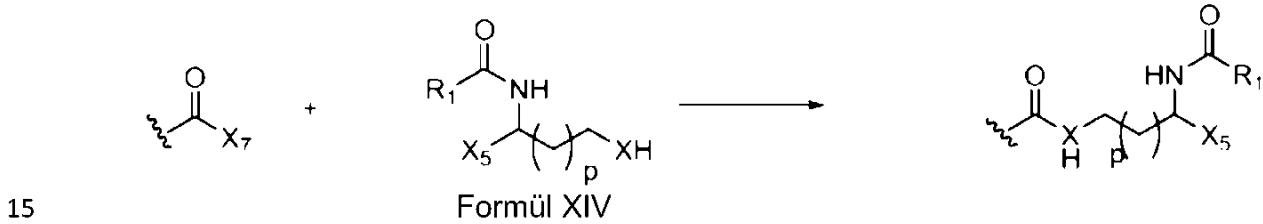
25 Formül I'in formül II'yi içeren bileşikleri bir karboksilik asidin uygun bir alkil halojenür (formül X) ile tepkimeye sokulmasıyla yapılabilir. Örn.



5 içerisinde Hal ifadesi bir halojendir (örn. F, Cl, Br veya I) ve R₁, R₂ ve R₃ ifadeleri formül II'de tanımlandığı gibidir. Tepkime, uygun şekilde bir çözücü, örneğin diklorometan, aseton, asetonitril veya N,N-dimetilformamit içinde, uygun bir baz, örneğin trietilamin, diizopropiletilamin veya sezyum karbonat ile, örneğin -10°C ila 80°C arasındaki bir sıcaklıkta, özellikle oda sıcaklığında gerçekleştirilir. Tepkime, sodyum iyodür veya tetraalkil amonyum halojenürler (örn. tetrabutil amonyum iyodür) gibi isteğe bağlı katkı maddeleri ile gerçekleştirilebilir.

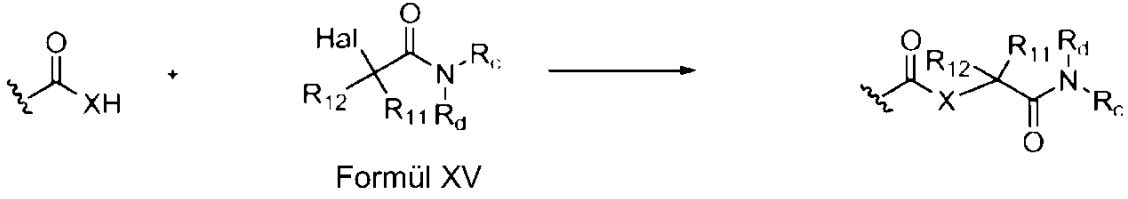
10 Formül X'in bileşikleri ya ticari olarak temin edilebilir ya da Journal of the American Chemical Society, 43, 660-7; 1921 veya Journal of medicinal chemistry (1992), 35(4), 687-94 belgelerinde belirtilenler gibi literatür yöntemleri ile uygun şekilde hazırlanabilir.

Formül I'in, formül VII'yi içeren bileşikleri, aktive edilmiş bir karboksilik asidin formül XIV'ün bir bileşiğiyle, isteğe bağlı olarak aktive edici türler mevcutken tepkimeye sokulmasıyla yapılabilir.



20 içerisinde X₅ ve R₁ ifadeleri formül VII'de tanımlandığı gibidir ve X₇ ifadesi Hal (Cl, F, Br) veya karışık anhidrittir. Tercihen X₇ = Cl'dir. Tepkime, uygun şekilde bir çözücü, örneğin diklorometan, aseton, THF, asetonitril veya N,N-dimetilformamit içinde, uygun bir baz, örneğin trietilamin, diizopropiletilamin veya sezyum karbonat ile, örneğin -10°C ila 80°C arasındaki bir sıcaklıkta, özellikle oda sıcaklığında gerçekleştirilir.

Formül I'in, formül VIII'i içeren bileşikleri, aktive edilmiş bir karboksilik asidin formül XIV'ün bir bileşiğiyle, isteğe bağlı olarak aktive edici türler mevcutken tepkimeye sokulmasıyla yapılabilir.



içerisinde Hal ifadesi bir halojendir (örn. F, Cl, Br veya I) ve R₁₁, R₁₂ ve R_c ve R_d ifadeleri formül VIII'de tanımlandığı gibidir. Tepkime, uygun şekilde bir çözücü, örneğin diklorometan, aseton, asetonitril veya N,N-dimetilformamit içinde, uygun bir baz, örneğin trietilamin, diizopropiletilamin veya sezyum karbonat ile, örneğin -10°C ila 80°C arasındaki bir sıcaklıkta, özellikle 80 °C'de gerçekleştirilir. Tepkime, sodyum iyodür veya tetraalkil amonyum halojenürler (örn. tetrabutyl amonyum iyodür) gibi isteğe bağlı katkı maddeleri ile gerçekleştirilebilir.

- 10 Formül X'un bileşikleri ya ticari olarak temin edilebilir ya da bir aminin bir asil klorür ile tepkimeye sokulduğu literatüre uygun metotlarla uygun şekilde hazırlanabilir.

Formül I'in, Formül IX'u içeren bileşikleri, yukarıda tarif edilen metotlar ve teknikte uzman bir kişi tarafından bilinen diğer metotların birleştirilmesiyle yapılabilir.

Mevcut buluşun bileşiklerinin genel kullanımı

- 15 Burada tarif edilen bileşikler tıpta veya kozmetikte veya böyle bir kullanıma uygun bir bileşimin üretiminde kullanılabilir. İlaçlar gelişmiş veya korunan bir enerji üretimi (ATP) istendiği herhangi bir durumda, örneğin metabolik hastalıkların tedavisinde veya mitokondriyal fonksiyon bozukluğu hastalıkları veya rahatsızlıklarının tedavisinde, mitokondriyal bozuklukların tedavisinde veya bastırılmasında kullanılabilir. Bileşikler, 20 mitokondriyal enerji üretiminin uyarılmasında ve örneğin, sensörinöral işitme kaybı veya kulak çınlaması (mitokondriyal toksisiteye bağlı bazı antibiyotiklerin yan etkisi) veya laktik asidoz gibi ilaca bağlı mitokondriyal disfonksiyonun restorasyonunda kullanılabilir. Bileşikler kanser, diyabet, akut açlık, endotoksemi, sepsisemi, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu, çoklu organ fonksiyon bozukluğu sendromunun tedavisinde ve hipoksi, 25 iskemi, inme, miyokart enfarktüsü, akut anjin, bir akut böbrek yaralanması, koroner oklüzyon ve atriyal fibrilasyon sonrasında veya reperfüzyon yaralanmalarının önlenmesi

veya bunlara karşı konulmasında kullanılabilir. Ayrıca, mevcut buluşun bileşiklerinin erkekte kısırlığın tedavisinde yararlı olabileceği öngörülmektedir.

5 Buluşun bileşiklerinin Krebs döngüsünün bileşenlerini ve isteğe bağlı olarak glikoliz yollarının hücre geçirgen öncüllerini sağlayacağı öngörülmektedir. Hücre içine girdikten sonra, enzimatik veya kimyasal hidrolizin, isteğe bağlı olarak asetat ve glikoz gibi diğer enerji sağlayıcı malzemeler ile birlikte suksinat veya metil malonatı serbest bırakacağı düşünülmektedir.

10 Mevcut buluşun bileşikleri mitokondrielerde enerji üretimini geliştirmede veya geri kazanmada kullanılabilir. Açıkça, bileşikler tıp veya kozmetik alanında kullanılabilir. Bileşikler mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve/veya bir enerji (ATP) eksikliği bileşeniyle ilgili bir bileşene sahip olan bozukluklar veya hastalıkların önlenmesi ya da tedavisinde kullanılabilir.

15 Enerji üretiminin artırılması, örneğin bir mitokondriyal eksiklik, bozukluk veya hastalıktan muzdarip olan kişilerle ilgilidir. Mitokondriyal hastalıklar, alyuvarlar dışında vücudun her hücresinde bulunan özel bölümler olan mitokondrinin işlev bozukluğundan kaynaklanır. Mitokondriyal fonksiyon azaldığında, hücre içinde üretilen enerji azalır ve hücre hasarı veya hücre ölümü takip eder. Bu işlem vücutta tekrarlanırsa, kişinin yaşamı ciddi şekilde tehlikeye girer.

20 Mitokondri hastalıkları genellikle retina, koklea, beyin, kalp, karaciğer, iskelet kasları, böbrek ve endokrin ve solunum sistemi gibi çok enerji gerektiren organlarda görülür.

Bir mitokondriyal hastalığın belirtileri motor kontrol kaybı, kas zayıflığı ve ağrı, nöbetler, görme/işitme sorunları, kalp hastalıkları, karaciğer hastalıkları, gastrointestinal bozukluklar, yutma güçlükleri ve daha fazlasını içerebilir.

25 Bir mitokondriyal hastalık kalıtsal olabilir veya normalde mitokondride ikamet eden proteinlerin veya RNA moleküllerinin işlevlerinde değişime yol açan kendiliğinden mutasyonlara bağlı olabilir.

Kompleks I, II, III veya IV eksikliği veya örneğin piruvat dehidrojenaz eksikliği gibi bir enzim eksikliği benzeri birçok hastalığın bir mitokondriyal eksiklik içerdiği bulunmuştur. Bununla birlikte, durum karmaşıktır ve hastalıklarda birçok faktör bulunabilir.

Günümüze kadar, iyileştirici tedaviler bulunmamıştır. Mevcut olan tek tedavi çeşidi, semptomları hafifletebilen ve hastalığın ilerlemesini geciktirebilen tedavilerdir. Buna göre, mevcut buluş sahiplerinin bulguları ve burada tarif edilenler, mitokondriyadaki enerji üretimi üzerindeki süksinik asit hücre geçirgen bileşiklerinin yararlı etkisini göstermeleri bakımından çok önemlidir.

Ek olarak, bilinen süksinat ön ilaçlarıyla karşılaştırıldığında (örneğin, WO 97/47584'te bahsedilen), bunlar bu ve ilişkili hastalıkların tedavisi için gelişmiş özellikler göstermekte olup, örneğin daha iyi hücre geçirgenliği, daha uzun plazma yarı ömrü, düşük toksisite, mitokondrilere enerji salımında artış ve gelişmiş formülasyonu (çözünürlük artışı gibi gelişmiş özelliklerden kaynaklı) içerir. Bazı durumlarda bileşiklerin ayrıca oral yoldan biyolojik olarak kullanımı mümkün olup, bu da daha kolay uygulamaya izin verir.

Bu nedenle, mevcut buluşun bileşiğinin avantajlı özellikleri aşağıdakilerden bir ya da daha fazlasını içerebilir:

- Arttırılmış hücre geçirgenliği
- 15 ○ Plazmada daha uzun yarı ömür
- Azaltılmış toksisite
- Mitokondrilere arttırılmış enerji salımı
- Gelişmiş formülasyon
- Arttırılmış çözünürlük
- 20 ○ Arttırılmış oral biyoyararlanım

Mevcut buluş, bir farmasötik olarak, özellikle hücresel enerji (ATP) eksikliğinin tedavisinde kullanılmak üzere mevcut buluşun bileşiğini sağlar.

Mevcut buluşun bir bileşiği kompleks I bozukluğunun tedavisinde, kompleksin kendisinin fonksiyon bozukluğunun veya Kompleks I'e NADH teminini kısıtlayan herhangi bir rahatsızlık ya da hastalığın, örn. Krebs döngüsü, glikoliz, beta-oksidasyon, piruvat metabolizması ve hatta glükoz veya diğer Kompleks-I ile ilişkili substratların taşınmasındaki fonksiyon bozukluğunun tedavisinde kullanılabilir.

Mevcut buluşun bileşikleri mitokondriyal kompleks I ile ilişkili bozuklukların, örneğin sınırlandırma olmaksızın, Leigh Sendromu, Leber kalıtsal optik nöropati (LHON), MELAS (mitokondriyal ensefalomiyopati, laktik asidoz ve inme benzeri nöbetler) ve MERRF (düzensiz kırmızı lifli miyoklonik epilepsi) tedavisinde kullanılabilen olup, 5 ihtiyacı olan bir hastaya, mevcut buluşun bileşiğinin etkili bir miktarının uygulanmasını içerir.

Mevcut buluş ayrıca, mevcut buluşun bileşiğinin, ilaca bağlı olarak gelişen laktik asidozun tedavisine yönelik bir ilacın üretiminde kullanımını sağlar.

Buluşun bir bileşiği, ayrıca, uzun süreli cerrahi ve yoğun bakım gibi, ancak bunlarla 10 sınırlı olmamak üzere, ekstra enerji üretiminin potansiyel olarak yararlı olabileceği her durumda yararlı olabilir.

Mitokondriler

Mitokondriler ökaryotik hücrede organeller olup, popüler olarak hücrenin "enerji santrali" olarak adlandırılır. Birincil fonksiyonlarından biri oksidatif fosforilasyondur. Adenozin 15 trifosfat (ATP) molekülü, bir enerji "para birimi" veya hücre içinde enerji taşıyıcısı olarak işlev görür ve ökaryotik hücreler, ATP'lerinin çoğunu, mitokondri ile gerçekleştirilen biyokimyasal işlemlerden alırlar. Bu biyokimyasal prosesler, oksitlenmiş nikotinamid adenin dinükleotitten (NAD^+) indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit ($NADH$) ve oksitlenmiş flavin adenin dinükleotitten (FAD) indirgenmiş flavin adenin dinükleotit 20 ($FADH_2$) üreten sitrik asit döngüsünü (trikarboksilik asit döngüsü veya Krebs döngüsü) ve aynı zamanda $NADH$ ve $FADH_2$ 'nin yeniden $NAD^{<+>}$ ve FAD 'ye oksitlendiği oksidatif fosforilasyonu içerir.

$NADH$ 'nin oksidasyonuyla açığa çıkan elektronlar, solunum zinciri olarak bilinen bir dizi protein kompleksleri (Kompleks I, Kompleks II, Kompleks III ve Kompleks IV) ile indirilir. 25 Süksinatın oksidasyonu, kompleks II'de (süksinat dehidrojenaz kompleksi) meydana gelir ve FAD , enzim kompleksi süksinat dehidrojenazda (kompleks II) bir prostetik gruptur. Solunum kompleksleri mitokondriyonun iç zarına gömülüdür. Zincirin sonundaki kompleks IV, elektronları oksijene aktarır ve bu da suya indirgenir. Bu elektronlar kompleksleri geçerken salınan enerji, mitokondriyonun iç membranı boyunca bir proton 30 gradyanı oluşturmak için kullanılmakta olup, bu iç membran boyunca bir elektrokimyasal

potansiyel oluşturur. Başka bir protein kompleksi olan Kompleks V (Kompleks I, II, III ve IV ile doğrudan ilişkili değildir), ADP'yi ATP'ye dönüştürmek için elektrokimyasal gradyan tarafından depolanan enerjiyi kullanır.

5 Sitrik asit döngüsü ve oksidatif fosforilasyon, bir glükoz molekülünün glükoz molekülü başına iki ATP molekülü ile birlikte iki moleküllü pirüvata ayrıldığı glikolizden önce gelir. Piruvat molekülleri daha mitokondrilere girer, burada oksidatif fosforilasyon vasıtasıyla tamamıyla CO₂ ve H₂O'ya oksitlenir (genel proses aerobik respirasyon olarak bilinir). İki piruvat molekülünün karbondioksit ve suya tam oksidasyonu, glüközün iki piruvat molekülüne dönüştürülmesiyle üretilen 2 ATP molekülüne ek olarak en az 28-29 ATP
10 molekülü verir. Oksijen mevcut değilse, piruvat molekülü mitokondrilere girmeyip, daha ziyade anaerobik solunum sürecinde laktata dönüşür.

Glüköz molekülü başına toplam net verim yaklaşık olarak en az 30-31 ATP molekülüdür. ATP, hücredeki hemen hemen her diğer biyokimyasal reaksiyona doğrudan veya dolaylı olarak enerji sağlamak için kullanılır. Bu nedenle, aerobik solunum sırasında oksidatif
15 fosforilasyonun katkıda bulunduğu en az (yaklaşık) 28 veya 29 adet ekstra ATP molekülü, hücrenin düzgün çalışması için kritik öneme sahiptir. Oksijen eksikliği aerobik solunumu önler ve neredeyse tüm aerobik organizmaların ölümüne neden olmakta olup; mayalar gibi birkaç organizma, aerobik veya anaerobik solunumu kullanarak hayatta kalabilmektedir.

20 Bir organizmadaki hücreler geçici olarak oksijenden yoksun kaldığında, oksijen tekrar mevcut hale gelene veya hücre ölünceye kadar anaerobik solunum kullanılır. Glikoliz sırasında üretilen piruvat, anaerobik solunum sırasında laktata dönüştürülür. Laktik asit birikiminin, kas hücrelerine oksijen sağlanamadığında, yoğun aktivite dönemlerinde kas yorgunluğundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Oksijen tekrar mevcut olduğunda,
25 laktat oksidatif fosforilasyonda kullanılmak üzere tekrar piruvat haline dönüştürülür.

Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu çeşitli hastalık durumlarına katkıda bulunur. Bazı mitokondriyal hastalıklar mitokondriyal genom veya nükleer mutasyonlar veya delesyonlardan kaynaklanır. Hücredeki mitokondri eşik değeri kusurlu ise ve bir doku içindeki bu tür hücrelerin eşik oranı bozuk mitokondrileri varsa, doku veya organ

fonksiyon bozukluğu semptomları görülebilir. Pratikte, herhangi bir doku etkilenebilir ve farklı dokuların katkısına bağlı olarak çok çeşitli semptomlar bulunabilir.

Mevcut buluşun bileşiklerinin kullanımı

Mevcut buluşun bileşikleri gelişmiş veya korunan bir enerji üretimi (ATP) istendiği herhangi bir durumda kullanılabilir. Örneklerin tamamı örneğin mitokondriyal ATP üretiminin artışında veya mitokondriyal fonksiyonun restorasyonunda potansiyel bir yarar olduğu, örneğin ilaca bağlı olarak gelişen mitokondriyal fonksiyon bozukluğu veya laktik asidozun restorasyonunda ve kanser, diyabet, akut açlık, endotoksemi, septisemi, işitme kaybı, görsel keskinlik kaybı, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu ve çoklu organ fonksiyon bozukluğu sendromu durumlarında tamamıyla klinik koşullar altındadır. Bileşikler ayrıca hipoksi, iskemi, inme, miyokard enfarktüsü, akut anjina, akut böbrek hasarı, koroner oklüzyon, atriyal fibrilasyon ve reperfüzyon hasarlarının önlenmesinde veya sınırlandırılmasında da yararlı olabilir.

Özellikle, mevcut buluşun bileşikleri tıp alanında, özellikle mitokondrilerle ilişkili bir rahatsızlık, hastalık ya da bozukluğun tedavisinde ya da önlenmesinde veya kozmetik alanında kullanılabilir.

Mitokondri fonksiyon bozukluğu ayrıca renal tübüler asidoz; motor nöron hastalığı; diğer nörolojik hastalıklar; epilepsi; genetik hastalıklar; Huntington hastalığı; duygudurum bozuklukları; şizofreni; bipolar rahatsızlık; yaşla ilişkili hastalıklar; serebral vasküler kazalar, maküler dejenerasyon; diyabet; ve kanserle ilişkili olarak da tarif edilir.

Mevcut buluşun mitokondriyle ilişkili bozukluklar veya hastalıklarda kullanıma yönelik bileşikleri Mevcut buluşa göre bileşikler aşağıdakilerin arasından seçilen bir mitokondriyle ilişkili hastalığın önlenmesi ya da tedavisinde kullanılabilir:

- Alpers Hastalığı (Progresif İnfantil Poliyodistrofi)
- Amiyotrofik lateral skleroz (ALS)
- Otizm
- Barth sendromu (Ölümcül infantil kardiyomiyopati)
- Beta oksidasyon bozuklukları

- Biyoenerji metabolizması eksikliği
- Karnitin-Asil-Karnitin Eksikliği
- Karnitin eksikliği
- Kreatin Eksikliği Sendromları (Serebral Kreatin Eksikliği Sendromları
- 5 (CCDS) şunları içerir: Guanidinoasetat Metiltransferaz eksikliği (GAMT Eksikliği), L-Arjinin:Glisin Amidinotransferaz eksikliği (AGAT Eksikliği) ve SLC6A8 ile ilişkili kreatin taşıyıcı eksikliği (SLC6A8 Eksikliği).
- Ko-enzim Q10 eksikliği
- Kompleks I Eksikliği (NADH dehidrojenaz (NADH-CoQ redüktaz) eksikliği)
- 10 ○ Kompleks II Eksikliği (Süksinat dehidrojenaz eksikliği)
- Kompleks III Eksikliği (Ubikinon-sitokrom koksiiidoredüktaz eksikliği)
- Kompleks IV Eksikliği/COX Eksikliği (Sitokrom koksidadaz eksikliği, solunum zincirinin kompleks IV'ündeki bir bozukluktan kaynaklanır)
- Kompleks V eksikliği (ATP sentaz eksikliği)
- 15 ○ COX eksikliği
- CPEO (Kronik Progresif Dış Oftalmopleji Sendromu)
- CPT I Eksikliği
- CPT II Eksikliği
- Friedreich ataksisi (FRDA veya FA)
- 20 ○ Glutarik Asidüri Tip II
- KSS (Kearns-Sayre Sendromu)
- Laktik asidoz
- LCAD (Uzun Zincirli Asil-CoA Dehidrojenaz Eksikliği)
- LCHAD
- 25 ○ Leigh Hastalığı veya Sendromu (Subakut Nekrotizan Ensefalomiyelopati)

- LHON (Leber kalıtsal optik nöropatisi)
 - Luft Hastalığı
 - MCAD (Orta-Zincirli Asil-CoA Dehidrojenaz Eksikliği)
 - MELAS (Mitokondriyal Ensefalomiyopati Laktik asidoz ve inme benzeri
- 5 nöbetler)
- MERRF (Miyoklonik Epilepsi ve Düzensiz Kırmızı Lif Hastalığı)
 - MIRAS (Mitokondriyal Resesif Ataksi Sendromu)
 - Mitokondriyal Sitopati
 - Mitokondriyal DNA Tüketimi
- 10 ○ Mitokondriyal Ensefalopati şunları içerir: Ensefalomiyopati, Ensefalomiyelopati
- Mitokondriyal miyopati
 - MNGIE (Miyoneürogastrointestinal Bozukluk ve Ensefalopati)
 - NARP (Nöropati, Ataksi ve Retinitis Pigmentosa)
- 15 ○ Parkinson, Alzheimer veya Huntington hastalığı ile ilişkili nörodejeneratif hastalıklar
- Pearson sendromu
 - Piruvat Karboksilaz Eksikliği
 - Piruvat Dehidrojenaz Eksikliği
- 20 ○ POLG mutasyonları
- Solunum Zinciri Eksiklikleri
 - SCAD (Kısa Zincirli Asil-CoA Dehidrojenaz Eksikliği)
 - SCHAD (Kısa Zincirli L-3-Hidroksiasil-CoA Dehidrojenaz (SCHAD) Eksikliği, ayrıca 3-Hidroksi Asil CoA Dehidrojenaz Eksikliği HADH olarak da adlandırılır
- 25 ○ VLCAD (Çok Uzun Zincirli Asil-CoA Dehidrojenaz Eksikliği)

- Diyabet
- Akut açlık
- Endotoksemi
- Septisemi
- 5 ○ Sistemik inflamasyon yanıt sendromu (SIRS)
- Çoklu organ yetmezliği

Birleşik Mitokondriyal Hastalıklar Vakfı'nın (www.umdf.org) web sayfasından alınan bilgilere istinaden, yukarıda bahsedilen hastalıkların bazıları aşağıda daha ayrıntılı olarak ele alınmıştır:

- 10 *Kompleks I eksikliği:* Mitokondriyonun içinde dört zincir reaksiyonu (Kompleks I-IV) boyunca elektronları taşıyan ve enerji üretimi ile sonuçlanan bir grup protein bulunur. Bu zincir, Elektron Taşıma Zinciri olarak bilinir. Beşinci bir grup (Kompleks V) ATP'yi seri olarak üretir. Birlikte, elektron taşıma zinciri ve ATP sentaz respiratuvar zinciri oluşturur ve tüm süreç oksidatif fosforilasyon veya OXPHOS olarak bilinir.
- 15 Bu zincirdeki ilk adım olan Kompleks I, respiratuvar zincir eksikliklerinin üçte birini temsil eden mitokondriyal anormalliklerin en yaygın bölgesidir. Genellikle doğumda veya erken çocukluk döneminde ortaya çıkan Kompleks I eksikliği genellikle ilerleyici bir nörodejeneratif bozukluktur ve özellikle beyin, kalp, karaciğer ve iskelet kasları gibi yüksek enerji seviyelerine ihtiyaç duyan organlarda ve dokularda çeşitli klinik
- 20 semptomlardan sorumludur. Belirli bazı mitokondriyal bozukluklar, aşağıdakileri içeren Kompleks I eksikliği ile ilişkilendirilmiştir: Leber'in kalıtsal optik nöropatisi (LHON), MELAS, MERRF ve Leigh Sendromu (LS). MELAS, (mitokondriyal ensefalomyopati, laktik asidoz ve inme benzeri nöbetler) ve düzensiz kırmızı lifli miyoklonik epilepsi için MERRF standını temsil eder.
- 25 LHON, ortalama 27 ila 34 yaş arasında görülen körlük ile karakterize edilmekte olup; körlük, her iki göze aynı anda veya ardışık olarak gelişebilir (bir göz körlük geliştirir, ardından diğer gözde ortalama olarak iki ay sonra görülür). Kardiyak anomalileri ve nörolojik komplikasyonlar gibi başka semptomlar da görülebilir.

Kompleks I eksikliğinin üç ana formu vardır:

i) Zayıf kas tonusu, gelişimsel gecikme, kalp hastalığı, laktik asidoz ve solunum yetmezliği ile karakterize edilen ölümcül infantil multisistem bozukluğu.

ii) Çocukluk veya yetişkinlik döneminden başlayarak zayıflık veya egzersiz intoleransı ile karakterize edilen miyopati (kas hastalığı).

iii) Çocukluk veya yetişkinlik döneminden başlayarak, göz kası felci, pigmenter retinopati (görme kaybı ile retinal renk değişiklikleri), işitme kaybı, duyuşal nöropati (duyuş organlarını içeren sinir hasarı), nöbetler, bunama, ataksi (anormal kas koordinasyonu) ve istemsiz hareketleri içerebilen çeşitli semptom kombinasyonlarını içeren mitokondriyal ensefalomiyopati (beyin ve kas hastalığı). Kompleks I eksikliğinin bu formu Leigh Sendromuna ve MELAS'a neden olabilir.

Çoğu Kompleks I eksikliği vakası otozomal resesif kalıtımın (hem anne hem de babadan gelen hatalı nükleer genlerin kombinasyonu) sonucudur. Daha seyrek olarak, hastalık maternal kalıtsal veya sporadiktir ve genetik bozukluk mitokondriyal DNA'dadır.

Tedavi: Tüm mitokondriyal hastalıklarda olduğu gibi, şu anda Kompleks I eksikliği için iyileştirici bir tedavi yoktur. Etkili olabilen veya olmayabilen çeşitli tedaviler örneğin riboflavin, tiyamin, biyotin, ko-enzim Q10, karnitin ve ketojenik diyet gibi metabolik terapileri içerebilir. Infantil çok sistemli form için terapiler başarısız olmuştur.

Kompleks I hastaları için klinik seyir ve prognoz oldukça değişkendir ve spesifik genetik bozukluğu, başlangıç yaşına, dahil olan organlara ve diğer faktörlere bağlı olabilir.

Kompleks III Eksikliği: Semptomlar dört ana formu içerir:

i) Ölümcül infantil ensefalomiyopati, konjenital laktik asidoz, hipotoni, distrofik duruş, nöbetler ve koma. Kas dokusunda düzensiz kırmızı lifler yaygındır.

ii) Daha sonra başlangıçlı ensefalomiyopatiler (çocukluktan yetişkinliğe): kuvvetsizlik, kısa boy, ataksi, bunama, işitme kaybı, duyuşal nöropati, pigmenter retinopati ve piramidal işaretlerin çeşitli kombinasyonları. Düzensiz kırmızı lifler yaygındır. Olası laktik asidoz.

iii) Miyopati, egzersiz intoleransı ile birlikte sabit kuvvetsizliğe dönüşmektedir. Düzensiz kırmızı lifler yaygındır. Olası laktik asidoz.

iv) İnfantil histiositoid kardiyomiyopati.

Kompleks IV Eksikliği/COX Eksikliği: Semptomlar iki ana formu içerir:

- 5 1. Ensefalomiyopati: Tipik olarak yaşamın ilk 6 ila 12 aylık süreci için normaldir ve daha sonra gelişimsel regresyon, ataksi, laktik asidoz, optik atrofi, oftalmopleji, nistagmus, distoni, piramidal işaretler ve solunum problemleri gösterir. Sık nöbetler. Leigh Sendromuna neden olabilir

2. Miyopati: İki ana varyant bulunur:

- 10 1. Ölümcül infantil miyopati: doğumdan hemen sonra başlayabilir ve hipotoni, kuvvetsizlik, laktik asidoz, düzensiz kırmızı lifler, solunum yetmezliği ve böbrek problemleri eşlik edebilir.

- 15 2. Benign infantil miyopati: doğumdan hemen sonra başlayabilir ve hipotoni, kuvvetsizlik, laktik asidoz, düzensiz kırmızı lifler, solunum problemleri eşlik edebilir, ancak (eğer çocuk hayatta kalırsa) spontan iyileşme ile devam edebilir.

KSS (Kearns-Sayre Sendromu): KSS, sıklıkla göz kapaklarının sarkmasıyla (ptozis) başlayan, yavaş ilerleyen birçok sistemli mitokondriyal hastalıktır. Diğer göz kasları da nihai olarak dahil olur ve göz hareketinin felce uğramasına neden olur. Retina dejenerasyonu genellikle loş ışıklı ortamlarda görme zorluğuna neden olur.

20 KSS üç ana özellik ile karakterize edilir:

- tipik olarak 20 yaşından önce başlangıç, ancak bebeklik veya yetişkinlikte de ortaya çıkabilir
- Spesifik göz kaslarının felci (kronik progresif dış oftalmopleji - CPEO olarak adlandırılır)
- 25 • retinanın dejenerasyonu ve bunun sonucunda pigmentli (renkli) malzemenin anormal birikmesi (pigmenter retinopati).

Ayrıca, aşağıdaki koşullardan bir ya da daha fazlası bulunur:

- kalpte elektrik sinyallerinin bloke edilmesi (kalp iletim bozuklukları)
- yüksek serebrospinal sıvı proteini
- hareketlerin koordinasyonsuzluğu (ataksi).

5 KSS'li hastalarda ayrıca sağırılık, bunama, böbrek fonksiyon bozukluğu ve kas güçsüzlüğü gibi sorunlar da olabilir. Büyüme geriliği, kısa boy veya diyabet dahil olmak üzere endokrin anomalileri de belli olabilir. KSS nadir görülen bir hastalıktır. Genellikle, hücre çekirdeğinin DNA'sından çok, mitokondriya (mtDNA) DNA'sındaki genetik materyalin tek bir büyük delesyonundan (kaybından) kaynaklanır. 150'den fazla türü olan bu delesyonlar genellikle kendiliğinden 10 ortaya çıkar. Daha az sıklıkla, mutasyon anne tarafından bulaşır.

Tüm mitokondriyal hastalıklarda olduğu gibi KSS için de iyileştirici tedavi yoktur.

Tedaviler, dahil olan semptom ve organ tiplerine dayanır ve şunları içerebilir: Koenzim Q10, diyabet insülini, kalp ilaçları ve hayat kurtarıcı olabilen kalp pili. Göz kapaklarının sarkması için cerrahi müdahale düşünülebilir, ancak oftalmik cerrahi merkezlerindeki 15 uzmanlar tarafından yapılmalıdır.

KSS yavaş ilerler ve prognoz şiddete bağlı olarak değişir. Ölüm üçüncü veya dördüncü on yılda yaygındır ve organ sistemi yetmezliklerinden kaynaklanabilir.

Leigh Hastalığı veya Sendromu (Subakut Nekrotizan Ensefalomiyelopati): Semptomlar: Nöbetler, hipotoni, yorgunluk, nistagmus, zayıf refleksler, yeme ve yutma güçlüğü, 20 solunum problemleri, zayıf motor fonksiyonu, ataksi.

Nedenler: Piruvat Dehidrogenaz Eksikliği, Kompleks I Eksikliği, Kompleks II Eksikliği, Kompleks IV / COX Eksikliği, NARP.

Leigh Hastalığı, genellikle bir viral enfeksiyondan sonra bebeklik veya çocukluk çağında genel bir başlangıcı olan ilerleyen bir nörometabolik rahatsızlıktır, ancak aynı zamanda 25 gençler ve yetişkinlerde de ortaya çıkabilir. MRI'da beyin üzerinde, özellikle orta beyin ve beyin sapında görülen nekrotizan (ölü veya ölmekte olan doku) lezyonları ile karakterize edilir.

Çocuk doğumda genellikle normal görünür, ancak zamanlama daha erken veya daha geç olsa da genellikle birkaç aydan iki yaşına kadar semptomları ortaya çıkarmaya başlar. İlk belirtiler emme, kafa kontrolü, yürüme ve konuşma gibi temel becerilerin kaybolmasını içerebilir. Bunlar, sinirlilik, iştah kaybı, kusma ve nöbetler gibi başka problemler ile birlikte olabilir. Bazı fonksiyonlarda ani düşüş veya bazı işlevlerin geçici olarak geri gelmesi görülebilir. Sonuç olarak, çocuk ayrıca kalp, böbrek, görme ve nefes alma komplikasyonlarına da sahip olabilir.

Leigh Hastalığına neden olan birden fazla kusur vardır. Bunlar bir piruvat dehidrojenaz (PDHC) eksikliğini ve solunum zinciri enzim defektlerini (Kompleks I, II, IV ve V) içerir. Defektine bağlı olarak, kalıtım biçimi X'e bağlı dominant olabilir (X kromozomunda bozukluk ve genellikle hastalık sadece erkeklerde görülür), otozomal resesif (hem anne hem de babadan alınan genler) ve maternal (sadece anneden) olabilir. Kalıtsal olmayan spontan vakalar da olabilir.

Leigh hastalığı için iyileştirici tedavi yoktur. Tedaviler genellikle vitamin ve takviye terapilerinin varyasyonlarını, genellikle "kokteyl" kombinasyonunda içerir ve sadece kısmen etkilidir. Çeşitli kaynak alanları tiyamin, koenzim Q10, riboflavin, biyotin, kreatin, süksinat ve idebenonun olası kullanımını içerir. Bazı kliniklerde dikloroasetat (DCA) gibi deneysel ilaçlar da denenmektedir. Bazı durumlarda, özel bir diyet verilebilir ve metabolik bozukluklar konusunda bilgili bir diyetisyen tarafından izlenmesi gerekebilir.

Leigh Hastalığı'nın prognozu zayıftır. Kusura bağlı olarak, bireyler tipik olarak birkaç yıldan onlu yaşlarının ortalarına kadar yaşarlar. Leigh benzeri sendrom tanısı olan veya yetişkinliğe kadar semptom göstermeyenler daha uzun yaşama eğilimindedir.

MELAS (Mitokondriyal Ensefalomiyopati Laktik Asidoz ve İnme Benzeri Nöbetler):
Semptomlar: Kısa boy, nöbetler, inme benzeri nörolojik eksiklikler, tekrarlayan baş ağrıları, bilişsel regresyon, hastalık progresyonu, düzensiz kırmızı lifler.

Neden: Mitokondriyal DNA nokta mutasyonları: A3243G (en yaygın)

MELAS - Mitokondriyal miyopati (kas güçsüzlüğü), Ensefalopati (beyin ve merkezi sinir sistemi hastalığı), Laktik Asidoz (anaerobik solunumu oluşturan bir ürünün birikimi) ve İnme benzeri ataklar (kısmi felç, kısmi görme kaybı veya diğer nörolojik anomaliler).

MELAS, 2 ve 15 yaşları arasında tipik başlangıçlı, ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır, ancak bebeklik döneminde veya yetişkinlik dönemlerinde ortaya çıkabilir. İlk belirtiler arasında inme benzeri ataklar, nöbetler, migren baş ağrıları ve tekrarlayan kusma sayılabilir.

- 5 Genellikle, boy kısalığı yaygın olmasına rağmen, hasta bebeklik döneminde normal görünmektedir. Daha az yaygın olan, gelişimsel gecikme, öğrenme güçlüğü veya dikkat eksikliği bozukluğunu içerebilen erken bebeklik belirtileridir. Egzersiz intoleransı, ekstremitte zayıflığı, işitme kaybı ve diyabet, inme benzeri atakların ortaya çıkmasından önce de olabilir.
- 10 Sıklıkla nöbetlerin eşlik ettiği inme benzeri ataklar MELAS'ın belirleyici semptomudur ve kısmi felç, görme kaybı ve fokal nörolojik defektlere neden olur. Bu bölümlerin aşamalı kümülatif etkileri, genellikle motor becerilerin (konuşma, hareket ve yeme) kaybı, duyu bozukluğu (görme kaybı ve vücut duyularının kaybı) ve zihinsel bozukluk (demans) gibi değişken kombinasyonlarla sonuçlanır. MELAS hastaları ayrıca kas güçsüzlüğü,
- 15 periferik sinir disfonksiyonu, diyabet, işitme kaybı, kalp ve böbrek problemleri ve sindirim bozuklukları gibi ek semptomlara da maruz kalabilir. Laktik asit genellikle kanda, beyin omurilik sıvısında veya her ikisinde yüksek seviyelerde birikmektedir.

MELAS, mitokondri içindeki DNA'daki bir kusur nedeniyle maternal olarak kalıtılır. MELAS'a neden olabilecek en az 17 farklı mutasyon vardır. Şimdiye kadar en yaygın

20 olanı, vakaların yaklaşık %80'inden sorumlu olan A3243G mutasyonudur.

MELAS için iyileştirici tedavi veya spesifik tedavi yoktur. Klinik çalışmaların etkinliği kanıtlanmamış olsa da, genel tedaviler şu gibi metabolik tedavileri içerebilir: CoQ10, kreatin, fillokinon ve diğer vitaminler ve takviyeler. Ek semptom yönetimi için nöbet ilaçları ve insülin gibi ilaçlar gerekebilir. Kas disfonksiyonu olan bazı hastalar hafif

25 gözetimli egzersizden yararlanabilir. Bazı durumlarda, reçete edilebilecek diğer tedaviler arasında, diklorasetat (DCA) ve menadion bulunur; ancak bunlar, zararlı yan etkilere sahip olma potansiyellerinden dolayı rutin olarak kullanılmaz.

MELAS'ın prognozu zayıftır. Tipik olarak, bazı hastalar daha uzun yaşayabilmesine rağmen ölüm yaşı 10 ila 35 arasındadır. Ölüm, ilerleyici demans ve kas güçsüzlüğü

veya kalp ya da böbrek gibi diğer etkilenmiş organların komplikasyonları nedeniyle genel vücut tükenmesi sonucu ortaya çıkabilir.

MERRF, genellikle çocukluk döneminde başlayan, ancak erişkin dönemde ortaya çıkabilen ilerleyici bir çok sistemli sendromdur. İlerleme oranı çok çeşitli olarak değişir.

5 Etkilenen kardeşler arasında semptomların başlangıç ve kapsamı farklı olabilir.

MERRF'nin klasik özellikleri şunları içerir:

- Miyoklonus (kısa, ani, kas spazmı seçirmesi) - en karakteristik semptom
 - Epileptik nöbetler
 - Ataksi (bozulmuş koordinasyon)
- 10 • Düzensiz kırmızı lifler (MERRF ve diğer mitokondriyal rahatsızlıkları olan hastaların kas biyopsisinde gözlenen karakteristik bir mikroskobik anomali) Ek semptomlar şunları içerebilir: işitme kaybı, laktik asidoz (kanda yükselmiş laktik asit seviyesi), kısa boy, egzersiz intoleransı, demans, kardiyak defektler, göz anomalileri ve konuşma bozukluğu.
- 15 Her ne kadar birkaç MERRF vakası sporadik olsa da, çoğu vaka, mitokondri içinde bir mutasyona bağlı olarak maternal olarak kalıtılmaktadır. En yaygın MERRF mutasyonu, vakaların %80'inden fazlasını oluşturan A8344G'dir. Dört adet başka mitokondriyal DNA mutasyonunun MERRF'ye neden olduğu bildirilmiştir. Bir anne MERRF mutasyonunu tüm yavrularına iletirken, bazıları hiçbir zaman semptom göstermeyebilir.
- 20 Tüm mitokondriyal bozukluklarda olduğu gibi, MERRF için bir iyileştirici tedavi yoktur. Terapiler, genellikle "kokteyl" kombinasyonunda koenzim Q10, L-karnitin ve çeşitli vitaminleri içerebilir. Nöbetlerin yönetimi genellikle antikonvülsan ilaçlar gerektirir. Diğer semptomların kontrolü için ilaçlar da gerekli olabilir.

MERRF için prognoz, başlangıç yaşlarına, semptomların tipine ve şiddetine, ilgili organlara ve diğer faktörlere bağlı olarak büyük ölçüde değişir.

25

Mitokondriyal DNA Tükenmesi: Semptomlar üç ana formu içerir:

1. Konjenital miyopati: Yenidoğan güçsüzlüğü, destekli ventilasyon gerektiren hipotoni, olası böbrek fonksiyon bozukluğu. Şiddetli laktik asidoz. Öne çıkan düzensiz kırmızı lifler. Solunum yetmezliğine bağlı ölüm genellikle bir yaşından önce gerçekleşir.

2. İnfantil miyopati: Bir yaşına kadar normal erken gelişimi takiben, kuvvetsizlik ortaya çıkar ve hızla artar, solunum yetmezliğine ve genellikle birkaç yıl içinde ölüme neden olur.

3. Hepatopati: Büyümüş karaciğer ve inatçı karaciğer yetmezliği, miyopati. Şiddetli laktik asidoz. Ölüm tipik olarak ilk yıl içinde gerçekleşir.

Friedreich ataksisi

10 Friedreich ataksisi (FRDA veya FA), protein frataksinin düşük düzeylerinden kaynaklanan otozomal resesif nörodejeneratif ve kardiyovenjeneratif bir hastalıktır. Frataksin mitokondriyal respiratuvar zincir komplekslerinde demir-kükürt kümelerinin bir araya getirilmesi için önemlidir. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki FRDA'nın yaygınlığına ilişkin tahminler, her 22.000-29.000 kişiden 1'i ile 50.000 kişiden 1'i arasındadır (bkz. 15 www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/001411.htm). Hastalık, istemli motor koordinasyonunun progresif olarak kaybına (ataksi) ve kardiyak komplikasyonlarına neden olur. Semptomlar tipik olarak çocukluk döneminde başlar ve hasta büyüdükçe hastalık giderek artmakta olup; hastalar sonunda hareket yetmezliklerinden dolayı tekerlekli sandalye kullanmak zorunda kalırlar.

20 Kalıtsal kusurlu mitokondrileri içeren konjenital bozukluklara ek olarak, edinilmiş mitokondriyal disfonksiyonun, özellikle Parkinson, Alzheimer ve Huntington Hastalıkları gibi yaşlanma ile ilişkili nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere hastalıklara katkıda bulunması önerilmiştir. Mitokondriyal DNA'daki somatik mutasyonların insidansı, yaşla birlikte üstel olarak yükselmekte olup; azalmış solunum zinciri aktivitesi yaşlanan 25 insanlarda evrensel olarak bulunur. Mitokondriyal disfonksiyon, eksitotoksisite, nöronal hasar, nöbetler, inme ve iskemi ile ilişkili olan serebral vasküler kazalarda da rol oynamaktadır.

Mevcut buluşun bir bileşimini içeren farmasötik bileşimler

Mevcut buluş ayrıca, mevcut buluşun bileşimini, bir ya da daha fazla farmasötik olarak kabul edilebilir seyreltici veya taşıyıcı ile birlikte içeren bir farmasötik bileşim sağlar.

Mevcut buluşun bileşimi veya bunun bir formülasyonu herhangi bir konvansiyonel metotla, örneğin, sınırlandırma olmaksızın, parenteral olarak, oral olarak, topikal olarak (örneğin bukal, sublingual veya transdermal), bir tıbbi cihaz vasıtasıyla (örn. bir stent), inhalasyon yoluyla veya enjeksiyon yoluyla (subkütanöz veya intramusküler) uygulanabilir. Tedavi, tek bir doz veya bir süre boyunca çok sayıda dozdan oluşabilir.

Tedavi, günde bir kez, günde iki kez, günde üç kez, günde dört kez vb. sıklıkla yapılabilir. Tedavi ayrıca, örneğin damlatma yoluyla intravenöz uygulama gibi sürekli uygulama ile de olabilir.

Buluşa ait bileşimin tek başına uygulanabilmesi mümkün olmakla birlikte, bir veya daha fazla kabul edilebilir taşıyıcı ile birlikte bir farmasötik formülasyon olarak sunulması tercih edilir. Taşıyıcılar, mevcut buluşun bileşimiyle uyumlu olacak ve alıcılarına zarar vermeyecek şekilde "kabul edilebilir" olmalıdır. Uygun taşıyıcıların örnekleri aşağıda ayrıntılı olarak verilmektedir.

Formülasyonlar, uygun şekilde, bir birim dozaj biçiminde sunulabilir ve eczacılık tekniğinde iyi bilinen metotlarla hazırlanabilir. Bu tür metotlar, aktif bileşenin (mevcut buluşun bileşimi) bir ya da daha fazla yardımcı içerik maddesi barındıran taşıyıcıyla ilişkiye sokulması adını içerir. Genel olarak, bu formülasyonlar, aktif bileşenin, sıvı taşıyıcılar veya ince parçalanmış katı taşıyıcılarla ya da her ikisi ile homojen olarak ve yakın temasla bir araya getirilmesi ve sonra, gerektiği takdirde, ürünün şekillendirilmesi yoluyla hazırlanır.

Mevcut buluşun bileşimi normalde intravenöz olarak, oral olarak veya herhangi bir parenteral yolla, aktif bileşeni, isteğe bağlı olarak bir toksik olmayan organik ya da inorganik asit veya baz katılma tuzu biçiminde, farmasötik olarak kabul edilebilir bir dozaj biçimi içinde içeren bir farmasötik formülasyon biçiminde uygulanır. Bozukluğa ve tedavi edilecek olan hastaya ve aynı zamanda uygulama yoluna bağlı olarak, bileşimler değişen dozlarda uygulanabilir.

Farmasötik bileşimler, üretim ve depolama koşulları altında stabil olmalıdır; bu nedenle, tercihen bakteri ve mantarlar gibi mikroorganizmaların kirletici etkisine karşı korunmalıdır. Taşıyıcı, örneğin, su, etanol, poliöl (örn. gliserol, propilen glikol ve sıvı polietilen glikol), bitkisel yağlar ve bunların uygun karışımlarını içeren bir çözücü veya dispersiyon ortamı olabilir.

Örneğin, mevcut buluşun bileşiği ayrıca oral olarak, bukal olarak veya sublingual olarak, tabletler, kapsüller, ovüller, iksirler, solüsyonlar veya süspansiyonlar biçiminde uygulanabilmekte olup, bunlar anında, gecikmeli veya kontrollü salımlı uygulamalar için tatlandırıcı veya renk verici ajanlar içerebilir.

10 Oral uygulama için uygun olan mevcut buluşa göre formülasyonlar ayrı birimler halinde, örneğin kapsüller, kaşeler veya tabletler halinde sunulabilmekte olup, bunların her biri önceden belirlenmiş miktarda aktif bileşeni; bir toz veya granül biçiminde; bir çözelti veya süspansiyon biçiminde, sulu veya susuz bir sıvı içinde; veya bir su içinde yağ sıvı emülsiyonu veya bir yağ içinde su sıvı emülsiyonu biçiminde içerir. Aktif bileşen ayrıca
15 bir bolus, elektuar ya da macun biçiminde de sunulabilir.

Mevcut buluşun bileşiğinin oral uygulama için uygun olan çözeltileri veya süspansiyonları ayrıca, örn. N,N-dimetilasetamid, dağıtıcı maddeler, örn. polisorbata 80, yüzey aktif maddeler ve çözüdürücüler, örn. polietilen glikol, Phosal 50 PG (fosfatidilkolin, soya yağ asitleri, etanol, mono/digliseritler, propilen glikol ve askorbil
20 palmitattan oluşur) içerebilir. Mevcut buluşa göre olan formülasyonlar, aynı zamanda, Formül l'e göre olan bir bileşiğin, bir sulu yağ emülsiyonunda mevcut olabildiği emülsiyonlar formunda da olabilir. Yağ, örneğin, soya fasulyesi yağı veya aspur yağı, orta zincirli trigliserit (MCT yağı), örneğin hindistancevizi yağı, hurma yağı vb. veya bunların kombinasyonları gibi herhangi bir yağ benzeri madde olabilir.

25 Tabletler örneğin mikrokristalli selüloz, laktoz (örn. laktoz monohidrat veya susuz laktoz), sodyum sitrat, kalsiyum karbonat, dibazik kalsiyum fosfat ve glisin, bütillenmiş hidroksitolüen (E321), krospovidon, hipermelez, bozundurucular, örneğin nişasta (tercihen mısır, patates veya tapyoka nişastası), sodyum nişasta glikolat, kroskarmeloz sodyum ve belirli kompleks silikatlar ve granülasyon bağlayıcıları, örneğin
30 polivinilpirolidon, hidroksipropilmetilselüloz (HPMC), hidroksi-propilselüloz (HPC),

makrogol 8000, sukroz, jelatin ve akasya gibi ekspiyanları içerebilir. Ayrıca, kayganlaştırıcı ajanlar, örneğin magnezyum stearat, stearik asit, gliseril behenat ve talk da dahil edilebilir.

5 Bir tablet sıkıştırma ya da kalıplama ile, isteğe bağlı olarak bir ya da daha fazla yardımcı bileşenle birlikte hazırlanabilir. Sıkıştırılmış tabletler uygun bir makina içinde, aktif bileşenin bir serbest akış formu, örneğin bir toz veya granüller içine, isteğe bağlı olarak bir bağlayıcı (örn. povidon, jelatin, hidroksipropilmetil selüloz), kayganlaştırıcı, inert seyreltici, koruyucu, dağıtıcı (örn. sodyum nişasta glikolat, çapraz bağlı povidon, çapraz bağlı sodyum karboksimetil selüloz), yüzey-aktif veya dispersan ajanla karıştırılmış
10 halde sıkıştırılmasıyla hazırlanabilir. Kalıplanan tabletler, uygun bir makine içinde, toz haline getirilmiş bileşiğin, inert bir sıvı seyreltici ile nemlendirilerek kalıplanmasıyla hazırlanabilir. Tabletler, isteğe bağlı olarak kaplı ya da çentikli olabilir ve içlerinde bulunan aktif bileşenin yavaş ya da kontrollü salımını sağlayacak şekilde, örneğin istenen salım profilini sağlamak üzere çeşitli oranlarda hidroksipropilmetilselüloz
15 kullanılarak formüle edilebilir.

Benzer türde katı bileşimler de ayrıca jelatin kapsüllerin içinde dolgular olarak kullanılabilir. Bu bağlamda tercih edilen ekspiyanlar arasında laktoz, nişasta, bir selüloz, süt şekeri veya yüksek moleküler ağırlıklı polietilen glikol bulunur. Sulu süspansiyonlar ve/veya iksirler için, mevcut buluşun bileşikleri çeşitli tatlandırıcı veya lezzet verici
20 ajanlar, renklendirici madde veya boyalarla, emülgatör ve/veya süspanse edici ajanlarla ve seyrelticiler, örneğin su, etanol, propilen glikol ve gliserinle ve bunların kombinasyonlarıyla birleştirilebilir.

Ağızdan topikal uygulamaya uygun formülasyonlar arasında, aktif bileşeni çeşnili olarak içeren, genellikle sukroz ve akasya veya kitreyle içeren pastiller; aktif bileşeni inert
25 olarak, örneğin jelatin ve gliserin veya sukroz ve akasya içinde içeren pastiller; ve aktif bileşeni uygun bir sıvı taşıyıcı içinde içeren gargaralar bulunur.

Topikal uygulama için uyarlanmış farmasötik bileşimler, merhemler, kremler, süspansiyonlar, losyonlar, tozlar, çözeltiler, macunlar, jeller, emdirilmiş sargılar, spreyleyler, aerosoller veya yağlar, transdermal cihazlar, tozlama tozları ve benzerleri olarak
30 formüle edilebilir. Bu bileşimler, aktif maddeyi içeren geleneksel yöntemlerle

5 hazırlanabilir. Böylelikle, koruyucu maddeler, ilaç penetrasyonuna yardımcı olan çözücüler, krem veya merhemlerde yumuşatıcı ve losyonlar için etanol veya oleil alkol gibi uygun geleneksel taşıyıcılar ve katkı maddeleri de içerebilirler. Bu gibi taşıyıcılar, bileşimin yaklaşık %1 ila yaklaşık %98'i kadar mevcut olabilir. Daha genel olarak, bileşimin yaklaşık %80'ine kadarını oluşturacaklardır. Yalnızca bir örnek olarak, bir krem veya merhem, arzu edilen kıvama sahip bir krem veya merhem üretmek için yeterli miktarlarda bileşiğin ağırlıkça yaklaşık %5-10'unu içeren yeterli miktarda hidrofilik malzeme ve suyun karıştırılmasıyla hazırlanır.

10 Transdermal uygulama için uyarlanan farmasötik bileşimler, uzun bir süre boyunca alıcının epidermisi ile yakın temas halinde kalması amaçlanan ayrı yamalar olarak sunulabilir. Örneğin, aktif ajan yamadan iyontoforez ile dağıtılabilir.

Dış dokulara, örneğin ağız ve deriye uygulamalarda, bileşimler tercihen bir topikal merhem veya krem olarak uygulanır. Bir merhem içinde formüle edildiğinde, aktif madde bir parafinikle veya suyla karışabilir bir merhem bazı ile birlikte kullanılabilir.

15 Alternatif olarak, aktif ajan, bir su içinde yağ krem bazlı olarak veya bir yağ içinde su bazlı olarak bir krem içinde formüle edilebilir.

20 Parenteral uygulama için, sıvı dozaj biçimleri aktif bileşen ve steril bir vehikül, örneğin, sınırlandırma olmaksızın, su, alkoller, polioller, gliserin ve bitkisel yağlar kullanılarak hazırlanmakta olup, su tercih edilir. Aktif ajan, kullanılan vehikül ve konsantrasyona dayalı olarak, vehikül içinde koloidal olabilir, askıya alınabilir ya da çözündürülebilir. Çözeltilerin hazırlanmasında aktif bileşen enjeksiyon için suda çözülebilir ve uygun bir şişe veya ampule doldurulmadan ve sızdırmaz hale getirilmeden önce filtreye sterilize edilebilir.

25 Avantajlı olarak, lokal anestezikler, koruyucular ve tampon maddeleri gibi maddeler vehikül içinde çözülebilir. Stabilitiyi arttırmak için, bileşim şişe içine doldurulduktan sonra dondurulabilir ve su vakum altında çıkarılabilir. Kuru liyofilize toz daha sonra viyal içinde kapatılır ve kullanımdan önce sıvıyı yeniden oluşturmak için enjeksiyon için bir şişe su temin edilebilir.

Mevcut buluşun, enjekte edilebilir kullanıma uygun farmasötik bileşimleri steril sulu çözeltiler ve dispersiyonları içerir. Ayrıca, bileşimler bu tür çözeltiler veya dispersiyonların ekstamporane hazırlanışı için steril tozlar biçiminde olabilir. Her durumda, nihai enjekte edilebilir form steril olmalı ve kolay şırıngalama için etkili bir şekilde akışkan olmalıdır.

Parenteral süspansiyonlar, esas olarak çözelti ile aynı şekilde hazırlanır, ancak aktif bileşen, çözülmek yerine araç içinde süspansiyon haline getirilir ve sterilizasyon, filtrasyon ile gerçekleştirilemez. Aktif bileşen, steril vehikül içinde süspansiyon haline getirilmeden önce etilen okside maruz bırakılarak sterilize edilebilir. Avantajlı bir şekilde, aktif bileşenin homojen dağılımını kolaylaştırmak için bileşime bir yüzey aktif madde veya ıslatıcı madde eklenir.

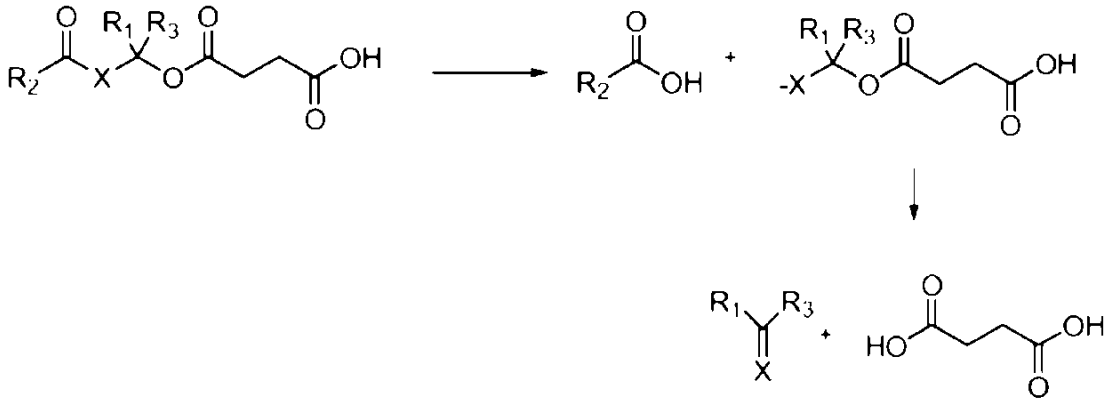
Yukarıda özellikle bahsedilen içerik maddelerine ek olarak, mevcut buluşun formülasyonlarının, söz konusu formülasyonun tipine ilişkin olarak sanayide geleneksel olarak bilinen başka maddeleri de içerebileceği, örneğin oral uygulama için uygun olanların, tatlandırıcı maddeler içerebileceği anlaşılmalıdır. Teknikte uzman bir kişi, uygun bir formülasyonun nasıl seçileceğini ve nasıl hazırlanacağını bilecektir (bkz. Örneğin Remington's Pharmaceutical Sciences 18. baskı veya sonrası). Teknikte uzman bir kişi, çeşitli uygulama yolları için uygun formülasyonların nasıl hazırlanacağını bilecektir.

Teknikte uzman bir kişi tarafından, mevcut buluşun bir bileşiğinin en uygun miktarı ve ayrık dozajların aralıklandırılmasının, tedavi edilen rahatsızlığın yapısı ve kapsamı, uygulama biçimi, yolu ve bölgesi ve tedavi edilen hastanın yaşı ve durumuna bağlı olarak belirenebileceği ve kullanılacak olan uygun dozajları nihai olarak bir doktorun belirleyeceği takdir edilecektir. Bu dozaj, uygun olduğu kadar sıklıkla tekrarlanabilir. Yan etkiler gelişirse, dozajın miktarı ve/veya sıklığı normal klinik uygulamaya uygun olarak değiştirilebilir veya azaltılabilir.

Bağlam aksini gerektirmedikçe, burada belirtilen tüm %değerler %ağırlık/ağırlıktır.

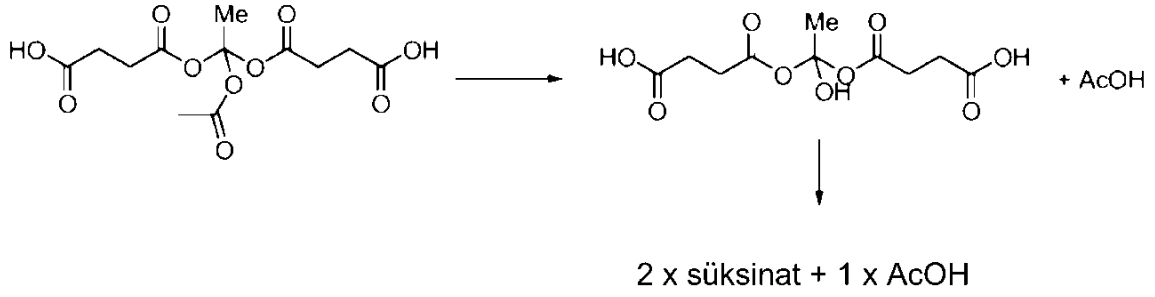
Buluşa ait bileşiklerin hepsi, süksinik asit, süksinil koenzim A'yı veya bunun kanonik formlarını serbest bırakmak için bir biyolojik matriste dönüştürülebilir. Bunu aşağıdaki gibi yapabilirler.

R', R'' veya R''' ifadeleri formül II'nin bir bileşiği olduğunda, R₂'yi içeren asil grubu, uygun bir enzimle, tercihen bir esteraz ile yarılabılır. Bu, bir karbonil, imin veya tiyokarbonil gruba ve bir serbest karboksilik aside kendiliğinden kaplanabilen bir hidroksimetil ester, bir aminometil ester veya bir tiyol metil ester açığa çıkarır. Örnek olarak, Formül I'de, A ifadesi OR' olduğunda, R' ifadesi formül II ve B ifadesi H ve Z ifadesi -CH₂CH₂-'dir.

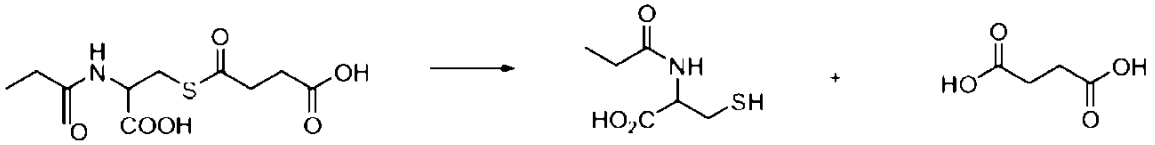


B ifadesi -SR''' olduğunda bir tiyol grubu salınır. Bu, tiyol grubunun indirgeyici özellikleri olduğu için özellikle avantajlı olarak kabul edilir. Birçok hastalığın hücre yapısına ve hücre işlevine zarar verebilecek istenmeyen bir oksidatif stres bileşeni vardır. Buna göre, bir anti-oksidan olarak hareket edebilen ve serbest radikalleri kazıyan veya oksijen-reaktif türleri azaltabilen bir bileşenin salımının, tıbbi veya kozmetik kullanımda ekstra fayda sağlaması beklenir.

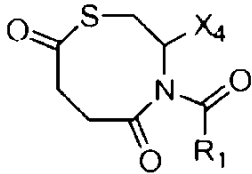
R', R'' veya R''' ifadeleri formül V'in bir bileşiği olduğu durumda, R₁₀ grubu üzerindeki ornatık, uygun bir enzimin etkisi veya in vivo kimyasal hidroliz yoluyla uzaklaştırılabilir. Örnek olarak, Formül I'de, A ifadesi OR' olduğunda ve R' ifadesi formül II ve B ifadesi H ve Z ifadesi -CH₂CH₂- olduğunda, X ifadesi O ve R₈ ifadesi H, R₉ ifadesi Me ve R₁₀ ifadesi O-asetildir.



R', R'' veya R''' ifadeleri formül VII'nin bir bileşiği olduğu durumda, grup, süksinik asidi serbest bırakmak üzere uygun bir enzimin etkisiyle veya in vivo kimyasal hidroliz yoluyla uzaklaştırılabilir. Örnek olarak, Formül I'de, A ifadesi SR olduğunda R ifadesi formül VII ve B ifadesi OH ve Z ifadesi $-CH_2CH_2-$ olduğunda, X_5 ifadesi CO_2H ve R_1 ifadesi Et 'dir:

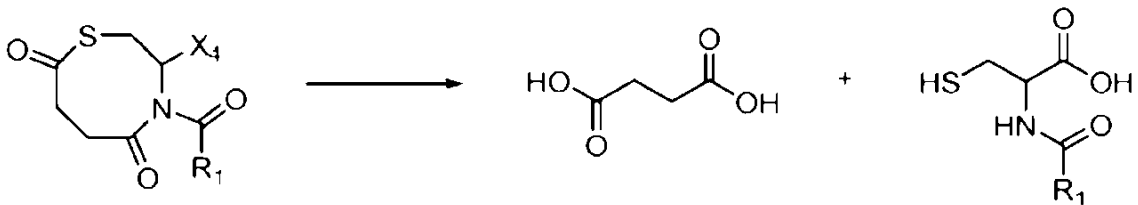


Alternatif olarak, formül VII'ye ait bileşikler için, entite kendi içinde, süksinil-CoA'nın yerine doğrudan Krebs döngüsüne alınabilir. Formül I aşağıdaki gibi olduğunda:



10

bileşik, aşağıdaki şemaya ve X_4 ifadesinin $-COOH$ olduğu duruma göre bir bileşiği vermek üzere hidrolize olabilir.



Buluşun diğer yönleri

Mevcut buluş ayrıca formül l'in bir bileşiği veya bunun yukarıda tanımlanmış olan farmasötik olarak kabul edilebilir bir biçimi ve aşağıdakilerin arasından bağımsız olarak seçilen bir ya da daha fazla ajanın bir kombinasyonunu (örneğin, mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun tedavisi için) sağlar:

- 5 • Kinon türevleri, örneğin ubikinon, idebenon, MitoQ
- Vitaminler, örneğin Tokoferoller, Tokotrienoller ve Troloks (Vitamin E), Askorbat (C), Tiamin (B1), Riboflavin (B2), Nikotinamid (B3), Menadion (K3),
- Vitaminlere ek olarak antioksidanlar, örneğin, TPP-bileşikleri (MitoQ), Sk-bileşikleri, Epikatekin, Katekin, Lipoik asit, Ürik asit, Melatonin
- 10 • Dikloroasetat
- Metilen Mavisi
- l-arjinin
- Szeto-Schiller peptitleri
- Kreatin
- 15 • Benzodiazepinler
- PGC-1 α modülatörleri
- Ketojenik diyet

Mevcut buluşun bir başka yönüne göre, burada açıklanan bileşiklerden herhangi biri herhangi bir başka bileşikle, örneğin sodyum bikarbonatla (bir bolus (örn., 1 mekv/kg) ve ardından bir sürekli infüzyon olarak), burada açıklanan bileşiklere eşlik eden ilaç olarak uygulanabilir.

Mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun kompleks I ile ilişkili bozukluğuna bağlı laktik asidoz veya ilaca bağlı yan etkiler

Mevcut buluş ayrıca laktik asidozun ve mitokondriyal ilişkili ilacın neden olduğu yan etkilerin önlenmesi veya tedavisi ile ilgilidir. Özellikle, mevcut buluşa göre bileşikler, Kompleks I'de veya bunun akış yukarısında mitokondriyal ilişkili ilaca bağlı olarak gelişen yan etkilerin önlenmesi ya da tedavisinde kullanılır, ya da başka türlü ifade

etmek gerekirse, mevcut buluş Kompleks I'in ilaca bağı olarak gelişen doğrudan inhibisyonunun veya Kompleks I'e NADH teminini kısıtlayan herhangi bir ilaca bağı olarak gelişen etkinin (örneğin, sınırlandırma olmaksızın, Krebs döngüsü, glikoliz, beta-oksidadasyon, piruvat metabolizması ve hatta glüköz veya diğer kompleks I ile ilişkili substratların taşınmasını veya düzeylerini etkileyen ilaçlar üzerindeki etkinin) önlenmesi ya da tedavisi için mevcut buluşa göre bileşikler sağlar.

İlaçlar tarafından indüklenen mitokondriyal toksisite istenen terapötik etkinin bir parçası olabilir (örneğin, kanser ilaçları tarafından tetiklenen mitokondriyal toksisite), fakat çoğu durumda ilaçların neden olduğu mitokondriyal toksisite istenmeyen bir etkidir. Mitokondriyal toksisite, oksidatif fosforilasyon ile mitokondriyal ATP oluşumunun hücrel kaybını telafi etmek için glikolizi belirgin olarak artırabilir. Bu, laktik plazma seviyelerinde artışa neden olabilir ve bu artışın aşırı olması halinde, ölümcül olabilecek olan laktik asidozla sonuçlanır. Tip A laktik asidoz, esas olarak doku hipoksisi ile ilişkili iken, tip B aerobik laktik asidoz, ilaçlar, toksin veya karaciğer hastalıkları, diyabet, kanser ve doğuştan gelen metabolizma hataları (örneğin mitokondriyal genetik defektler) gibi sistemik bozukluklarla ilişkilidir.

Bilinen birçok ilaç, mitokondriyal solunumu (örneğin antipsikotikler, lokal anestezipler ve anti-diyabetikler) olumsuz etkilemektedir ve buna göre, böyle bir ilaç maddesi kullanımının neden olduğu negatif mitokondriyal etkilerin ortadan kaldırılması veya azaltılması için kullanılabilen araçların tanımlanması veya geliştirilmesi gerekmektedir.

Mevcut buluş laktik asidozun ve mitokondriyal ilişkili ilacın neden olduğu yan etkilerin önlenmesi veya tedavisinde kullanıma yönelik olarak bileşikler sağlar. Özellikle, süksinat ön ilaçları, Kompleks I'de veya bunun akış yukarısında mitokondriyal ilişkili ilaca bağı olarak gelişen yan etkilerin önlenmesi ya da tedavisinde kullanılır, ya da başka türlü ifade etmek gerekirse, mevcut buluş Kompleks I'in ilaca bağı olarak gelişen doğrudan inhibisyonunun veya Kompleks I'e NADH teminini kısıtlayan herhangi bir ilaca bağı olarak gelişen etkinin (örneğin, sınırlandırma olmaksızın, Krebs döngüsü, glikoliz, beta-oksidadasyon, piruvat metabolizması ve hatta glüköz veya diğer kompleks I ile ilişkili substratların taşınmasını veya düzeylerini etkileyen ilaçlar üzerindeki etkinin) önlenmesi ya da tedavisi için süksinat ön ilaçları sağlar.

Yukarıda belirtildiği gibi, mitokondriyal ilişkili yan etkilere sahip olabilen ilaçlarla tedavi edilen hastalarda artmış laktat plazma seviyeleri görülür. Bu buluş, metforminin (tip 2 diyabet için birinci basamak tedavisi ve nadir görülen bir yan etki olarak laktik asidozla ilişkilendirilmiştir) Kompleks I'de insan periferik kan hücrelerinin mitokondriyal fonksiyonunu zamana ve doza bağımlı bir şekilde, metformin intoksikasyonu için ilişkili konsantrasyonlarda inhibe ettiğini gösteren deneysel sonuçlara dayanır. Metformin ayrıca, zamanla bozulmamış trombositler tarafından laktat üretiminde önemli bir artışa neden olur. Buluşa göre bileşiklerin kullanımı, metformine maruz kalmış sağlam trombositlerde laktat üretimini önemli ölçüde azaltmıştır. Ekzojen olarak uygulanan süksinat, yani substratın kendisi, metforminin indüklediği laktat üretimini azaltmamıştır.

Başka bir çalışmada, laktat üretimi, rotenon ile inhibe olan trombositlerde birkaç saat boyunca gözlemlenmiştir (yani, kompleks I'in fonksiyonunun bozulduğu bir durumdur). Buluşa göre olan bileşiklerin (ancak süksinat değil) kullanımı, sağlam insan trombositlerinin rotenon-indüklü laktat üretimini zayıflatmıştır. Respirometrik deneyler insan fibroblastlarında ve insan kalp kas liflerinde tekrarlanmış ve kan hücrelerinde görülen bulguları doğrulamıştır.

Buna göre, mevcut buluş, laktik asidozun önlenmesinde veya tedavisinde kullanılmak üzere Formül I'e uygun bileşikler sağlar. Bununla birlikte, burada rapor edilen sonuçlar Kompleks I'in doğrudan inhibisyonuyla ilişkili laktik asidoza dayalı olduğundan veya Kompleks I'de veya bunun akıntı yukarısındaki bir arızayla ilişkili olduğundan dolayı, mevcut buluşa göre bileşiklerin, Kompleks I'de veya bunun akıntı yukarısında mitokondriyal ilişkili ilaca bağlı olarak gelişen yan etkilerin önlenmesi ya da tedavisinde kullanıma uygun olduğu düşünülmektedir. Mevcut buluşa göre bileşikler ayrıca Kompleks I'in akış yukarısındaki metabolizmayı bozan ilaç etkilerine karşı da etki eder (Kompleks I'e NADH teminini kısıtlayacak olan herhangi bir ilaç etkisini kapsayacak olan Kompleks I'in dolaylı inhibisyonu, örneğin Krebs döngüsü, glikoliz, beta-oksidasyon, piruvat metabolizması üzerindeki etkiler ve hatta glükoz ve diğer kompleks I ile ilişkili substratların düzeylerini etkileyen ilaçlar).

Buluşa göre bileşiklerin, endüstriyel uygulamalarda, örneğin laktat oluşumunu azaltmak veya inhibe etmek veya ticari veya endüstriyel hücre hatlarının ATP mevcudiyetini

arttırmak için in vitro olarak kullanılabilceği düşünölmektedir. Örnekler hücre kültüründe, organ korunmasında vb. kullanımları içerir.

5 Buluşa göre bileşikler, ilaca bağlı mitokondriyal ilişkili yan etkilerin tedavisinde veya önlenmesinde veya tedavide hücresele enerji düzeylerinin (ATP) arttırılmasında veya geri getirilmesinde kullanılır. Özellikle, doğrudan veya dolaylı olarak ilaç kaynaklı Kompleks I mitokondriyal ilişkili yan etkilerin tedavisinde veya önlenmesinde kullanılırlar. Özellikle, bir ilaç maddesinin neden olduğu laktik asidoz gibi laktik asidozun tedavisinde veya önlenmesinde kullanılırlar.

10 Mevcut buluş ayrıca formöl I'in bir bileşigi ve mitokondriyal ilişkili bir yan etkiyi, özellikle ilaç maddesi tarafından Kompleks I'in doğrudan ya da dolaylı olarak bozulmasından kaynaklanan bir yan etkiyi indükleyebilecek olan bir ilaç maddesinin bir kombinasyonu ile ilgilidir. Bu kombinasyon, mitokondriyal ilişkili bir yan etkinin profilaktik olarak önlenmesi veya yan etkinin ortaya çıkması durumunda, mitokondriyal yan etkilerin hafifletilmesinde ve/veya tedavi edilmesinde kullanılabilir.

15 Aşağıda tarif edildiği gibi bileşiklerin, özellikle kompleks I'in doğrudan veya dolaylı inhibisyonuna bağlı yan etkilerde, ilaca bağlı yan etkilerin tedavisinde veya önlenmesinde etkili olacağı düşünölmektedir.

Kompleks I arızalarına, sorunlarına veya bozulmasına yol açtığı bilinen ve/veya yan etki olarak laktik asidoza yol açtığı bilinen ilaç maddeleri şunlardır:

- 20
- Asetaminofen, kapsaisin de dahil olmak üzere analjezikler
 - Amiodaron, perheksilin dahil antianjinaler
 - Linezolid, trovafloksasin, gentamisin dahil olmak üzere antibiyotikler
 - Mitomisin C, adriamisin dahil olmak üzere kinonları içeren antikanser ilaçları
 - Valproik asit dahil anti-konvulsant ilaçlar
- 25
- Metformin, fenformin, butilbiguanid, troglitazon ve rosiglitazon, pioglitazon dahil olmak üzere anti-diyabetikler
 - Fialuridin dahil Anti-Hepatit B maddeleri
 - Antihistaminler

- Tokkapon dahil Anti-Parkinson maddeleri
- Anti-psikotikler Risperidon,
- Anti-şizofreni zotepin, klozapin
- Antiseptikler, kuaterner amonyum bileşikleri (QAC)
- 5 • İzoniazit dahil olmak üzere anti-tüberküloz maddeleri
- Klofibrat, siprofibrat, simvastatin dahil olmak üzere fibratlar
- Propofol dahil hipnotikler
- İmmünosüpresif hastalığı modifiye edici antiromatizmal ilaç (DMARD) Leflunomid lokal anestetikler, örneğin bupivakain, diklofenak, indometasin ve lidokain Kas gevşetici,
- 10 örneğin dantrolen
- Klorpromazin, flufenazin ve haloperidol gibi antipsikotik nöroleptikler dahil olmak üzere nöroleptikler
- Efavirenz, tenofovir, emtrisitabin, zidovudin, lamivudin, rilpivirin, abakavir, didanozin dahil olmak üzere NRTI (nükleotit ters transkriptaz inhibitörleri) NSAID'ler,
- 15 örneğin nimesülfit, mefenamik asit, sulindak
- Barbiturik asitler.

Yan etkiler olarak laktik asidozu olduğu bilinen diğer ilaç maddeleri arasında beta2-agonistleri, epinefrin, teofilin veya diğer herbisitler bulunur. Alkoller ve kokain de laktik asidozla sonuçlanabilir.

- 20 Ayrıca, buluşun bileşiklerinin, bir kompleks I kusuruyla ilişkili olmasa bile, laktik asidozun tedavisinde veya önlenmesinde de etkili olabileceği düşünülmektedir.

İlaçlar ve mevcut buluşun bileşiklerinin kombinasyonu

- Mevcut buluş aynı zamanda bir laktik asidozdan ve bir kompleks I kusuru, inhibisyonu veya arızasına bağlı yan etkiden seçilen ilaca bağlı bir yan etkinin tedavisinde ve/veya
- 25 önlenmesinde kullanım için bir ilaç maddesinin ve buluşun bir bileşiğinin kombinasyonuna ilişkin olup, içerisinde

i) ilaç maddesi, ilaç maddesinin endike olduğu bir hastalığın tedavisi için kullanılır ve

ii) buluşa ait bileşik, ilaç maddesi tarafından indüklenen veya indüklenebilen yan etkilerin önlenmesi veya hafifletilmesi için kullanılmakta olup; burada yan etkiler, laktik asidozdan ve Kompleks I kusuru, inhibisyonu veya işlev bozukluğuna bağlı yan etkiler arasından seçilir.

- 5 Bu tür bir ilaç maddesinin mevcut buluşun herhangi bir bileşiğiyle herhangi bir kombinasyonu mevcut buluşun kapsamı dahilindedir. Buna göre, buradaki açıklamaya dayanarak, teknikte uzman bir kişi, buluşun özünün, burada tarif edilen yan etkilerin önlenmesi veya azaltılması için buluşun bileşiklerinin değerli özelliklerinin bulguları olduğunu anlayacaktır. Bu nedenle, bu buluşa ait bileşiklerin, hücrelerin içine girme ve
- 10 burada tarif edilen yan etkilere sahip olan ya da potansiyel olarak yan etkileri olan herhangi bir ilaç maddesi ile kombinasyon halinde süksinat ve muhtemelen diğer aktif maddeleri iletmeye potansiyeli olan kullanımı, bu tarifnamede açıkça görülmektedir.

Mevcut buluş ayrıca:

- i) bir ilaç maddesini ve buluşun bir bileşiğini içeren bir bileşim olup, içerisinde ilaç
- 15 maddesi, laktik asidoz ve Kompleks I kusuru, inhibisyonu ya da işlev bozukluğuna bağlı yan etkilerden seçilen potansiyel olarak ilaç kaynaklı bir yan etkiye sahiptir;
- ii) yukarıda madde i'de tarif edilen şekilde bir bileşim olup, içerisinde buluşa ait bileşik, ilaç maddesi tarafından indüklenen veya indüklenebilen yan etkilerin önlenmesi veya hafifletilmesi için kullanılmakta olup; burada yan etkiler, laktik asidozdan ve Kompleks I
- 20 kusuru, inhibisyonu veya işlev bozukluğuna bağlı yan etkiler arasından seçilir.

Bileşim iki ayrı paket biçiminde olabilir:

- İlaç maddesini veya ilaç maddesini içeren bir bileşimi barındıran bir birinci paket ve
 - mevcut buluşun bileşiğini veya mevcut buluşun bileşiğini içeren bir bileşimi
- 25 barındıran bir ikinci paket. Bileşim ayrıca, hem ilaç maddesini hem de buluşun bileşiğini içeren tek bir bileşim olabilir.

Bileşimin iki ayrı paket içermesi durumunda, ilaç maddesi ve mevcut buluşun bileşiği farklı uygulama yollarından uygulanabilir (örn., ilaç maddesi oral uygulama yoluyla ve mevcut buluşun bileşiği parenteral veya mukozal uygulama yoluyla) ve/veya esas olarak

aynı zamanda uygulanabilir veya ilaç maddesi mevcut buluşun bileşiğinden önce veya tam tersi şekilde uygulanabilir.

Kitler

Mevcut buluş ayrıca aşağıdakileri içeren bir kit sağlar:

- 5 i) laktik asidoz ve bir Kompleks I bozukluğu, inhibisyonu veya arızasıyla ilişkili yan etkiler arasından seçilen bir potansiyel ilaca bağlı olarak gelişen yan etkiye sahip bir ilaç maddesi içeren bir birinci kap, ve
- ii) ilaç maddesi tarafından indüklenen veya indüklenebilen yan etkilerin önlenmesi veya hafifletilmesi için potansiyele sahip olan; içerisinde yan etkilerin, laktik asidoz ve
10 Kompleks I kusuru, inhibisyonu veya işlev bozukluğuna bağlı yan etkiler arasından seçildiği bir bileşik içeren ikinci bir kap.

Yan etkilerin tedavisi/önlenmesi için metot

- Mevcut buluş ayrıca laktik asidoz ve bir Kompleks I bozukluğu, inhibisyonu veya arızası ile ilişkili yan etki arasından seçilen bir ilaca bağlı olarak gelişen yan etkisi olan bir
15 hastanın tedavisine yönelik bir metotla ilgili olup, bu metot, hastaya mevcut buluşun bir bileşiğinin etkili bir miktarının uygulanmasını içerir, ve laktik asidoz ve bir Kompleks I bozukluğu, inhibisyonu veya arızası ile ilişkili yan etki arasından seçilen bir yan etkiyi potansiyel olarak indükleyen bir ilaç maddesi ile tedavi edilen bir hastalığı olan bir
20 hastada, laktik asidoz ve bir Kompleks I bozukluğu, inhibisyonu veya arızası ile ilişkili yan etki arasından seçilen bir ilaca bağlı olarak gelişen yan etkinin önlenmesi veya hafifletilmesine yönelik bir metotla ilgili olup, bu metot, hastaya, bahsedilen ilaç maddesi ile tedaviden önce, tedavi sırasında veya sonrasında mevcut buluşun bir bileşiğinin etkili bir miktarının uygulanmasını içerir.

Metformin

- 25 Metformin biguanidler sınıfına ait bir anti-diyabetik ilaçtır. ABD'de diyabet vakalarının yaklaşık %90'ını oluşturan tip 2 diyabet için ilk basamak tedavisidir. Anti-diyabetik etki, hepatik glikoz üretiminin azalmasına, periferel dokularda artan glikoz alımıyla insülinin biyolojik etkisini artırmaya ve bağırsakta glukoz alımını azaltmaya atfedilmiştir, ancak tam etki mekanizmaları tam olarak açıklanmamıştır. Diğer anti-diyabetiklere göre

avantajlarına rağmen, nadir görülen laktik asidoz vakaları (LA) yan etki olarak tanımlanmıştır. LA, artmış anyon boşluğu, 5 mM'ın üzerinde bir arteriyel kan laktat seviyesi ve $\text{pH} \leq 7.35$ olarak tanımlanmaktadır. Metformin ile ilişkili LA'nın kesin patojenezi hala tam olarak ortaya çıkmamakla birlikte, glukoneojenezin bir inhibisyonu ve bunun sonucunda alanin, piruvat ve laktat gibi glukoneojenik öncülerin birikmesi önerilmiştir. Bununla birlikte, diğerleri, ilacın, hem birincil terapötik hem de glikoz düşürücü etkinin yanı sıra metformin ile ilişkili LA'nın gelişimi için anahtar faktör olan mitokondriyal fonksiyonla etkileşimini önermektedir. Mitokondriyal inhibisyonun bir sonucu olarak, hücre kısmen yükseltilmiş laktat seviyeleri ile glikolizi teşvik ederek, aerobikten anaerobik metabolizmaya kısmen geçecektir. Metformin ile aynı ilaç sınıfının başka bir anti-diyabetik maddesi olan feniformin, yüksek oranda LA (10000 tedavi yılı başına 4 vaka) nedeniyle çoğu ülkede piyasadan çekilmiştir. Buna karşılık, metformin için LA insidansı, feniformin için bunun yaklaşık onda biridir ve bu nedenle, oldukça güvenli bir terapötik madde olarak kabul edilir. Metforminle ilişkili LA, çoğunlukla kardiyovasküler sistemi, karaciğeri veya böbrekleri etkileyen ek predispozan durumları olan hastalarda görülür. Bu koşullar altında, vücuttan gelen ilaç klirensi bozulmakta, bu da zamanla tespit edilmezse, metforminin artan kan konsantrasyonlarına yol açmaktadır. Metformin kullanımının tip 2 diyabet prevalansının artmasına bağlı olarak artması beklendiği için metformin kaynaklı mitokondriyal toksisite ve LA ile ilgili araştırma güncel ve acil bir konudur. Metformin mitokondriyal toksisitesi üzerine yapılan araştırmalar tutarsız sonuçlara işaret etmektedir. Kane ve ark., (2010), sıçanların iskelet kaslarında in vivo olarak metformin ile bazal respirasyon ve maksimal respiratuvar kapasitelerin inhibisyonunu saptamamış ve aynı şekilde metforminle işleme tabi tutulmuş tip 2 diyabet hastalarının kas biyopsilerinde de bunu saptamamıştır. Bunun aksine, diğerleri metformin ve feniforminin toksik etkilerini mitokondriya ve bunun LA ile hayvan dokuları ile olan ilişkisi üzerine tarif etmişlerdir. İnsan dokusu ile ilgili veriler, özellikle ex vivo veya in vivo olarak az sayıdadır. Metformin ve LA üzerindeki çoğu insan verileri, insan doku örneklerinin elde edilmesinin zorluğu nedeniyle retrospektif çalışmalara dayanmaktadır. Ancak, Protti ve ark. (2010), biguanidile ilişkili LA olan hastalarda sistemik oksijen tüketiminde azalma bildirmiş ve hem Protti ve ark. (2012b) hem de Larsen ve ark. (2012) sırasıyla insan iskelet kas ve trombositlerinde \leq

10 mM metformin ekspozürüne yanıt olarak in vitro mitokondriyal fonksiyon bozukluğu tarif etmiştir. Protti ve ark., (2012b) ayrıca, 1 mM'de metformin maruziyetine yanıt olarak insan trombositlerinde artan laktat salınımı rapor etmiştir. Her ne kadar metformin bu konsantrasyonda terapötik koşullarda bulunmasa da, bunun intoksikasyon sırasında kanda bu düzeylere eriştiği gösterilmiştir ve plazmaya kıyasla gastrointestinal yol, böbrek, karaciğer, tükürük bezleri, akciğer, dalak ve kaslarda 7 ila 10 kata kadar biriktiği bilinmektedir.

Burada bildirilen çalışmada amaç, yüksek çözünürlüklü respirometri kullanılarak insan kan hücrelerinde metformin ve fenforminin mitokondriyal toksisitesini değerlendirmek olmuştur. Benzer şekilde yapılandırılmış iki ilacın aktivitesini karşılaştırmak ve mitokondriyal toksisite ile insan hastalarda tarif edilen LA insidansı arasındaki ilişkiyi incelemek için fenformin dahil edilmiştir. Membran geçirgenliğini ve bu biguanitlerin spesifik toksisitesini araştırmak için, ilaç toksisitesini test etmek için bir model, hem komplike hem de permeabilize edilmiş kan hücreleri kullanılarak, solunum kompleksine spesifik substratlar ve inhibitörlerin ardışık olarak eklenmesiyle uygulanmıştır.

Diğer yönler ekteki istemlerden anlaşılacaktır. Tüm detaylar ve bilgiler, gerekli değişikliklerin yapılması koşuluyla bu yönlere uygular.

Tanımlar

"Bir" ifadesi, burada, makalenin dilbilgisel nesnelere bir veya birden fazla (yani en az bir) olacak şekilde ifade etmek için kullanılmıştır. Örnek olarak "bir analog" ifadesi bir analog veya birden fazla analog anlamına gelir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "hücre geçirgen süksinatlar", "mevcut buluşun bileşiği/bileşikleri", "hücre geçirgen süksinat türevleri" ve "süksinatın hücre geçirgen öncülleri" ifadeleri birbirlerinin yerine kullanılır ve formül l'in bileşiklerini belirtir.

Burada kullanıldığı şekliyle "biyoyararlanım" terimi, bir ilacın veya başka bir maddenin tatbik edildikten sonra biyolojik aktivite alanında emildiği veya mevcut olduğu dereceyi ifade eder. Bu özellik bileşiğin çözünürlüğü, bağırsakta emilim oranı, protein bağlanma ve metabolizma derecesi gibi bir dizi faktöre bağlıdır. Teknikte uzman bir kişi tarafından

bilinen biyoyararlanım için çeşitli testler burada tarif edilmiştir (ayrıca bakınız Trepanier ve ark., 1998, Gallant-Haidner ve ark., 2000).

Burada kullanıldığı şekliyle, "bozukluk", "inhibisyon", "arıza" terimleri, respiratuvar zincirin Kompleks I'yle ilişkili olarak kullanıldığında, belirli bir ilaç maddesinin Kompleks I üzerinde veya Kompleks I'in akış yukarısındaki mitokondriyal metabolizma üzerinde negatif bir etkiye sahip olduğunu belirtmekte için kullanılmakta olup, bu etki Kompleks I'e NADH teminini kısıtlayan herhangi bir ilaç etkisini, örn. Krebs döngüsü, glikoliz, beta-oksidadasyon, piruvat metabolizması ve hatta glüköz veya diğer kompleks I ile ilişkili substratların taşınmasını veya düzeylerini etkileyen ilaçlar üzerindeki etkiyi kapsar.

10 Burada tarif edilen şekilde, bir hastada laktat genellikle Kompleks I dahil olmak üzere aerobik respirasyon üzerinde negatif bir etkinin göstergesidir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "yan etki" ifadesi, respiratuvar zincirin Kompleks I'inin fonksiyonu ile ilişkili olarak kullanıldığında, laktik asidoza ilişkin bir yan etki olabilir veya idiyosenkratik ilaç organ toksisitesiyle örn. hepatotoksisite, nörotoksisite,

15 kardiyotoksisite, renal toksisite ve kas toksisitesiyle ilişkili bir yan etki, örneğin, bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, oftalmopleji, miyopati, sensorinöral işitme bozukluğu, nöbetler, inme, inme benzeri olaylar, ataksi, ptoz, bilişsel yetersizlik, değişen bilinç durumları, nöropatik ağrı, polinöropati, nöropatik gastrointestinal sorunlar (gastroözofageal reflü, kabızlık, bağırsak psödo tıkanması), proksimal renal tübüler fonksiyon bozukluğu,

20 kardiyak ileti defektleri (kalp blokları), kardiyomiyopati, hipoglisemi, glükoneojenik bozukluklar, alkole bağlı olmayan karaciğer yetmezliği, optik nöropati, görsel kayıp, diyabet ve ekzokrin pankreatik yetmezliği, bitkinlik, solunumla ilgili problemler, örneğin fasılalı nefes açlığı bulunur.

Burada kullanıldığı şekliyle, "ilaca bağlı olarak gelişen" terimi, "yan etki" terimiyle ilişkili olarak kullanıldığında geniş anlamda anlaşılmalıdır. Dolayısıyla, sadece ilaç maddelerini değil, aynı zamanda istenmeyen laktat varlığına yol açabilecek diğer maddeleri de kapsar. Örnekler herbisitler, toksik mantarlar, meyveler vs.'dir.

Mevcut buluşun farmasötik olarak kabul edilebilir tuzları, farmasötik olarak kabul edilebilir inorganik veya organik asitlerden veya organik asitler veya bazlardan ve aynı

30 zamanda kuaterner amonyum asit katılma tuzlarından oluşan konvansiyonel tuzları

5 içerir. Uygun asit tuzlarının daha spesifik örnekleri arasında hidroklorik, hidrobromik, sülfürik, fosforik, nitrik, perklorik, fumarik, asetik, propiyonik, süksinik, glikolik, formik, laktik, maleik, tartarik, sitrik, palmoik, malonik, hidroksimaleik, fenilasetik, glutamik, benzoik, salisilik, fumarik, tolüensülfonik, metansülfonik, naftalin-2-sülfonik, 5 benzensülfonik hidrosinaftoik, hidroiyodik, malik, steroik, tanik ve benzerleri bulunur. Oksalik gibi diğer asitler, kendi içlerinde farmasötik olarak kabul edilebilir olmamakla birlikte, mevcut buluşun bileşiklerinin ve bunların farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlarının elde edilmesinde ara ürünler olarak kullanışlı olan tuzların hazırlanışında kullanışlı olabilir. Uygun bazik tuzların daha spesifik örnekleri arasında sodyum, lityum, 10 potasyum, magnezyum, alüminyum, kalsiyum, çinko, N,N'-dibenziletildiamin, kloropropain, kolin, dietanolamin, etilendiamin, N-metilglukamin ve prokain tuzları bulunur.

Burada kullanıldığı şekliyle, "alkil" terimi yalnızca sp³ karbon atomlarından oluşan, hidrojen atomlarıyla tamamıyla doymuş olan, örneğin düz zincirli alkiller için - 15 C_nH_{2n+1} şeklinde olan, içerisinde n ifadesinin 1 ile 10 arasında olduğu herhangi bir düz ya da dallanmış zinciri belirtmekte olup, örneğin metil, etil, propil, isopropil, n-bütil, isobütil, sec-bütil, tert-bütil, n-pentil, neopentil, isopentil, hekzil, isohekzil, heptil, oktil, nonil veya desildir. Burada kullanıldığı şekliyle alkil ayrıca ornatılabilir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "sikloalkil" terimi -C_nH_{2n-1} genel formülüne sahip olan ve 20 içerisinde n ifadesinin 3-10 arasında olduğu siklik/halkalı yapıda karbon zincirlerini belirtmekte olup, örneğin siklopropil, siklobütil, siklopentil, siklohekzil, sikloheptil veya siklooktil, bisikl[3.2.1]oktil, spiro[4,5]desil, norpinil, norbonil, norkapril, adamantil ve benzeridir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "alken" terimi, karbon ve hidrojen atomlarından oluşan bir 25 düz ya da dallanmış zinciri belirtmekte olup, içerisinde en az iki karbon atomu bir çift bağ ile, örneğin iki ila on adet karbon atomuna ve en az bir çift bağa sahip olan C₂₋₁₀ alkenil doymamış hidrokarbon zinciriyle bağlanır. C₂₋₆ alkenil gruplarının örnekleri arasında, sınırlandırma olmaksızın vinil, 1-propenil, alil, iso-propenil, n-butenil, n-pentenil, n-hekzenil ve benzeri bulunur.

Mevcut bağlamda "C₁₋₁₀ alkoksi" terimi, tek başına veya kombinasyon halinde kullanılan bir -O-C₋₁₋₆ alkil grubunu belirtmekte olup, içerisinde C₁₋₁₀ alkil yukarıda tanımlandığı gibidir. Doğrusal alkoksi gruplarının örnekleri arasında metoksi, etoksi, propoksi, bütoksi, pentoksi ve heksoksi bulunur. Dalkanmış alkoksi örnekleri arasında iso-propoksi, sec- bütoksi, tert-bütoksi, iso-pentoksi ve iso-heksoksi bulunur. Siklik alkoksi örnekleri arasında siklopropiloksi, siklobütoksi, siklopentiloksi ve siklonksioksi bulunur.

"C₃₋₇ heterosikloalkil" terimi, burada kullanıldığı şekliyle, halkadan bağımsız olarak azot, oksijen ve kükürt arasından seçilen bir ya da daha fazla heteroatom içeren bir siklik hidrokarbon gibi tamamıyla doymuş bir heterohalkanın bir radikalini belirtir. Heterohalkaların örnekleri arasında, sınırlandırma olmaksızın pirolidin (1-pirolidin, 2-pirolidin, 3-pirolidin, 4-pirolidin, 5-pirolidin), pirazolidin (1-pirazolidin, 2-pirazolidin, 3-pirazolidin, 4-pirazolidin, 5-pirazolidin), imidazolidin (1-imidazolidin, 2-imidazolidin, 3-imidazolidin, 4-imidazolidin, 5-imidazolidin), zolidin (2-tiyazolidin, 3-tiyazolidin, 4-tiyazolidin, 5-tiyazolidin), piperidin (1-piperidin, 2-piperidin, 3-piperidin, 4-piperidin, 5-piperidin, 6-piperidin), piperazin (1-piperazin, 2-piperazin, 3-piperazin, 4-piperazin, 5-piperazin, 6-piperazin), morfolin (2-morfolin, 3-morfolin, 4-morfolin, 5-morfolin, 6-morfolin), tiyomorfolin (2-tiyomorfolin, 3-tiyomorfolin, 4-tiyomorfolin, 5-tiyomorfolin, 6-tiyomorfolin), 1,2-oksatiyolan (3-(1,2-oksatiyolan), 4-(1,2-oksatiyolan), 5-(1,2-oksatiyolan)), 1,3-dioksolan (2-(1,3-dioksolan), 3-(1,3-dioksolan), 4-(1,3-dioksolan)), tetrahidropiran (2-tetrahidropiran, 3-tetrahidropiran, 4-tetrahidropiran, 5-tetrahidropiran, 6-tetrahidropiran), heksahidropiradizin, (1-(heksahidropiradizin), 2-(heksahidropiradizin), 3-(heksahidropiradizin), 4-(heksahidropiradizin), 5-(heksahidropiradizin), 6-(heksahidropiradizin)) bulunur.

Burada kullanılan şekliyle "C₁₋₁₀alkil-C₃₋₁₀sikloalkil" terimi, yukarıda tanımlandığı gibi belirtilen sayıda karbon atomuna sahip olan bir alkil grubu vasıtasıyla bağlanan yukarıda tanımlandığı gibi bir sikloalkil grubunu belirtir.

Burada kullanılan şekliyle "C₁₋₁₀alkil-C₃₋₇heterosikloalkil" terimi, yukarıda tanımlandığı gibi belirtilen sayıda karbon atomuna sahip olan bir alkil grubu vasıtasıyla bağlanan yukarıda tanımlandığı gibi bir heterosikloalkil grubunu belirtir.

Burada kullanılan "aril" teriminin karbosiklik aromatik halka sistemlerini içermesi amaçlanmıştır. Aril ayrıca, aşağıda sıralanan karbosiklik sistemlerin kısmen hidrojenlenmiş türevlerini de kapsamaktadır.

5 Burada kullanıldığı şekliyle "heteroaril" terimi, azot, oksijen ve kükürt arasından seçilen bir veya daha fazla heteroatom içeren, furil, tiyenil, pirrolil gibi heterosiklik doymamış halka sistemlerini kapsamaktadır ve ayrıca aşağıda sayılan heterosiklik sistemlerin kısmen hidrojene edilmiş türevlerini kapsaması amaçlanmıştır.

Burada kullanıldığı şekliyle "aril" ve "heteroaril" terimleri isteğe bağlı olarak ornatılmamış veya mono-, di- veya tri-ornatılmış olabilen bir arili veya isteğe bağlı olarak ornatılmamış veya mono-, di- veya tri-ornatılmış olabilen bir heteroarili belirtir. "Aril" ve "heteroaril" örnekleri arasında, sınırlandırma olmaksızın, fenil, bifenil, indenil, naftil (1-naftil, 2-naftil), N-hidroksitetrazolil, N-hidroksitriazolil, N-hidroksiimidazolil, antrasenil (1-antrasenil, 2-antrasenil, 3-antrasenil), fenantrenil, florenil, pentalenil, azulenil, bifenilenil, tiyofenil (1-tiyenil, 2-tiyenil), furil (1-furil, 2-furil), furanil, tiyofenil, isoksazolil, isotiyazolil, 1,2,3-triazolil, 1,2,4-triazolil, piranil, piridazinil, pirazinil, 1,2,3-triazinil, 1,2,4-triazinil, 1,3,5-triazinil, 1,2,3-oksadiazolil, 1,2,4-oksadiazolil, 1,2,5-oksadiazolil, 1,3,4-oksadiazolil, 1,2,3-tiyadiazolil, 1,2,4-tiyadiazolil, 1,2,5-tiyadiazolil, 1,3,4-tiyadiazolil, tetrazolil, tiyadiazinil, indolil, isoindolil, benzofuranil, benzotiyofenil (tiyanaftenil), indolil, oksadiazolil, isoksazolil, kinazolinil, florenil, ksantenil, isoindanil, benzhidril, akridinil, 20 benzisoksazolil, purinil, kinazolinil, kinolizinil, kinolinil, isokinolinil, kinoksalinil, naftiridinil, fteridinil, azepinil, diazepinil, pirolil (2-pirolil), pirazolil (3-pirazolil), 5-tiyofen-2-il-2H-pirazol-3-il, imidazolil (1-imidazolil, 2-imidazolil, 4-imidazolil, 5-imidazolil), triazolil (1,2,3-triazol-1-il, 1,2,3-triazol-2-il, 1,2,3-triazol-4-il, 1,2,4-triazol-3-il), oksazolil (2-oksazolil, 4-oksazolil, 5-oksazolil), tiyazolil (2-tiyazolil, 4-tiyazolil, 5-tiyazolil), piridil (2-piridil, 3-piridil, 4-piridil), 25 pirimidinil (2-pirimidinil, 4-pirimidinil, 5-pirimidinil, 6-pirimidinil), pirazinil, piridazinil (3-piridazinil, 4-piridazinil, 5-piridazinil), isokinolil (1-isokinolil, 3-isokinolil, 4-isokinolil, 5-isokinolil, 6-isokinolil, 7-isokinolil, 8-isokinolil), kinolil (2-kinolil, 3-kinolil, 4-kinolil, 5-kinolil, 6-kinolil, 7-kinolil, 8-kinolil), benzo[b]furanil (2-benzo[b]furanil, 3-benzo[b]furanil, 4-benzo[b]furanil, 5-benzo[b]furanil, 6-benzo[b]furanil, 7-benzo[b]furanil), 30 2,3-dihidro-benzo[b]furanil (2-(2,3-dihidro-benzo[b]furanil), 3-(2,3-dihidro-benzo[b]furanil), 4-(2,3-dihidro-benzo[b]furanil), 5-(2,3-dihidro-benzo[b]furanil), 6-(2,3-

dihidro-benzo[b]furanil), 7-(2,3-dihidro-benzo[b]furanil)), benzo[b]tiyofenil (2-benzo[b]tiyofenil, 3-benzo[b]tiyofenil, 4-benzo[b]tiyofenil, 5-benzo[b]tiyofenil, 6-benzo[b]tiyofenil, 7-benzo[b]tiyofenil), 2,3-dihidro-benzo[b]tiyofenil (2-(2,3-dihidro-benzo[b]tiyofenil), 3-(2,3-dihidro-benzo[b]tiyofenil), 4-(2,3-dihidro-benzo[b]tiyofenil), 5-(2,3-dihidro-benzo[b]tiyofenil), 6-(2,3-dihidro-benzo[b]tiyofenil), 7-(2,3-dihidro-benzo[b]tiyofenil)), indolil (1-indolil, 2-indolil, 3-indolil, 4-indolil, 5-indolil, 6-indolil, 7-indolil), indazolil (1-indazolil, 2-indazolil, 3-indazolil, 4-indazolil, 5-indazolil, 6-indazolil, 7-indazolil), benzimidazolil, (1-benzimidazolil, 2-benzimidazolil, 4-benzimidazolil, 5-benzimidazolil, 6-benzimidazolil, 7-benzimidazolil, 8-benzimidazolil), benzoksazolil (1-benzoksazolil, 2-benzoksazolil), benzotiyazolil (1-benzotiyazolil, 2-benzotiyazolil, 4-benzotiyazolil, 5-benzotiyazolil, 6-benzotiyazolil, 7-benzotiyazolil), karbazolil (1-karbazolil, 2-karbazolil, 3-karbazolil, 4-karbazolil) bulunur. Kısmen hidrojenlenmiş türevlerin kısıtlayıcı olmayan örnekleri 1,2,3,4-tetrahidronaftil, 1,4-dihidronaftil, pirolinil, pirazolinil, indolinil, oksazolidinil, oksazolinil, oksazepinil ve benzeridir.

15 Burada kullanılan "asil" terimi, bir $-C(=O)R$ karbonil grubunu belirtmekte olup, içerisinde R grubu yukarıda tanımlanan gruplardan herhangi biridir. Spesifik örnekler formil, asetil, propiyonil, bütiril, pentanoil, hekzanoil, heptanoil, octanoil, nonanoil, dekanol, benzoil ve benzerleridir.

"İsteğe bağlı olarak ornatılmış" ifadesi, herhangi bir gruba uygulandığında, bahsedilen grubun, istendiği takdirde, aynı ya da farklı olabilen bir ya da daha fazla ornatıkla ornatılabileceği anlamına gelir. "İsteğe bağlı olarak ornatılmış alkil" hem "alkil" hem de "ornatılmış alkil" içerir.

"Ornatılmış" ve "isteğe bağlı olarak ornatılmış" parçaların uygun ornatıklarının örnekleri arasında halo (floro, kloro, bromo veya iyodo), alkil, C_{3-6} sikloalkil, hidroksi, C_{1-6} alkoksi, siyano, amino, nitro, C_{1-6} alkilamino, C_{2-6} alkenilamino, di- C_{1-6} alkilamino, C_{1-6} asilamino, di- C_{1-6} asilamino, C_{1-6} aril, C_{1-6} arilamino, C_{1-6} aroilamino, benzilamino, C_{1-6} arilamido, karboksi, C_{1-6} alkoksikarbonil veya (C_{1-6} aril)(C_{1-10} alkoksi)karbonil, karbamoil, mono- C_{1-6} karbamoil, di- C_{1-6} karbamoil veya yukarıdakilerin içinden bir hidrokarbil parçasının kendisinin halo, siyano, hidroksi, C_{1-2} alkoksi, amino, nitro, karbamoil, karboksi veya C_{1-2} alkoksikarbonil ile ornatıldığı herhangi birisi bulunur. Bir oksijen atomu içeren hidroksi

ve alkoksi gibi gruplarda oksijen atomu kükürt ile değiştirilerek örneğin tiyo (SH) ve tiyo-alkil (S-alkil) gibi gruplar yapılabilir. İsteğe bağlı ornatıklar bu nedenle örneğin S-metil gibi grupları içerir. Tiyo-alkil gruplarında, kükürt atomu bir sülfoksit veya sülfonun yapılması için ayrıca oksitlenebilir ve bu nedenle isteğe bağlı ornatıklar S(O)-alkil ve S(O)₂-alkil gibi grupları içerir.

Ornatım çift bağ biçimini alabilir ve heteroatomları içerebilir. Dolayısıyla bir CH₂ yerine bir karbonili (C=O) olan bir alkil grubu, ornatılmış bir alkil grubu olarak düşünülebilir.

Bu nedenle, ornatılmış gruplar, örneğin CFH₂, CF₂H, CF₃, CH₂NH₂, CH₂OH, CH₂CN, CH₂SCH₃, CH₂OCH₃, OMe, OEt, Me, Et, -OCH₂O-, CO₂Me, C(O)Me, *i*-Pr, SCF₃, SO₂Me, NMe₂, CONH₂, CONMe₂ ve benzerlerini içerir. Aril grupları durumunda, ornatımlar, aril halkasındaki bitişik karbon atomlarından, örneğin O-CH₂-O gibi siklik asetallerden gelen halka formunda olabilir.

Mevcut buluş aşağıdaki şekillerde örneklendirilmiştir:

• **Şekil 1. Kompleks I inhibe edilmiş hücrelerde mitokondriyal enerji üretim fonksiyonunun geliştirilmesine yönelik şematik değerlendirme deneyi şekli.** Mevcut buluşa göre bileşiklerin değerlendirilmesi için protokol. Deneyde, sağlam hücrelerde mitokondriyal fonksiyon respiratuvar kompleks I inhibitörü rotenon ile bastırılır. İlaç adayları, biyoenerjetik artışı veya inhibisyonu değerlendirmek için plazma membranının geçirgen hale getirilmesinden önce ve sonra endojen (hücre geçirgen olmayan) substratlarla karşılaştırılır.

• **Şekil 2. Sağlam hücrelerde mitokondriyal enerji üretim fonksiyonunun geliştirilmesine ve inhibisyonuna yönelik deneyin şematik şekli.** Mevcut buluşa göre bileşiklerin etkinliğinin değerlendirilmesi için protokol. Deneyde, mitokondriyal aktivite, protonofor FCCP ile mitokondrileri ayrıştırarak uyarılır. İlaç adayları, maksimum yakınsak (kompleks I ve kompleks II'den türetilmiş) respirasyon seviyesini elde etmek için titre edilir. Rotenon ilavesinden sonra, kompleks II'ye bağımlı stimülasyon elde edilir. Kompleks III inhibitörü Antimisin eklenerek mitokondriyal olmayan oksijen tüketimi değerlendirilir.

- **Şekil 3. Bir mitokondriyal kompleks I inhibitörüne maruz kalan hücrelerde laktat birikmesinin önlenmesine yönelik deneyin şematik şekli.** Mevcut buluşa göre bileşiklerin etkinliğinin değerlendirilmesi için protokol. Deneyde, sağlam hücrelerde mitokondriyal fonksiyon respiratuvar kompleks I inhibitörü rotenon ile bastırılır. Hücreler, 5 glikoliz laktatına kaydıkça ortamda birikmektedir. İlaç adayları endojen (hücre geçirgen olmayan) substratlarla karşılaştırılır ve azalan laktat birikim oranı, mitokondriyal ATP üretiminin restorasyonunu gösterir.
- **Şekil 4. Domuzda bir akut metabolik kriz modelinde laktat birikimi şekli.** Domuzda bir akut metabolik kriz modelinde laktat birikimi. Hayvan modelinde, 10 mitokondriyal fonksiyon respiratuvar kompleks I inhibitörü rotenonun infüzyonu yoluyla baskılanır. Hücreler, glikoliz laktatına kaydıkça vücutta birikmektedir. Ortalama arteriyel laktat konsantrasyonları, belirtilen infüzyon hızlarında rotenon ve vehikül ile tedavi edilen hayvanlarda gösterilmiştir. İlaç adayları rotenonla işleme tabi tutulan hayvanlarda değerlendirilmiştir ve laktat birikimi oranının azalması mitokondriyal ATP üretiminin 15 restorasyonunu belirtir.
- **Şekil 5** Geçirgenleştirilmiş insan periferal kan tek çekirdekli hücreleri (PBMC'ler) ve trombositlerde mitokondriyal respirasyon üzerine metformin etkisi. **(a)** Eşzamanlı olarak ölçülen metformin (1 mM siyah iz) veya vehikül ile işleme tabi tutulan (H₂O, gri iz) geçirgenleştirilmiş PBMC'lerin O₂ tüketimi, belirtilen respiratuvar komplekse özgü 20 substratlar ve inhibitörlerin art arda eklenmesiyle değerlendirilmiştir. İzlerin stabilizasyon fazı, haznenin yeniden oksijenlenmesinden ve kompleks IV substrat uygulamasından kaynaklanan bozukluklar atlanmıştır (kesikli çizgiler). İzlerin altındaki kutular, verilen substratların, kompleks I (CI), kompleks II (CII) veya her ikisinin (CI + II) oksidasyonu sırasında respirasyon için kullanılan respiratuvar kompleksleri ve aynı zamanda 25 protokolün belirtilen bölümlerindeki respiratuvar durumlarını belirtir. Üç farklı respiratuvar durum ve substrat kombinasyonu için respiratuvar oranlar kontrol (H₂O) ve belirtilen metformin konsantrasyonları için gösterilmiş olup; kompleks I substratları tarafından desteklenen oksidatif fosforilasyon kapasitesi (OXPHOS_{CI}), protonofor FCCP'nin titrasyonunun ardından elektron taşıma sistemi (ETS_{CII}) içinden kompleks 30 II'ye bağımlı maksimal akı ve kompleks IV (CIV) kapasitesi gösterilmiştir. Değerler ortalama ± SEM olarak gösterilmiştir. *= P < 0.05, **= P < 0.01 ve ***= P < 0.001; Holm-

Sidak çoklu karşılaştırma metoduyla birlikte tek yönlü ANOVA kullanılarak, $n = 5$. OXPHOS = oksidatif fosforilasyon. ETS = elektron taşıma sistemi. ROX = artık oksijen konsantrasyonu.

• **Şekil 6** Metformin ve fenformin tarafından görüntülenen toksisitenin, permeabilize edilmiş insan trombositlerinde kompleks I'e bağlı substratların (OXPHOS_{C1}) desteklediği oksidatif fosforilasyon sırasında mitokondriyal solunum kapasitesine göre karşılaştırılması. Solunum hızları ortalama \pm SEM olarak sunulmuş ve metformin ve fenformin için yarı maksimum inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) değerlerini elde etmek için standart lineer olmayan eğri uydurma uygulanmıştır. *= $P < 0.05$, **= $P < 0.01$ ve ***= $P < 0.001$; Holm-Sidak çoklu karşılaştırma metoduyla birlikte tek yönlü ANOVA kullanılarak kontrolle karşılaştırılmıştır, $n = 5$.

• **Şekil 7** Metforminin sağlam insan trombositlerinde mitokondriyal respirasyon üzerindeki zamana ve doza bağımlı etkileri. **(a)** trombositlerin rutin respirasyonu, yani, hücrelerin endojenöz substrat temini ve ATP talepleriyle respirasyonu, belirtilen konsantrasyonlardaki metformin veya vehikülün (H₂O) 60 dakikalık inkübasyon sırasında görüntülenmiş ve bunun ardından **(b)** protonofor FCCP'nin titrasyonu ile indüklenen maksimal respiratuvar kapasite izlenerek sağlam hücrelerin elektron taşıma sistemi (ETS) üzerinden maksimal akı belirlenmiştir. Veriler ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir, $n = 5$. *= $P < 0.05$, **= $P < 0.01$ ve ***= $P < 0.001$; tek yönlü ANOVA (b) ve iki yönlü ANOVA (a) ve Holm-Sidak post-hoc testi kullanılmıştır.

• **Şekil 8** Metformin ve fenforminin laktat üretimi ve bozulmamış insan trombosit süspansiyonlarının pH'ı üzerindeki etkisi Trombositler glükoz (10 mM) içeren fosfat tamponlu salin içinde 8 saat boyunca metformin (10 mM, 1 mM), fenformin (0.5 mM), kompleks I inhibitörü rotenon (2 μ M) veya vehikül (DMSO, kontrol) ile inkübe edilmiştir. **(a)** laktat düzeyleri her 2 saatte bir belirlenmiş ($n = 5$), ve **(b)** pH düzeyi her 4 saatte bir ölçülmüştür ($n = 4$). Veriler ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir. *= $P < 0.05$, **= $P < 0.01$ ve ***= $P < 0.001$; iki yönlü ANOVA ve Holm-Sidak post-hoc testi kullanılmıştır.

• **Şekil 9** 10 mM glükoz içeren PBS içinde inkübe edilmiş sağlam trombositler (200•10⁶/ml). **(A)** 10 mM metformin ile inkübe edilen hücreler, her 30 dakikada bir 250

μM 'lık ardışık eklemelerde süksinat veya NV118 ile muamele edilmiştir. NV118'in 0 saatte ilave edilmesinden önce, hücreler eşit ilk laktat seviyelerini oluşturmak için sadece metformin veya vehikül ile 1 saat inkübe edilmiştir (veriler gösterilmemiştir). Laktat konsantrasyonları 30 dakikada bir örneklenmiştir. **(B)** Laktat üretimi doğrusal olmayan uygun bir regresyon ile hesaplanmış ve zaman laktat eğrileri için %95 güven aralıkları hesaplanmıştır. Metformin ile inkübe edilen hücreler kontrole göre önemli ölçüde daha yüksek laktat üretimine sahip olmuş ve süksinat ilaveleri bunu değiştirmemiştir. Metformin ile inkübe edilen hücrelere NV118 eklendiğinde laktat üretimi önemli ölçüde azalmıştır. **(C)** Rotenon tarafından indüklenen laktat üretimi benzer şekilde tekrarlanan NV118 ilaveleri ile zayıflatılabilir.

- **Şekil 10** 10 mM glükoz içeren PBS içinde inkübe edilmiş sağlam trombositler ($200 \cdot 10^6/\text{ml}$). **(A)** 10 mM metformin ile inkübe edilen hücreler, her 30 dakikada bir 250 μM 'lık ardışık eklemelerde süksinat veya NV189 ile muamele edilmiştir. NV119'un 0 saatte ilave edilmesinden önce, hücreler eşit ilk laktat seviyelerini oluşturmak için sadece metformin veya vehikül ile 1 saat inkübe edilmiştir (veriler gösterilmemiştir). Laktat konsantrasyonları 30 dakikada bir örneklenmiştir. **(B)** Laktat üretimi doğrusal olmayan uygun bir regresyon ile hesaplanmış ve zaman laktat eğrileri için %95 güven aralıkları hesaplanmıştır. Metformin ile inkübe edilen hücreler kontrole göre önemli ölçüde daha yüksek laktat üretimine sahip olmuş ve süksinat ilaveleri bunu değiştirmemiştir. Metformin ile inkübe edilen hücrelere NV189 eklendiğinde laktat üretimi önemli ölçüde azalmıştır. **(C)** Rotenon tarafından indüklenen laktat üretimi benzer şekilde tekrarlanan NV189 ilaveleri ile zayıflatılabilir. Antimisin de eklendiğinde, NV189'un kompleks 2 üzerindeki etkisi, antimisin'in kompleks III üzerindeki inhibitör etkisi ile ortadan kaldırılmıştır.

- **Şekil 11** 10 mM glükoz içeren PBS içinde inkübe edilmiş sağlam trombositler ($200 \cdot 10^6/\text{ml}$). **(A)** 10 mM metformin ile inkübe edilen hücreler, her 30 dakikada bir 250 μM 'lık ardışık eklemelerde süksinat veya NV241 ile muamele edilmiştir. NV241'in 0 saatte ilave edilmesinden önce, hücreler eşit ilk laktat seviyelerini oluşturmak için sadece metformin veya vehikül ile 1 saat inkübe edilmiştir (veriler gösterilmemiştir). Laktat konsantrasyonları 30 dakikada bir örneklenmiştir. **(B)** Laktat üretimi doğrusal olmayan uygun bir regresyon ile hesaplanmış ve zaman laktat eğrileri için %95 güven

aralıkları hesaplanmıştır. Metformin ile inkübe edilen hücreler kontrole göre önemli ölçüde daha yüksek laktat üretimine sahip olmuş ve süksinat ilaveleri bunu değiştirmemiştir. Metformin ile inkübe edilen hücrelere NV241 eklendiğinde laktat üretimi önemli ölçüde azalmıştır. **(C)** Rotenon tarafından indüklenen laktat üretimi benzer şekilde tekrarlanan NV241 ilaveleri ile zayıflatılabilir.

• **Şekil 12** 10 mM glükoz içeren PBS içinde, her 30 dakikada bir laktat konsantrasyonlarının numunesi alınarak inkübe edilmiş olan trombositler ($200 \cdot 10^6/\text{ml}$). **(A)** 3 saatlik inkübasyon sırasında, zaman içinde ortamdaki laktat konsantrasyonundaki değişimi görmek için hücreler rotenon ($2 \mu\text{M}$) ya da bunun vehikülü ile işleme tabi tutularak izlenmiştir. Ayrıca, hücreler, NV189 ile birlikte rotenon ile inkübe edilmiş ve rotenon, NV189 ve kompleks III inhibitörü antimisin ($1 \mu\text{g/mL}$) içeren hücreler izlenmiştir. NV189'un 0 saatte ilave edilmesinden önce, hücreler eşit ilk laktat seviyelerini oluşturmak için sadece rotenon veya vehikül ile 1 saat inkübe edilmiştir (veriler gösterilmemiştir). Rotenon, hücrelerin laktat üretimini artırır, ancak bu, NV189 ile birlikte (her 30 dakikada bir $250 \mu\text{M}$ ardışık eklemeler) inkübasyonla normale (aynı eğri eğimi) geri getirilir. Antimisin de mevcut olduğunda, NV189, kompleks II seviyesinde çalışamaz ve laktat üretimi, sadece mevcut rotenon ile aynı seviyeye yükseltilir. **(B)** Rotenon ile olduğu gibi benzer bir laktat üretim hızı 10 mM konsantrasyonda metformin ile inkübasyon ile indüklenebilir.

Deneysel

Genel Biyoloji Yöntemleri

Teknikte uzman bir kişi, teknikte uzman kişilerce bilinen in vivo ve in vitro metotları, örneğin, sınırlandırma olmaksızın, aşağıda ve Gallant-Haidner ve ark., 2000 ve Trepanier ve ark., 1998 belgelerinde ve bunların referanslarında tarif edilen metotları kullanarak mevcut buluşun bileşiğinin farmakokinetiğini ve biyoyararlanımını belirleyebilir. Bir bileşiğin biyoyararlanımı çeşitli faktörlerle (örn., suda çözünürlük, hücre membranı geçirgenliği, protein bağlanma kapsamı ve metabolizma ve stabilite) belirlenmekte olup, bunların her biri buradaki örneklerde tarif edilen şekilde in vitro testlerle belirlenebilir. Teknikte uzman bir kişi tarafından takdir edileceği üzere, bu faktörlerden bir ya da daha fazlasındaki bir gelişim bir bileşiğin biyoyararlanımında bir

gelişim sağlayacaktır. Alternatif olarak, mevcut buluşun bileşiğinin biyoyararlanımı, aşağıda veya buradaki örneklerde daha ayrıntılı olarak tarif edilen şekilde in vivo metotlar kullanılarak ölçülebilir.

5 İn vivo biyoyararlanımı ölçmek için, bir bileşik bir test hayvanına (örn., fare veya sıçan) intraperitoneal olarak (i.p.) veya intravenöz olarak (i.v.) ve oral olarak (p.o.) uygulanabilir ve düzenli aralıklarla kan örnekleri alınarak ilacın plazma konsantrasyonunun zamana bağlı olarak nasıl değiştiği incelenebilir. Plazma konsantrasyonunun zamana bağlı seyri, standart modeller kullanılarak bileşiğin mutlak biyoyararlanılığını bir yüzde olarak hesaplamak için kullanılabilir. Tipik bir protokol örneği aşağıda açıklanmıştır.

10 Örneğin, fareler veya sıçanlar, mevcut buluşun bileşiğinin 1 veya 3 mg/kg'ı ile intravenöz olarak veya mevcut buluşun bileşiğinin 1, 5 veya 10 mg/kg'ı ile oral olarak dozlanmıştır. Kan örnekleri 5 dakika, 15 dakika, 1 saat, 4 saat ve 24 saat aralıklarla alınmıştır ve örnekte buluşa ait bileşiğin konsantrasyonu, LCMS-MS ile belirlenmiştir. Plazma süreci veya tam kan konsantrasyonları kullanılarak daha sonra plazma altındaki alan veya kan konsantrasyonu-zaman eğrisi (AUC - sistemik dolaşıma erişen değişmemiş ilacın toplam miktarı ile doğru orantılıdır), maksimum (pik) plazma veya kan ilaç konsantrasyonu, maksimum plazma veya kan ilaç konsantrasyonunun meydana geldiği zaman (pik zaman) gibi kilit parametreler ve biyoyararlanımın hassas bir şekilde belirlenmesinde kullanılan ilave faktörler, örneğin bileşiğin yarı ömrü, toplam vücut klerensi, dağılımın durağan hal hacmi ve %F belirlenebilir. Bu parametreler daha sonra hesaplanan bir yüzdelik biyoyararlanımı elde etmek için bölümsel olmayan veya bölümsel yöntemlerle analiz edilir ve bu tip bir yöntem örneği olarak Gallant-Haidner ve ark., 2000 ve Trepanier ve arkadaşları, 1998 ve burada verilen referanslar verilebilir.

25 Mevcut buluşun bileşiğinin etkinliği aşağıda tarif edilen metotlardan bir ya da daha fazlası kullanılarak test edilebilir:

I. Sağlam hücrelerde mitokondriyal enerji üretim fonksiyonunun geliştirilmesi ve inhibisyonunun değerlendirilmesine yönelik deneyler Yüksek çözünürlüklü *Respirometri - A- genel metot*

30 Mitokondriyal respirasyonun ölçümü yüksek çözünürlüklü bir oksigraf içinde (Oksigraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Avusturya), 37 °C'lik sabit bir sıcaklıkta

gerçekleştirilir. İzole edilmiş insan trombositleri, akyuvarlar, fibroblastlar, insan kalp kası lifleri veya canlı mitokondrileri içeren diğer hücre tipleri 2 mL'lik bir cam hazne içinde, ortamda $\geq 10 \text{ pmol O}_2 \text{ s}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ 'lik bir oksijen tüketimini vermeye yetecek bir konsantrasyonda askıya alınmıştır.

5 *Yüksek çözünürlüklü respirometri- B (laktat çalışmalarında kullanılır)*

Gerçek zamanlı respirometrik ölçümler yüksek çözünürlüklü oksigraflar (Oksigraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Avusturya) kullanılarak yapılmıştır. Ölçümler sırasında deney koşulları aşağıdaki gibi olmuştur: 37 ° C, 2 mL aktif hazne hacmi ve 750 rpm karıştırıcı hızı. O₂ hazne konsantrasyonları, deneyler sırasında odadaki reoksijenasyon ile 200-50 μM arasında tutulmuştur (Sjövall ve ark., 2013a). Veri kaydı için DatLab yazılımı sürüm 4 ve 5 kullanılmıştır (Oroboros Instruments, Innsbruck, Avusturya). Ayarlar, günlük kalibrasyon ve enstrümantal arka plan düzeltmeleri üreticinin talimatlarına göre yapılmıştır. Respiratuvar ölçümler, 0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 60 mM K-laktobiyonat, 20 mM Taurin, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES, 110 mM sukroz ve 1 g/L bovin serum albumin (MiR05) veya glükoz (5 mM) ve EGTA (5 mM) içeren fosfat tamponlu salin (PBS) içeren bir tampon içinde, ilişkin bölümlerde belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Solunum değerleri, her iki ortamda (0.92) oksijen çözünürlük faktörü için düzeltilmiştir (Pesta ve Gnaiger, 2012). Bozulmamış insan trombositlerinin laktat üretimi 10 mM glükoz içeren PBS içinde belirlenmiştir. Tüm ölçümler, mL başına 200 $\times 10^6$ hücre trombosit konsantrasyonunda veya mL başına 5 $\times 10^6$ hücre PBMC konsantrasyonunda gerçekleştirilmiştir.

Bileşiklerin değerlendirilmesi

Bozulmamış hücrelerde dört tipik değerlendirme protokolü kullanılır.

25 *(1) İnhibe edilmiş respiratuvar kompleks I'li hücrelerde mitokondriyal enerji üretme fonksiyonunun geliştirilmesine yönelik deney*

Hücreler 110 mM sukroz, HEPES 20 mM, taurin 20 mM, K-laktobiyonat 60 mM, MgCl₂ 3 mM, KH₂PO₄ 10 mM, EGTA 0.5 mM, BSA 1 g/l, pH 7.1 içeren bir tampon içine yerleştirilmiştir. Endojenöz substratlarla referans hattı respirasyon belirlendikten sonra, kompleks I Rotenon 2 μM ile inhibe edilmiştir. Bileşikler DMSO içinde çözündürülmüş 10

μM ila 10 mM son konsantrasyon aralığında titre edilmiştir. Ardından hücre zarları, hücre dışı olarak salınan enerji substratının veya hücre geçirimsiz enerji substratlarının girişine izin vermek üzere digitonin ($1\text{mg}/1 \cdot 10^6 \text{ plt}$) ile geçirgen hale getirilmiştir. Stabilize respirasyondan sonra, kompleks I'in akış aşağısında solunumu sağlamak için bir referans olarak Süksinat 10 mM eklenir. Solunum stabilize edildikten sonra deney, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nihai konsantrasyonda Antimisin ilavesiyle sonlandırılır ve herhangi bir artık mitokondriyal olmayan oksijen tüketimi ölçülür. Tarif edilen protokolde solunum hızındaki bir artış, hücreler ayrılmadıkça (yani ATP üretimi olmaksızın proton sızıntısı) oksidatif fosforilasyon ile ATP sentezine sıkı sıkıya bağlıdır. Ayırma, bir protokolde ATP sentez inhibitörü oligomisin ($1\text{-}2 \mu\text{g mL}^{-1}$) eklenerek test edilmekte olup, burada ayrılma derecesi oligomisin ilavesini takiben solunum hızına karşılık gelir.

(2) Sağlam hücrelerde mitokondriyal enerji üretim fonksiyonunun geliştirilmesine ve inhibisyonuna yönelik deney

İkinci protokolde, yukarıda tarif edildiği gibi aynı tampon kullanılır. Bazal solunum sağlandıktan sonra, mitokondriyal ayırıcı FCCP, metabolik talebi arttırmak için 2 nM'lik bir konsantrasyonda eklenir. DMSO içinde çözüldürülmüş olan bileşikler birkaç adımda $10 \mu\text{M}$ ila 10 mM son konsantrasyona titre edilerek respirasyonun gelişme ve/veya inhibisyonunun konsantrasyon aralığının değerlendirilmesi sağlanır. Deney, solunum kompleksinin aşağı akışında kalan substrat kullanımını ortaya çıkarmak üzere kompleks I'i inhibe etmek için 2 μM Rotenon eklenmesiyle ve mitokondriyal olmayan oksijen tüketimini ölçmek üzere 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kompleks III inhibitörü Antimisin eklenmesiyle sona erdirilir.

(3) Bozulmamış hücrelerde ayrılmayı değerlendirmek için deney

Üçüncü protokolde, yukarıda tarif edilenle aynı tampon kullanılır. Bazal solunum kurulduktan sonra, DMSO içinde çözülmüş 1 mM bileşik ilave edilir. Daha sonra, ATP-sentaz inhibitörü Oligomisin ilave edilir. Solunumda bir azalma ATP sentezine ne kadar oksijen tüketiminin bağlandığının bir ölçümünü verir. Hiç azalma olmaması ya da sadece hafif bir azalma olması, bileşiğin iç mitokondriyal membran üzerinde bir proton sızıntısı indüklediğini gösterir. Ayırıcı FCCP daha sonra maksimum ayrılmış solunumun indüklenmesi için titre edilir. Daha sonra bu solunum kompleksinin akış aşağısında

kalan substrat kullanımını ortaya çıkararak kompleks I'yi inhibe etmek üzere Rotenon (2 μ M) eklenir. Deney, mitokondriyal olmayan oksijen tüketimini ölçmek için 1 μ g/mL kompleks III inhibitörü Antimisin ilavesi ile sona erdirilir.

(4) *İnsan plazmasında inhibe edilmiş respiratuvar kompleks I'li hücrelerde mitokondriyal enerji üretme fonksiyonunun geliştirilmesine yönelik deney*

Bozulmamış insan kan hücreleri, aynı donörden plazma içinde inkübe edilmiştir. Endojenöz substratlarla referans hattı respirasyon belirlendikten sonra, kompleks I Rotenone 2 μ M ile inhibe edilmiştir. Bileşikler DMSO içinde çözündürülmüş 10 μ M ila 10 mM son konsantrasyon aralığında titre edilmiştir. Deney, 1 μ g/mL nihai konsantrasyonda Antimisin ilavesiyle sonlandırılmış ve herhangi bir artık mitokondriyal olmayan oksijen tüketimi ölçülmüştür.

Solunum analizlerinde istenen bileşiğin özellikleri

İdeal bileşik, protokol 1'deki geçirgenleştirmenin ardından süksinat ile stimüle edilmiş respirasyon üzerinde veya protokol 2'de endojenöz respirasyon üzerinde inhibitör etki olmaksızın düşük konsantrasyonda sağlam hücrelerde tarif edilen protokollerde respirasyonu stimüle eder. Maksimum uyarıcı etki ve inhibisyon arasındaki konsantrasyon mümkün olduğunca geniş olmalıdır. Kompleks III'ün altında veya sonunda mitokondriyal toksinlerle solunumun inhibisyonundan sonra solunum durmalıdır. Lütfen Şekil 1'e ve aşağıdaki listeye bakınız.

20 Bileşiklerin istenen özellikleri:

- maksimum a değeri düşük ilaç konsantrasyonunda erişilir.
- a büyük ölçüde (a')'dan fazladır
- a (b')'ye yaklaşır
- c (c')'ye yaklaşır
- 25 • d (d')'ye yaklaşır

Hücre sel membrana nüfuz etmeyen bileşikler, tahlilde aşağıdaki gibi tanımlanır:

- a (a')'ya yaklaşır

İlaç adayının neden olduğu mitokondriyal olmayan oksijen tüketimi aşağıda durumda tanımlanır:

- d (d')den fazladır

II. Bir mitokondriyal kompleks I inhibitörüne maruz kalan hücrelerde laktat birikmesinin önlenmesine yönelik deney

Bozulmamış insan trombositleri, beyaz kan hücreleri, fibroblastlar veya canlı mitokondri içeren diğer hücre tipleri, 8 saat boyunca 10 mM glukoz içeren fosfat tamponlu salin içinde, kompleks I inhibitör ilaçlar olan metformin (10 mM), fenformin (0.5 mM) veya rotenon (2 μ M) ile inkübe edilmiştir. Bu bileşikler tarafından oksidatif fosforilasyon yoluyla mitokondriyal ATP üretiminin inhibisyonu, glikoliz ile laktat birikimini artırır. Laktat seviyeleri, Lactate Pro™ 2 kan laktat test cihazı (Arkray, Alere AB, Lidingö, İsveç) veya benzer tipteki ölçümler kullanılarak her 2 saatte bir (veya daha sık, örn. her 30 dakikada bir) belirlenir. İnkübasyon 37 °C'de gerçekleştirilir. pH değeri, başlangıçta, 4 ve 8 saat inkübasyondan sonra (veya daha sık), standart pH metre, örneğin PHM210 (Radiometer, Copenhagen, Danimarka) kullanılarak ölçülür. İlaç adayları, 10 μ M - 5 μ M aralığındaki konsantrasyonlarda 30-60 dakika veya sonrasında başlayarak analize eklenir. Laktat birikiminin önlenmesi, sadece DMSO olmak üzere bileşik vehikülüyle yapılan paralel deneylerle karşılaştırılır. İlaç adayının spesifikliğini değerlendirmek için, aynı zamanda, ilaç adayının etkisini ortadan kaldıracak ve laktat üretimini geri kazandıracak olan 1 μ g/mL'de kompleks III inhibitörü Antimisin gibi bir akış aşağı inhibitörü ile birlikte de test edilir. Bu nedenle antimisin kullanımı, aynı zamanda, ilaç adaylarının testte kullanılan hücrelerin laktat üretme kabiliyeti üzerindeki gereksiz etkilerinin kontrolüdür. (Bkz., örn., Şekil 9, 10 ve 11).

Veri analizi

İstatistiksel analiz, Graph Pad PRISM yazılımı (GraphPad Software versiyon 6.03, La Jolla, Kaliforniya, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Tüm respiratuvar, laktat ve pH verileri ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir. Oranlar bireyler ve ortalamalar olarak çizilmiştir. Üç veya daha fazla grubun (ilaç konsantrasyonu) tek faktörlü karşılaştırması için tek yönlü ANOVA ve üç veya daha fazla grubun iki faktörlü karşılaştırması (ilaç/tedavi süresi ve konsantrasyonu) için iki yönlü karma model ANOVA kullanılmıştır. Çoklu

karşılaştırmaların telafi edilmesi için post-hoc testler Holm-Sidak'a göre yapılmıştır. Korelasyonlar r^2 ve P değerleri olarak ifade edilmiştir. Yarı maksimal inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değerlerini hesaplamak için standart lineer olmayan eğri oturtma uygulanmıştır. Sonuçlar $P < 0.05$ için istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

5 *Hücrel laktat biriktirme deneyinde istenen bileşiğin özellikleri*

(1) İdeal bileşik, kompleks I inhibisyonu ile oluşan laktat birikimini önler, yani laktat birikimi, kompleks I ile inhibe edilmemiş hücrelerdekine benzer bir orana yaklaşır. (2) Laktat birikiminin önlenmesi, Antimisin gibi bir akış aşağı solunum inhibitörüyle kaldırılır.

10 *III. Domuzlarda bir akut metabolik kriz modelinde laktat birikimi ve enerjetik inhibisyonun önlenmesine yönelik deney*

Kurşun ilaç adayları, kompleks I'de mitokondriyal disfonksiyona bağlı metabolik krizin in vivo modelinde bir kavram kanıtı olarak test edilecektir. Model, mitokondriyal kompleks I'de genetik mutasyonları olan çocuklarda veya hücre ve dokuların içinde biriktiğinde kompleks I'i inhibe eden klinik olarak kullanılan örneğin metformin gibi ilaçlarla tedavi edilen ve aşırı doz alan hastalarda meydana gelebilecek olan ciddi durumları taklit eder.

Çalışmada dişi Landrace domuzlar kullanılmıştır. Anestezi uygulanmış, ameliyata alınmış ve infüzyon ve izleme aktiviteleri için kateterler yerleştirilmiştir. Metabolik bir kriz, mitokondriyal kompleks I inhibitör rotenonun 3 saat boyunca 0.25 mg/kg/saat hızında infüzyonu ve ardından bir saat içinde 0.5 mg/kg/saat infüzyonu ile indüklenmiştir (vehikül %25 NMP/%4 polisorbata 80/%71 sudan oluşur). Arteriyel kan basıncı gibi kardiyovasküler parametreler, femoral artere yerleştirilen bir kateter ile sürekli olarak ölçülmüştür. Kardiyak debisi (CO) her 15 dakikada bir termo-seyreltim ile ölçülmüş ve kaydedilmiş, pulmoner arter basıncı (PA, sistolik ve diyastolik), santral venöz basınç (CVP) ve SvO_2 her 15 dakikada bir kaydedilmiş ve pulmoner veç basıncı (PCWP) Swan-Ganz kateterinden her 30 dakikada bir kaydedilmiştir. Dolaylı kalorimetri, örneğin bir Quark RMR ICU seçeneği (Cosmed, Roma, İtalya) ekipmanı vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. Kan gazları ve elektrolitler, femoral arter ve Swan-Ganz kateterlerinden toplanan arteriyel ve venöz kanda belirlenmiş ve ABL725 kan gazı analizörü (Radiometer Medical Aps, Brønshøj, Danimarka) kullanılarak analiz edilmiştir.

30 Analizler pH, BE, Hemoglobün, HCO_3^- , pO_2 , pCO_2 , K^+ , Na^+ , Glüköz ve Laktatı içerir.

In vivo metabolik kriz modelinde kavram kanıtı olarak istenen bileşiğin özellikleri

İdeal bileşik, kompleks I inhibisyonu ile oluşan metabolik kriz ile domuzlarda laktat birikimini ve pH düşüşünü azaltmalıdır. Kompleks I inhibisyonunu takiben enerji tüketimindeki azalma hafifletilmelidir. Bileşik, kan ve hemodinamik analizlerle ölçülen herhangi bir aşikar negatif etki oluşturmamalıdır.

Metabolomik metot

Beyaz kan hücreleri veya trombositler standart metotlarla toplanmış ve 110 mM sukroz, HEPES 20 mM, taurin 20 mM, K-laktobiyonat 60 mM, MgCl₂ 3 mM, KH₂PO₄ 10 mM, EGTA 0.5 mM, BSA 1 g/l ve isteğe bağlı olarak 5 mM glükoz içeren pH 7.1 olan bir tampon olan MiR05 içinde askıya alınmıştır. Numune, 37 °C'de sabit bir sıcaklıkta yüksek çözünürlüklü bir oksigraf (Oksigraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Avusturya) içinde karıştırılarak inkübe edilmiştir.

10 dakika sonra DMSO içinde rotenon ilave edilmiş (2 µM) ve inkübasyon devam ettirilmiştir. 5 Dakika daha geçtikten sonra DMSO içinde test bileşiği eklenmiş, isteğe bağlı olarak daha sonra bir başka test bileşiği eklenmiş ve bir süre daha inkübasyon yapılmıştır. Inkübasyon sırasında O₂ tüketimi gerçek zamanlı olarak ölçülmüştür.

Inkübasyonun sonunda hücreler santrifüjleme ile toplanmış ve %5 mannitol solüsyonu içinde yıkanmış ve metanol içine ekstrakte edilmiştir. İç standardı içeren bir sulu çözelti ilave edilmiş ve elde edilen çözelti, bir filtre ile uygun bir mikrofüj tüpünde santrifüjleme ile işlenmiştir.

Elde edilen süzüntü, Ooga ve arkadaşları (2011) ve Ohashi ve arkadaşlarının (2008) metoduyla çeşitli primer metabolitleri ölçmek için CE-MS analizinden önce vakum altında kurutulmuştur.

Özellikle, TCA döngüsü ve glikolizdeki metabolit seviyeleri buluşun bileşiklerinin etkisi için değerlendirilmiştir.

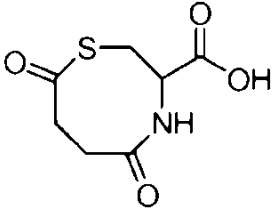
Ooga ve ark., Metabolomic anatomy of an animal model revealing homeostatic imbalances in dyslipidaemia, Molecular Biosystems, 2011, 7, 1217-1223 Ohashi ve ark., Molecular Biosystems, 2008, 4, 135-147

Malzemeler

Aksi belirtilmedikçe, aşağıdaki örneklerde kullanılan tüm reaktifler ticari kaynaklardan elde edilir.

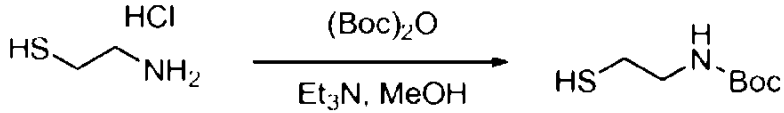
Örnekler

5 Örnek 1

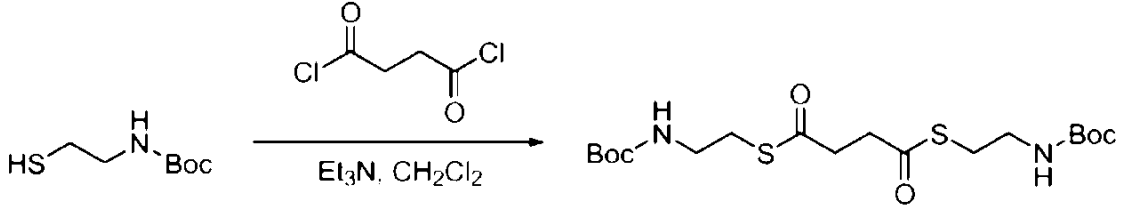


Süksinil klorür (0.1 mol) ve trietilamin (0.4 mol) bileşikleri DCM içinde çözüldürülmüş ve sistein eklenmiştir. Tepkime oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Tepkime sulu seyreltik hidroklorik asit içine eklenmiş ve ardından su ve salamura ile yıkanmıştır. Organik katmanlar magnezyum sülfat üzerinde kurutulmuş ve vakum içinde indirgenmiştir. Hedef bileşik silika jel kromatografi ile saflaştırılmıştır.

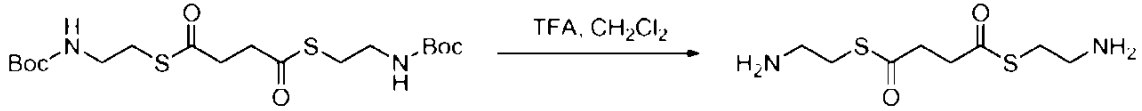
Örnek 2 - S,S-bis(2-propiyonamidoetil) bütanbis (tiyoat) (NV038, 01-038) sentezi



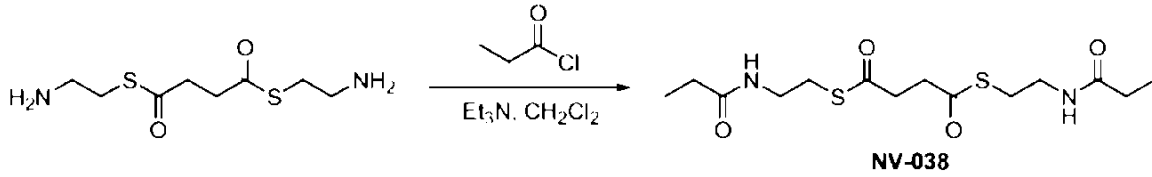
Sisteamin hidroklorür (5.0 g, 44 mmol) bileşiğinin CH₃OH (50 mL) içindeki bir çözeltisine Et₃N (4.4 g, 44 mmol) ve ardından (Boc)₂O (10.5 g, 48.4 mmol) eklenmiş ve karışım 1 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı vakum altında konsantre edilir. Elde edilen artık madde CH₂Cl₂ içinde çözüldürülmüş, 2M HCl sulu çözeltisi ve salamura ile yıkanmış, Na₂SO₄ üzerinde kurutulmuş, filtrelenmiş ve buharlaştırılarak tert-bütül 2-merkaptoetilkarbammat bileşiğini renksiz bir yağ biçiminde vermiş ve bu da bir sonraki adımda daha fazla saflaştırılmadan kullanılmıştır.



- tert-Bütül 2-merkptoetilkarbamat (9.8 g, 55.0 mmol) ve Et₃N (5.6 g, 55.0 mmol) bileşikleri CH₂Cl₂ (100 mL) içinde çözüldürülmüş, karışım 0 °C'ye soğutulmuş, süksinil klorür (2.1 g, 13.8 mmol) damlatılarak eklenmiştir. Ardından, karışım oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. Tepkime karışımı konsantre edilmiş ve artık madde kolon kromatografiyle saflaştırılmıştır (petrol eter/EtOAc = 1/10 ila 1/1). S,S-bis(2-(tert-bütoksikarbonilamino)etil) bütanbis(tiyooat) bileşiğini beyaz bir katı madde biçiminde vermiştir.

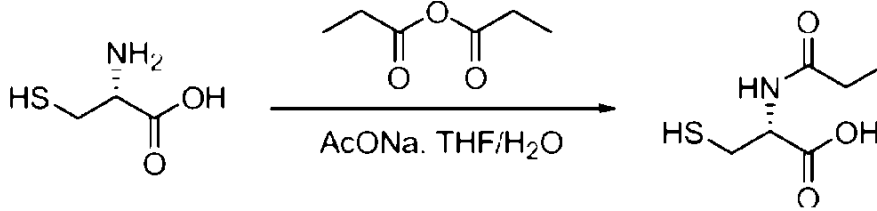


- S,S-bis(2-(tert-bütoksikarbonilamino)etil) bütanbis(tiyooat) (2.0 g, 4.58 mmol) ve TFA (10 mL) bileşiklerinin CH₂Cl₂ (10 mL) içindeki bir karışımı oda sıcaklığında 4 saat boyunca karıştırılmıştır. Tepkime karışımı konsantre edilerek S,S-bis(2-aminoetil) bütanbis(tiyooat) bileşiğini sarı bir yağ biçiminde vermiş ve bu da bir sonraki adımda daha fazla saflaştırılmadan kullanılmıştır.



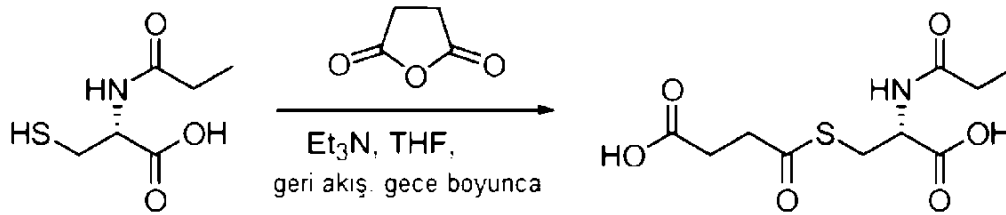
- S,S-bis(2-aminoetil) bütanbis(tiyooat) (1.1 g, 4.58 mmol) ve Et₃N (1.4 g, 13.74 mmol) bileşikleri CH₂Cl₂ (15 mL) içinde çözüldürülmüş, karışım 0 °C'ye soğutulmuş, propiyonil klorür (0.9 g, 10.07 mmol) damlatılarak eklenmiştir. Ardından, karışım oda sıcaklığında 3 saat karıştırılmıştır. Tepkime karışımı konsantre edilmiş ve artık madde hazırlayıcı TLC ile saflaştırılmıştır (CH₂Cl₂/MeOH=15/1). S,S-bis(2-Propiyonamidoetil) bütanbis(tiyooat) bileşiğini beyaz bir katı madde biçiminde vermiştir.

Örnek 3 - (R)-4-(2-karboksi-2-propiyonamidoetiltiyo)-4-oksobütanoik asit (NV-041, 01-041) sentezi



5 L-sistein

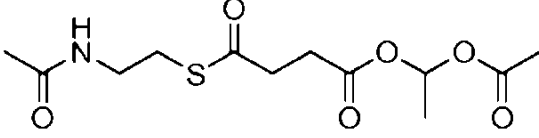
L-sistein (2.00 g, 16.5 mmol) bileşiğinin THF/H₂O (8 mL/2 mL) içindeki bir karışımına NaOAc (2.70 g, 33.0 mmol) eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında 20 dakika boyunca karıştırılmıştır. Tepkime 5 °C'ye soğutulmuş ve ardından propiyonik anhidrit (2.30 g, 17.6 mmol) damlatılarak eklenmiştir. Tepkime karışımı oda sıcaklığında gece boyunca karıştırılmış ve ardından 4 saat boyunca geri akışa ısıtılmıştır. Tepkime karışımı soğutulmuş ve 4N HCl eklenerek asitleştirilmiştir. Elde edilen çözelti düşük basınç altında buharlaştırılarak THF uzaklaştırılmıştır. Artık madde hazırlayıcı HPLC ile saflaştırılarak (H₂O (%0.05 TFA) ve CH₃CN ile ayrıştırılarak) 1.00 g (R)-3-merkpto-2-propiyonamidopropanoik asit bileşiğini renksiz yağ biçiminde vermiştir.



15

(R)-3-merkpto-2-propiyonamidopropanoik asit (1.00 g, 5.65 mmol), süksinik anhidrit (565 mg, 5.65 mmol) ve Et₃N (572 mg, 5.65 mmol) bileşiklerinin 10 mL THF içindeki bir çözeltisi gece boyunca geri akış altında ısıtılmıştır. Tepkime karışımı konsantre edilmiş ve artık madde hazırlayıcı HPLC ile saflaştırılarak (H₂O (%0.05 TFA) ve CH₃CN ile ayrıştırılarak) (R)-4-(2-karboksi-2-propiyonamidoetiltiyo)-4-oksobütanoik asit bileşiğini renksiz bir yağ biçiminde vermiştir.

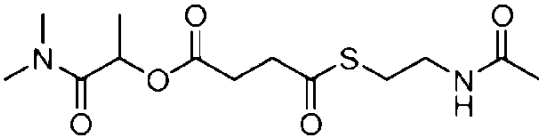
20

Örnek 4**Adım 1**

5 Trietilamin (0.24 mol) bileşiği N-asetilsisteamin (0.2 mol) bileşiğinin DCM içindeki bir çözeltilisine eklenmiştir. 4-Kloro-4-oksobütanoik asit (0.1 mol) damlatılarak eklenmiş ve tepkime karışımı oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Karışım sulu seyreltik hidroklorik asit içine eklenmiş ve etil asetatla ekstrakte edilmiş ve ardından su ve salamura ile yıkanmıştır. Organik katmanlar magnezyum sülfat üzerinde kurutulmuş ve vakum içinde indirgenmiştir.

10 Adım 2

Adım 3'ün ürünü (0.1 mol), asetik asit 1-bromoetil ester (0.1 mol) ve sezyum karbonat (0.12 mol) bileşikleri DMF içinde askıya alınmış ve 60 °C'de inert bir atmosfer altında karıştırılmıştır. Süspansiyon oda sıcaklığına soğumaya bırakılmış ve etil asetat eklenmiş ve sırasıyla sulu seyreltik hidroklorik asit ve suyla yıkanmıştır. Organik maddeler 15 magnezyum sülfat üzerinde kurutulmuş ve vakum içinde indirgenmiştir. Artık madde kolon kromatografiyle saflaştırılmıştır.

Örnek 5**Adım 1**

20 Trietilamin (0.24 mol) bileşiği N-asetilsisteamin (0.2 mol) bileşiğinin DCM içindeki bir çözeltilisine eklenmiştir. 4-Kloro-4-oksobütanoik asit (0.1 mol) damlatılarak eklenmiş ve tepkime karışımı oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Karışım sulu seyreltik hidroklorik asit içine eklenmiş ve etil asetatla ekstrakte edilmiş ve ardından su ve salamura ile

yıkanmıştır. Organik katmanlar magnezyum sülfat üzerinde kurutulmuş ve vakum içinde indirgenmiştir.

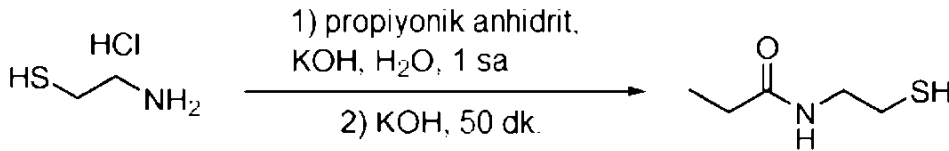
Adım 2

Dimetilamin (0.1 mol) ve trietilamin (0.1 mol) bileşikleri diklorometan içinde seyreltilmiş, 5 çözelti 0 °C'ye soğutulmuş ve DCM içinde 2-kloropropiyonil klorür (0.1 mol) eklenmiş ve çözelti oda sıcaklığına ısınmaya bırakılmış ve inert bir atmosfer altında karışmaya bırakılmıştır. Çözelti suyla yıkanmıştır. Organik maddeler birleştirilmiş ve uçucu maddeler vakum içinde uzaklaştırılmıştır. Artık madde silika jel kromatografiyle saflaştırılmıştır.

10 Adım 3

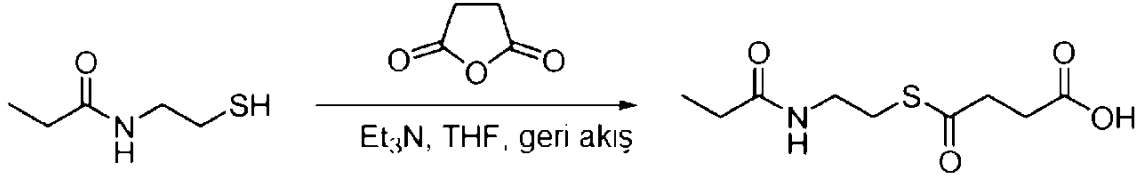
2-Kloro-N,N-dimetil-propiyonamit (0.1 mol), Adım 1'in ürünü (0.1 mol), sezyum karbonat (0.1 mol) ve sodyum iyodür (0.01 mol) bileşikleri DMF içinde askıya alınmış ve süspansiyon 80 °C'de inert bir atmosfer altında karıştırılmıştır. Süspansiyon oda sıcaklığına soğutulmuş, etil asetat ile seyreltilmiş ve suyla yıkanmıştır. Organik 15 maddeler vakum içinde indirgenmiştir. Artık madde silika jel kromatografiyle saflaştırılarak hedef bileşiği vermiştir.

Örnek 6 - 4-okso-4-(2-propiyonamidoetil)tiyo)bütanoik asit (NV114, 01-114) sentezi



Propiyonik anhidrit (11.7 g, 89.7 mmol) ve sulu KOH (8 M, pH=8'de tutmak için) 20 bileşikleri karıştırılmakta olan 24 mL su içindeki bir sisteamin hidroklorür (3.40 g, 30.0 mmol) çözeltisine damlatılarak eklenmiştir. Karışım 2 N HCl ile nötrale edilmiş ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Çözelti bir buz banyosu ile soğutulmuş ve katı KOH (6.00 g, 105 mmol) yavaşça eklenmiştir. Karışım 50 dakika oda sıcaklığında karıştırılmıştır. NaCl ile doyurulduktan ve 6N HCl ile nötrale edildikten sonra, karışım 25 CH₂Cl₂ (4 × 30 mL) ile ekstrakte edilmiştir. Birleştirilen CH₂Cl₂ ekstraktları kurutulmuş (Na₂SO₄) ve vakum içinde konsantre edilerek N-(2-merkaptometil)propiyonamit bileşiğini

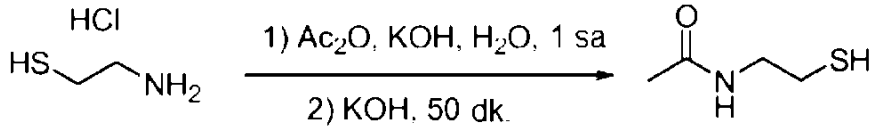
renksiz yağ biçiminde vermiş ve bu da bir sonraki adımda daha fazla saflaştırılmadan kullanılmıştır.



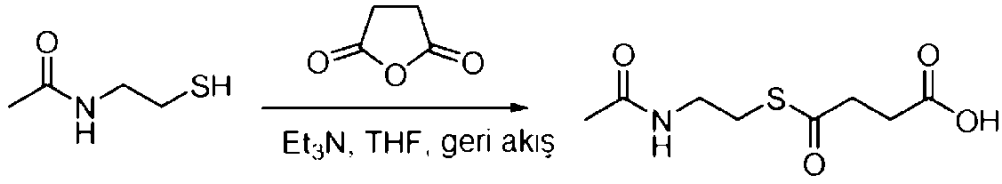
5 N-(2-merkaptometil)propionamidit (2.00 g, 15.0 mmol), süksinik anhidrit (1.50 g, 15.0 mmol) ve Et₃N (1.50 g, 15.0 mmol) bileşiklerinin 20 mL THF içindeki bir çözeltisi geri akış altında gece boyunca ısıtılmıştır. Tepkime karışımı konsantre edilmiş ve artık madde hazırlayıcı HPLC ile saflaştırılarak (H₂O (%0.05 TFA) ve CH₃CN ile ayrıştırılarak) 4-okso-4-(2-propionamidoetiltiyu)bütanoik asit bileşiğini renksiz bir yağ biçiminde vermiştir.

10 Örnek 7 - 4-(2-asetamidoetiltiyu)-4-oksobütanoik asit (NV108, 01-108) sentezi

Bu örnek mevcut buluşa göre değildir.

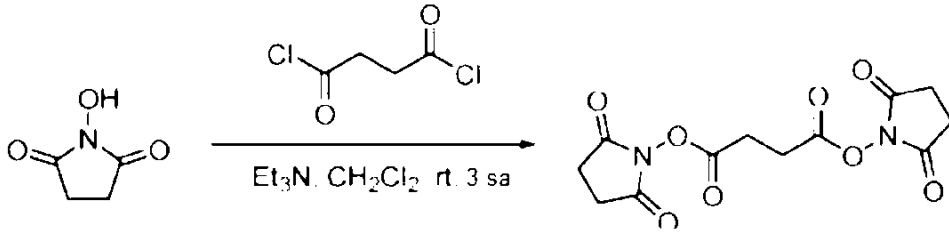


15 Asetik anhidrit (8.48 g, 90.0 mmol) ve sulu KOH (8 M, pH=8'de tutmak için) bileşikleri karıştırılmakta olan 24 mL su içindeki bir sisteamin hidroklorür (3.40 g, 30.0 mmol) çözeltisine damlatılarak eklenmiştir. pH değeri daha sonra 2 N HCl eklenerek 7'ye getirilmiştir. Karışım oda sıcaklığında 1 saat boyunca karıştırılmış ve ardından çözelti bir buz banyosu ile soğutulmuştur. Yukarıdaki çözeltiye katı KOH (6.0 g, 105 mmol) yavaşça eklenmiş ve elde edilen karışım 50 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. NaCl ile doyurulduktan ve 6N HCl ile nötralize edildikten sonra, karışım
20 CH₂Cl₂ (4 × 30 mL) ile ekstrakte edilmiştir. Birleştirilen CH₂Cl₂ ekstraktları kurutulmuş (Na₂SO₄) ve vakum içinde konsantre edilerek N-(2-merkaptometil)asetamidit bileşiğini renksiz yağ biçiminde vermiş ve bu da bir sonraki adımda daha fazla saflaştırılmadan kullanılmıştır.

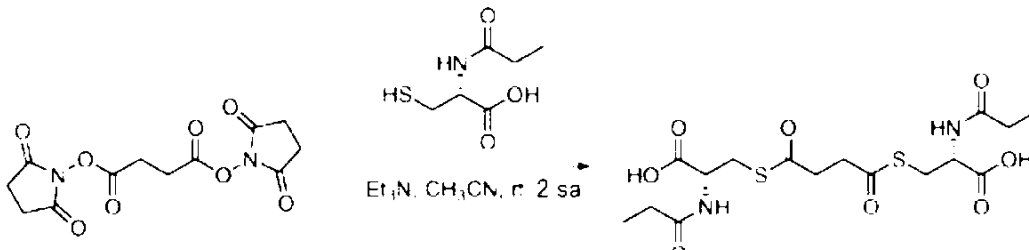


N-(2-merkaptoetil)asetamit (1.50 g, 12.7 mmol), süksinik anhidrit (1.3 g, 12.7 mmol) ve Et₃N (1.3 g, 12.7 mmol) bileşiklerinin 20 mL THF içindeki bir çözeltisi geri akış altında gece boyunca ısıtılmıştır. Tepkime karışımı konsantre edilmiş ve artık madde hazırlayıcı HPLC ile saflaştırılarak (H₂O (%0.05 TFA) ve CH₃CN ile ayrıştırılarak) 4-(2-asetamidoetiltiyo)-4-oksobütanoik asit bileşiğini renksiz bir yağ biçiminde vermiştir.

Örnek 8 - (R)-3-(4-((R)-2-karboksi-2-propiyonamidoetiltiyo)-4-oksobutanoiltiyo)-2-propiyonamidopropanoik asit (NV099, 01-099) sentezi



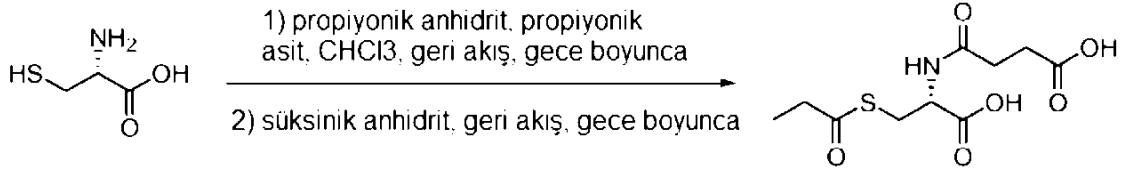
N-hidroksisüksinimit (3.00 g, 26.1 mmol) ve Et₃N (3.20 g, 31.3 mmol) bileşiklerinin CH₂Cl₂ (60 mL) içindeki bir karışımına damlatılarak süksinil klorür (2.00 g, 13.0 mmol) eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında 3 saat boyunca karıştırılmış ve ardından suyla seyreltilmiştir (60 mL). Elde edilen süspansiyon filtrelenmiş, su ve CH₂Cl₂ ile yıkanmıştır. Kek toplanmış ve kurutulularak bis(2,5-dioksopirolidin-1-il) süksinat bileşiğini gri bir katı madde biçiminde vermiştir.



N-(2-merkaptoetil)propiyonamit (400 mg, 2.26mmol), bis(2,5-dioksopirolidin-1-il) süksinat (353 mg, 1.13 mmol) ve TEA (286 mg, 2.83 mmol) bileşiklerinin 3.0 mL CH₃CN

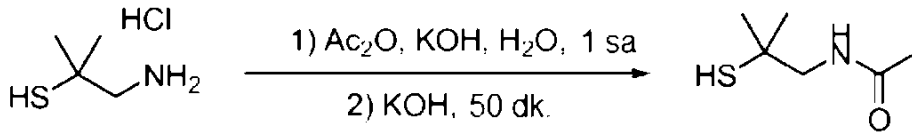
içindeki bir karışımı oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. Berrak tepkime çözeltisi hazırlayıcı HPLC ile saflaştırılmış (H_2O (%0.05 TFA) ve CH_3CN ile ayrıştırılarak) ve (R)-3-(4-((R)-2-karboksi-2-propiyonamidoetiltiliyo)-4-oksobütanoiltiliyo)-2-propiyonamidopropanoik asit bileşiğini renksiz yağ biçiminde vermiştir.

5 **Örnek 9 - (R)-4-(1-karboksi-2-(propiyoniltiyo)etilamino)-4-oksobütanoik asit (NV122, 01-122) sentezi**



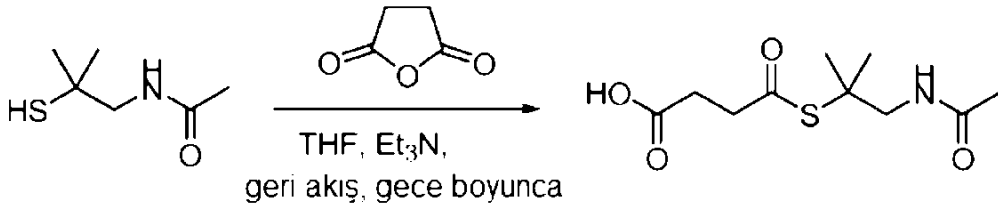
(R)-3-merkapto-2-propiyonamidopropanoik asit (1.00 g, 8.25 mmol) ve propiyonik asit (1.0 mL) bileşiklerinin $CHCl_3$ (10 mL) içindeki bir karışımına propiyonik anhidrit (1.13 g, 8.67 mmol) damlatılarak eklenmiştir. Tepkime karışımı gece boyunca geri akışa 10 ısıtılmıştır. Tepkime karışımı soğutulmuş ve süksinik anhidrit (1.00 g, 9.99 mmol) eklenmiştir. Karışım gece boyunca geri akışa tabi tutulmuş ve ardından düşük basınç altında konsantre edilmiştir. Artık madde hazırlayıcı HPLC ile saflaştırılarak (H₂O (%0.05 TFA) ve CH_3CN ile ayrıştırılarak) (R)-4-(1-karboksi-2-(propiyoniltiyo)etilamino)- 15 4-oksobütanoik asit bileşiğini beyazımsı bir katı madde biçiminde vermiştir.

Örnek 10 - 4-(1-asetamido-2-metilpropan-2-iltiyo)-4-oksobütanoik asit (NV188, 01-188) sentezi



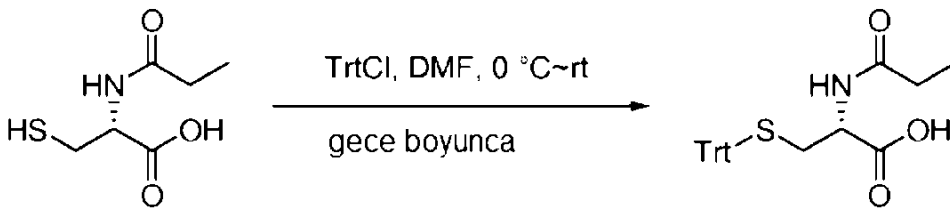
Sisteamin hidroklorür (2.00 g, 14.1 mmol) bileşiğinin 15 mL su içinde karıştırılan bir 20 çözeltisine asetik anhidrit (4.30 g, 42.4 mmol) ve sulu KOH (8 M, pH=8'de tutmak için) damlatılarak eklenmiştir. Karışım daha sonra 2 N HCl ile nötralize edilmiş ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Bir buz banyosu ile soğutulmuş olan çözeltiye

yavaşça katı KOH (2.80 g, 49.4 mmol) eklenmiş ve karışım 50 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. NaCl ile doyurulduktan ve 6N HCl ile nötralize edildikten sonra, karışım CH₂Cl₂ ile iki kez ekstrakte edilmiştir. Birleştirilen CH₂Cl₂ ekstraktları kurutulmuş (Na₂SO₄) ve vakum içinde konsantre edilerek N-(2-merkpto-2-
5 metilpropil)asetamit bileşiğini beyaz bir katı madde biçiminde vermiş ve bu da bir sonraki adımda daha fazla saflaştırılmadan kullanılmıştır.



N-(2-merkpto-2-metilpropil)asetamit (400 mg, 2.72 mmol), süksinik anhidrit (326 mg, 3.26 mmol) ve Et₃N (330 mg, 3.26 mmol) bileşiklerinin 6 mL THF içindeki bir çözeltisi
10 gece boyunca ısıtılmıştır. Tepkime karışımı konsantre edilmiş ve artık madde hazırlayıcı HPLC ile saflaştırılarak (H₂O (%0.05 TFA) ve CH₃CN ile ayrıştırılarak) 4-(1-asetamido-2-metilpropan-2-iltiy)-4-oksobütanoik asit bileşiğini sarı yağ biçiminde vermiştir.

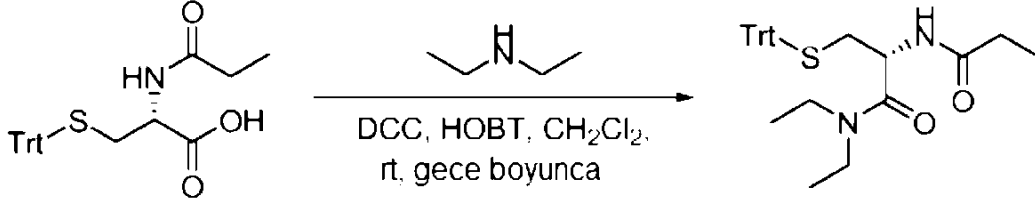
Örnek 11 - S,S-bis((R)-3-(dietilamino)-3-okso-2-propiyonamidopropil) bütanbis(tiyoat) (NV185, 01-185) sentezi



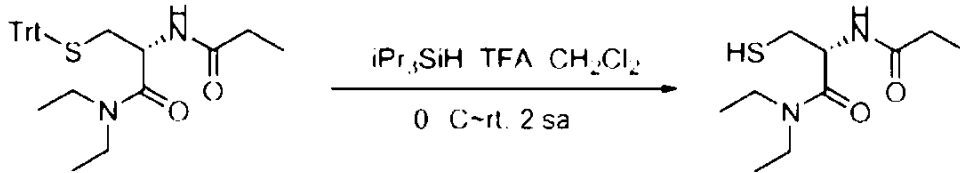
15

(R)-3-merkpto-2-propiyonamidopropanoik asit (5.00 g, 28.0 mmol) bileşiğinin DMF (50 mL) içindeki bir çözeltisine trifenilmetil klorür (8.70 g, 31.0 mmol) 0 °C'de eklenmiştir. Karışım 0 °C'de 30 dakika boyunca karıştırılmış ve ardından gece boyunca oda sıcaklığına ısıtılmıştır. Karışım su ile işleme tabi tutulmuş ve EtOAc ile iki kez ekstrakte
20 edilmiştir. Birleştirilen organik katmanlar salamurayla yıkanmış, Na₂SO₄ üzerinde kurutulmuş ve düşük basınç altında konsantre edilmiştir. Artık madde silika jel kolon

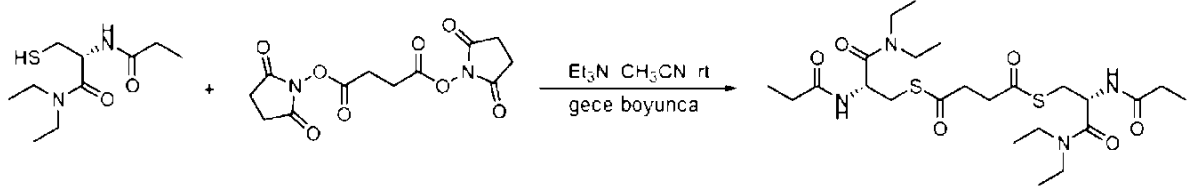
kromatografi ile saflaştırılmış (CH_2Cl_2 / MeOH = 80/1 ila 50/1) ve (*R*)-2-propiyonamido-3-(tritiltiy)propanoik asit bileşiğini beyaz bir katı madde biçiminde vermiştir.



(*R*)-2-propiyonamido-3-(tritiltiy)propanoik asit (1.7 g, 4.0 mmol) bileşiğinin CH_2Cl_2 (50 mL) içindeki karıştırılan bir çözeltisine DCC (1.7 g, 8.0 mmol) ve HOBT (0.50 g, 4.0 mmol) oda sıcaklığında eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında 1 saat boyunca karıştırılmış ve ardından dietilamin (0.80 g, 8.0 mmol) eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında gece boyunca karıştırılmıştır. Karışım su ile yıkanmış, Na_2SO_4 üzerinde kurutulmuş ve düşük basınç altında konsantre edilerek işlenmemiş ürün vermiş ve bu da silika jel kolon kromatografi ile saflaştırılarak (EtOAc / petrol eter = 1/6 ila 1/1) (*R*)-*N,N*-dietil-3-merkaptopropanamid bileşiğini sarı yağ biçiminde vermiştir.



(*R*)-*N,N*-dietil-3-merkaptopropanamid (400 mg, 0.800 mmol) bileşiğinin CH_2Cl_2 (10 mL) içindeki 0 °C'deki bir çözeltisine TFA (1 mL) ve $i\text{-Pr}_3\text{SiH}$ (253 mg, 1.60 mmol) eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığına ısıtılmış ve 2 saat karıştırılmıştır. Çözelti düşük basınç altında buharlaştırılmıştır. Artık madde hazırlayıcı HPLC ile saflaştırılmış (H_2O (%0.5 TFA) ve CH_3CN ile ayrıştırılarak) ve (*R*)-*N,N*-dietil-3-merkaptopropanamid bileşiğini sarı yağ biçiminde vermiştir.

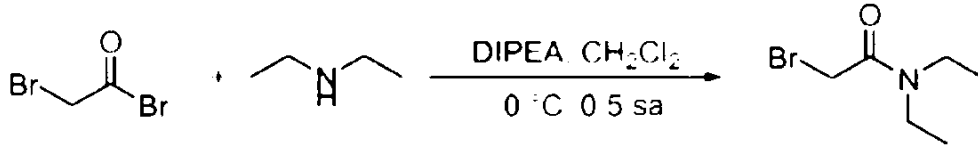


(*R*)-*N,N*-dietyl-3-merkapto-2-propionamidopropanamit (150 mg, 0.600 mmol), Et₃N (242 mg, 2.40 mmol) ve bis(2,5-dioksopirolidin-1-il) süksinat (94 mg, 0.30 mmol) bileşiklerinin CH₃CN (100 mL) içindeki bir karışımı oda sıcaklığında gece boyunca karıştırılmıştır.

- 5 Karışım düşük basınç altında buharlaştırılmıştır. Artık madde hazırlayıcı HPLC ile saflaştırılarak (H₂O (%0.5 TFA) ve CH₃CN ile ayrıştırılarak) *S,S*-bis((*R*)-3-(dietylamino)-3-okso-2-propionamidopropil) bütanbis(tiyolat) (%36 verim) bileşimini sarı bir katı madde biçiminde vermiştir.

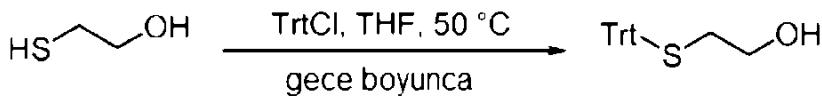
Örnek 12 - 4-(2-(2-(dietylamino)-2-oksoetoksi)etiltiyoo)-4-oksobütanoik asit (NV193, 01-193) sentezi.

10



2-bromoasetil bromür (4.00 g, 20.0 mmol) ve DIPEA (2.60 g, 20 mmol) bileşiklerinin CH₂Cl₂ (50 mL) içindeki bir çözeltisine damlatılarak dietylamin (1.60 g, 20.0 mmol) 0 °C'de eklenmiştir. Karışım 0 °C'de 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. Çözelti düşük basınç altında buharlaştırılarak CH₂Cl₂ uzaklaştırılmıştır. Artık madde silika jel kolon kromatografi ile saflaştırılmış (EtOAc/petrol eter = 1/5 ila 1/2) ve 2-bromo-*N,N*-dietylasetamit bileşimini sarı yağ biçiminde vermiştir.

15

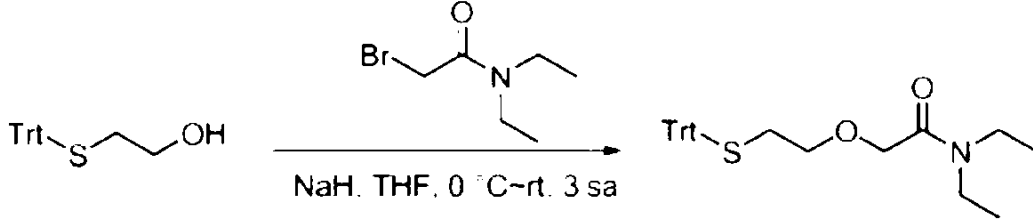


2-merkaptoetanol

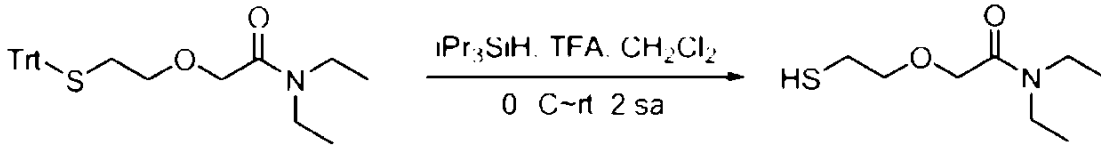
2-merkaptoetanol (2.50 g, 32.0 mmol), trifenilmetil klorür (10.7 g, 38.4 mmol) bileşiklerinin 100 mL THF içindeki bir çözeltisi geri akış altında gece boyunca ısıtılmıştır.

20

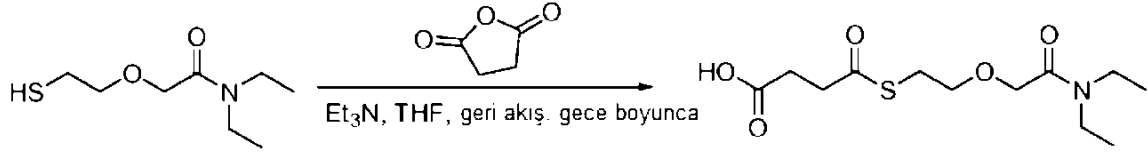
Tepkime karışımı konsantre edilmiş ve artık madde silika jel kolon kromatografi ile saflaştırılarak (EtOAc / petrol eter = 1/5 ila 1/1) 2-(2,2,2-trifeniletilyo)etanol bileşiğini beyaz bir katı madde biçiminde vermiştir.



- 5 2-(2,2,2-trifeniletilyo)etanol (3.50 g, 10.9 mmol) bileşiğinin THF (30 mL) içindeki bir çözeltilisine NaH (0.500 g, 13.0 mmol, yağ içinde %60) porsiyonlar halinde 0 °C'de eklenmiştir. Tepkime karışımı 0 °C'de 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Ardından, THF (5 mL) içinde 2-bromo-*N,N*-dietilasetamit (2.1 g, 10.9 mmol) bileşiği damlatılarak eklenmiştir. Elde edilen karışım 2 saat boyunca oda sıcaklığına ısıtılmıştır. Karışım
- 10 suyla söndürülmüş ve EtOAc ile iki kez ekstrakte edilmiştir. Birleştirilen organik katmanlar salamurayla yıkanmış, Na₂SO₄ üzerinde kurutulmuş ve düşük basınç altında konsantre edilmiştir. Artık madde silika jel kolon kromatografi ile saflaştırılmış (EtOAc/petrol eter = 1/5 ila 1/2) ve *N,N*-dietil-2-(2-(triflito)etoksi)asetamit bileşiğini beyaz bir katı madde biçiminde vermiştir.

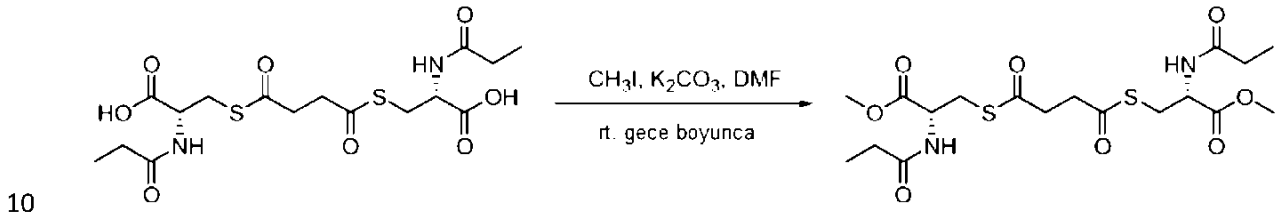


- 15 *N,N*-dietil-2-(2-(triflito)etoksi)asetamit (2.70 g, 6.30 mmol) bileşiğinin CH₂Cl₂ (20 mL) içindeki bir çözeltilisine TFA (2 mL) ve *i*-Pr₃SiH (2.00 g, 12.6 mmol) 0 °C'de eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığına ısıtılmış ve 2 saat karıştırılmıştır. Çözelti düşük basınç altında buharlaştırılarak CH₂Cl₂ uzaklaştırılmıştır. Artık madde silika jel kolon kromatografi ile
- 20 saflaştırılmış (EtOAc / petrol eter = 1/5 ila 1/1) ve *N,N*-dietil-2-(2-merkaptotoksi)asetamit bileşiğini renksiz yağ biçiminde vermiştir.



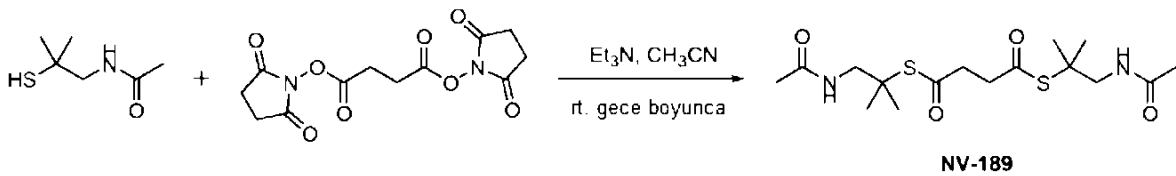
N,N-dietil-2-(2-merkptoetoksi)asetamit (356 mg, 1.90 mmol), süksinik anhidrit (200 mg, 2.10 mmol) ve Et_3N (300 mg, 2.90 mmol) bileşiklerinin 10 mL THF içindeki bir çözeltisi geri akış altında gece boyunca karıştırılmıştır. Tepkime karışımı vakum içinde konsantre edilmiş ve artık madde hazırlayıcı HPLC ile saflaştırılarak (H_2O (%0.5 TFA) ve CH_3CN ile ayrıştırılarak) 4-(2-(2-(dietilamino)-2-oksoetoksi)etiltiyo)-4-oksobütanoik asit bileşiğini renksiz yağ biçiminde vermiştir.

Örnek 13 - (R)-metil 3-(4-((R)-3-metoksi-3-okso-2-propiyonamidopropiltiyo)-4-oksobütanoiltiyo)-2-propiyonamidopropanoate (NV205, 01-205) sentezi



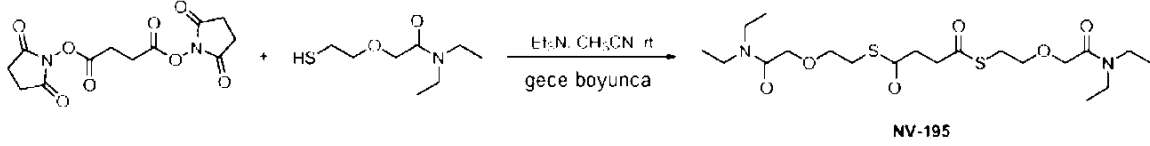
(R)-3-(4-((R)-2-karboksi-2-propiyonamidoetiltiyo)-4-oksobütanoiltiyo)-2-propiyonamidopropanoik asit (300 mg, 0.69 mmol), CH_3I (293 mg, 2.06 mmol) ve K_2CO_3 (475 mg, 3.44 mmol) bileşiklerinin 4.0 mL DMF içindeki bir karışımı gece boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Tepkime karışımı filtrelenmiş ve filtrat hazırlayıcı HPLC ile saflaştırılarak (H_2O (%0.05 TFA) ve CH_3CN ile ayrıştırılarak) doğrudan (R)-metil 3-(4-((R)-3-metoksi-3-okso-2-propiyonamidopropiltiyo)-4-oksobütanoiltiyo)-2-propiyonamidopropanoate bileşiğini beyazımsı bir katı madde biçiminde vermiştir.

Örnek 14 - NV189 Sentezi



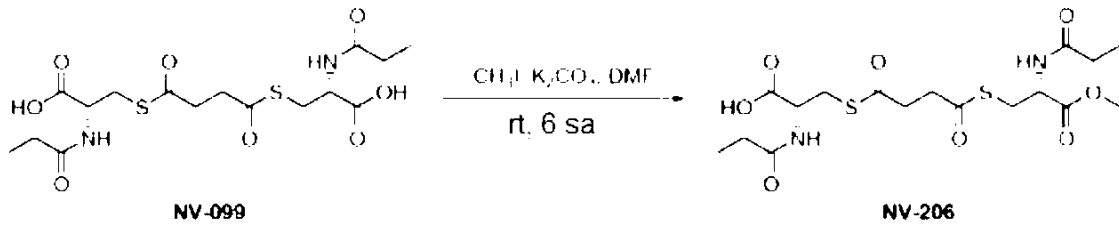
N-(2-merkpto-2-metilpropil)asetamit (400 mg, 2.72 mmol), bis(2,5-dioksopirolidin-1-il) süksinat (339 mg, 1.09 mmol) ve Et₃N (550 mg, 5.44 mmol) bileşiklerinin 6 mL CH₃CN içindeki bir karışımı oda sıcaklığında gece boyunca karıştırılmıştır. Tepkime karışımı konsantre edilmiş ve artık madde hazırlayıcı HPLC ile saflaştırılarak (H₂O (%0.05 TFA) ve CH₃CN ile ayrıştırılarak) **NV189** bileşiğini beyazımsı bir katı madde biçiminde vermiştir.

Örnek 15- S,S-bis(2-(2-(dietilamino)-2-oksoetoksi)etil) bütanbis(tiyolat) (NV195, 01-195) Sentezi



N,N-dietil-2-(2-merkptoetoksi)asetamit (438 mg, 2.3 mmol) bileşiğinin CH₃CN (10 mL) içindeki bir çözeltisine bis(2,5-dioksopirolidin-1-il) süksinat (374 mg, 1.2 mmol) ve Et₃N (232 mg, 2.3 mmol) eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında gece boyunca karıştırılmıştır. Tepkime karışımı vakum içinde konsantre edilmiş ve artık madde hazırlayıcı HPLC ile saflaştırılarak (H₂O (%0.5 TFA) ve CH₃CN ile ayrıştırılarak) S,S-bis(2-(2-(dietilamino)-2-oksoetoksi)etil) bütanbis(tiyolat) bileşiğini renksiz bir yağ biçiminde vermiştir.

Örnek 16- NV206 Sentezi



(*R*)-3-(4-((*R*)-2-karboksi-2-propiyonamidoetiltiyo)-4-oksobutanoiltiyo)-2-propiyonamidopropanoik asit (400 mg, 0.916 mmol), CH₃I (156 mg, 1.1 mmol) ve K₂CO₃ (190 mg, 1.37 mmol) bileşiklerinin 4 mL DMF içindeki bir karışımı oda sıcaklığında 6 saat boyunca karıştırılmıştır. Tepkime karışımı filtrelenmiş ve filtrat

hazırlayıcı HPLC ile saflaştırılarak (H₂O (%0.05 TFA) ve CH₃CN ile ayrıştırılarak) doğrudan NV206 bileşimini renksiz bir sakız biçiminde vermiştir.

Örnek 17 Biyolojik deneylerin sonuçları

Aşağıdaki tabloda verilen bileşikler, I. Sağlam hücrelerde mitokondriyal enerji üretme fonksiyonunun geliştirilmesi ve inhibisyonunun değerlendirilmesine yönelik deney başlığı altında bahsedilen deney 1-4'e tabi tutulmuştur. Aşağıdaki tabloda sonuçlar gösterilmekte olup, bu sonuçlar test edilen tüm bileşiklerin uygun özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Önemli bir biçimde, tüm bileşikler tarama protokolleri 1 ve 4'ten görüldüğü üzere CII-bağlı respirasyon üzerinde spesifik etki göstermekte olup, CI substratlar deney 2'de gösterildiği gibi mevcuttur.

Tarama protokolleri 1-4'ün sonuçları

Örnek 1-16'da ortaya konan bileşik numaraları.

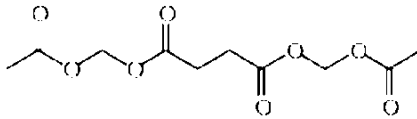
Bileşik NV	Konverjan (Rutin)	Konverjan (FCCP)	CII (plazma)	CII	Ayrılan	Toksisite
01-193	(++)	+	(+)	+	+	5 mM
01-188	+++	+++	+	+	(+)	5 mM
01-185	(+)	+	+	+	(+)	2 mM
01-205	+++	++	+	++	(+)	5 mM
01-114	+++	++	+	++	(+)	10 mM
01-041	+	+++	+	++	(+)	5 mM
01-108	++	++	(+)	(++)	+	10 mM

Açıklama: Konverjan (Rutin) - tarama deneyi 3'te tarif edilen koşullar altında bileşik tarafından indüklenen mitokondriyal oksijen tüketimindeki artış; Konverjan (FCCP) - tarama deneyi 2'de (ayrılan koşullar) tarif edilen koşullar altında bileşik tarafından indüklenen mitokondriyal oksijen tüketimindeki artış; Konverjan (plazma) - tarama deneyi 4'te tarif edilen şekilde, insan plazması içinde inkübe edilen inhibe edilmiş kompleks I'li hücrelerin içindeki bileşikle indüklenen mitokondriyal oksijen tüketimindeki artış; CII - tarama deneyi 1'de tarif edilen şekilde, inhibe edilmiş kompleks I'li hücrelerin içindeki bileşikle indüklenen mitokondriyal oksijen tüketimindeki artış; Ayırma - tarama testi 3'te tarif edildiği gibi oligomisin eklendikten sonra oksijen tüketimi seviyesi. Her parametredeki yanıt, artan güç sırasına göre +, ++ veya +++ olarak derecelendirilir. Parantezler [()] bir ara efekti gösterir, yani (+++) işareti ++ ve +++ arasındadır. Toksikite - oksijen tüketimindeki düşüşün tarama testi 2'de tarif edildiği gibi olduğu bileşik titrasyon sırasında en düşük konsantrasyon.

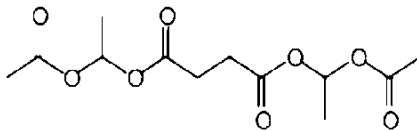
Örnek 18-20

15 Metformin çalışmaları

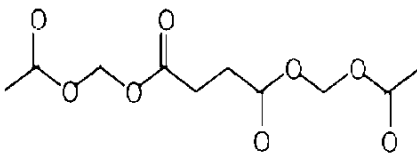
Metformin çalışmasında, aşağıdaki bileşikler kullanılmıştır (ve şekillerde bunlara atıfta bulunmaktadır). Bileşikler WO 2014/053857 belgesinde tarif edilmektedir.



(NV118)



(NV189)



(NV241)

Numune alımı ve hazırlanışı

Çalışma, İsveç Lund Üniversitesi bölgesel etik kurulu onayı (etik inceleme kurulu izin no 2013/181) ile gerçekleştirilmiştir. 18 sağlıklı yetişkinden (11 erkek ve 7 kadın) venöz kan, K₂EDTA tüplerinde (BD Vacutainer® Brand Tube, dipotasyum EDTA, BD, Plymouth, UK), klinik standart prosedüre göre, yazılı bilgilendirilmiş rıza alındıktan sonra alınmıştır. Trombosit izolasyonu için tüm kan, 10 dakika boyunca oda sıcaklığında (RT) 500 g'de santrifüj edilmiştir (Multifuge 1 SR Heraeus, Thermo Fisher Scientifics, Waltham, ABD). Trombosit açısından zengin plazma 15 mL'lik falcon tüplerine toplanmış ve 8 dakika boyunca oda sıcaklığında 4600 g'de santrifüjlenmiştir. Elde edilen topak, donörün 1-2 mL kendi plazmasında yeniden süspansiyon edilmiştir. PBMC'ler Ficol gradyan santrifüjü kullanılarak izole edilmiştir (Boyum, 1968). Trombositlerin izolasyonundan sonra kalan kan, eşit hacimde fizyolojik salin ile yıkanmış ve 3 mL Lymphoprep™ üzerinde katmanlanmıştır. 30 dakika boyunca oda sıcaklığında 800 g'de santrifüjlemeden sonra PBMC toplanmış ve fizyolojik salin ile yıkanmıştır. 10 dakika boyunca oda sıcaklığında 250 g'de bir santrifüjlemeden ardından PBMC'lerin topağı iki ölçek fizyolojik salin ve bir ölçek donörün kendi plazması içinde yeniden süspansiyon edilmiştir. Hem PBMC'ler hem de trombositler için hücre sayımı bir otomatik hemasitometre (Swelab Alfa, Boule Medical AB, Stockholm, İsveç) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Örnek 18-19'da rapor edilen çalışmanın amacı Metformin, spesifik mitokondriyal kompleks I inhibisyonu yoluyla periferik kan mononükleer hücrelerinde ve trombositlerde laktat üretimine neden olur.

Metformin, ilaca bağlı mitokondriyal disfonksiyona bağlı olduğu düşünülen laktik asidozun nadir yan etkisiyle ilişkili yaygın olarak kullanılan bir anti-diyabetik ilaçtır. Respirometri kullanılarak, aşağıdaki Örnek 1-2'de rapor edilen çalışmanın amacı, çoğu ülkede yüksek laktik asidoz insidansı nedeniyle alınan bir biguanid analogu olan fenformin ile ilişkili olarak metforminin insan kan hücrelerine mitokondriyal toksisitesini değerlendirmek olmuştur.

Örnek 20'de rapor edilen çalışmanın amacı

Amaç, süksinat ön ilaçların metformin ve fenforminin istenmeyen etkilerini hafifletme veya yok etme yeteneğini araştırmaktır.

Örnek 18A Metformin ve fenforminin geçirgenleştirilmiş insan trombositlerinde mitokondriyal respirasyon üzerindeki etkileri

Biguanid toksisitesinin spesifik hedefini araştırmak için, kan hücrelerinin digitonin geçirgenleştirilmesi kullanılarak ve art arda respiratuvar komplekse özgü substratlar ve

5 MiR05 ortamında inhibitörlerin eklenmesiyle bir protokol uygulanmıştır. Rutin respirasyonun stabilizasyonundan, yani hücrelerin endojenöz substrat temini ve ATP talebiyle respirasyonunun sağlanmasından sonra metformin, fenformin veya bunların vehikülü (çift deiyonize su eklenmiştir. İlaçların geniş bir konsantrasyon aralığı uygulanmış olup; 0.1, 0.5, 1 ve 10 mM metformin ve 25, 100 ve 500 µM fenformin

10 uygulanmıştır. 37 °C'de 10 dakika süreyle inkübasyon yapıldıktan sonra, mitokondriyal fonksiyonu bozmadan ve maksimal respiratuvar kapasitelerin ölçümüne olanak tanıyarak maksimal hücre membranı geçirgenleştirmesini indüklemek üzere önceden belirlenmiş optimal bir digitonin konsantrasyonunda (1 µg 10⁻⁶ trombosit) trombositler geçirgenleştirilmiştir (Sjövall ve ark., (2013a). İlk önce kompleks I'e bağımlı oksidatif

15 fosforilasyon kapasitesinin (OXPHOS_{CI}) değerlendirilmesi için, NADH-bağlantılı substratlar olan piruvat ve malat (5 mM), daha sonra ADP (1 mM) ve son olarak, ilave kompleks I substrat glutamat (5 mM) art arda eklenmiştir. Ardından, FADH₂-bağlı substrat olan süksinat (10 mM), konverjan kompleks I ve II'ye bağlı OXPHOS kapasitesini (OXPHOS_{CI+II}) belirlemek için verilmiştir. LEAK_{I+II} durumu, oksijen

20 tüketiminin mitokondriyal membran boyunca protonların geri akışını telafi ettiği bir solunum durumu (Gnaiger, 2008) olup, ATP-sentaz inhibitörü oligomisin (1 µg mL⁻¹) eklenerek değerlendirilmiştir. Kompleks I ve II (ETS_{CI+II}) yoluyla konverjan giriş ile desteklenen maksimum ayrılmamış respiratuvar elektron taşıma sistemi kapasitesi, protonofor karbonil-siyanid p-(triflorometoksi) fenilhidrazon (FCCP) ile müteakip

25 titrasyon ile değerlendirilmiştir. Kompleks I inhibitör rotenonun (2 µM) eklenmesi, kompleks II'ye bağımlı maksimal ayrılmayan respirasyonu (ETS_{CI}) ortaya çıkarmıştır. Daha sonra rezidüel oksijen tüketimini (ROX) ortaya çıkarmak için kompleks III inhibitör antimisin (1 µg mL⁻¹) verilmiştir. Son olarak, kompleks IV aktivitesini ve kimyasal arkaplını ölçmek için sırasıyla yapay kompleks IV substrat olan N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür (TMPD, 0.5 mM) eklenmiş ve sodyum azit (10 mM)

30 verilmiştir. Kompleks IV aktivitesi, sodyum azit değerinin TMPD değerinden

5 çıkarılmasıyla hesaplanmıştır. Kompleks IV aktivitesi haricinde, tüm respiratuvar durumlar kararlı halde ölçülmüş ve ROX için düzeltilmiştir. Kompleks IV aktivitesi, kararlı halde değil, ROX tayininden sonra ölçülmüştür. Dış mitokondriyal membranın bütünlüğü, vehikül, 100 mM metformin veya 500 uM fenformin varlığında OXPHOS_{CI+II} sırasında sitokrom c (8 µM) eklenerek incelenmiştir.

Örnek 18B Metforminin geçirgenleştirilmiş insan periferel kan tek çekirdekli hücrelerinde mitokondriyal respirasyon üzerindeki ve sağlam insan trombositlerinde mitokondriyal respirasyon üzerindeki etkisi

10 Metformine (0.1, 1 ve 10 mM) yanıt olarak geçirgenleştirilmiş PBMC'lerin respirasyon analizi için, geçirgenleştirilmiş trombositlerle aynı protokol kullanılmış, ancak digitonin konsantrasyonu 6 µg 10⁻⁶ PBMC'ye ayarlanmıştır (Sjövall ve ark., 2013b).

Sonuçlar

15 Kompleks I substratlarını kullanarak respirasyon, hem geçirgenleştirilmiş insan PBMC'lerinde hem de trombositlerde metformin ile doza bağımlı olarak inhibe edilmiştir (Şekil 1). OXPHOS_{CI} kapasitesi, 10 mM'de kontrollerle karşılaştırıldığında artan metformin konsantrasyonlarıyla birlikte neredeyse tamamıyla inhibisyonla birlikte azalmış (PBMC'lerde -%81.47, P < 0.001 ve trombositlerde -%92.04, P < 0.001) ve bunun sonucunda PBMC'ler için IC₅₀ değeri 0.45 mM ve trombositler için 1.2 mM olmuştur. Kompleks I ve kompleks II'ye bağlı substratlar OXPHOS_{CI+II} ve ETS_{CI+II} 20 kullanılarak, respiratuvar kapasiteler metformin ile OXPHOS_{CI}'ye benzer şekilde azaltılmış olup, vehikül ile işleme tabi tutulan ve 1 mM metformin ile işleme tabi tutulan geçirgenleştirilmiş PBMC'lerin eşzamanlı olarak ölçülen O₂ tüketiminin temsili izleriyle gösterilmektedir (Şekil 5a). Buna karşılık, ETS_{CI} kapasitesi ve kompleks IV aktivitesi, her iki hücre tipinde kontrollerle karşılaştırıldığında metformin varlığında anlamlı bir 25 değişiklik göstermemiş (Şekil 5b, c) ve LEAK_{I+II} respirasyonu da anlamlı bir değişiklik göstermemiştir (oksijen tüketiminin, protonların mitokondriyal membran üzerinden geri akışını telafi ettiği respiratuvar durum, geleneksel olarak izole mitokondrilere durum 4 olarak adlandırılır, veriler gösterilmemiştir). Metformin ile indüklenen kompleks I'in mitokondriyal inhibisyonu, hücrelerin sırasıyla yıkanması ve permeabilize edilmesi 30 yoluyla ilacın hücre dışı ve hücre içi çıkarılması üzerine tersinir görünmemektedir.

Kompleks I inhibisyonunun hasarının şiddeti uzaklaştırma ile zayıflatılmış olmasına rağmen (muhtemelen ilacın daha kısa bir maruz kalma süresine atfedilmiştir) trombositler, kontrol ile karşılaştırılabilir rutin ve maksimal mitokondriyal fonksiyonu geri kazanmamıştır (veriler gösterilmemiştir). Fenformin, benzer şekilde, OXPHOS_{Cl} (Fig. 6),
5 OXPHOS_{Cl+II} ve ETS_{Cl+II}'yi inhibe etse de, ETS_{Cl}'yi veya kompleks IV'e özgü solunumu (veriler gösterilmemiştir) inhibe etmemiştir. Phenformin, metformin ile karşılaştırıldığında, permeabilize trombositlerde OXPHOS_{Cl}'nin 20 kat daha güçlü bir inhibisyonunu göstermiştir (sırasıyla, IC₅₀ 0.058 mM ve 1.2 mM) (Şekil 2). Metformin ve fenformin sitokrom c uygulandıktan sonra solunum artışını indüklememiş ve dolayısıyla dış
10 mitokondriyal membranın bütünlüğünü bozmamıştır.

MiR05 ortamında rutin solunumun stabilize edilmesinden sonra, vehikül (çift deiyonize su) veya 1, 10 ve 100 mM metformin eklenmiştir. LEAK solunumunu değerlendirmek için ATP-sentaz inhibitörü oligomisin (1 µg mL⁻¹) eklenmeden önce 37 °C'de 60 dakika boyunca rutin solunum izlenmiştir. Endojen substratlar (ETS) tarafından desteklenen
15 maksimal ayrışmamış solunum elektron taşıma sistemi kapasitesine FCCP titrasyonu ile ulaşılmıştır. ROX'i değerlendirmek için kompleks I inhibitörü rotenon (2 µM), kompleks III inhibitörü antimisin (1 µg mL⁻¹) ve kompleks IV inhibitörü sodyum azit (10 mM) tarafından respirasyon art arda bloke edilmiş ve tüm respirasyon değerleri bunun için düzeltilmiştir. Ek bir deneyde, tam kan trombositlerin izolasyonundan ve solunum
20 analizlerinden 18 saat önce farklı metformin konsantrasyonları (0.1, 0.5 ve 1 mM) ile K₂EDTA tüplerinde inkübe edilmiştir.

Sonuçlar

Bozulmamış insan trombositlerinde, metformin, doza ve zamana bağlı bir şekilde rutin solunumu azaltmıştır (Şekil 7a). Metformin veya vehiküllere maruz kaldığında,
25 trombositler zaman içinde rutin solunumda sürekli bir düşüş göstermiştir. 60 dakika sonunda, rutin solunum, eklemenin ardından yapılan ilk ölçüme kıyasla kontrolde -%14.1 (P < 0.05), 1 mM'da -%17.27 (P < 0.01), 10 mM'da -%28.61 (P < 0.001) ve 100 mM'da -%81.78 oranında azalmıştır. 100 mM'de metformin rutin solunumu, 15 dakikalık maruziyetin ardından kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı derecede azaltmıştır (-
30 %39.77, P<0.01). 60 dakikalık inkübasyondan sonra trombositlerin (protonofor titrelili

ETS kapasitesi) maksimal ayrılmamış solunumu, 10 mM (-%23.86, P <0.05) ve 100 mM (-%56.86, P <0.001) metformin ile önemli ölçüde inhibe edilmiştir (Şekil 3b). Bozulmamış hücrelerde LEAK solunumu, metformin inkübasyonu ile önemli ölçüde değiştirilmemiştir (veriler gösterilmemiştir). Tam kan, 18 saat boyunca 1 mM'lik bir metformin konsantrasyonunda inkübe edildiğinde, bozulmamış insan trombositlerinin rutin solunumu %30.49 oranında azalmıştır (P <0.05).

Örnek 19 Metformin ve fenforminin laktat üretimi ve bozulmamış insan trombositlerinin pH'ı üzerindeki etkisi

Trombositler 8 saat süreyle metformin (1 mM, 10 mM), fenformin (0.5 mM), rotenon (2 µM) veya rotenon (DMSO) vehikülü ile inkübe edilmiştir. Laktat seviyeleri, Lactate Pro™ 2 kan laktat test cihazı (Arkray, Alere AB, Lidingö, İsveç) kullanılarak her 2 saatte bir (n = 5) belirlenmiştir (Tanner ve ark., 2010). İnkübasyon, 750 rpm'lik bir karıştırıcı hızında 37 °C'de gerçekleştirilmiş ve pH, bir PHM210 Standart pH Ölçer (Radiometer, Copenhagen, Danimarka) kullanılarak başlangıçta ve 4 ve 8 saat inkübasyondan sonra ölçülmüştür.

Sonuçlar

Laktat üretimi, insan trombositlerinde metformin ve fenformin ile inkübasyona yanıt olarak zaman ve doza bağımlı bir şekilde artmıştır (Şekil 8a). Kontrolle karşılaştırıldığında, metformin- (1 ve 10 mM), fenformin- (0.5 mM) ve rotenon- (2 µM) ile muamele edilmiş trombositlerin hepsi 8 saat tedavi boyunca önemli ölçüde daha fazla laktat üretmiştir. 1 mM metforminde laktat 8 saatte 0.30 ± 0.1 'den 3.34 ± 0.2 'ye arttırılmış ve 10 mM metforminde laktat 0.22 ± 0.1 'den 5.76 ± 0.7 mM'a arttırılmıştır. İlişkin pH değeri her iki grupta 7.4 ± 0.01 'den, sırasıyla 1 mM ve 10 mM için 7.16 ± 0.03 ve 7.00 ± 0.04 'e düşmüştür. Fenformin ile tedavi edilen trombositler (0.5 mM), 10 mM metformin ile muamele edilmiş numunelerle benzer seviyelerde laktat üretmiştir. Laktat artış düzeyi, tüm tedavi grupları için pH azalması ile korele olmuştur. Metformin ile tedavi edilen sağlam trombositlerde artmış laktat seviyeleri, metforminle tedavi edilen permeabilize trombositlerde görülen azalmış OXPHOS_{C1} respiratuvar değerleri ile de korele olmuştur ($r^2 = 0.60$, P <0.001). Sınırlı sayıda deneyler ayrıca, bozulmamış

PBMC'lerin ayrıca 10 mM metformine maruz kaldığında artan laktat salınımı gösterdiğini göstermiştir (veriler gösterilmemiştir).

Örnek 18-19'daki sonuçların tartışılması

Bu çalışma, metforminin, metformin intoksikasyonunun klinik durumuyla ilgili
5 konsantrasyonlarda insan plateletlerinde ve PBMC'lerde kompleks I için spesifik mitokondri üzerindeki geri dönüşümsüz toksik etkisini göstermektedir. Trombositlerde azalmış Kompleks I solunumu ile artan laktat üretimi arasında bir korelasyon olduğunu da ayrıca göstermiş bulunuyoruz. Metformin için gözlemlediğimiz mitokondriyal toksisite, bozulmamış hücrelerde zaman içinde gelişmiştir. Fenformin günümüzde birçok ülkede
10 yüksek LA insidansı nedeniyle geri çekilmiş olan yapısal olarak ilişkili bir bileşik olup, büyük ölçüde düşük konsantrasyonda bir kompleks I'e özgü etki vasıtasıyla trombositlerde laktat salınımı ve pH düşüşünü indüklemiştir.

Mevcut çalışmada, insan trombositlerinin bütünleşik mitokondriyal fonksiyonunu değerlendirmek üzere yüksek çözünürlüklü respirometrel bir model kullanarak, hem
15 metformin hem de fenforminin mitokondriyal toksisitesinin respiratuvar kompleks I'e spesifik olduğunu ve benzer bir spesifik inhibisyonun ayrıca PBMC'lerde bulunduğunu göstermiş bulunuyoruz. Permeabilize PBMC'lerin kompleks I respirasyonu, permeabilize (geçirgenleştirilmiş) trombositlerinkine göre metformine 2.6 kat daha duyarlı olmuştur. Bununla birlikte, metforminin zamana bağlı toksisitesinden dolayı (aşağıya bakınız), IC₅₀
20 muhtemelen düşük bir tahmindir ve daha uzun pozlama süresinden sonra tespit edilirse daha düşük olabilir. Bu bulgular metforminin mitokondriyal toksisitesinin, daha önce başkaları tarafından gösterildiği gibi spesifik dokularla sınırlı olmadığını, daha ziyade hücre içi seviyede genel bir etki oluşturduğunu daha da güçlendirmektedir. Protti ve ark.
2012a, Protti ve ark. 2012b belgelerinde bildirilen trombositlerde metformin ile
25 indüklenmiş kompleks IV inhibisyonu bu çalışmada veya izole bovin mitokondrileri kullanılan önceki bir çalışmada (Dykens ve ark. (2008)) doğrulanmamıştır. Ayrıca, metformin ve fenformin, iç veya dış mitokondriyal membranların herhangi bir spesifik olmayan geçirgenlik değişimleri yoluyla solunum inhibisyonunu indüklememiştir, çünkü ilaçların mevcudiyetinde sitokrom c ilavesini takiben ayrılma veya uyarma tepkisi
30 olduğuna dair bir kanıt yoktur. Yüksek çözünürlüklü respirometri, yüksek hassasiyetli bir

yöntemdir ve pikomolar aralıkta O₂ ölçümleri sağlar. İnsan kan hücrelerine ex vivo uygulandığında, bozulmamış hücrelerde tam entegre halde solunumun değerlendirilmesine izin verir ve geçirgen hale getirilmiş hücrelerde sağlam mitokondriye ekzojen teminine ve substratların kontrolüne izin verir. Bu, metforminin mitokondriyal toksisitesi üzerine yapılan araştırmada, örneğin Dykens ve ark. (2008) ve Owen ve ark. (2000) araştırmalarında büyük bir çoğunlukla kullanılan enzimatik spektrofotometrik deneylerin aksidir. Bu analizler, tek komplekslerin bağımsız, entegre olmayan fonksiyonlarını ölçer ve bu nedenle, çalışmalarımızdaki sonuçlardaki farklılıklara katkıda bulunabilecek şekilde daha az fizyolojiktir.

Çalışmanın sonuçları, halihazırda 8 ila 8 saat sonunda intoksikasyonla ilişkili konsantrasyonlarda metformin tarafından kaynaklanan sağlam trombosit süspansiyonlarındaki belirgin respiratuvar inhibisyonu, laktat artışını ve pH düşüşünü göstermiştir. Mitokondriyal respirasyonun zamana bağlı inhibisyonu ve bununla birlikte, hücre dışı tamponun değişimi ve çözünür metforminin hücre geçirgenleştirilmesiyle birlikte hücre içi miktarının seyreltiminin ardından tersine çevrilme eksikliği, mitokondriyal birikimin ilaca bağlı olarak gelişen mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna ilişkin LA'de, diğerleri tarafından önerildiği gibi (Chan ve ark., 2005, Lalau, 2010) önemli bir faktör olduğunu göstermektedir.

Fenforminin mitokondriyal toksisitesi daha önce örneğin HepG2 hücreleri, bir karaciğer karsinomu hücre çizgisi ve sıçan ve ineğin izole edilmiş mitokondrilerinde gösterilmiştir. Burada insan kan hücrelerini kullanarak spesifik mitokondriyal toksisite gösterilmiştir. Metformin ile karşılaştırıldığında, fenformin insan trombositlerinde daha güçlü bir mitokondriyal toksik potansiyele sahiptir (sırasıyla IC₅₀ 1.2 mM ve 0.058 mM). Fenformin ve metformin klinik dozda 10 ila 15 kat fark ve terapötik plazma konsantrasyonunda 3 ila 10 kat fark gösterir. Bu çalışmada, kompleks I'in engellenme potansiyeline yönelik fenformin ve metformin arasında 20 katlık bir fark gözlemledik. Hastalara çevrildiğinde, klinik dozlama ile ilişkili olarak mitokondriyal toksisitede bu farklılık fenforminin fenformin ile ilişkili LA insidansının daha yüksek olduğunu açıklayabilir.

Metforminin standart terapötik plazma konsantrasyonları 0.6 ve 6.0 µM aralığındadır ve toksik konsantrasyonlar 60 µM ve 1 mM arasındadır. Hemodiyalizden önce istemsiz

metformin zehirlenmesi olgusunda, 2 mM'ın üzerinde bir metformin düzeyi bildirilmiştir (Al-Abri ve ark. 2013). Doku dağılımı çalışmaları ayrıca kararlı durumdaki metformin konsantrasyonunun plazma/serumda diğer organlara göre daha düşük olduğunu göstermiştir. Mide-bağırsak yolunda 7 ila 10 kat daha yüksek konsantrasyonlarda biriktiği ve böbrek, karaciğer, tükürük bezleri, akciğer, dalak ve kaslarda plazma düzeylerine kıyasla bundan daha az, ancak yine de anlamlı düzeyde yüksek miktarlarda biriktiği gösterilmiştir. Kardiyovasküler sistemi, karaciğeri veya böbrekleri etkileyen predispozan durumlar gibi metforminin temizlenmesinin zayıf olduğu durumlarda, toksik düzeylere ulaşabilir. Bu çalışmada görülen metforminin toksik konsantrasyonu (1 mM) böylelikle metformin intoksikasyonu olan hastaların kanında bulunanlarla karşılaştırılabilir. Metformin, bu çalışmada gösterildiği gibi, kan hücreleri için toksik olmasına rağmen, trombositlerin ve PBMC'lerin LA'nın gelişimine önemli katkıları olması olası değildir. Metformin diğer organlarda biriktiğinden ve ayrıca bu organlar daha metabolik olarak aktif olduğundan, diğer dokularda ilk olarak laktat üretiminin artması muhtemeldir. Sonuçlarımız, başkaları tarafından önerilen şekilde (Brunmair ve ark., 2004, Protti ve ark., 2012b, Dykens ve ark., 2008), sistemik mitokondriyal inhibisyonun, metformin ile indüklenen LA'nın nedeni olduğu önerisini güçlendirmektedir.

Daha önceki çalışmalara ve mevcut bulgulara dayanarak, metforminin anti-diyabetik etkisinin aerobik solunumun inhibisyonu ile ilişkili olabileceği olasılığı hakkında spekülasyon yapmak ilgi çekicidir. Metformin ile tedavi edilen diyabetik hastalarda karaciğerdeki azalmış glikoz seviyeleri ve ince bağırsakta kana glikoz alımının azalması, kısmi kompleks I inhibisyonuna bağlı olabilir. Kompleks I inhibisyonu, düşük ATP üretimi, artan AMP miktarları, enzim AMP ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK) aktivasyonu ve azalan ATP üretimini telafi etmek için artan glikolizle birlikte hızlandırılmış glükoz dönüşümüne neden olur.

Şimdiye kadar, metformin ilişkili LA için tedavi önlemleri toksinin uzaklaştırılması için hemodiyaliz ve hemofiltrasyon, asidoz için doğrulama yapılması ve böbrek kan akışının artırılmasından oluşmuştur.

Örnek 20 Hücre geçirgen süksinat ön ilaçları ile laktat üretiminde metformin kaynaklı artışa müdahale

Yeni geliştirilen ve sentezlenmiş hücre geçirgen süksinat ön ilaçları ile intakt insan trombositlerinde laktat üretiminde metformin kaynaklı artışa müdahale 10 mM glukoz içeren PBS içinde yapılmıştır. Trombositler ya tek başına rotenona (2 µM) maruz bırakılmış veya rotenon (2 µM) ve antimisin (sadece NV 189 ile tedavi edilen hücreler için 1 µg/mL) veya 10 mM metformin ve 60 dakika sonra vehikül (DMSO, kontrol), hücre geçirgen süksinat ön ilaçlarından biri (NV118, NV189 ve NV241) ya da süksinat, her 30 dakikada bir 250 µM konsantrasyonda eklenmiştir. Laktat seviyeleri, deneyin başlangıcı ile 30 dakikalık aralıklarla ölçülmüştür. Ek olarak, ilk vehikülün (dmsso, kontrol), farklı hücre geçirgen süksinat ön ilaçlarının (NV118, NV189, NV241) veya süksinatın eklenmesinden önce ve deneyin sonunda pH ölçülmüştür. Laktat üretim hızı, laktat-zaman eğrisinin %95 güven aralığı (CI) ile lineer olmayan bir uyumla hesaplanmıştır (Şekil 9, 10, 11 ve 12).

Örnek 20 ile ilgili sonuçlar, burada tarif edilen analizlere dayanmaktadır.

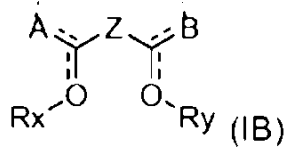
Trombositlerde rotenon ve metformin inkübasyonuna bağlı laktat üretimi, hücre geçirgen suksinat ön ilaçlarının ilavesiyle zayıflatılmaktadır

2 µM Rotenon ile inkübe edilen trombositlerde laktat üretim hızı 0.86 mmol laktat $(200 \cdot 10^6 \text{trc} \cdot \text{h})^{-1}$ (%95 Güven Aralığı [CI] 0.76-0.96) olup, bu değer NV118 (0.25 mmol [%95 CI 0.18-0.33]), NV189 (0.42 mmol [%95 CI 0.34-0.51]) ve NV241 (0.34 mmol [%95 CI 0.17-0.52]) ile azaltılmış ve rotenon almayan hücrelerden anlamlı düzeyde farklı olmamıştır (0.35 [%95 CI 0.14-0.55]) (Şekil 9, 10 ve 11). Rotenon ve NV189'a ek olarak antimisin ile inkübe edilen hücreler, hücre geçirgen suksinat ön ilaçlarının spesifik mitokondriyal etkisini gösteren, rotenon ile muamele edilmiş hücreye (0.89 mmol [0.81-0.97]) benzer bir laktat üretimine sahip olmuştur (Şekil 10). 10 mM metformin ile inkübe edilmiş olan hücreler 0.86 mmol laktat $(200 \cdot 10^6 \text{trc} \cdot \text{h})^{-1}$ (%95 CI 0.69-1.04) hızında laktat üretirken, vehikül (su) ile işleme tabi tutulan hücreler ise 0.22 mmol (%95 CI 0.14-0.30) hızında üretmiştir (Şekil 12). Üç süksinat ön ilacından herhangi biri ile birlikte inkübasyon sonucunda metformin etkisi zayıflatılmakta olup, NV118 için 0.43 mmol üretim (%95 CI 0.33-0.54) (Şekil 9), NV189 için 0.55 mmol (%95 CI 0.44-0.65) (Şekil 10) ve NV241 için 0.43 mmol (%95 CI 0.31-0.54) (Şekil 11) sonucu vermiştir.

Mevcut tarifname ve devamında gelen istemler boyunca, bağlamda aksi açıkça belirtilmediği sürece, "içerir" ifadesi ve bunun "içeren", "içerdiği" vb. varyasyonlarının, belirtilen tamsayı ya da adım ya da tamsayı ya da adım gruplarına dahil edildiğini, ancak herhangi bir başka tamsayı ya da adımın ya da tamsayı ya da adım grubunun 5 dışarıda bırakılmadığı takdir edilecektir. "İçermek" kelimesi "içerir" ve "...den oluşur" ifadelerini kapsar.

Mevcut buluşun bileşiğinin ait olduğu bileşik sınıfının genel açıklaması

Bileşiklerin sınıfı aşağıdaki Formül IB ile tanımlanabilir:



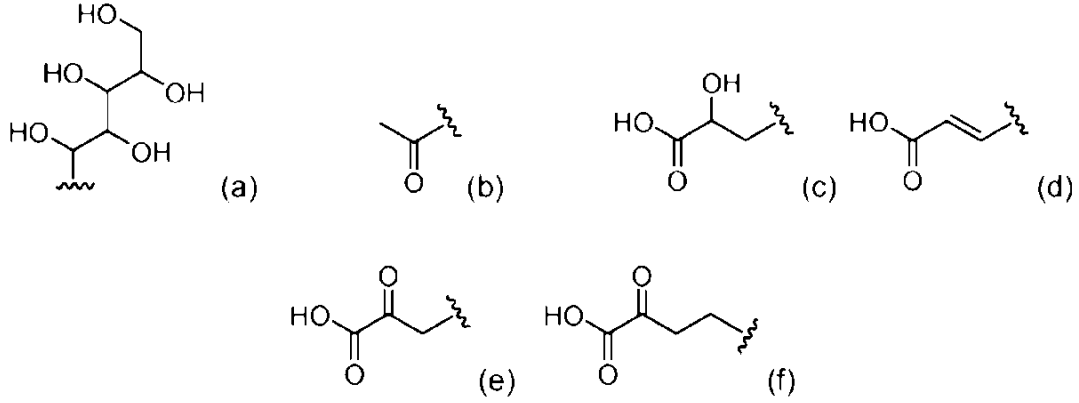
10 ya da bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzudur. A ve B arasındaki noktalı bağ, kapalı halka yapısı oluşturmak üzere isteğe bağlı bir bağı belirttiğinde, özelliği; içerisinde

Z ifadesinin -CH₂-CH₂- veya >CH(CH₃), -O, S arasından seçilmesi,

A ve B ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya aynı olması ve -O-R', -NHR'', -SR''' veya 15 -OH arasından seçilmesi, hem A hem de B'nin H olmaması koşulu bulunması,

R', R'' ve R''' ifadelerinin bağımsız olarak farklı veya aynı olması ve aşağıdaki Formül IIB ile IXB arasından seçilmesi:

$R_1 = H, Me, Et, \text{propil}, i\text{-propil}, \text{bütil}, \text{iso-bütil}, t\text{-bütil}, O\text{-asil}, O\text{-alkil}, N\text{-asil}, N\text{-alkil}, X\text{-asil}, CH_2X\text{-alkil}, CH_2X\text{-asil}, F, CH_2COOH, CH_2CO_2\text{alkil}$ veya aşağıdaki formül a-f'den herhangi biri olmasıdır:



- 5 Tercih edilen yapılar da, $R_1 = H, Me, Et, \text{propil}, i\text{-propil}, \text{bütil}, \text{iso-bütil}, t\text{-bütil}, O\text{-asil}, O\text{-alkil}, N\text{-asil}, N\text{-alkil}, X\text{-asil}, CH_2X\text{-alkil}, CH_2X\text{-asil}, F, CH_2COOH$.

$X = O, NH, NR_6, S$

$R_2 = Me, Et, \text{propil}, i\text{-propil}, \text{bütil}, \text{iso-bütil}, t\text{-bütil}, -C(O)CH_3, -C(O)CH_2C(O)CH_3, -C(O)CH_2CH(OH)CH_3,$

- 10 $R_3 = R_1$, yani, R_1 altında belirtildiği gibi aynı ya da farklı gruplardır

$X_1 = CR'_3R'_3, NR_4$

$n = 1-4,$

$p = 1-2$

$X_2 = OR_5, NR_1R'_2$

- 15 $R'_3 = H, Me, Et, F$

$R_4 = H, Me, Et, i\text{-Pr}$

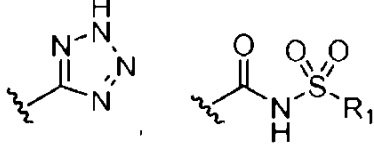
$R_5 = \text{asetil}, \text{propiyonil}, \text{benzoil}, \text{benzilkarbonil}$

$R'_2 = H, HX_3, \text{asil}, \text{asetil}, \text{propiyonil}, \text{benzoil}, \text{benzilkarbonil}$

$X_3 = F, Cl, Br \text{ ve } I$

$R_6 = H$ veya alkil, örneğin Me, Et, n-propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül veya asetil, örneğin asil, propiyonil, benzoil, veya formül IIB, formül IIBI veya formül VIIIB

$X_5 = -H, -COOH, -C(=O)XR_6,$



5 X_5 ayrıca $CONR_1R_3$ olabilir.

$R_9 = H, Me, Et$ veya $O_2CCH_2CH_2COXR_8$

$R_{10} = O$ asil, NHalkil, NHasil veya $O_2CCH_2CH_2COX_6R_8$

$X_6 = O, NR_8$

10 $R_8 = H, alkil, Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül, asetil, asil, propiyonil, benzoil$ or formula (IIB),

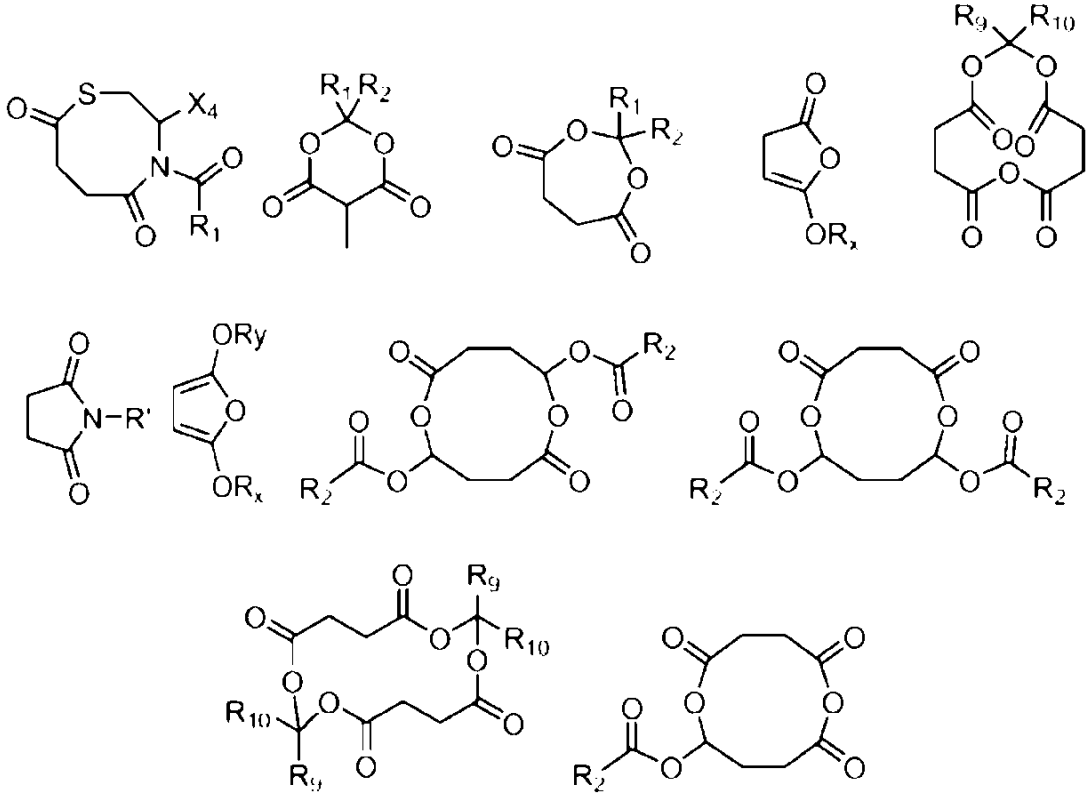
R_{11} ve R_{12} ifadeleri bağımsız olarak H, alkil, Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül, asetil, asil, propiyonil, benzoil, asil, $-CH_2X$ -alkil, $-CH_2X$ -asil olup, burada $X = O, NR_6$ veya S,

R_c ve R_d ifadeleri bağımsız olarak CH_2X -alkil, CH_2X -asil olup, burada $X = O, NR_6$ veya S,

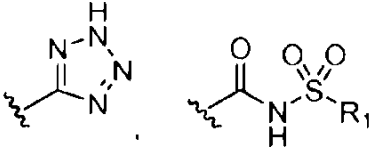
15 R_f, R_g ve R_h ifadeleri bağımsız olarak X-asil, $-CH_2X$ -alkil, $-CH_2X$ -asil ve R_9 arasından seçilir,

20 içerisinde alkil örneğin metil, etil, propil, isopropil, n-bütül, isobütül, sec-bütül, tert-bütül, n-pentil, neopentil, isopentil, hekzil, isohekzil, heptil, oktil, nonil veya desildir ve asil örneğin formil, asetil, propiyonil, bütiril pentanoil, benzoil ve benzeridir ve içerisinde asiller ve alkiler isteğe bağlı olarak ornatılabilir,

A ve B arasındaki noktalı bağ, formül I'in bir halkalı yapısını oluşturmak üzere isteğe bağlı bir bağ belirtmekte olup, bu tür halkalı bir bağ mevcut olduğunda, formül I'e göre bileşiğin aşağıdakilerin arasından seçilmesi koşulu bulunur:

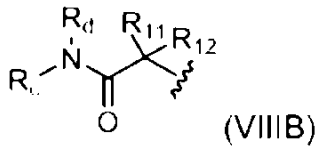
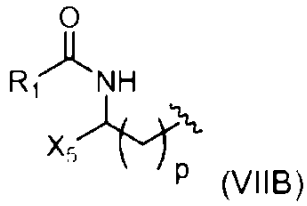
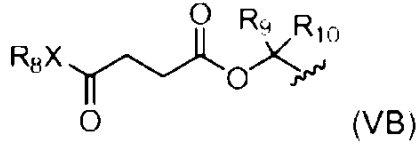
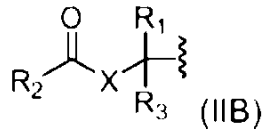


içerisinde X_4 ifadesi $-\text{COOH}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{XR}_6$ arasından seçilir,

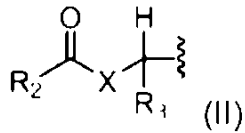


ve içerisinde R_x ve R_y ifadeleri bağımsız olarak R_1 , R_2 , R_6 veya R' , R'' veya R''' arasından seçilmekte olup, R_x ve R_y ifadelerinin her ikisi birden $-\text{H}$ olamaz.

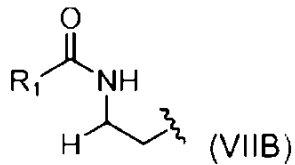
Tercih edilen bir yönde, R' , R'' ve R''' ifadeleri bağımsız olarak farklı veya aynıdır ve aşağıdaki formül IIB, VB, VIIB veya VIIIB arasından seçilir:



Tercihen ve formül IIB'ye göre, R_1 ve R_3 ifadelerinden en az biri -H olup, böylece formül II aşağıdaki gibi olur:

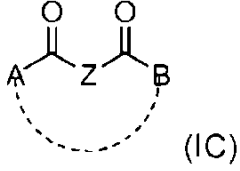


- 5 Tercihen ve formül VII'ye göre, p ifadesi 1 veya 2 olup, tercihen p ifadesi 1'dir ve X_5 ifadesi -H olup, örneğin formül VIIB aşağıdaki gibidir:



Tercihen ve formül IXB'ye göre, R_f , R_g , R_h ifadelerinden en az biri -H veya alkil olup, alkil burada tanımlandığı gibidir. Ayrıca, Formül IXB'ye göre, R_f , R_g , R_h ifadelerinden en az birinin $-CH_2X$ -asil olması ve asilin burada tanımlandığı gibi olması tercih edilir.

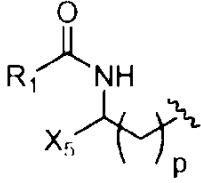
Yukarıda bahsedilen sınıfın ilginç bir alt sınıfı Formül I'in bileşikleriyle:



5

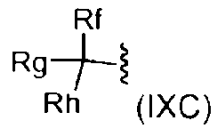
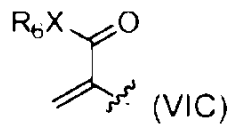
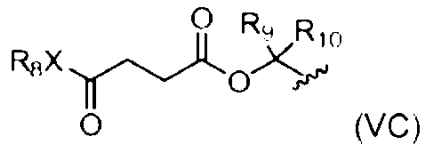
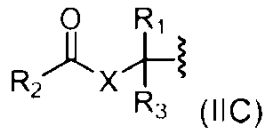
ya da bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzuyla ilgilidir. A ve B arasındaki noktalı bağ, kapalı halka yapısı oluşturmak üzere isteğe bağlı bir bağı belirtir.

Formül IC'de, Z ifadesi $-CH_2-CH_2-$ veya $>CH(CH_3)$ arasından seçilmekte olup, A ifadesi $-SR$, $-OR$ ve NHR arasından seçilir ve içerisinde R ifadesi aşağıdaki gibidir:

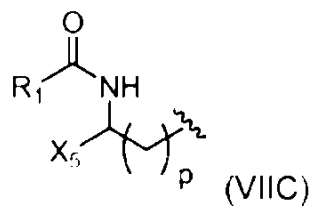
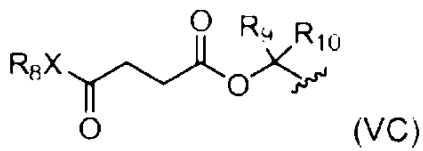
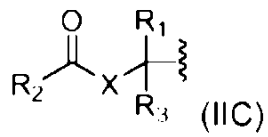


10

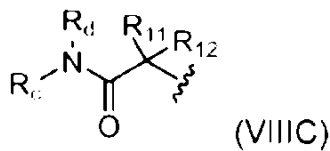
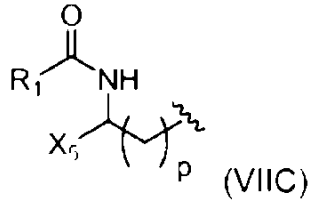
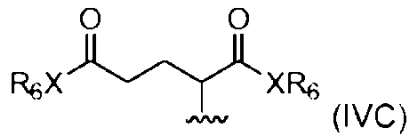
B ifadesi $-O-R'$, $-NHR''$, $-SR'''$ veya $-OH$ arasından seçilmekte olup; R' ifadesi aşağıdaki Formül IIC ile IXC arasından seçilir:



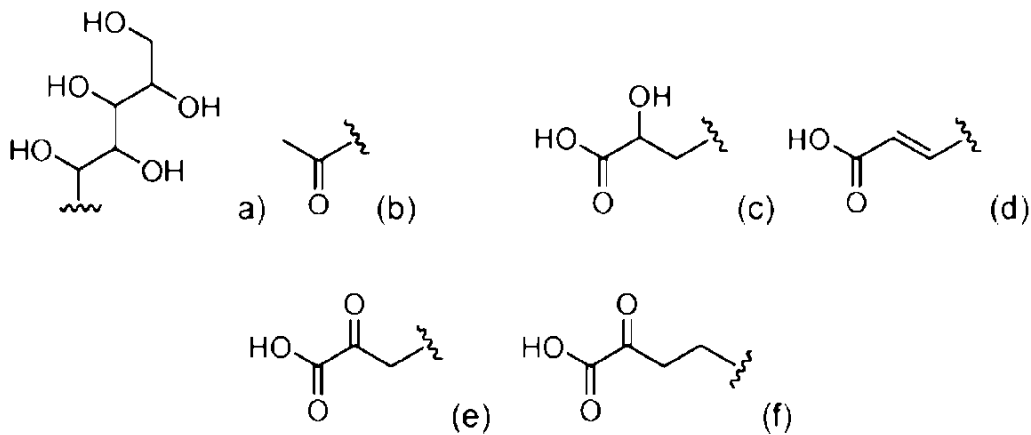
Tercihen, R' ifadesi aşağıdaki formül IIC, VC ile IXC arasından seçilir:



R', R'' ve R''' ifadeleri bağımsız olarak farklı veya aynıdır ve aşağıdaki Formül IVC-VIIC arasında seçilir:



$R_1 = \text{H, Me, Et, propil, i-propil, büt il, iso-büt il, t-büt il, O-asil, O-alkil, N-asil, N-alkil, X-asil, CH}_2\text{X-alkil, CH}_2\text{X-asil, F, CH}_2\text{COOH, CH}_2\text{CO}_2\text{alkil veya formül a-f'den herhangi biridir}$



5

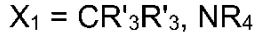
Tercihen, $R_1 = \text{H, Me, Et, propil, i-propil, büt il, iso-büt il, t-büt il, O-asil, O-alkil, N-asil, N-alkil, X-asil, CH}_2\text{X-alkil, CH}_2\text{X-asil, F, CH}_2\text{COOH, CH}_2\text{CO}_2\text{alkil,}$

$X = \text{O, NH, NR}_6, \text{S}$

$R_2 = \text{Me, Et, propil, i-propil, büt il, iso-büt il, t-büt il, C(O)CH}_3, \text{C(O)CH}_2\text{C(O)CH}_3, \text{C(O)CH}_2\text{CH(OH)CH}_3,$

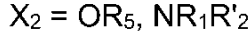
10

$R_3 = R_1$ olup, yani R_1 altında tanımlananla aynı veya farklı bir grup olabilir,



$$n = 1-4,$$

$$p = 1-2$$



$$5 \quad R'_3 = H, Me, Et, F$$

$$R_4 = H, Me, Et, i-Pr$$

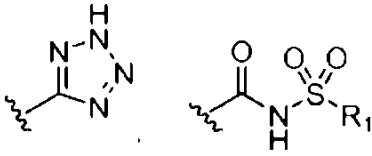
$$R_5 = \text{asetil, propiyonil, benzoil, benzilkarbonil}$$

$$R'_2 = H.HX_3, \text{asil, asetil, propiyonil, benzoil, benzilkarbonil}$$

$$X_3 = F, Cl, Br \text{ ve } I$$

$$10 \quad R_6 = H, \text{alkil, Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül, asetil, asil, propiyonil, benzoil} \\ \text{veya formül IIC, formül IIIC veya formül VIIC}$$

$$X_5 = -H, -COOH, -C(=O)XR_6,$$



X_5 ayrıca $CONR_1R_3$ olabilir

$$15 \quad R_9 = H, Me, Et \text{ veya } O_2CCH_2CH_2COXR_8$$

$$R_{10} = \text{Oasil, NHalkil, NHasil veya } O_2CCH_2CH_2COX_6R_8$$

$$X_6 = O, NR_8$$

$R_8 = H, \text{alkil, Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül, asetil, asil, propiyonil, benzoil}$ veya formül IIC, formül IIIC veya formül VIIC

$$20 \quad R_{11} \text{ ve } R_{12} \text{ ifadeleri bağımsız olarak } H, \text{alkil, Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül,} \\ \text{asetil, asil, propiyonil, benzoil, asil, } -CH_2X\text{-alkil, } -CH_2X\text{-asil olup, burada } X = O, NR_6 \text{ veya } S,$$

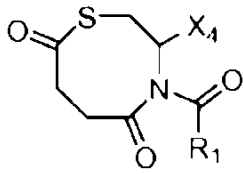
R_c ve R_d ifadeleri bağımsız olarak CH_2X -alkil, CH_2X -asil olup, burada $X = O, NR_6$ veya S ,

R_f , R_g ve R_h ifadeleri bağımsız olarak X-asil, -CH₂X-alkil, -CH₂X-asil ve R_g arasından seçilir

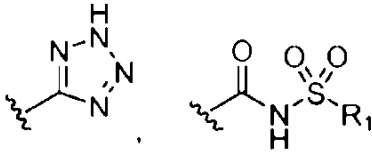
alkil örneğin Me, Et, propil, i-propil, bütül, iso-bütül, t-bütül and asil is e.g. formil, asetil, propiyonil, isopropiyonil, bütiril, tert-bütiril, pentanoil, benzoil ve benzeridir ve içerisinde asiller ve alkiler isteğe bağlı olarak ornatılabilir, ve

5

A ve B arasında noktalı bağ mevcut olduğunda, formül I'e göre bileşik aşağıdaki gibi olup:

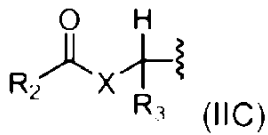


içerisinde X_4 ifadesi -COOH, -C(=O)XR₆ arasından seçilir,



10

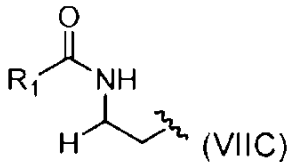
Tercihen ve formül IIC'ye göre, R_1 ve R_3 ifadelerinden en az biri -H olup, böylece formül II aşağıdaki gibi olur:



Tercihen ve formül VIIC'ye göre, p ifadesi 1 veya 2 olup, tercihen p ifadesi 1'dir ve

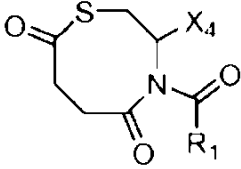
15

X_5 ifadesi -H olup, örneğin formül VIIC aşağıdaki gibidir:



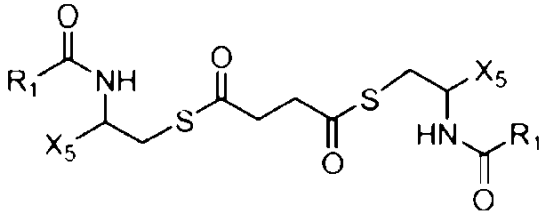
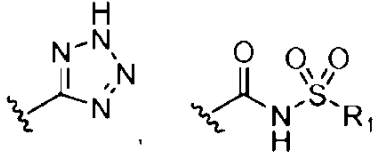
Tercihen ve formül IXC'ye göre, R_f , R_g , R_h ifadelerinden en az biri -H veya alkil olup, alkil burada tanımlandığı gibidir. Ayrıca, Formül IXC'ye göre, R_f , R_g , R_h ifadelerinden en az birinin $-CH_2X$ -asil olması ve asilin burada tanımlandığı gibi olması tercih edilir.

Formül IC'ye göre ilgi çekici bileşikler aşağıdakiler olup:

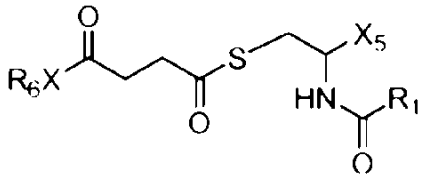


5

içerisinde X_4 ifadesi $-COOH$, $-C(=O)XR_6$ arasından seçilir,

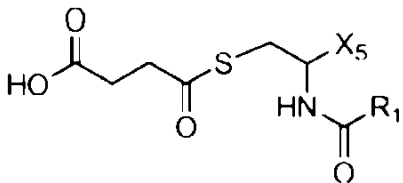


içerisinde R_1 ve X_5 ifadeleri burada tanımlandığı gibidir. Tercihen X_5 ifadesi -H'dir.



10

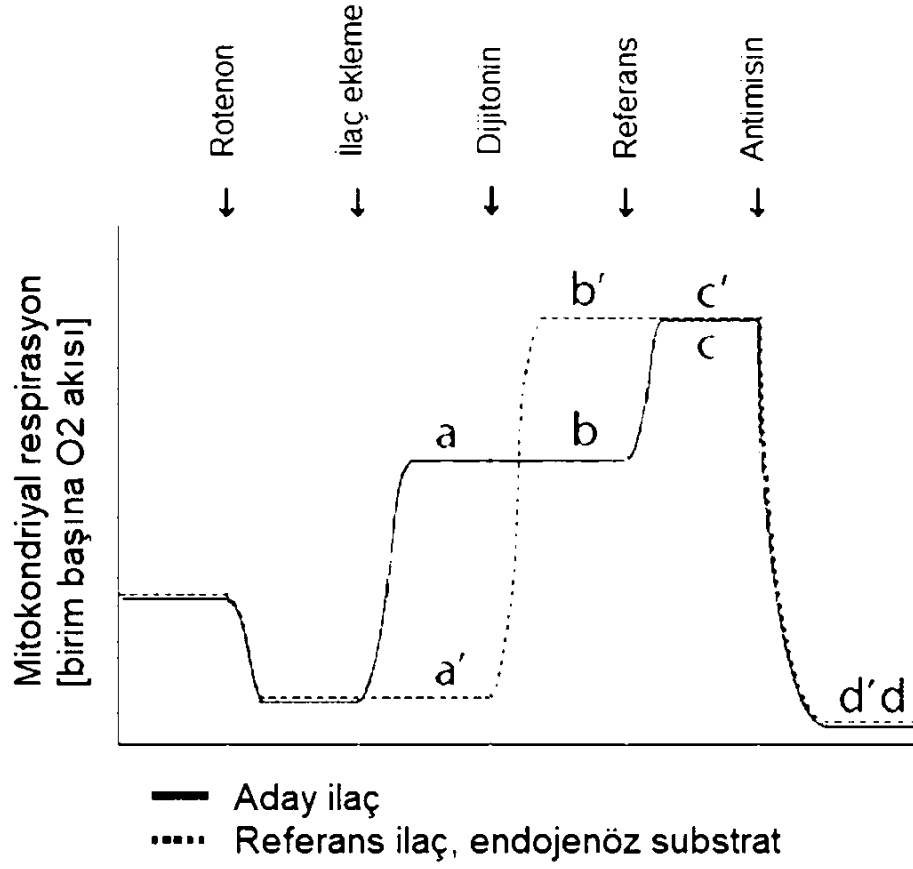
içerisinde R_6 , X_5 ve R_1 ifadeleri burada tanımlandığı gibidir. Tercihen X_5 ifadesi -H'dir.



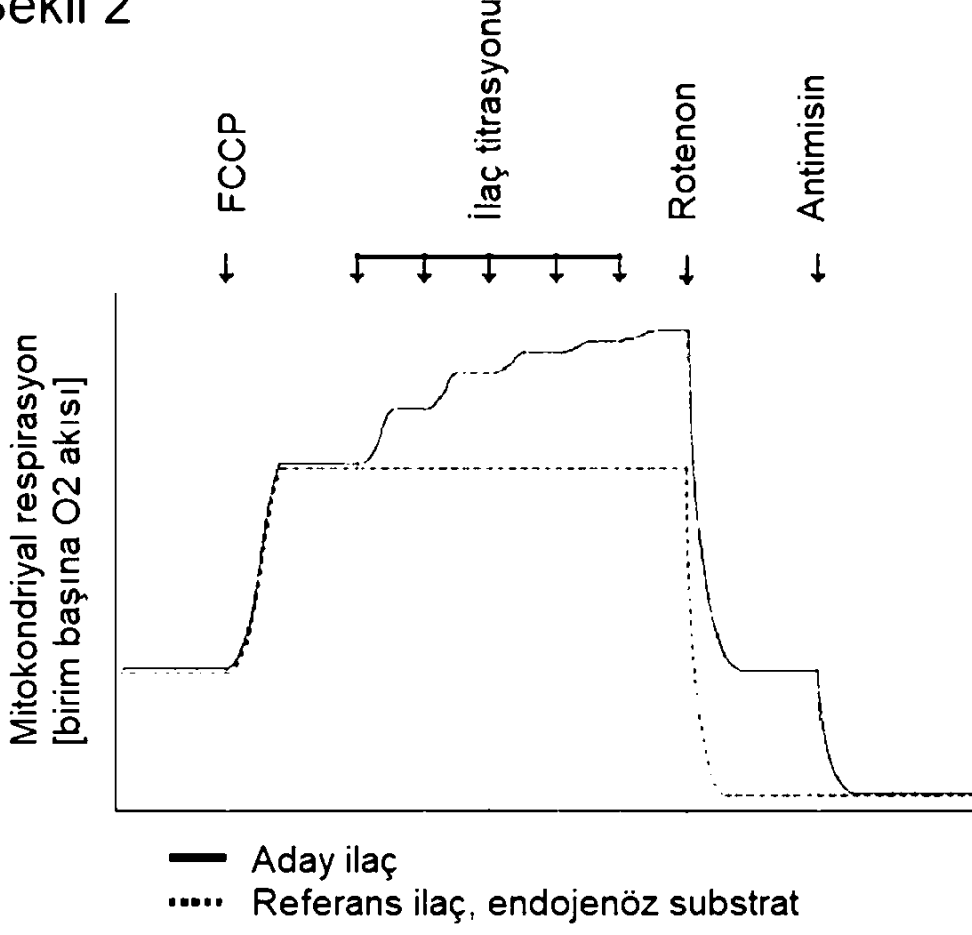
içerisinde X_5 ve R_1 ifadeleri burada tanımlandığı gibidir.

Tercihen X_5 ifadesi -H'dir.

Şekil 1

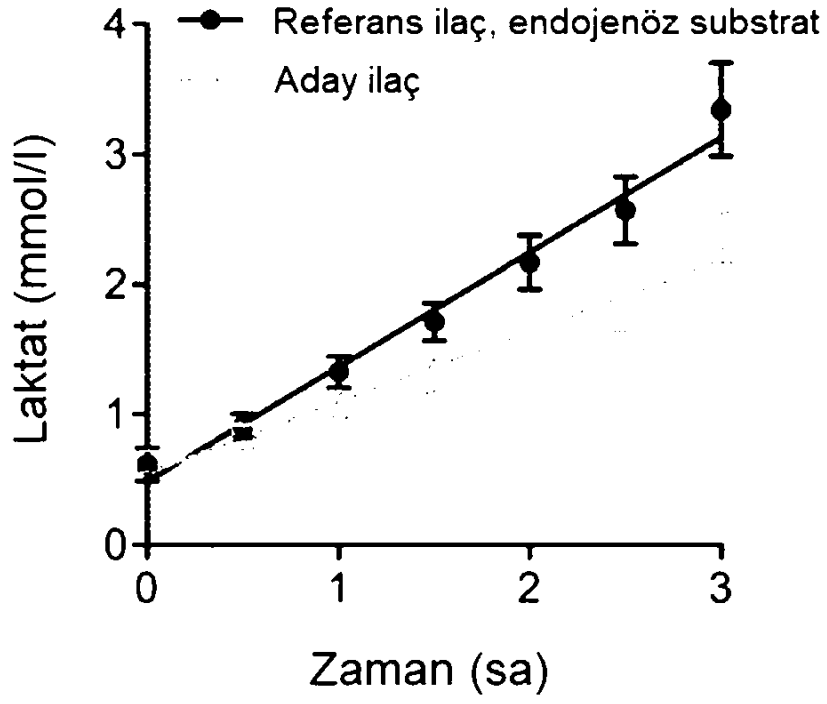


Şekil 2

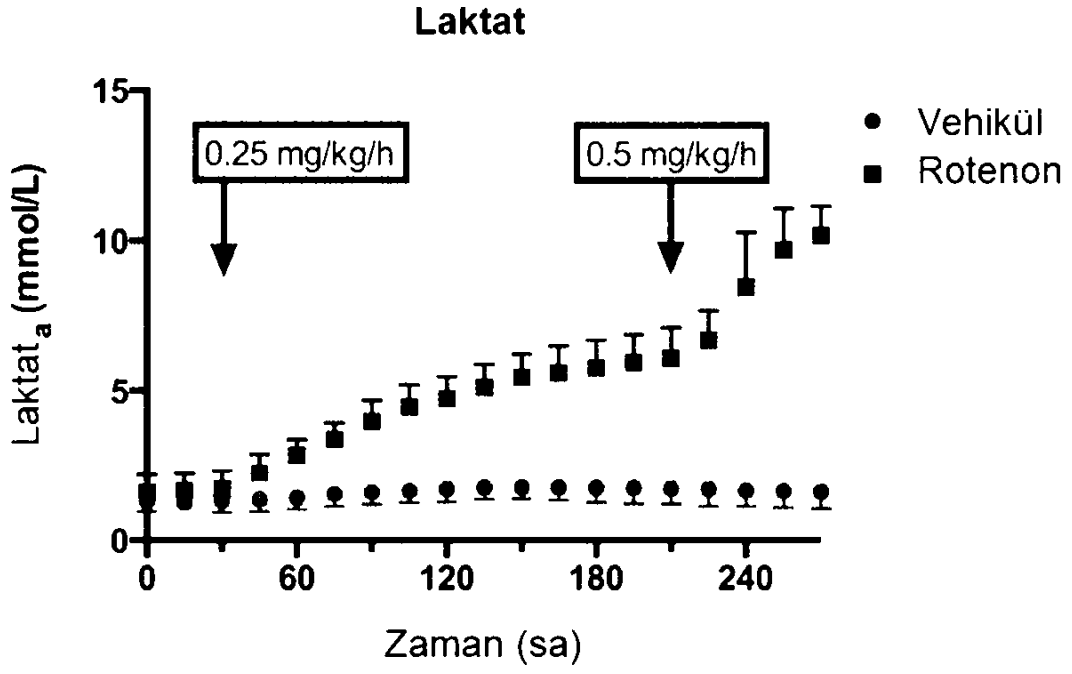


Şekil 3

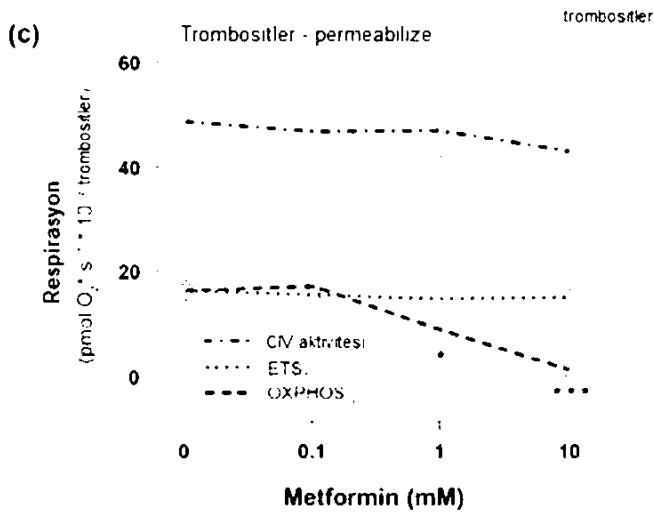
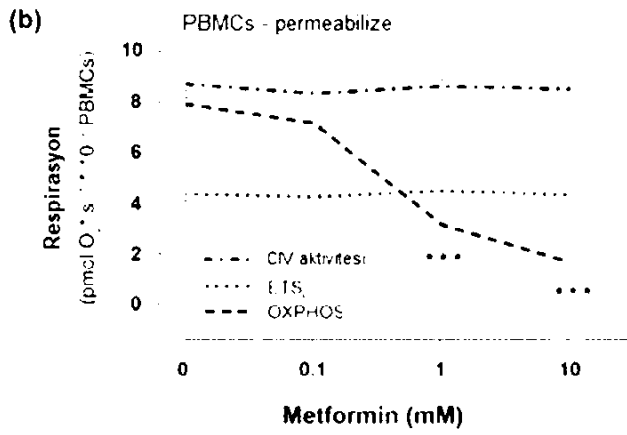
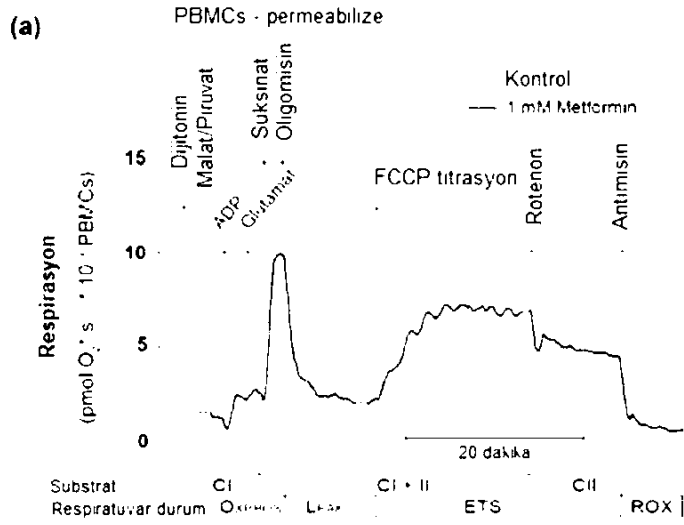
10 mM Metmorfin ile inkübe edilmiş
Trombositler ($200 \cdot 10^6 / \text{ml}$)



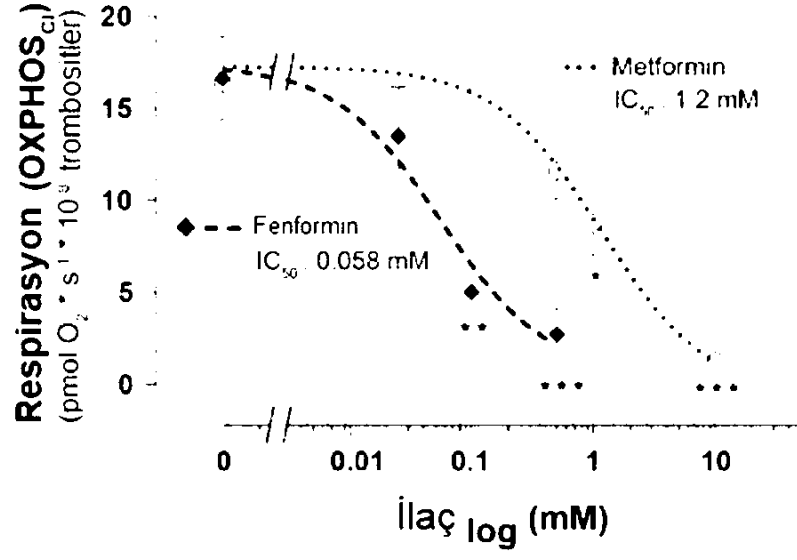
Şekil 4



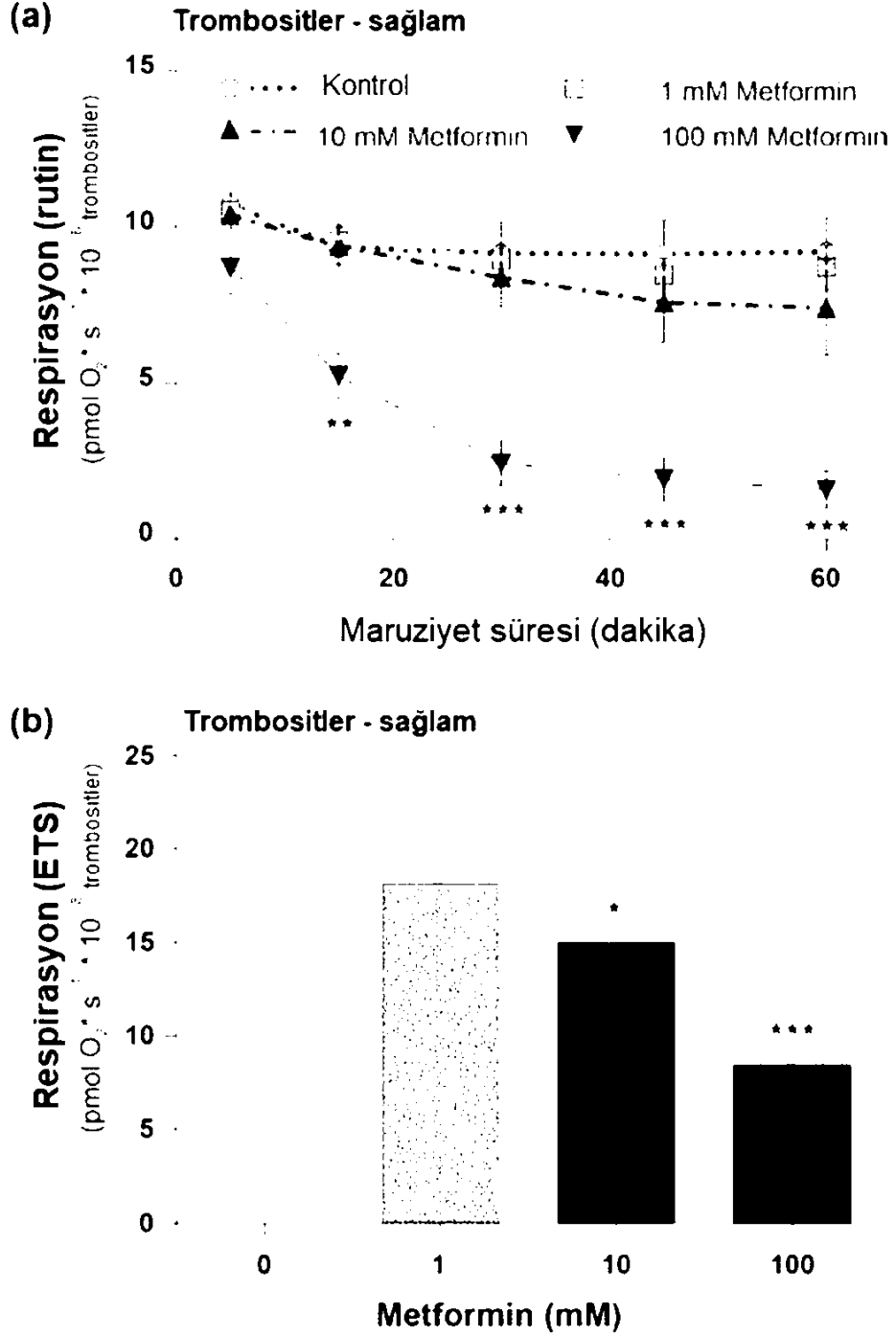
Şekil 5



Şekil 6

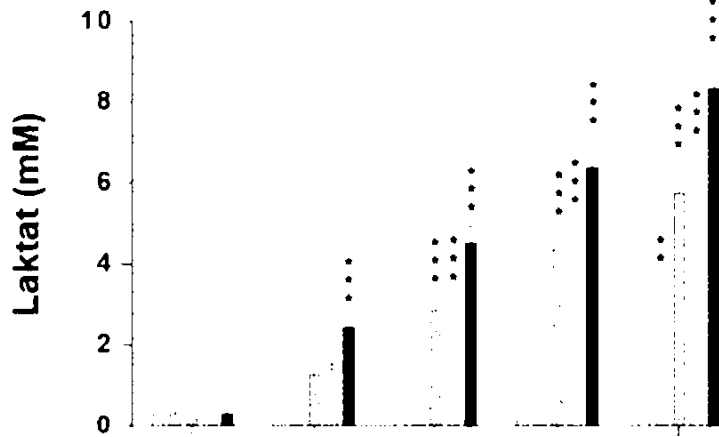
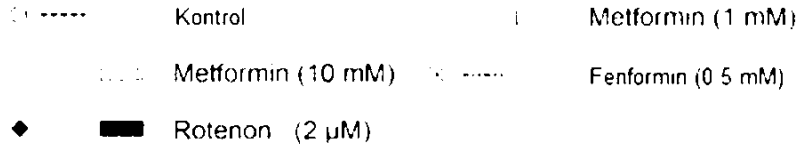


Şekil 7

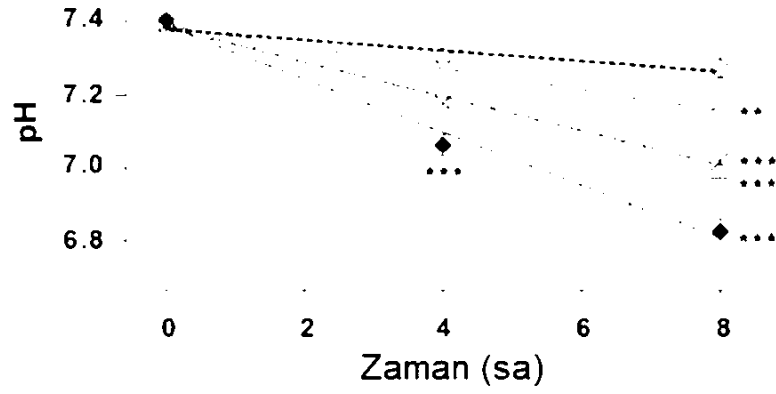


Şekil 8

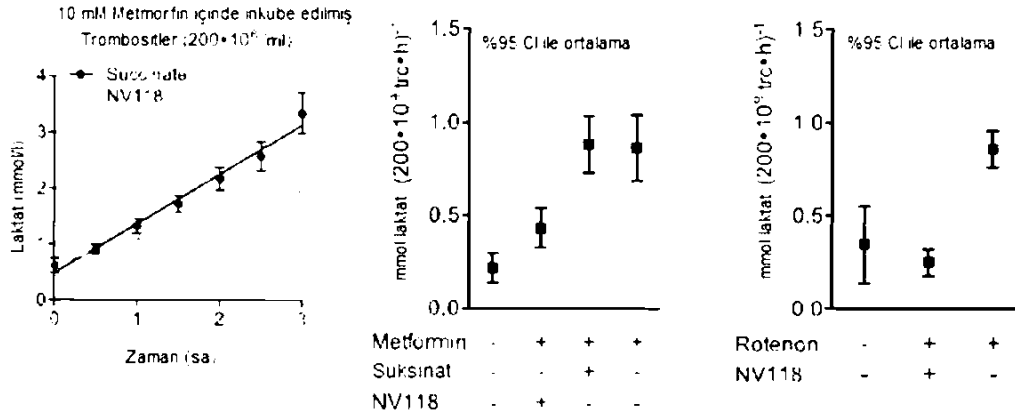
(a) Trombositler - sağlam



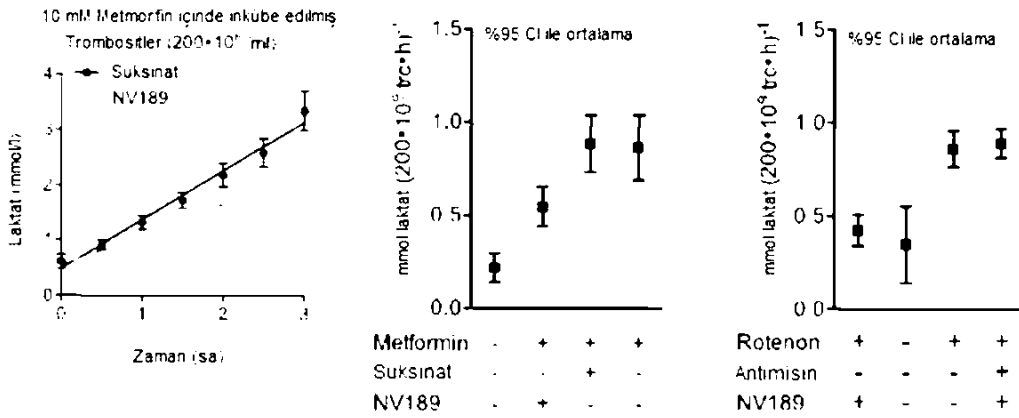
(b)



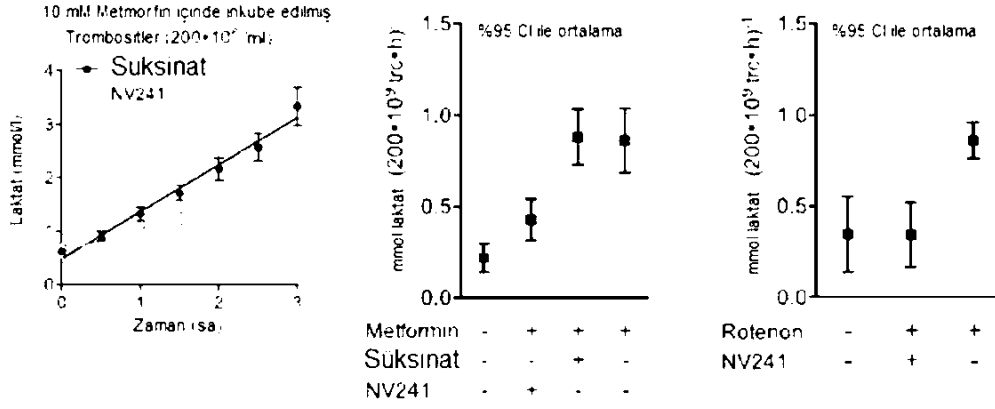
Şekil 9



Şekil 10



Şekil 11



Şekil 12

