

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 715**

51 Int. Cl.:

A61K 31/137 (2006.01)
A61K 31/197 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2017** **PCT/US2017/061854**
87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2018** **WO18093936**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2017** **E 17871457 (2)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2024** **EP 3541185**

54 Título: **Uso de 2-hidroxibencilamina en el tratamiento y la prevención de la hipertensión pulmonar**

30 Prioridad:

15.11.2016 US 201662422486 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
10.10.2024

73 Titular/es:

VANDERBILT UNIVERSITY (100.0%)
305 Kirkland Hall, 2201 West End Avenue
Nashville, TN 37240, US

72 Inventor/es:

FESSEL, JOSHUA, P.;
ROBERTS, L., JACKSON y
WEST, JAMES

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 981 715 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de 2-hidroxibencilamina en el tratamiento y la prevención de la hipertensión pulmonar

5 Apoyo gubernamental

La presente invención se realizó con apoyo gubernamental en virtud de la subvención número K08 HL121174, K23 HL098743, R01 HL095797, P01 HL108800, T32 HL007106-34, T32 HL-007891 (identificar el contrato) adjudicado por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno posee determinados derechos sobre la invención.

10 Antecedentes y sumario de la invención

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) se reconoce cada vez más como una enfermedad sistémica provocada por la alteración en el funcionamiento normal de múltiples vías metabólicas que afectan a todos los principales sustratos de carbono, incluidos los aminoácidos. Los presentes inventores descubrieron que los pacientes con hipertensión pulmonar humana (grupo I de la OMS, HAP) presentan alteraciones sistémicas y pulmonares específicas en el metabolismo de la glutamina, con la vasculatura pulmonar enferma absorbiendo significativamente más glutamina que la de los controles. Utilizando modelos de cultivo celular y ratones transgénicos que expresan mutaciones BMPR2 que causan HAP, los presentes inventores descubrieron que el endotelio pulmonar en HAP desvía significativamente más carbono de glutamina hacia el ciclo del ácido tricarboxílico (ATC) que el endotelio de tipo salvaje. El endotelio de la HAP requiere un mayor metabolismo de la glutamina a través del ciclo del ATC para sobrevivir, para mantener la energía normal y manifestar el fenotipo hiperproliferativo característico de la enfermedad. El requerimiento estricto de glutamina se debe a la pérdida de la actividad de la sirtuina-3 (SIRT3) a través de la modificación covalente por productos reactivos de la peroxidación de lípidos.

Los compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención, incluida la 2-hidroxibencilamina (denominada también salicilamina, SAM o 2HOBA), captadores de productos reactivos de la peroxidación de lípidos, tienen un efecto que conserva la función SIRT3, normaliza el metabolismo de la glutamina y previene el desarrollo de HAP en ratones con BMPR2 mutante. En la HAP, la actuación sobre el metabolismo de la glutamina y los mecanismos que subyacen a la reprogramación metabólica conducida por la glutamina representan una nueva vía viable para el desarrollo de productos terapéuticos para la HAP.

Las alteraciones en las estrategias metabólicas normales utilizadas por diversos tipos de células se reconocen cada vez más como parte de un mecanismo patogénico central en la hipertensión arterial pulmonar.^{1,2} Cualquier tipo de célula determinada: endotelio, músculo liso, miocardio, músculo esquelético, etc., presenta un "programa metabólico" en condiciones saludables, homeostáticas, que es la suma total del uso y destino de todas las fuentes de carbono disponibles (principalmente carbohidratos, grasas y aminoácidos). Los detalles del programa metabólico de una célula suelen ser específicos de ese tipo de célula. Por ejemplo, en condiciones normales, los miocitos cardíacos oxidan principalmente los ácidos grasos como fuente de energía, mientras que las células endoteliales utilizan preferentemente la glucosa a través de vías oxidativas y no oxidativas.^{3,4} Cualquier perturbación que imponga demandas a una célula para aumentar la producción de energía, aumentar la síntesis de macromoléculas o resistir estímulos que provoquen la muerte ejercerá presión sobre los recursos de carbono de la célula y necesariamente cambiará el programa metabólico de la célula. En cambio, cualquier cosa que restrinja la capacidad de una célula para utilizar uno o más sustratos de carbono puede inducir una reprogramación metabólica que a menudo cambiará una o más propiedades fundamentales de la célula, tales como el estado de diferenciación, la tasa proliferativa o la sensibilidad a la apoptosis. Así pues, el programa metabólico de una célula está indisolublemente ligado al papel que desempeña la célula en la salud y la enfermedad.

En la HAP, es bien sabido que múltiples tipos de células involucradas en la patogénesis de la enfermedad presentan una reprogramación metabólica caracterizada por una mayor derivación del carbono derivado de la glucosa hacia vías no oxidativas, productoras de lactato, a pesar de la presencia de un amplio suministro de oxígeno para permitir el metabolismo oxidativo de la glucosa.^{1,2,5-7} A esto se le conoce coloquialmente como el "efecto Warburg", descrito por primera vez por Otto Warburg como una característica de las células cancerosas. Sin embargo, la red de vías metabólicas dentro de una célula está muy interconectada y no es frecuente que una vía se altere de forma aislada. En efecto, cada vez se reconoce más que el metabolismo de los ácidos grasos también está notablemente alterado en la HAP, y que la relación recíproca entre la glucosa y la oxidación de los ácidos grasos (el llamado "ciclo de Randle") es anómala y probablemente contribuye a la patogénesis tanto en el corazón como en la vasculatura pulmonar.⁸⁻¹³ La tercera fuente importante de carbono celular (los aminoácidos en general y la glutamina en particular) sigue estando relativamente poco estudiada en la HAP.¹⁴ Aunque los aminoácidos representan la tercera fuente principal de carbono utilizada por la mayoría de las células, el tráfico de aminoácidos se ha estudiado principalmente en la HAP en el contexto de la síntesis del óxido nítrico. Descubrimientos recientes en la biología del cáncer han determinado que los aminoácidos en general y, específicamente, la glutamina, tienen funciones centrales para la biosíntesis, la energética celular y la homeostasis redox.¹⁵⁻¹⁸ Los presentes inventores examinaron el metabolismo de la glutamina en la HAP en el contexto específico de la transducción de señales disfuncional a través del receptor de proteína morfogénica ósea de tipo 2 (BMPR2), y demostraron que el endotelio pulmonar en la HAP presentaría un aumento anómalo en el metabolismo de la glutamina como fuente primaria de carbono, de manera similar a lo que se

ha observado en el cáncer.

Los datos emergentes sugieren que la mayor parte de la hipertensión pulmonar del grupo I de la OMS se debe a una disfunción de la transducción de señales de BMP, específicamente la transducción de señales disfuncional de BMPR2.

5 Los presentes inventores se han centrado en mutaciones genéticas de pérdida de función en BMPR2 asociadas con HAP hereditaria, pero las consecuencias moleculares de la alteración de la transducción de señales de BMPR2 son similares en todas las variantes conocidas de la enfermedad del grupo I de la OMS.

10 Así pues, la presente invención se dirige a compuestos, incluida la salicilamina, para su uso en la prevención o el tratamiento de casos de enfermedad vascular pulmonar del grupo I de la OMS.

15 En los Estados Unidos, la hipertensión pulmonar del grupo II de la OMS es la forma más común de hipertensión pulmonar en general. Este tipo de HP se ha relacionado con el síndrome metabólico y con el estrés oxidativo. Más recientemente, la pérdida de función de SIRT3 se ha implicado como un mecanismo molecular clave que impulsa el desarrollo de la HP del grupo II de la OMS. Dado el hallazgo de los inventores de que la salicilamina actúa en múltiples contextos al preservar la actividad de las isoformas de sirtuina (y SIRT3 en particular), los presentes inventores suponen que la salicilamina mostraría eficacia en el tratamiento o la prevención de la hipertensión pulmonar del grupo II de la OMS.

20 La enfermedad vascular pulmonar del grupo III de la OMS está relacionada con enfermedades del pulmón que provocan hipoxia crónica o intermitente. Se sabe que este es un estímulo que impulsa la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, la activación de vías que requieren la pérdida de la función SIRT3, la reprogramación metabólica y la remodelación estructural de los vasos, incluida la fibrosis. Se ha descubierto que todos estos procesos patógenos mejoran al menos parcialmente con los compuestos de la presente invención, en especial la salicilamina.

25 Grupo IV de la OMS: La hipertensión pulmonar tromboembólica crónica (HPTEC) es una complicación poco común pero devastadora de la tromboembolia venosa/embolia pulmonar. Por lo general, se trata de una enfermedad que implica un fallo en la resolución de los coágulos en lugar de una sobreproducción continua de nuevos coágulos de sangre. Aunque la biología subyacente todavía está por resolverse, el estrés oxidativo y las alteraciones metabólicas se han implicado en la patogénesis de la HPTEC.

30 Grupo V de la OMS: Esta es una categoría de enfermedad vascular pulmonar sin un mecanismo patogénico unificador obvio. Sin embargo, muchas de las enfermedades asociadas que constituyen el grupo V, tales como la sarcoidosis, la enfermedad renal crónica, la enfermedad tiroidea, los trastornos metabólicos sistémicos y las vasculitis autoinmunitarias, tienen todas al estrés oxidativo como proceso patogénico común.

El documento WO 2015/127163 A1 describe el uso de piridoxamina en el tratamiento de la anemia de células falciformes, la talasemia y otras enfermedades de la sangre.

40 El documento US 2012/0157501 A1 describe el uso de captadores de isocetales y la mitigación de trastornos que implican lesión oxidativa.

Por consiguiente, se divulgan compuestos para su uso en un método para tratar o prevenir la hipertensión pulmonar del grupo I de la OMS según las reivindicaciones 1 a 3.

45 Otras ventajas de la invención se expondrán en parte en la siguiente descripción y, en parte, serán evidentes a partir de la descripción o pueden aprenderse por la práctica de la invención. Las ventajas de la invención se realizarán y alcanzarán mediante los elementos y las combinaciones específicamente en las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse que esta descripción es ilustrativa y no restrictiva de la invención tal como se reivindica. Sin embargo, la invención se define por las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

55 La figura 1 es un gráfico que demuestra que los seres humanos con HAP y alteración de la transducción de señales de BMPR2 presentan una reprogramación vascular sistémica y pulmonar del metabolismo de la glutamina. A) Los seres humanos con mutaciones de BMPR2, independientemente de la presencia o ausencia de HAP diagnosticada, tienen un aumento estadísticamente significativo en la glutamina circulante en comparación con los miembros de la familia con BMPR2 WT. N = 11-24, * $p < 0,02$. B) La captación transpulmonar de glutamina medida en un cateterismo cardíaco derecho aumenta significativamente en pacientes con HAP del grupo I de la OMS en comparación con personas con hemodinámica normal y personas con hipertensión pulmonar del grupo III de la OMS. N = 6-11, * $p < 0,05$.

65 La figura 2 demuestra que las PMVEC con BMPR2 mutante transportan significativamente más glutamina al ciclo del ATC. A) Las tasas de flujo de captación de glutamina extracelular específicas para las PMVEC con BMPR2 mutante son el doble de las medidas para las PMVEC WT. N = 4 experimentos independientes, * $p < 0,005$ mediante la prueba de la t de dos colas. B) Esquema conceptual para el marcaje de [U- $^{13}\text{C}_5$]-L-glutamina para

determinar el flujo de carbono hacia el ciclo del ATC. C) En comparación con WT, las PMVEC con BMPR2 mutante aproximadamente duplican la cantidad de carbono derivado de glutamina que se incorpora en múltiples intermediarios del ciclo del ATC (citrato, malato y glutamato, el precursor inmediato del α -cetoglutarato) mediante el porcentaje de enriquecimiento en átomos de ^{13}C cuantificado por espectrometría de masas. N = 4, $*p < 0,05$ mediante ANOVA de dos vías con prueba *a posteriori* de Tukey. D) El marcaje de $^{13}\text{C}_5$ -L-glutamina y la cuantificación de los intermediarios del ciclo de ATC mediante espectrometría de masas demuestran un marcado desplazamiento en el destino intracelular del carbono derivado de glutamina en PMVEC con BMPR2 mutante en comparación con WT, ilustrado por los isotómeros de malato. En células WT, la mayor parte del carbono del ciclo del ATC no está marcado, representado por el isotómero M0, lo que indica el uso de una fuente de carbono sin marcar (principalmente glucosa). Por el contrario, $>60\%$ del carbono del ATC en las PMVEC con BMPR2 mutante muestra la incorporación de al menos 2 carbonos marcados, estando el 40 % del conjunto total de malato completamente marcado, representado por el isotómero M4. N = 3 para cada uno de WT y BMPR2 mutante.

La figura 3 demuestra que las PMVEC con BMPR2 mutante requieren una mayor disponibilidad de glutamina para manifestar un comportamiento hiperproliferativo típico de la HAP. A) En condiciones limitadas por glutamina (0,2 mM), PMVEC WT son capaces de mantener una proliferación constante, pero las PMVEC BMPR2^{R899X} comienzan a morir rápidamente después de 24 horas en cultivo. B) En condiciones más repletas de glutamina (0,5 mM), PMVEC WT prácticamente no se ven afectadas, mientras que las PMVEC BMPR2^{R899X} presentan el fenotipo hiperproliferativo característico de la HAP. N = 6 para cada punto temporal, $*p < 0,01$, $**p < 0,001$ mediante la prueba de la *t* bilateral.

La figura 4 muestra que las mutaciones de BMPR2 que causan HAP dirigen la disfunción mitocondrial y la reprogramación metabólica hacia la preferencia por la glutamina. A) La cuantificación del conjunto intracelular de NADH y FAD⁺ en células vivas utilizando autofluorescencia de dos fotones para calcular el cociente redox óptico demostró que las PMVEC humanas cultivadas WT conservan la flexibilidad metabólica al mantener el estado redox intracelular a pesar de la limitación de la disponibilidad de glucosa y glutamina como fuentes de carbono. Por el contrario, las PMVEC que expresan BMPR2 mutante presentan una reducción sustancial del cociente redox cuando la glucosa y la glutamina están limitadas. N = 3 en medios convencionales, N = 6 en medios sin glucosa/sin glutamina, $*p < 0,05$ mediante ANOVA de dos vías con prueba *a posteriori* de Tukey. B-D) En comparación con WT, las PMVEC murinas cultivadas que expresan Bmpr2 mutante presentan una respiración mitocondrial ligada a ATP sustentada por glutamina mejorada (panel B, $**p < 0,0001$ por ANOVA frente a todos los demás grupos), una disminución de la respiración de fuga (panel C, $**p < 0,0001$ por ANOVA frente a todos los demás grupos) y un aumento de la eficiencia de acoplamiento (panel D, $**p < 0,0001$ por ANOVA frente a todos los demás grupos). N = 8-10 mediciones para cada condición por experimento, experimentos realizados por duplicado.

La figura 5 demuestra que la activación normóxica de HIF1 α en PMVEC con BMPR2 mutante contribuye a la reprogramación metabólica. A-B) HIF1 α aumenta en condiciones normóxicas en dos tipos diferentes de mutaciones de BMPR2 expresadas en PMVEC (A) y se cuantifica mediante densitometría (B), N = 3 experimentos independientes para cada uno de PMVEC humanas y murinas, datos analizados en conjunto con $*p < 0,05$ mediante la prueba de la *t* de dos colas. C) El tratamiento de PMVEC con BMPR2 mutante con dosis bajas de quetomina, un inhibidor farmacológico de HIF1 α , redujo significativamente el cociente de flujo de glutamina a glucosa y prácticamente no afectó a las PMVEC WT. N = 3 para cada condición, $*p < 0,05$.

La figura 6 demuestra que SIRT3 está inactivada en ratones BMPR2^{R899X}. A) Las mitocondrias aisladas de ratones BMPR2^{R899X} tienen un contenido de SIRT3 equivalente en comparación con WT, pero presentan hiperacetilación de múltiples proteínas mitocondriales (carriles 1-2 y 5-6), lo que indica pérdida de la función SIRT3. El tratamiento de ratones BMPR2^{R899X} con 2-hidroxibencilamina (2HOBA), un captador de isocetales, normaliza el estado de acetilación de proteínas mitocondriales (carriles 3-4 y 7-8). Las imágenes de la transferencia Western son exposiciones en serie separadas de la misma transferencia después de extraerlas y ensayarlas de nuevo con anticuerpos contra las proteínas indicadas. B) Esquema que muestra cómo se cree que la lesión oxidativa de la membrana mitocondrial inactiva la SIRT3 mediante la aducción por isocetales. C) La actividad SIRT3 humana recombinante purificada medida mediante ensayo de luminiscencia (Sirt-Glo, Promega) es inhibida por isocetales de forma dependiente de la dosis. D) Cuantificación densitométrica de 4-9 animales a partir de experimentos realizados por triplicado. $**p < 0,01$ frente a todos los demás grupos mediante ANOVA con prueba *a posteriori* de Tukey.

La figura 7 demuestra que 2HOBA reduce la glutamina circulante y previene el desarrollo de HAP en ratones BMPR2^{R899X}. A) La glutamina sintetasa en la fracción mitocondrial del hígado se encuentra elevada en ratones BMPR2^{R899X} (carriles 5-6) en comparación con WT (carriles 1-2). El tratamiento con 2HOBA redujo la glutamina sintetasa en los ratones BMPR2^{R899X} (carriles 7-8), pero no sustancialmente en WT (carriles 3-4). Las imágenes de la transferencia Western son exposiciones en serie separadas de la misma transferencia después de extraerlas y ensayarlas de nuevo con anticuerpos contra las proteínas indicadas. B) El tratamiento con 2HOBA reduce significativamente la disponibilidad de glutamina plasmática en ratones BMPR2^{R899X} en comparación con ratones WT tratados con 2HOBA. N = 6-29, $*p < 0,05$. C) El tratamiento con 2HOBA redujo la resistencia pulmonar total en ratones BMPR2^{R899X} hasta un nivel estadísticamente indistinguible del WT. N = 5-14, $*p < 0,02$ mediante ANOVA con análisis *a posteriori* de Tukey.

La figura 8 muestra un esquema de la reprogramación metabólica mediada por BMPR2. El endotelio pulmonar normal depende principalmente de la glucosa como combustible bioenergético. Cuando se pierde la transducción de señales normal de BMPR2, la lesión oxidante en las mitocondrias impulsa la inactivación de SIRT3 mediante la aducción por isocetales. Esto se puede interrumpir con 2-hidroxi-bencilamina. Si no se trata, sin embargo, la lesión oxidante continua y la inactivación de SIRT3 conducen a la estabilización del HIF, todo lo cual impulsa un fenotipo endotelial pulmonar ávido de glutamina e hiperproliferativo que subyace al desarrollo de la HAP.

La figura 9 muestra un esquema de medición de la respiración mitocondrial en el analizador de flujo extracelular Seahorse y el cálculo de los parámetros de respiración. La curva azul son datos representativos de la tasa de consumo de oxígeno ("oxygen consumption rate", OCR, pmol/min) a lo largo del tiempo medida en PMVEC cultivadas. Se consiguen partes específicas de la curva que representan la respiración basal (1), la respiración sensible a la oligomicina (2), la respiración máxima (3) y la respiración no mitocondrial (4) con la adición de los compuestos indicados (oligomicina A, FCCP, antimicina A/rotenona). La respiración ligada a ATP, la respiración de fuga y la eficiencia del acoplamiento se calculan utilizando las distintas partes del perfil de respiración como se muestra.

La figura 10 demuestra que la glutamina sintetasa en el músculo esquelético está regulada positivamente en ratones BMPR2^{R899X}. El músculo gastrocnemio se fijó y se tiñó con un anticuerpo contra la glutamina sintetasa (rojo) y se contratiñó con tinción nuclear DAPI (azul). La expresión de la mutación BMPR2^{R899X} regula positivamente la glutamina sintetasa en el músculo esquelético, uno de los principales sitios de síntesis de glutamina *in vivo*, en comparación con el músculo WT. Barra de escala = 25 micrómetros.

La figura 11 demuestra que 2HOBA mejora tanto el gasto cardíaco como la presión sistólica del ventrículo derecho ("right ventricular systolic pressure", RVSP) en ratones BMPR2^{R899X}. La expresión de la mutación BMPR2^{R899X} reduce significativamente el gasto cardíaco (A) y aumenta modestamente la RVSP (B) en comparación con WT. El gasto cardíaco tiende a mejorar y la RVSP tiende a disminuir en BMPR2^{R899X} tratados con 2HOBA en comparación con mutantes tratados con vehículo, aunque ninguno alcanza los valores medidos en ratones WT tratados con 2HOBA.

La figura 12 demuestra que el carbono derivado de glutamina se incorpora desproporcionadamente al conjunto de alanina en PMVEC con BMPR2 mutante. El conjunto de lactato intracelular muestra una pequeña cantidad de incorporación de ¹³C, cuantificado por espectrometría de masas, procedente de glutamina marcada, y no difiere entre PMVEC WT y con BMPR2 mutante. Por el contrario, se produce un enriquecimiento sustancial en ¹³C procedente de glutamina marcada en el conjunto de alanina en PMVEC con BMPR2 mutante en comparación con WT, lo que indica que el aumento de carbono derivado de glutamina en las células con BMPR2 mutante no contribuye a las vías metabólicas anteriores al piruvato y el ciclo del ATC, pero probablemente sí contribuye al ciclo del piruvato. N = 3, *p < 0,05.

Descripción de la invención

Las publicaciones analizadas en el presente documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo expuesto en el presente documento se ha de interpretar como un reconocimiento de que la presente invención no tiene derecho a preceder a tal publicación en virtud de la invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas en el presente documento pueden ser distintas de las fechas de publicación reales, que deben confirmarse de forma independiente.

Tal como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así pues, por ejemplo, la referencia a "un grupo funcional", "un alquilo" o "un residuo" incluye mezclas de dos o más de dichos grupos funcionales, alquilos o residuos, y similares.

Los intervalos se pueden expresar en el presente documento como desde "aproximadamente" un valor concreto y/o hasta "aproximadamente" otro valor concreto. Cuando se expresa un intervalo de este tipo, otro aspecto incluye desde un valor concreto y/o hasta el otro valor concreto. De forma similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor concreto forma otro aspecto. Se entenderá además que los valores extremos de cada uno de los intervalos son significativos con respecto al otro valor extremo y son independientes del otro valor extremo. Se entiende también que en el presente documento se divulga un número de valores y que cada valor se divulga también en el presente documento como "aproximadamente" ese valor concreto, además del valor mismo. Por ejemplo, si se divulga el valor "10", entonces se divulga también "aproximadamente 10". Se entiende también que cada unidad entre dos unidades concretas se divulga también. Por ejemplo, si se divulgan 10 y 15, entonces 11, 12, 13 y 14 se divulgan también.

Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "opcional" u "opcionalmente" significan que el acontecimiento o la circunstancia descritos posteriormente se pueden producir o no, y que la descripción incluye casos en los que dicho acontecimiento o circunstancia se produce y casos en los que no.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a una diana de administración. El sujeto de los métodos divulgados en el presente documento puede ser un vertebrado, tal como un mamífero, un pez, un ave, un reptil o un anfibio. Así pues, el sujeto de los métodos divulgados en el presente documento puede ser un ser humano, un primate no humano, un caballo, un cerdo, un conejo, un perro, una oveja, una cabra, una vaca, un gato, una cobaya o un roedor. El término no indica una edad o género en particular. Así pues, se pretende que tanto sujetos adultos como recién nacidos, así como fetos, sean masculinos o femeninos, estén incluidos. Un paciente se refiere a un sujeto que padece una enfermedad o trastorno. El término "paciente" incluye sujetos humanos y veterinarios.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tratamiento" se refiere al tratamiento médico de un paciente con la intención de curar, mejorar, estabilizar o prevenir una enfermedad, una afección patológica o un trastorno. Este término incluye el tratamiento activo, es decir, el tratamiento dirigido específicamente a la mejora de una enfermedad, afección patológica o trastorno, y también incluye el tratamiento causal, es decir, el tratamiento dirigido hacia la eliminación de la causa de la enfermedad, afección patológica o trastorno asociados. Además, este término incluye el tratamiento paliativo, es decir, el tratamiento diseñado para el alivio de los síntomas más que para la cura de la enfermedad, la afección patológica o el trastorno; el tratamiento preventivo, es decir, el tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcial o completamente el desarrollo de la enfermedad, la afección patológica o el trastorno; y el tratamiento de apoyo, es decir, el tratamiento que se emplea para complementar otra terapia específica que está dirigida a la mejora de la enfermedad, la afección patológica o el trastorno.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "prevenir" se refiere a impedir, evitar, obviar, frustrar, detener u obstaculizar que algo suceda, especialmente mediante una acción anticipada. Se entiende que cuando se usan reducir, inhibir o prevenir en el presente documento, a menos que se indique específicamente lo contrario, también se divulga expresamente el uso de los otros dos términos. Tal como se puede observar en el presente documento, existe un solapamiento en la definición de tratar y prevenir.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "diagnosticado" significa haber sido sometido a un examen físico por un experto, por ejemplo, un médico, que pone de manifiesto que tiene una afección que puede ser diagnosticada o tratada por los compuestos, composiciones o métodos divulgados en el presente documento. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "identificado como que necesita tratamiento para un trastorno", o similares, se refiere a la selección de un sujeto en función de la necesidad de tratamiento del trastorno. Por ejemplo, se puede identificar un sujeto que tiene una necesidad de tratamiento de un trastorno (por ejemplo, un trastorno relacionado con la inflamación) basándose en un diagnóstico anterior realizado por un experto y, posteriormente, se puede someter a tratamiento para el trastorno. Se contempla que la identificación puede ser efectuada, en un aspecto, por una persona diferente a la persona que realiza el diagnóstico. También se contempla, en otro aspecto, que la administración pueda ser efectuada por alguien que posteriormente realice la administración.

Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "administrar" y "administración" se refieren a cualquier método de suministro de un preparado farmacéutico a un sujeto. Tales métodos son bien conocidos para los expertos en la materia e incluyen, entre otros, la administración oral, la administración transdérmica, la administración por inhalación, la administración nasal, la administración tópica, la administración intravaginal, la administración oftálmica, la administración intraauricular, la administración intracerebral, la administración rectal y la administración parenteral, incluida la administración inyectable, tal como la administración intravenosa, la administración intraarterial, la administración intramuscular y la administración subcutánea. La administración puede ser continua o intermitente. En diversos aspectos, un preparado puede administrarse terapéuticamente; es decir, se administra para tratar una enfermedad o afección existente. En diversos otros aspectos, un preparado puede administrarse profilácticamente; es decir, se administra para la prevención de una enfermedad o afección.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que es suficiente para lograr el resultado deseado o para tener un efecto sobre una afección indeseada. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es suficiente para lograr el resultado terapéutico deseado o para tener un efecto sobre síntomas no deseados, pero generalmente es insuficiente para causar efectos secundarios adversos. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente concreto dependerá de diversos factores, que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del paciente; el momento de la administración; la vía de administración; la tasa de excreción del compuesto concreto empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o simultáneos con el compuesto específico empleado y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está dentro de las habilidades del experto comenzar con dosis de un compuesto a niveles inferiores a los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado. Si se desea, la dosis diaria eficaz se puede dividir en múltiples dosis para fines de administración. Por consiguiente, las composiciones de dosis única pueden contener tales cantidades o submúltiplos de estas para componer la dosis diaria. Cada médico puede ajustar la dosis en el caso de cualquier contraindicación. La posología puede variar, y se puede administrar en una o más administraciones de la dosis a diario, durante uno o varios días. Se pueden encontrar en la bibliografía directrices para las dosis adecuadas de clases determinadas de productos farmacéuticos. En diversos otros aspectos, un preparado se puede administrar en una "cantidad profilácticamente eficaz"; es decir, una cantidad eficaz para la prevención de

una enfermedad o afección.

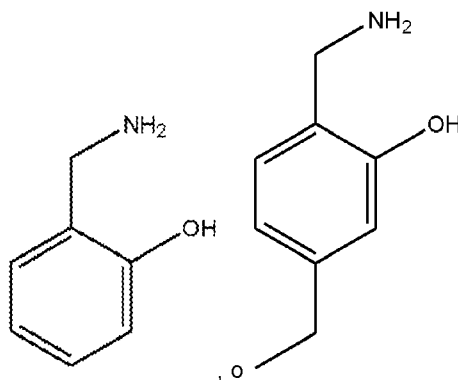
Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles, así como polvos estériles para su reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso. Algunos ejemplos de vehículos, diluyentes, disolventes o portadores acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), carboximetilcelulosa y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede asegurarse por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, tales como parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse con la inclusión de agentes, tales como monoestearato de aluminio y gelatina, que retardan la absorción. Las formas de depósito inyectables se preparan mediante la formación de matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables, tales como polilactida-poliglicólido, poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). En función de la proporción entre el fármaco y el polímero y de la naturaleza del polímero concreto empleado, puede controlarse la velocidad de liberación del fármaco. Las formulaciones inyectables de liberación prolongada también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que sean compatibles con los tejidos corporales. Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril justo antes de su uso. Algunos vehículos inertes adecuados pueden incluir azúcares, tales como lactosa. De manera deseable, al menos el 95 % en peso de las partículas del principio activo tiene un tamaño de partícula eficaz en el intervalo de 0,01 a 10 micrómetros.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "captador" se refiere a una sustancia química que se puede administrar con el fin de eliminar o inactivar impurezas o productos de reacción no deseados. Por ejemplo, los isocetales forman aductos de manera irreversible específicamente con residuos de lisina en las proteínas. Los captadores de isocetales de la presente invención reaccionan con isocetales antes de que estos formen un aducto con los residuos de lisina. Por consiguiente, los compuestos de la presente invención "captan" isocetales, evitando así que formen un aducto con las proteínas.

Los compuestos para su uso según la presente invención se unen rápidamente a γ -KA para "captar" estos mediadores dañinos para prevenir la modificación oxidativa de proteínas, como un enfoque alternativo a la terapia previa. Uno de los compuestos de la presente invención, la salicilamina, es un producto natural con un excelente perfil de seguridad en estudios preclínicos con animales. Además, la salicilamina previene la formación de γ -KA y oligómeros de proteínas tóxicos con un beneficio terapéutico notable en modelos animales de enfermedad de Alzheimer e hipertensión. Los presentes inventores han identificado oligómeros de proteínas y estrés oxidativo/formación de γ -KA en células y en modelos *in vivo* asociados con la susceptibilidad a la HAP. Es importante destacar que los presentes inventores han demostrado el efecto beneficioso de captar los γ -KA para modular el metabolismo de la glutamina y aumentar la actividad de SIRT3. Por consiguiente, los compuestos de la presente invención, incluida la salicilamina, representan una terapia completamente novedosa para prevenir y tratar la hipertensión pulmonar.

En una realización preferida, el compuesto a utilizar es salicilamina (2-hidroxibencilamina o 2-HOBA).

El compuesto puede elegirse entre:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas a partir de bases o ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Cuando el compuesto de la presente invención es ácido, su sal correspondiente se puede preparar de modo conveniente a partir de bases no tóxicas farmacéuticamente aceptables, incluidas bases inorgánicas y bases orgánicas. Las sales derivadas de dichas bases inorgánicas incluyen sales de aluminio, amonio, calcio, cobre (cúpricas y cuprosas), férricas, ferrosas, de litio, magnesio, manganeso (manganésicas y manganosas), potasio, sodio, cinc y sales similares. Se prefieren especialmente las sales de amonio, calcio, magnesio, potasio y sodio. Las sales derivadas de bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, así como aminas cíclicas y aminas sustituidas, tales como aminas sustituidas de origen natural y sintetizadas. Otras bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables a partir de las cuales se pueden formar sales incluyen resinas de intercambio iónico, tales como, por ejemplo, arginina, betaína, cafeína, colina, N,N'-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina y similares.

Otras realizaciones de la presente invención incluyen composiciones farmacéuticas que pueden usarse en relación con los métodos descritos en el presente documento. Estas composiciones incluyen al menos un compuesto para su uso según la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esto es, se puede proporcionar una composición farmacéutica que comprenda una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto divulgado o al menos un producto de un método divulgado y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En determinados aspectos, las composiciones farmacéuticas divulgadas comprenden los compuestos divulgados (incluidas una o más sales farmacéuticamente aceptables de los mismos) como principio activo, un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos o adyuvantes. Las presentes composiciones incluyen aquellas adecuadas para la administración oral, rectal, tópica y parenteral (incluida la administración subcutánea, intramuscular e intravenosa), aunque la vía más adecuada en cualquier caso determinado dependerá del hospedador concreto y de la naturaleza y gravedad de las afecciones para las que se administra el principio activo. Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar de manera conveniente en una forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia.

En la práctica, los compuestos para su uso de acuerdo con la invención, o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, de la presente invención se pueden combinar como principio activo mezclado a fondo con un vehículo farmacéutico de acuerdo con técnicas convencionales de composición farmacéutica. El vehículo puede tomar una amplia variedad de formas en función de la forma de preparación deseada para su administración, por ejemplo, oral o parenteral (incluida intravenosa). Así pues, las composiciones farmacéuticas se pueden presentar en forma de unidades discretas adecuadas para la administración oral, tales como cápsulas, obleas o comprimidos, que contienen cada una una cantidad predeterminada del principio activo. Además, las composiciones se pueden presentar en forma de un polvo, en forma de un granulado, en forma de una solución, en forma de una suspensión en un líquido acuoso, en forma de un líquido no acuoso, en forma de una emulsión de aceite en agua o en forma de una emulsión líquida de agua en aceite. Además de las formas farmacéuticas habituales expuestas anteriormente, los compuestos de la invención y/o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, también se pueden administrar por medios de liberación controlada y/o dispositivos de administración. Las composiciones se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos de la farmacia. En general, dichos métodos incluyen una etapa de asociar el principio activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes necesarios. En general, las composiciones se preparan mezclando de manera uniforme e íntima el principio activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos. A continuación, se le puede dar forma de manera conveniente al producto para obtener la presentación deseada.

Así pues, las composiciones farmacéuticas pueden incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de los compuestos de la invención. Los compuestos para su uso de acuerdo con la invención, o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, también se puede incluir en composiciones farmacéuticas junto con uno o más compuestos terapéuticamente activos diferentes. El vehículo farmacéutico empleado puede ser, por ejemplo, un sólido, un líquido o un gas. Algunos ejemplos de vehículos sólidos incluyen lactosa, sulfato de calcio dihidratado, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábiga, estearato de magnesio y ácido esteárico. Algunos ejemplos de vehículos líquidos son el jarabe de azúcar, el aceite de cacahuete, el aceite de oliva y el agua. Algunos ejemplos de vehículos gaseosos incluyen dióxido de carbono y nitrógeno.

En la preparación de las composiciones para formas farmacéuticas orales, se puede emplear cualquier medio farmacéutico conveniente. Por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares para formar preparados líquidos orales, tales como suspensiones, elixires y soluciones; mientras que pueden usarse vehículos, tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares para formar preparados orales sólidos, tales como polvos, cápsulas y comprimidos. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas son las formas farmacéuticas unitarias orales preferidas en las que se emplean vehículos farmacéuticos sólidos. Opcionalmente, los comprimidos se pueden recubrir mediante técnicas acuosas o no acuosas convencionales.

Se puede preparar un comprimido que contenga la composición de la presente invención mediante compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes auxiliares o adyuvantes. Los comprimidos que se han comprimido se pueden preparar mediante compresión, en una máquina adecuada, del principio activo en una forma fluida, tal como polvos o gránulos, opcionalmente mezclados con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden preparar mediante moldeo, en una máquina adecuada, de una mezcla del compuesto en polvo hidratado con un diluyente líquido inerte.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender un compuesto de la invención (o sales farmacéuticamente aceptables del mismo) como principio activo, un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente uno o más agentes terapéuticos o adyuvantes adicionales. Las presentes composiciones incluyen composiciones adecuadas para la administración oral, rectal, tópica y parenteral (incluida la administración subcutánea, intramuscular e intravenosa), aunque la vía más adecuada en cualquier caso determinado dependerá del hospedador concreto y de la naturaleza y gravedad de las afecciones para las que se administra el principio activo. Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar de manera conveniente en una forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden prepararse en forma de soluciones o suspensiones de los compuestos activos en agua. Se puede incluir un tensioactivo adecuado tal como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de estos en aceites. Además, se puede incluir un conservante para evitar el crecimiento perjudicial de microorganismos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles. Además, las composiciones pueden estar en forma de polvos estériles para la preparación improvisada de dichas soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma inyectable final debe ser estéril y debe ser eficazmente fluida para facilitar la inyectabilidad. Las composiciones farmacéuticas deben ser estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento; por tanto, se deben proteger preferentemente frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), aceites vegetales y mezclas adecuadas de los mismos.

Las composiciones farmacéuticas divulgadas pueden estar en una forma adecuada para un uso tópico tal como, por ejemplo, un aerosol, crema, pomada, loción, polvos corporales, enjuagues bucales, gargarismos y similares. Además, las composiciones pueden estar en una forma adecuada para su uso en dispositivos transdérmicos. Estas formulaciones se pueden preparar utilizando un compuesto de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, mediante métodos de procesamiento convencionales. Como ejemplo, se prepara una crema o pomada mezclando un material hidrófilo y agua, junto con aproximadamente del 5 % en peso a aproximadamente el 10 % en peso del compuesto, para producir una crema o pomada que tenga una consistencia deseada.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en una forma adecuada para la administración rectal en donde el vehículo es un sólido. Es preferible que la mezcla forme supositorios de dosis unitaria. Algunos vehículos adecuados incluyen manteca de cacao y otros materiales usados habitualmente en la técnica. Los supositorios se pueden formar de manera conveniente mezclando en primer lugar la composición con el vehículo o vehículos ablandados o fundidos, seguido del enfriamiento y la conformación en moldes.

Además de los ingredientes de vehículo mencionados anteriormente, las formulaciones farmacéuticas descritas anteriormente pueden incluir, según corresponda, uno o más ingredientes de vehículo adicionales, tales como diluyentes, tampones, agentes aromatizantes, aglutinantes, agentes tensioactivos, espesantes, lubricantes, conservantes (incluidos antioxidantes) y similares. Además, se pueden incluir otros adyuvantes para hacer que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado. Las composiciones que contienen un compuesto de la invención y/o sales farmacéuticamente aceptables del mismo también se pueden preparar en forma de polvo o concentrado líquido.

Ejemplos

Este ejemplo detalla la investigación en relación con una realización de la presente invención.

Materiales y métodos

Reactivos: La $^{13}\text{C}_5$ -L-glutamina se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La quetomina se adquirió de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). La 2-hidroxibencilamina (2HOBA) se sintetizó en Vanderbilt como ha sido descrito anteriormente.¹⁹ Los anticuerpos se adquirieron de la siguiente manera: HIF1 α y glutamina sintetasa, Novus Biologicals (Littleton, CO); Sirt3, Cell Signaling Technology (Danvers, MA); acetil-lisina, EMD Millipore (Billerica, MA); Cox4, Abcam (Cambridge, MA). El SIRT3 humano recombinante se adquirió de R&D Systems (Minneapolis, MN). El kit de ensayo Sirt-Glo se adquirió en Promega (Madison, WI) y se utilizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Cultivo celular: Los presentes inventores utilizaron células endoteliales microvasculares WT y con BMPR2 mutante previamente caracterizadas (BMPR2^{R899X}) aisladas de líneas murinas condicionalmente immortalizadas generadas con el trasfondo de ImmortoMouse,²⁰ y PMVEC WT y con BMPR2 mutante procedentes de una línea humana immortalizada original que expresa de manera estable una construcción WT o con BMPR2 mutante transfectada a la línea original y mantenida con selección con G418S. Para líneas murinas, las células se revirtieron a un fenotipo endotelial primario mediante la eliminación del interferón gamma murino y la transición a 37C (desde 33C, que mantiene el fenotipo inmortal condicional mediante la expresión de SV40 T grande), y se añadió doxiciclina (300 ng/ml) al medio para inducir la expresión del transgén (siendo la construcción Rosa26-rtTA x TetO₇-Bmpr2^{R899X}, el mismo que el utilizado en estudios con animales), ambos durante al menos 72 horas antes de los experimentos. Las líneas humanas expresan de manera estable WT o BMPR2 mutante, y la selección con G418S se interrumpió durante 24 horas antes de los experimentos.

Flujos metabólicos y marcaje con isótopos estables: Los niveles de glucosa y lactato se midieron utilizando el analizador de glucosa y lactato YSI 2300 Stat (Yellow Springs, OH). Se utilizó cromatografía líquida de alta resolución ("high performance liquid chromatography", HPLC) para cuantificar las concentraciones de aminoácidos, con norvalina como patrón interno. Luego se inyectaron muestras de aminoácidos en una columna Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent) usando un método de cromatografía de dos fases como ha sido descrito anteriormente.²¹ Para estudios de trazadores de isótopos, las PMVEC WT y con BMPR2 mutante se cultivaron en medios que contenían [U-¹³C₅]-glutamina 2 mM en lugar de glutamina sin marcar durante 24 horas. Los analitos se extrajeron en metanol enfriado con hielo y se separaron en cloroformo:H₂O 1:1. La fase acuosa que contenía los aminoácidos y los ácidos orgánicos se secó luego al aire a temperatura ambiente. Las muestras se derivatizaron utilizando MBTSTFA + TBDMCS al 1 % (Pierce). Luego se inyectaron 2 µl de cada muestra derivatizada en una columna capilar 30m DB-35ms en un GC-MS Agilent 6890N/5975B. Las tasas de flujo se calcularon utilizando el paquete de software ETA.²²

Ensayos de proliferación celular: Las células se sembraron y cultivaron en condiciones de medio específicas como se describe en Resultados. Se contaron las células totales y vivas mediante exclusión con azul tripano y se realizaron recuentos automatizados utilizando un contador de células Countess (Life Technologies, Grand Island, NY).

Medición de autofluorescencia de dos fotones del cociente redox óptico: Se adquirieron y analizaron imágenes de dos fotones como ha sido descrito anteriormente.²³ Brevemente, las células se sembraron con una densidad constante en placas con fondo de vidrio y se tomaron imágenes 48 horas después. Se utilizaron un microscopio de dos fotones (Bruker) y un objetivo de inmersión en aceite de 40x (1,3 NA) para adquirir imágenes de autofluorescencia de NADH y FAD para los mismos campos de visión. Las imágenes se importaron a MATLAB (Mathworks) y la intensidad de NADH se dividió por la intensidad de FAD para cada píxel para calcular una imagen de cociente redox. El cociente redox se promedió en cada imagen.

Estudios funcionales mitocondriales: Para evaluar la respiración mitocondrial en PMVEC cultivadas, las células se sembraron en medio de crecimiento en una placa de 96 pocillos de Seahorse Biosciences (Billerica, MA) a una densidad de siembra de 50 000 células vivas por pocillo. Al día siguiente, las células se lavaron y se introdujeron en medios de ensayo Seahorse suplementados con sustratos específicos (glucosa 1 g/l, L-glutamina 2 mM). Después del equilibrado, las tasas de consumo de oxígeno se midieron en un analizador Seahorse XFe96 utilizando el protocolo de prueba de estrés Mito. Para las mediciones de proteínas mitocondriales, las mitocondrias se aislaron de tejido hepático murino fresco como has sido descrito anteriormente.²⁴

Estudios en animales: Todos los estudios con animales fueron aprobados por la IACUC de Vanderbilt. Los ratones FVB/N macho y hembra tenían entre 10 y 16 semanas de edad. Se generaron los ratones BMPR2^{R899X} y se mantuvieron como ha sido descrito anteriormente.^{24,25} Para estudios de 2HOBA, se administró 1 g/L en el agua de bebida, con botellas de agua protegidas de la luz y cambios de agua cada 2 a 3 días. Se realizó una ecocardiografía en ratones anestesiados (anestesia con isoflurano) para determinar el gasto cardíaco. La presión sistólica del ventrículo derecho (RVSP) se midió de forma invasiva como ha sido descrito anteriormente, utilizando bromoetanol como anestésico.^{24,25}

Estudios en seres humanos: Todos los estudios en seres humanos fueron aprobados por las Juntas de Revisión Institucional de la Universidad de Vanderbilt, la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill y la Universidad de Yale. Se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente. Para medir los niveles de glutamina circulante, se obtuvieron muestras de sangre mediante punción venosa periférica, se centrifugaron para separar el plasma y se almacenaron a -80 ° C hasta el análisis. Los perfiles de aminoácidos se cuantificaron en el laboratorio de química clínica de Vanderbilt utilizando un método convencional aprobado por CLIA. Para las mediciones transpulmonares, se obtuvieron muestras en el momento del cateterismo diagnóstico del corazón derecho clínicamente indicado, como ha sido descrito anteriormente.^{26,27} Los pacientes fueron clasificados como con hipertensión pulmonar o no en función de los resultados de las pruebas hemodinámicas invasivas, con diferencias entre los grupos de la OMS determinadas por la anamnesis.

Análisis estadísticos: Todas las estadísticas se realizaron utilizando GraphPad Prism 6.0 o Microsoft Excel a menos que se especifique lo contrario. Para los experimentos con animales, los tamaños de las muestras se eligieron en

función de experimentos previos con aproximadamente el 80 % de los animales transgénicos con RVSP > 30 mm Hg. Los animales fueron asignados aleatoriamente a grupos de tratamiento por jaula. Para todas las mediciones, los investigadores desconocían los tratamientos y el genotipo hasta el análisis de los datos. Los datos se analizaron mediante la prueba de la *t* de dos colas o ANOVA de dos vías con la prueba *a posteriori* de Tukey, según se indica. La significancia se estableció en $\alpha < 0,05$ después de la corrección para comparaciones múltiples.

Resultados

El metabolismo de la glutamina es anómalo en pacientes humanos con HAP: Para probar la hipótesis de que la HAP implica una alteración del metabolismo de la glutamina, los presentes inventores cuantificaron los niveles de glutamina sérica en ayunas en pacientes con HAP hereditaria con mutaciones conocidas de BMPR2, en portadores de mutaciones no afectados (individuos con mutaciones conocidas de BMPR2, pero sin evidencia de HAP) y en controles casados de los mismos hogares que pacientes y portadores. Los presentes inventores descubrieron que los niveles de glutamina circulante estaban significativamente elevados tanto en pacientes con HAP hereditaria (451 ± 68 $\mu\text{mol/l}$) como en portadores de la mutación de BMPR2 (450 ± 50 $\mu\text{mol/l}$) en comparación con los controles (399 ± 82 $\mu\text{mol/l}$, $p < 0,05$, **figura 1A**). Esto fue inesperado, ya que trabajos anteriores han sugerido que el aumento de la captación cardíaca de glutamina es una característica del programa metabólico aberrante en la HAP.¹⁴ Para cuantificar mejor el metabolismo de la glutamina dentro de la vasculatura pulmonar, los presentes inventores midieron los gradientes transpulmonares de glutamina en pacientes con HAP del grupo I de la OMS, pacientes con HP del grupo III de la OMS e individuos con hemodinámica pulmonar normal. Se recogieron muestras de la arteria pulmonar principal y de la posición de enclavamiento capilar pulmonar en el momento del cateterismo diagnóstico del corazón derecho.²⁶ Las concentraciones de glutamina se cuantificaron en cada muestra, y la diferencia entre las muestras de PCW y PA para cada individuo fue la medición del gradiente (los valores negativos indican captación neta, los valores positivos indican liberación neta). Los pacientes con HAP del grupo I de la OMS mostraron una captación sustancial de glutamina por la vasculatura pulmonar en comparación con los pacientes del grupo III de la OMS y los controles (**figura 1B**). Considerados en conjunto, estos datos indicaron que los pacientes con HAP con función anómala de BMPR2 tienen cambios marcados en todo el cuerpo y en el metabolismo de la glutamina vascular pulmonar.

El endotelio con BMPR2 mutante muestra una avidéz anómala por el carbono de la glutamina: Los presentes inventores determinaron si el aumento de la captación de glutamina por las células endoteliales pulmonares con BMPR2 disfuncional es una propiedad intrínseca de esas células o simplemente se debe a la mayor disponibilidad de glutamina. Para evaluar esto, se cultivaron células endoteliales microvasculares pulmonares (PMVEC) de tipo salvaje (WT) y con BMPR2 mutante y se proporcionó glutamina en un exceso significativo (2 mM) de niveles fisiológicos en los medios de cultivo. En condiciones de exceso de glutamina, las PMVEC con BMPR2 mutante absorbieron glutamina al doble de velocidad que las células WT (**figura 2A**), lo que sugiere que una mayor captación de glutamina es intrínseca a PMVEC con transducción de señales disfuncional de BMPR2.

La glutamina se puede utilizar como fuente de aporte de carbono al ciclo del ATC, pero también es una fuente importante de nitrógeno en la célula, dando suministro a procesos que requieren nitrógeno, como la síntesis de nucleótidos. Los presentes inventores plantearon la hipótesis de que se estaba utilizando glutamina como fuente de carbono y que se estaba desviando preferentemente al ciclo de ATC en PMVEC con BMPR2 mutante en comparación con WT. Para someter a ensayo esta hipótesis, se cultivaron PMVEC WT y con BMPR2 mutante durante 24 horas en presencia de [$U\text{-}^{13}\text{C}_5$]-L-glutamina 2 mM, un isótopo estable de glutamina en el que los 5 átomos de carbono son carbono-13, que es fácilmente detectable por espectrometría de masas (véase el esquema de la **figura 2B**). Las otras fuentes importantes de carbono celular (glucosa, ácidos grasos) se dejaron sin marcar y el suero utilizado se dializó para eliminar los aminoácidos libres. En comparación con el WT, las PMVEC con BMPR2 mutante mostraron una incorporación excesiva de carbono derivado de glutamina en múltiples intermedios del ciclo de ATC (**figura 2C**). Además, cuando se descompusieron intermedios de ATC específicos (por ejemplo, malato) mediante espectrometría de masas en tándem para determinar cuántos átomos de carbono derivados de glutamina se habían incorporado (0, 1, 2, 3 o 4 para el malato), los presentes inventores descubrieron que la mayoría del malato presente (un 40 %) contenía 4 átomos de ^{13}C , lo que indica que la mayor parte del carbono en el ciclo del ATC provenía de la glutamina, ya que esta era la única fuente de ^{13}C disponible (**figura 2D**). Por el contrario, en PMVEC WT, la mayoría del malato presente (un +55 %) no contenía átomos de ^{13}C , lo que indican que, en las células WT, la mayor parte del carbono en el ciclo del ATC no provenía de la glutamina sino de la glucosa no marcada y los ácidos grasos presentes.

La glutamina es una fuente de carbono necesaria para las PMVEC con BMPR2 mutante

Los presentes inventores determinaron a continuación si las PMVEC con BMPR2 mutante tienen un requerimiento absoluto de glutamina o si esto representaba una "disposición de aprovechamiento" como resultado de la presencia de glutamina en exceso. Los presentes inventores cultivaron PMVEC WT y con BMPR2 mutante en dos concentraciones de glutamina, 500 μM (que imita las concentraciones séricas en pacientes con BMPR2 mutante) y 200 μM (que representa los niveles más bajos que se considerarían normales en humanos). A glutamina 500 μM , las PMVEC con BMPR2 mutante muestran una proliferación neta que excede la tasa de PMVEC WT en todos los puntos temporales hasta 72 horas (**figura 3A**). A glutamina 200 μM , la tasa proliferativa neta de PMVEC WT se mantiene prácticamente sin cambios, pero las PMVEC con BMPR2 mutante son completamente intolerantes a las condiciones limitadas por glutamina y todas estaban muertas a las 72 horas (**figura 3B**).

Para comprender mejor los detalles de la utilización de glutamina y los efectos de la limitación de glutamina en PMVEC con BMPR2 mutante, los presentes inventores cuantificaron el estado redox intracelular total de PMVEC WT y con BMPR2 mutante utilizando autofluorescencia de dos fotones de NADH y FAD endógenos, los principales portadores de electrones controlados por la actividad del ciclo del ATC. La fluorescencia de ambas especies permite el cálculo del cociente redox óptico, con una proporción más alta que indica más actividad del ciclo de ATC, un entorno redox intracelular más reducido y una mayor actividad metabólica general. En cambio, una reducción en el cociente redox óptico indica una disminución general de la actividad metabólica, especialmente a través del ciclo del ATC.²⁸⁻³⁰ La autofluorescencia de dos fotones tiene una resolución temporal muy alta, lo que permite detectar y cuantificar cambios rápidos en el estado metabólico y redox de la célula. Los presentes inventores cuantificaron el cociente redox óptico en PMVEC WT y con BMPR2 mutante en condiciones basales y con abstinencia aguda de glutamina y glucosa. En el momento inicial, las PMVEC con BMPR2 mutante tienen un cociente redox óptico más bajo que las células WT (**figura 4A**), lo que indica una capacidad relativamente alterada para mantener el entorno redox intracelular y una actividad metabólica general relativamente alterada. Con la limitación aguda de los sustratos del ciclo de ATC, las PMVEC WT puede adaptar rápidamente su comportamiento metabólico para mantener el cociente redox óptico (**figura 4A**), mientras que las PMVEC con BMPR2 mutante muestran una reducción adicional significativa en el cociente redox óptico (**figura 4A**), lo que sugiere una pérdida significativa de flexibilidad metabólica aguda.

A continuación, se examinaron las consecuencias de la dependencia de la glutamina del ciclo del ATC sobre la función mitocondrial en PMVEC con BMPR2 mutante. Las PMVEC WT y con BMPR2 mutante cultivadas recibieron glucosa o glutamina como único sustrato energético disponible. El consumo de oxígeno mitocondrial se cuantificó mediante el analizador Seahorse XFe96 y se calcularon componentes específicos de la respiración celular (respiración ligada a ATP, fuga de protones y eficiencia de acoplamiento) a partir de los perfiles de consumo de oxígeno (véase el esquema de la **figura 9**). Las PMVEC WT muestran una respiración ligada a ATP equivalente con glucosa o glutamina como única fuente de carbono, pero las PMVEC con BMPR2 mutante muestran una respiración ligada a ATP mejorada con glutamina como fuente de carbono en comparación con la glucosa (**figura 4B**). Cuando usan glutamina, las PMVEC WT presentan una mayor fuga de protones en las mitocondrias en comparación con el uso de glucosa, pero las células con BMPR2 mutante mantienen niveles bajos de fuga de protones con glutamina o glucosa (**figura 4C**), lo que sugiere que la eficiencia general para el uso de glutamina como combustible para sustentar la síntesis de ATP es mucho mayor en PMVEC con BMPR2 mutante en comparación con WT. De acuerdo con esto, cuando se compara la respiración ligada a ATP con la respiración basal, las células endoteliales WT muestran una menor eficiencia de acoplamiento cuando usan glutamina como combustible, mientras que las PMVEC con BMPR2 mutante mantienen una alta eficiencia de acoplamiento (**figura 4D**). Considerados en conjunto, estos datos indicaron que la glutamina es el sustrato preferido para la producción de energía en PMVEC con BMPR2 mutante.

El estrés oxidativo impulsa la activación de HIF y el deterioro de SIRT3 en el caso de BMPR2 mutante

A continuación, los presentes inventores desearon determinar los acontecimientos moleculares posteriores a la mutación de BMPR2 que contribuyen a la dependencia de la glutamina. Se ha demostrado que múltiples vías de transducción de señales regulan el aumento de la utilización de glutamina en diversos contextos de enfermedades.^{15,31-35} De las posibles vías candidatas, la vía de mayor importancia para la HAP, que también regula potentemente el metabolismo de la glutamina es el factor 1-alfa inducible por hipoxia (HIF1 α). Se ha demostrado que HIF1 α se estabiliza en condiciones normóxicas en HAP humana y experimental, y la activación de HIF1 α puede inducir la dependencia de glutamina.³⁶⁻³⁹ Los presentes inventores descubrieron que las PMVEC con BMPR2 mutante cultivadas presentaban una estabilización normóxica significativa de HIF1 α a nivel de proteína en comparación con WT (**figuras 5A y 5B**), y que esto era demostrable para dos tipos diferentes de mutación de BMPR2 asociada a la HAP. A continuación, las PMVEC WT y con BMPR2 mutante se trataron con quetomina, un inhibidor farmacológico de HIF, y se evaluó la captación de glucosa y glutamina cuantificando el cociente de flujo extracelular de glutamina a glucosa. El tratamiento de células WT no tuvo efecto sobre el cociente de flujo de glutamina a glucosa (**figura 5C**). Sin embargo, el tratamiento de PMVEC con BMPR2 mutante con el inhibidor de HIF redujo significativamente el cociente de flujo de glutamina a glucosa (**figura 5C**), lo que sugiere que la actividad de HIF1 ayuda a impulsar el requerimiento de glutamina en el endotelio con BMPR2 mutante.

Aunque la activación de HIF1 α contribuye a la captación y utilización de glutamina en células con BMPR2 mutante, los presentes inventores sospecharon que había alteraciones adicionales en las vías de transducción de señales que se sabe controlan el metabolismo. Se ha demostrado que la activación de HIF1 α por sí sola impulsa el metabolismo de la glutamina, pero la glutamina se utiliza desproporcionadamente para la biosíntesis.³⁹⁻⁴¹ Dado el hallazgo de que la glutamina en las PMVEC con BMPR2 mutante se está utilizando para la producción de energía y no, obviamente, para una biosíntesis desproporcionada, los presentes inventores plantearon la hipótesis de que probablemente estaba alterada una vía de control metabólico directamente implicada tanto en la regulación de la glutamina como en la producción de energía. La sirtuina-3 (SIRT3), una lisina desacetilasa implicada en la producción de energía mitocondrial y la homeostasis redox, surgió como un candidato fuerte. Se ha demostrado que la pérdida de SIRT3 se produce antes de la activación de HIF1 y se ha asociado con hipertensión pulmonar.^{15,42-44}

Debido a que la expresión y actividad de las sirtuinas están estrechamente reguladas por la disponibilidad del sustrato, la ingesta de nutrientes, la actividad física y las vías de transducción de señales que interactúan entre sí y actúan entre

sistemas de órganos, el papel de SIRT3 en la HAP mediada por BMPR2 se estudia mejor en un sistema modelo murino. Para investigar el papel de la inactivación de SIRT3 en la HAP mediada por BMPR2, los presentes inventores aislaron mitocondrias ratones de tipo salvaje y con BMPR2 mutante (BMPR2^{R899X}) alimentados con una dieta occidental (un 60 % de calorías provenientes de grasas) durante 8 semanas. Se evaluó la acetilación de los residuos de lisina en el proteoma mitocondrial, ya que la inactivación de SIRT3 conduce a la hiperacetilación de la lisina. En comparación con el WT, las mitocondrias con BMPR2^{R899X} tenían niveles equivalentes de proteína de SIRT3, pero presentaron una hiperacetilación de lisina significativa en múltiples proteínas mitocondriales (**figura 6A**, carriles 1-2 para WT y 5-6 para mutantes, cuantificado en la **figura 6D**), en coherencia con la pérdida de actividad SIRT3 en ratones BMPR2^{R899X}.

La hiperacetilación del proteoma mitocondrial sin cambios en el contenido de proteína SIRT3 es coherente con la pérdida de la actividad enzimática SIRT3. Los presentes inventores habían demostrado previamente que las membranas mitocondriales en ratones BMPR2^{R899X} presentaban una amplia peroxidación de lípidos, y que la peroxidación de lípidos se caracteriza por una producción excesiva de aductos covalentes entre proteínas e isocetales, un subconjunto de productos de la peroxidación de lípidos altamente reactivos.^{24,45} Por lo tanto, los presentes inventores plantearon la hipótesis de que SIRT3 estaba experimentando inactivación oxidativa en las mitocondrias de ratones BMPR2^{R899X}, y que el tratamiento con el captador de isocetales 2-hidroxibencilamina (2HOBA) restablecería la actividad normal de SIRT3 (esquema en la **figura 6B**). Los presentes inventores demostraron la plausibilidad bioquímica de esta hipótesis incubando isocetal sintéticamente puro con SIRT3 humana recombinante *in vitro*. El tratamiento con isocetal inactivó SIRT3 de una manera dependiente de la concentración, medida por luminiscencia mediante el ensayo Sirt-Glo (**figura 6C**). Entonces, se ensayó la hipótesis de que la captación de isocetales conservaría la función SIRT3 al tratar ratones WT y BMPR2^{R899X} con 2HOBA 1 g/l en el agua de bebida. El tratamiento con 2HOBA redujo significativamente la acetilación de lisina en el proteoma mitocondrial en ratones BMPR2^{R899X} en comparación con WT sin afectar el contenido total de SIRT3 en las mitocondrias (**figura 6A**, carriles 3-4 para WT y 7-8 para mutantes, cuantificado en la **figura 6D**), en coherencia con la conservación de la actividad catalítica de SIRT3.

2HOBA normaliza el metabolismo de la glutamina y previene la HAP in vivo: Habiendo demostrado que la función alterada de BMPR2 está asociada con la pérdida de la función SIRT3, y que esto se puede prevenir con el tratamiento con 2HOBA para eliminar los productos dañinos de la peroxidación de lípidos, los presentes inventores desearon a continuación evaluar la disfunción metabólica posterior a la mutación de BMPR2 *in vivo*, la relación con la HAP y el efecto del tratamiento con 2HOBA. Los presentes inventores plantearon la hipótesis de que 2HOBA impediría el desarrollo de HAP en ratones BMPR2^{R899X} y que tendría un efecto modulador beneficioso sobre el metabolismo de la glutamina *in vivo*. La expresión del alelo BMPR2^{R899X} fue suficiente para impulsar la regulación positiva de la glutamina sintetasa en el músculo esquelético (**figura 10**) y en las mitocondrias del hígado (**figura 7A**) en comparación con WT. A pesar de la regulación positiva de la glutamina sintetasa, las concentraciones de glutamina circulante fueron equivalentes en ratones WT y BMPR2^{R899X} tratados con vehículo (**figura 7B**), lo que sugiere que el aumento de la síntesis de glutamina iba acompañado de un mayor consumo en los ratones con BMPR2 mutante. Después del tratamiento con 2HOBA, los ratones BMPR2^{R899X} tenían menos glutamina sintetasa en las mitocondrias del hígado (**figura 7A**) y un nivel de glutamina circulante significativamente menor en comparación con los ratones WT tratados (**figura 7B**), lo que sugiere un efecto favorable sobre el equilibrio de glutamina en los mutantes. De acuerdo con los efectos sobre SIRT3 y el metabolismo de la glutamina, el tratamiento con 2HOBA previno el desarrollo de hipertensión pulmonar medida por la resistencia pulmonar total en los ratones BMPR2^{R899X} en comparación con ratones tratados con vehículo (**figura 7C**). El tratamiento con 2HOBA en los ratones BMPR2^{R899X} aumentó modestamente el gasto cardíaco (**figura 11A**) y disminuyó la RVSP (**figura 11B**), cuyo efecto combinado fue reducir significativamente la resistencia pulmonar total.

Análisis

Como parte de este ejemplo, los presentes inventores utilizaron modelos de cultivo de células humanas y murinas, ratones transgénicos y muestras de pacientes vivos con HAP para demostrar un programa metabólico notablemente alterado para la glutamina debido a la transducción de señales disfuncional de BMPR2 (**figura 8**). La pérdida de la función normal de BMPR2 conduce a una lesión oxidante en las mitocondrias y a la formación de productos reactivos de la peroxidación de lípidos denominados isocetales.⁴⁵ Los isocetales inactivan SIRT3 que, junto con un aumento del estrés oxidativo, da como resultado la estabilización de HIF1α. Juntas, SIRT3 y HIF1α son dos de las vías "reguladoras maestras" mejor establecidas para el metabolismo celular en general y el metabolismo de la glutamina en particular. Los presentes inventores han demostrado que este proceso puede interrumpirse *in vivo* mediante el tratamiento con un captador de isocetales biodisponible por vía oral, la 2-hidroxibencilamina (2HOBA), y que la interrupción de la cascada molecular que conduce a la adicción a la glutamina previene el desarrollo de HAP.

El descubrimiento de los presentes inventores se suma al creciente peso de la evidencia que implica al metabolismo celular alterado como un importante contribuyente al desarrollo y mantenimiento de la hipertensión pulmonar. La primera perturbación metabólica importante descrita en la HAP fue un cambio hacia la glucólisis productora de lactato a pesar de la presencia de amplias concentraciones de oxígeno para permitir la oxidación completa de la glucosa. Este hallazgo ahora se ha replicado en prácticamente todos los entornos de HAP experimental y humana, y los fundamentos moleculares continúan aclarándose.^{1,2,6,11,38,46-48} Sin embargo, tal como también ha ocurrido con la investigación del cáncer, los presentes inventores y otros están descubriendo que los cambios en el panorama

metabólico celular en la HAP no se limitan a la glucólisis, sino que parece involucrar a la mayoría de las principales vías metabólicas. Dada la interconexión del metaboloma en las células sanas, quizás esto no sea sorprendente. En efecto, los presentes inventores han demostrado previamente que la expresión de isoformas mutantes de BMPR2 en PMVEC es suficiente para reprogramar múltiples vías metabólicas.⁴⁷

Los hallazgos de los inventores ayudan a reunir varios otros informes publicados recientemente sobre el programa metabólico alterado en la hipertensión pulmonar. Piao *et al.* demostraron un aumento de la glutaminólisis del VD en ratas tratadas con monocrotalina, y que también estaba presente una firma de aumento de la glutaminólisis en el VD de pacientes humanos con HAP.¹⁴ Paulin *et al.* publicaron recientemente que la pérdida de la actividad de SIRT3 mediante la reducción del nivel de proteínas predisponía a los ratones al desarrollo de HAP, aunque el mecanismo de regulación a la baja no estaba del todo claro.⁴⁴ Ampliando estos hallazgos, Lai *et al.* han demostrado muy recientemente un papel importante para SIRT3 en la hipertensión pulmonar y los trastornos metabólicos sistémicos asociados observados en la insuficiencia cardíaca izquierda con fracción de eyección conservada.⁴⁹ Diebold *et al.* notificaron una remodelación metabólica en células endoteliales pulmonares con expresión reducida de BMPR2, aunque la manifestación del fenotipo de HAP requirió la exposición a hipoxia, implicando a HIF, pero no a SIRT3.^{46,50} Los descubrimientos relacionados con la presente invención llenan vacíos importantes dentro y entre estos estudios al proporcionar un posible mecanismo mediante el cual todos estos hallazgos publicados podrían ser coherentes entre sí. Además, los presentes inventores proporcionan pruebas en pacientes vivos con HAP de que el metabolismo dinámico de hecho se reprograma de una manera similar a lo que se ha observado en sistemas modelo y tejido cadavérico. Los presentes inventores también han demostrado que actuar sobre al menos uno de los mecanismos subyacentes a la reprogramación metabólica en la HAP tiene efectos beneficiosos *in vivo*, y los presentes inventores lo han conseguido con un compuesto que puede usarse en seres humanos. La 2-hidroxibencilamina tiene un perfil de seguridad a largo plazo muy favorable, sin que más de 12 meses de administración continua en ratones produjese una toxicidad significativa. La 2-hidroxibencilamina es un producto natural, lo que permite realizar estudios demostrativos preliminares acelerados en seres humanos, y pudiendo centrarse estudios posteriores en compuestos relacionados con una farmacocinética mejorada. Es importante destacar que el mecanismo de acción de 2HOBA se ha demostrado en otros modelos de enfermedades y en varias especies.^{19,51}

Referencias

1. Sutendra G., Michelakis E.D., The metabolic basis of pulmonary arterial hypertension, *Cell metabolism*, 2014, 19(4):558-573.
2. Ryan J.J., Archer S.L., Emerging concepts in the molecular basis of pulmonary arterial hypertension: part I: metabolic plasticity and mitochondrial dynamics in the pulmonary circulation and right ventricle in pulmonary arterial hypertension, *Circulation*, 2015, 131(19):1691-1702.
3. Taegtmeyer H., Young M.E., Lopaschuk G.D., Abel E.D., Brunengraber H., Darley-Usmar V., Des Rosiers C., *et al.*, Assessing Cardiac Metabolism: A Scientific Statement From the American Heart Association, *Circulation Research*, 2016, 118(10):1659-1701.
4. Eelen G., de Zeeuw P., Simons M., Carmeliet P., Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature, *Circulation Research*, 2015, 116(7):1231-1244.
5. Gómez-Arroyo J., Mizuno S., Szczepanek K., Van Tssell B., Natarajan R., dos Remedios C.G., Drake J.I., *et al.*, Metabolic gene remodeling and mitochondrial dysfunction in failing right ventricular hypertrophy secondary to pulmonary arterial hypertension, *Circ. Heart Fail.*, 2013, 6(1):136-144.
6. Ryan J., Dasgupta A., Houston J., Chen K.H., Archer S.L., Mitochondrial dynamics in pulmonary arterial hypertension, *Journal of molecular medicine*, 2015, 93(3):229-242.
7. Obre E., Rossignol R., Emerging concepts in bioenergetics and cancer research: metabolic flexibility, coupling, symbiosis, switch, oxidative tumors, metabolic remodeling, signaling and bioenergetic therapy, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2015, 59:167-181.
8. Chen X., Talati M., Fessel J.P., Hemnes A.R., Gladson S., French J., Shay S., *et al.*, Estrogen Metabolite 16alpha-Hydroxyestrone Exacerbates Bone Morphogenetic Protein Receptor Type II-Associated Pulmonary Arterial Hypertension Through MicroRNA-29-Mediated Modulation of Cellular Metabolism, *Circulation*, 2016, 133(1):82-97.
9. Hemnes A.R., Brittain E.L., Trammell A.W., Fessel J.P., Austin E.D., Penner N., Maynard K.B., *et al.*, Evidence for right ventricular lipotoxicity in heritable pulmonary arterial hypertension, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2014, 189(3):325-334.
10. West J., Niswender K.D., Johnson J.A., Pugh M.E., Gleaves L., Fessel J.P., Hemnes A.R., A potential role for insulin resistance in experimental pulmonary hypertension, *The European respiratory journal*, 2013, 41(4):861-871.

11. Dyck J.R., Hopkins T.A., Bonnet S., Michelakis E.D., Young M.E., Watanabe M., Kawase Y., Jisage K., Lopaschuk G.D., Absence of malonyl coenzyme A decarboxylase in mice increases cardiac glucose oxidation and protects the heart from ischemic injury, *Circulation*, 2006, 114(16):1721-1728.
12. Talati M.H., Brittain E.L., Fessel J.P., Penner N., Atkinson J., Funke M., Grueter C., *et al.*, Mechanisms of Lipid Accumulation in the Bone Morphogenic Protein Receptor 2 Mutant Right Ventricle, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2016.
13. Brittain E.L., Talati M., Fessel J.P., Zhu H., Penner N., Calcutt M.W., West J.D., *et al.*, Fatty Acid Metabolic Defects and Right Ventricular Lipotoxicity in Human Pulmonary Arterial Hypertension, *Circulation*, 2016, 133(20):1936-1944.
14. Piao L., Fang Y.H., Parikh K., Ryan J.J., Toth P.T., Archer S.L., Cardiac glutaminolysis: a maladaptive cancer metabolism pathway in the right ventricle in pulmonary hypertension, *Journal of molecular medicine*, 2013, 91(10):1185-1197.
15. Li C., Zhang G., Zhao L., Ma Z., Chen H., Metabolic reprogramming in cancer cells: glycolysis, glutaminolysis, and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer, *World J. Surg. Oncol.*, 2016, 14(1):15.
16. Yang C., Ko B., Hensley C.T., Jiang L., Wasti A.T., Kim J., Sudderth J., *et al.*, Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport, *Molecular Cell.*, 2014, 56(3):414-424.
17. Jiang L., Shestov A.A., Swain P., Yang C., Parker S.J., Wang Q.A., Terada L.S., *et al.*, Reductive carboxylation supports redox homeostasis during anchorage-independent growth, *Nature*, 2016, 532(7598):255-258.
18. DeBerardinis R.J., Chandel N.S., Fundamentals of cancer metabolism, *Sci. Adv.*, 2016, 2(5): e 1600200.
19. Kirabo A., Fontana V., de Faria A.P., Loperena R., Galindo C.L., Wu J., Bikineyeva A.T., *et al.*, DC isoketal-modified proteins activate T cells and promote hypertension, *The Journal of Clinical Investigation*, 2014, 124(10):4642-4656.
20. Majka S., Hagen M., Blackwell T., Harral J., Johnson J.A., Gendron R., Paradis H., *et al.*, Physiologic and molecular consequences of endothelial Bmpr2 mutation, *Respir. Res.*, 2011, 12:84.
21. Greene J., Henderson J.W., Wikswa J.P., Rapid and precise determination of cellular amino acid flux rates using HPLC with automated derivatization with absorbance detection, *Agilent Application Notes*, 2009.
22. Murphy T.A., Young J.D., ETA: robust software for determination of cell specific rates from extracellular time courses, *Biotechnol. Bioeng.*, 2013, 110(6):1748-1758.
23. Shah A.T., Demory Beckler M., Walsh A.J., Jones W.P., Pohlmann P.R., Skala M.C., Optical metabolic imaging of treatment response in human head and neck squamous cell carcinoma, *PLoS One*. 2014, 9(3):e90746.
24. Fessel J.P., Flynn C.R., Robinson L.J., Penner N.L., Gladson S., Kang C.J., Wasserman D.H., Hemnes A.R., West J.D., Hyperoxia synergizes with mutant bone morphogenic protein receptor 2 to cause metabolic stress, oxidant injury, and pulmonary hypertension, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2013, 49(5):778-787.
25. Johnson J.A., Hemnes A.R., Perrien D.S., Schuster M., Robinson L.J., Gladson S., Loibner H., *et al.*, Cytoskeletal defects in Bmpr2-associated pulmonary arterial hypertension, *American Journal of Physiology, Lung cellular and molecular physiology*, 2012, 302(5):L474-484.
26. Fares W.H., Ford H.J., Ghio A.J., Aris R.M., Safety and feasibility of obtaining wedged pulmonary artery samples and differential distribution of biomarkers in pulmonary hypertension, *Pulmonary circulation*, 2012, 2(4):477-482.
27. Monahan K., Scott T.A., Su Y.R., Lenneman C.G., Zhao D.X., Robbins I.M., Hemnes A.R., Reproducibility of intracardiac and transpulmonary biomarkers in the evaluation of pulmonary hypertension, *Pulmonary circulation*, 2013, 3(2):345-349.
28. Skala M.C., Riching K.M., Gendron-Fitzpatrick A., Eickhoff J., Eliceiri K.W., White J.G., Ramanujam N., *In vivo* multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(49):19494-19499.

29. Chance B., Schoener B., Oshino R., Itshak F., Nakase Y., Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples., NADH and flavoprotein fluorescence signals. *The Journal of Biological Chemistry*, 1979, 254(11):4764-4771.

30. Barlow C.H., Harden W.R., 3rd, Harken A.H., Simson M.B., Haselgrove J.C., Chance B., O'Connor M., Austin G., Fluorescence mapping of mitochondrial redox changes in heart and brain, *Crit. Care Med.*, 1979, 7(9):402-406.

31. Sánchez E.L., Lagunoff M., Viral activation of cellular metabolism, *Virology*, 2015, 479-480:609-618.

32. Hough K.P., Chisolm D.A., Weinmann A.S., Transcriptional regulation of T cell metabolism, *Mol. Immunol.*, 2015, 68(2 punto C):520-526.

33. Courtney R., Ngo D.C., Malik N., Ververis K., Tortorella S.M., Karagiannis T.C., Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K, *Mol. Biol. Rep.*, 2015, 42(4):841-851.

34. Ryan J.J., Archer S.L., The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure, *Circulation Research*, 2014, 115(1):176-188.

35. Chen J.Q., Russo J., Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, 1826(2):370-384.

36. Tudor R.M., Archer S.L., Dorfmueller P., Erzurum S.C., Guignabert C., Michelakis E., Rabinovitch M., Schermuly R., Stenmark K.R., Morrell N.W., Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2013, 62(25 suppl.):D4-12.

37. Pisarcik S., Maylor J., Lu W., Yun X., Undem C., Sylvester J.T., Semenza G.L., Shimoda L.A., Activation of hypoxia-inducible factor-1 in pulmonary arterial smooth muscle cells by endothelin-1, *American Journal of Physiology, Lung cellular and molecular physiology*, 2013, 304(8):L549-561.

38. Fijalkowska I., Xu W., Comhair S.A., Janocha A.J., Mavrikakis L.A., Krishnamachary B., Zhen L., *et al.*, Hypoxia inducible-factor1alpha regulates the metabolic shift of pulmonary hypertensive endothelial cells, *The American Journal of Pathology*, 2010, 176(3):1130-1138.

39. Wise D.R., Ward P.S., Shay J.E., Cross J.R., Gruber J.J., Sachdeva U.M., Platt J.M., DeMatteo R.G., Simon M.C., Thompson C.B., Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of alpha-ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(49):19611-19616.

40. Wise D.R., DeBerardinis R.J., Mancuso A., Sayed N., Zhang X.Y., Pfeiffer H.K., Nissim I., *et al.*, Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(48):18782-18787.

41. Hosios A.M., Hecht V.C., Danai L.V., Johnson M.O., Rathmell J.C., Steinhäuser M.L., Manalis S.R., Vander Heiden M.G., Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells, *Dev. Cell.*, 2016, 36(5):540-549.

42. Haigis M.C., Deng C.X., Finley L.W., Kim H.S., Gius D., SIRT3 is a mitochondrial tumor suppressor: a scientific tale that connects aberrant cellular ROS, the Warburg effect, and carcinogenesis, *Cancer Res.*, 2012, 72(10):2468-2472.

43. Finley L.W., Carracedo A., Lee J., Sousa A., Egia A., Zhang J., Teruya-Feldstein J., *et al.*, SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1alpha destabilization, *Cancer Cell*, 2011, 19(3):416-428.

44. Paulin R., Dromparis P., Sutendra G., Gurtu V., Zervopoulos S., Bowers L., Haromy A., *et al.*, Sirtuin 3 deficiency is associated with inhibited mitochondrial function and pulmonary arterial hypertension in rodents and humans, *Cell metabolism*, 2014, 20(5):827-839.

45. Lane K.L., Talati M., Austin E., Hemnes A.R., Johnson J.A., Fessel J.P., Blackwell T., *et al.*, Oxidative injury is a common consequence of BMPR2 mutations, *Pulmonary circulation*, 2011, 1(1):72-83.

46. Diebold I., Hennigs J.K., Miyagawa K., Li C.G., Nickel N.P., Kaschwich M., Cao A., *et al.*, BMPR2 Preserves Mitochondrial Function and DNA during Reoxygenation to Promote Endothelial Cell Survival and Reverse Pulmonary Hypertension, *Cell metabolism*, 2015, 21(4):596-608.

47. Fessel J.P., Hamid R., Wittmann B.M., Robinson L.J., Blackwell T., Tada Y., Tanabe N., Tatsumi K., Hemnes A.R., West J.D., Metabolomic analysis of bone morphogenetic protein receptor type 2 mutations in human

pulmonary endothelium reveals widespread metabolic reprogramming, *Pulmonary circulation*, 2012, 2(2):201-213.

48. Xu W., Koeck T., Lara A.R., Neumann D., DiFilippo F.P., Koo M., Janocha A.J., *et al.*, Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(4):1342-1347.

49. Lai Y.C., Tabima D.M., Dube J.J., Hugan K.S., Vanderpool R.R., Goncharov D.A., St Croix C.M., *et al.*, SIRT3-AMP-Activated Protein Kinase Activation by Nitrite and Metformin Improves Hyperglycemia and Normalizes Pulmonary Hypertension Associated With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction, *Circulation*, 2016, 133(8):717-731.

50. Waypa G.B., Osborne S.W., Marks J.D., Berkelhamer S.K., Kondapalli J., Schumacker P.T., Sirtuin 3 deficiency does not augment hypoxia-induced pulmonary hypertension, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2013, 49(6):885-891.

51. Nguyen T.T., Caito S.W., Zackert W.E., West J.D., Zhu S., Aschner M., Fessel J.P., Roberts L.J., 2^o, Scavengers of reactive gamma-ketoaldehydes extend *Caenorhabditis elegans* lifespan and healthspan through protein-level interactions with SIR-2.1 and ETS-7, *Aging (Albany NY)*, 2016.

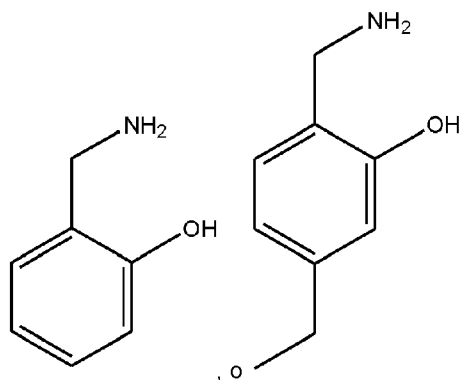
52. Bertero T., Oldham W.M., Cottrill K.A., Pisano S., Vanderpool R.R., Yu Q., Zhao J., *et al.*, Vascular stiffness mechanoactivates YAP/TAZ-dependent glutaminolysis to drive pulmonary hypertension, *The Journal of Clinical Investigation*, 2016.

53. Schoors S., Bruning U., Missiaen R., Queiroz K.C., Borgers G., Elia I., Zecchin A., *et al.*, Fatty acid carbon is essential for dNTP synthesis in endothelial cells, *Nature*, 2015, 520(7546):192-197.

REIVINDICACIONES

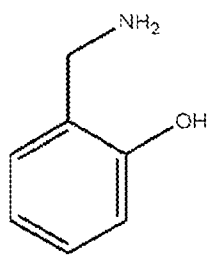
1. Un compuesto para su uso en un método para tratar o prevenir la hipertensión pulmonar del grupo I de la OMS, en donde el compuesto tiene la siguiente fórmula:

5



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 2. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto tiene la siguiente fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15

3. Un compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en un método para tratar o prevenir la hipertensión pulmonar hereditaria.

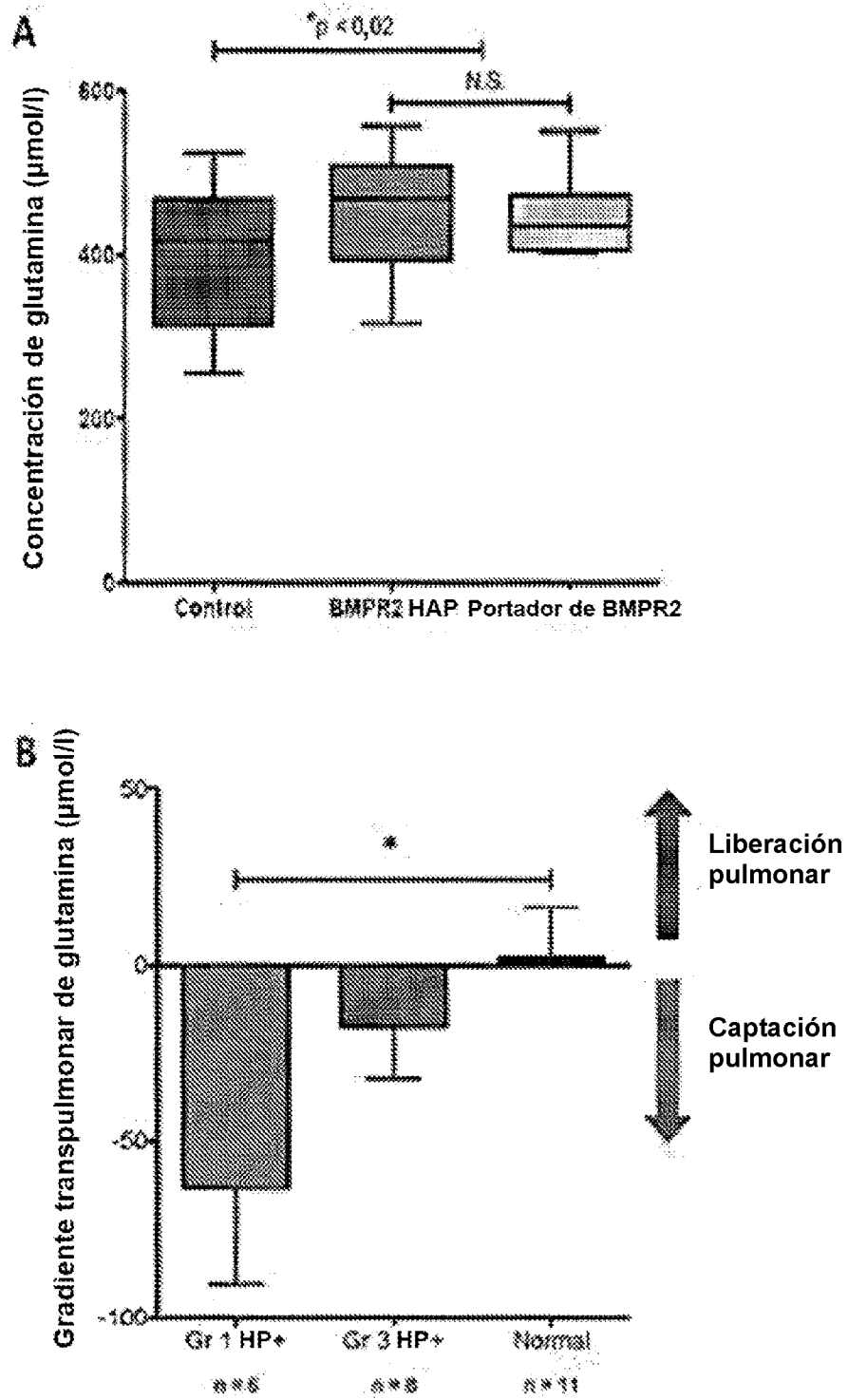


FIGURA 1

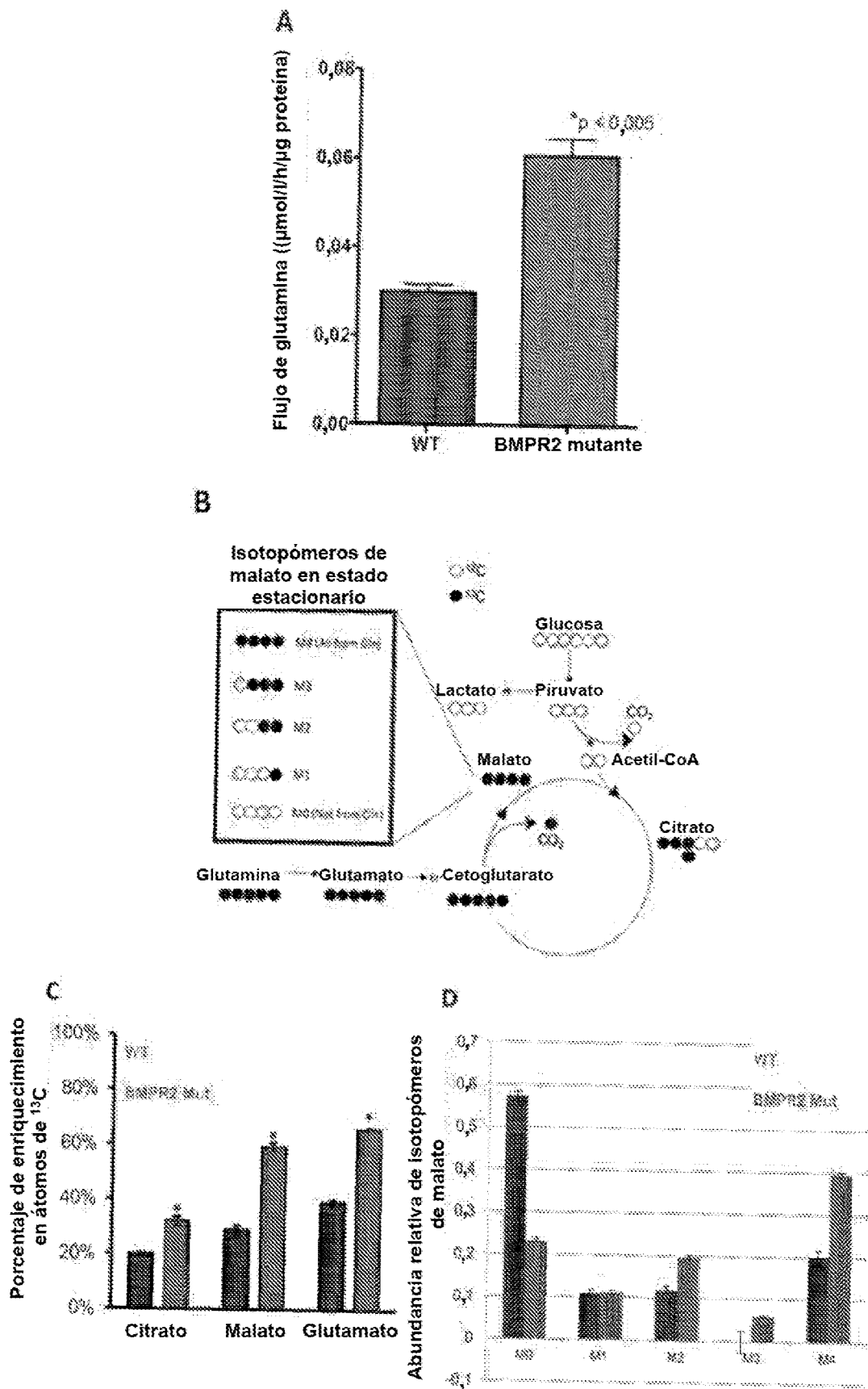


FIGURA 2

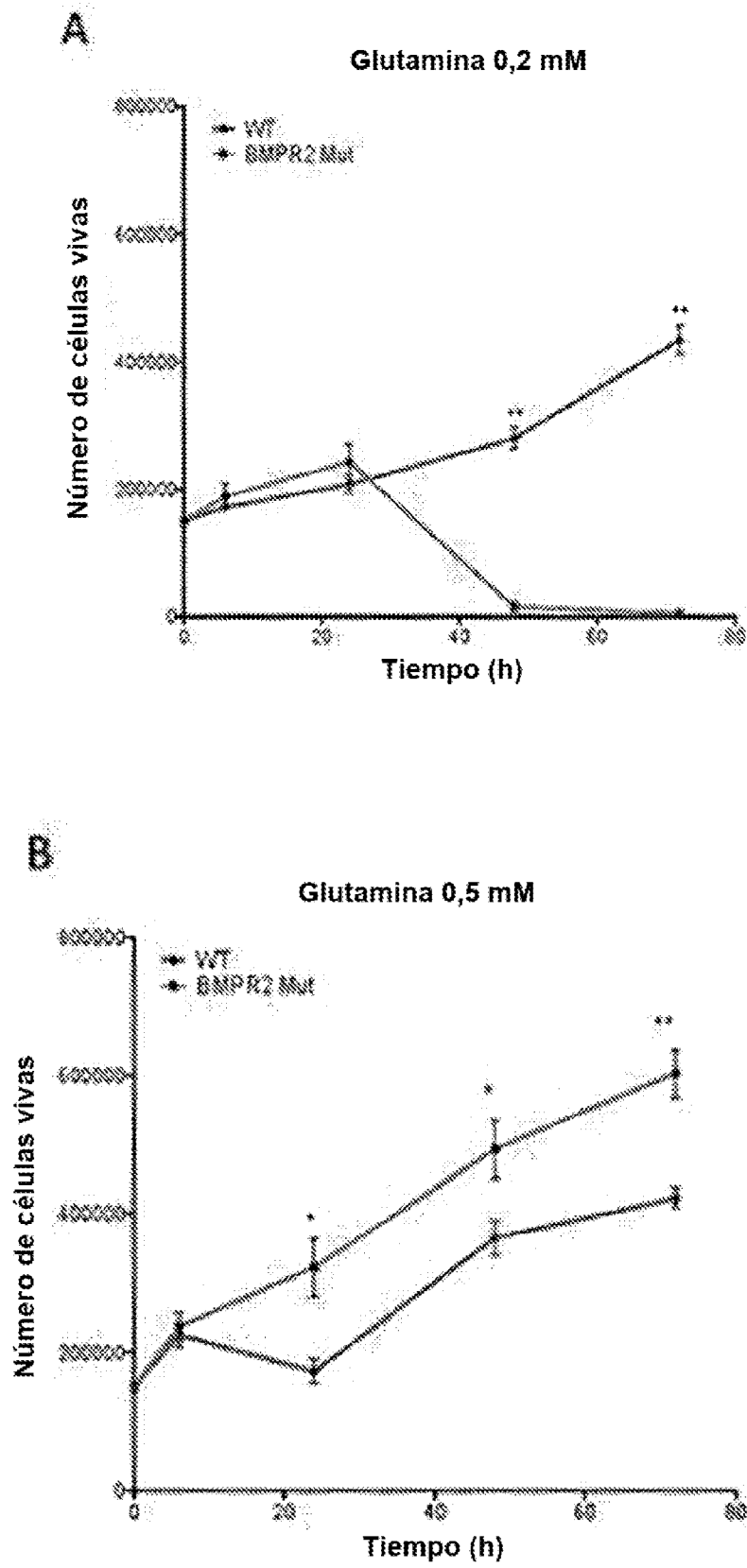


FIGURA 3

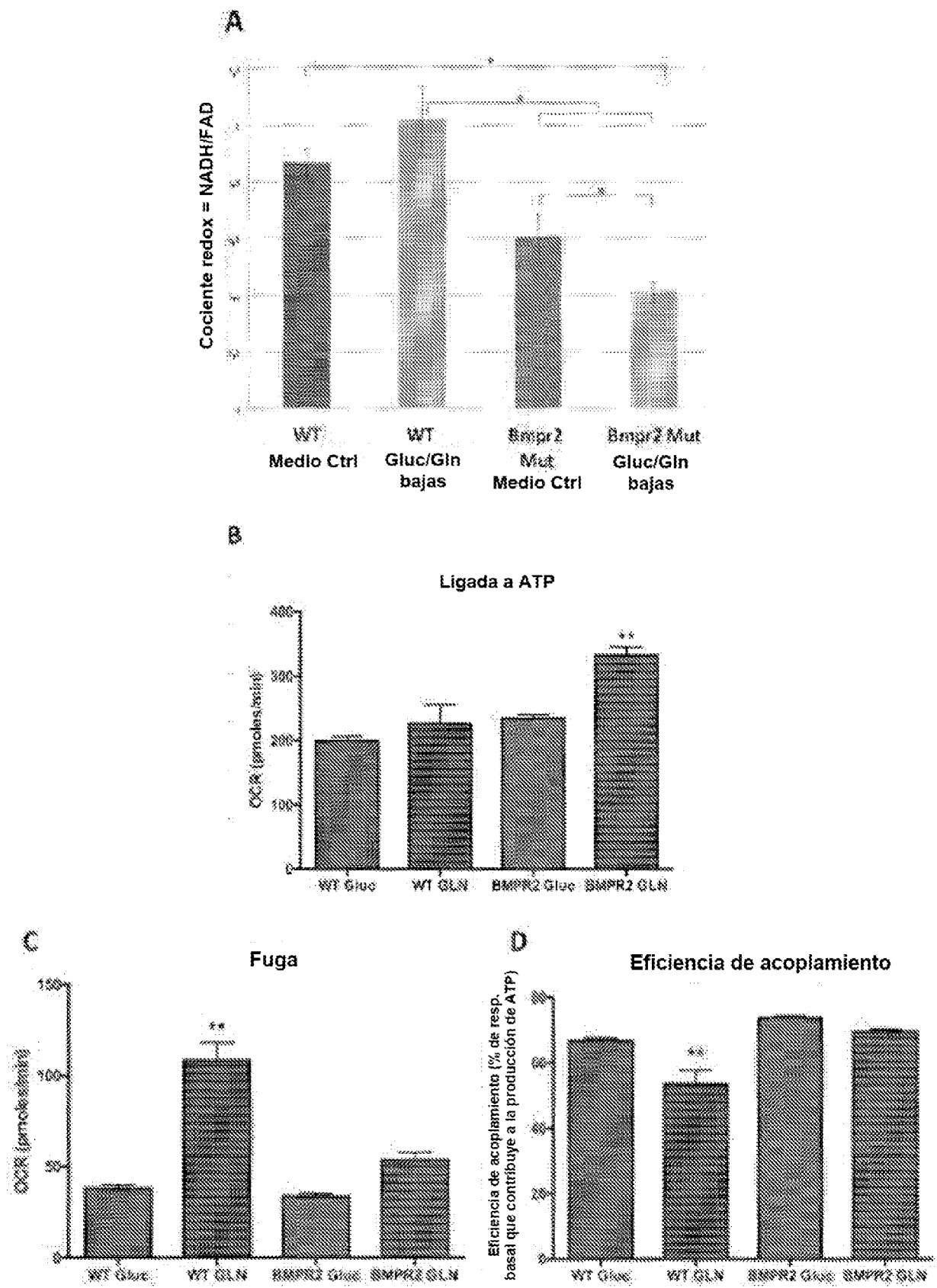


FIGURA 4

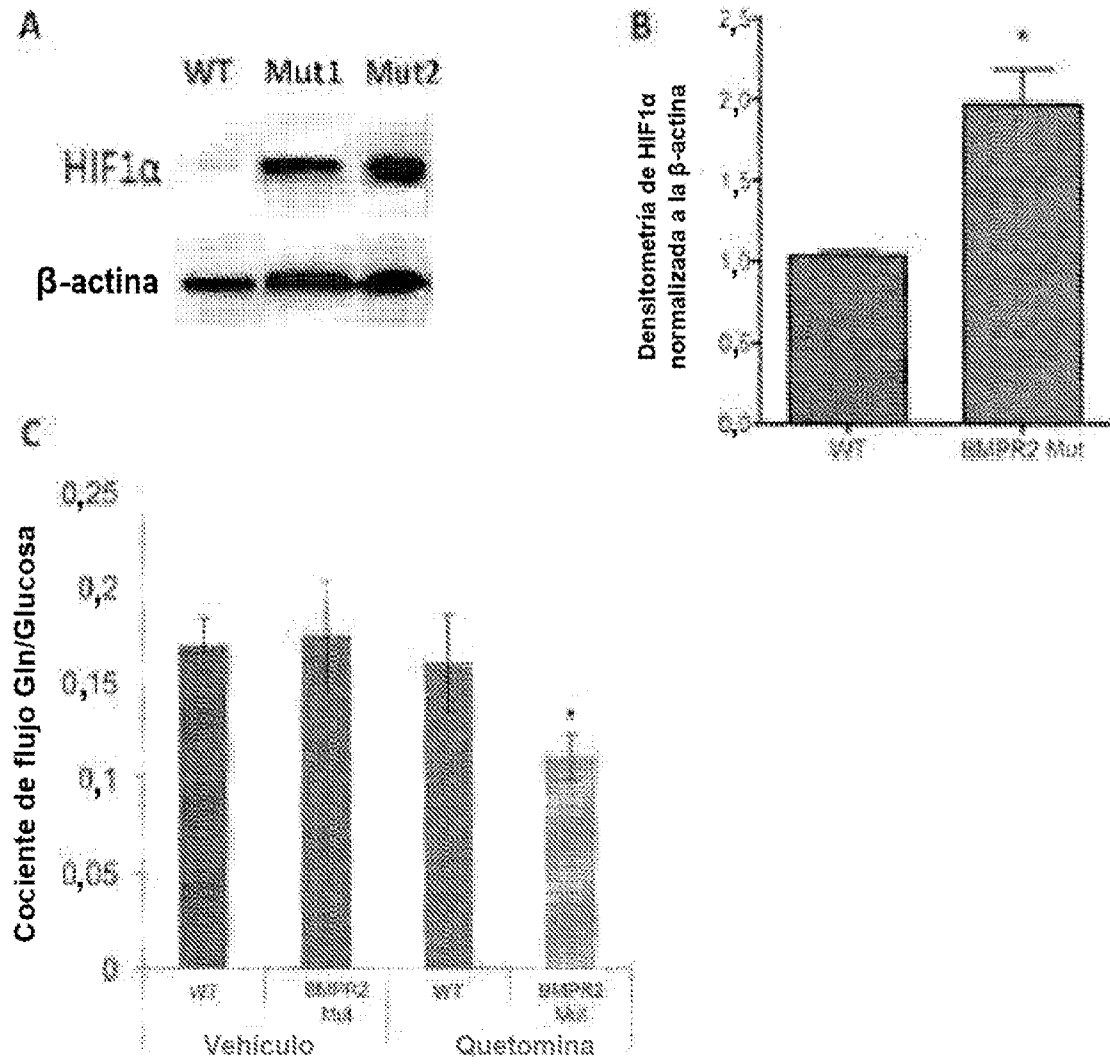


FIGURA 5

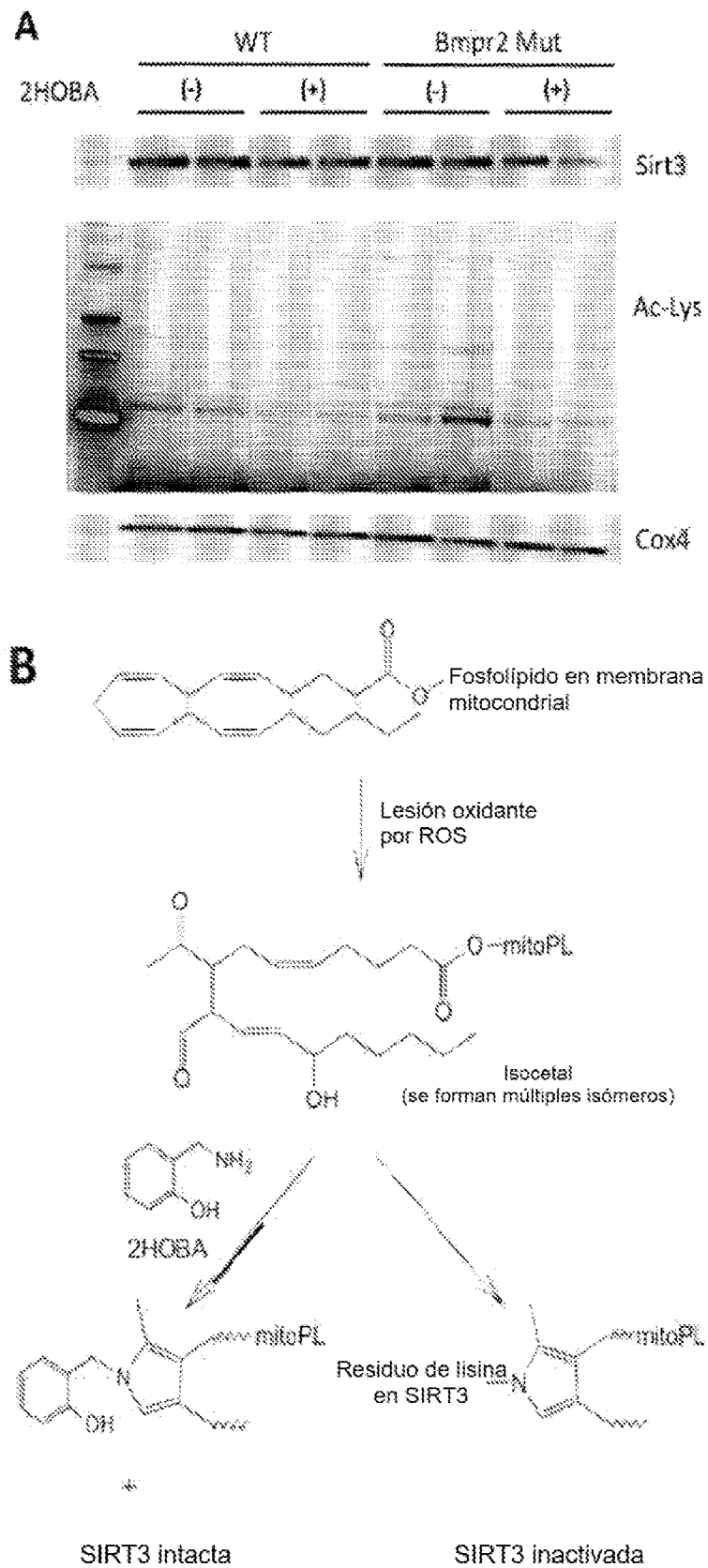


FIGURA 6A-6B

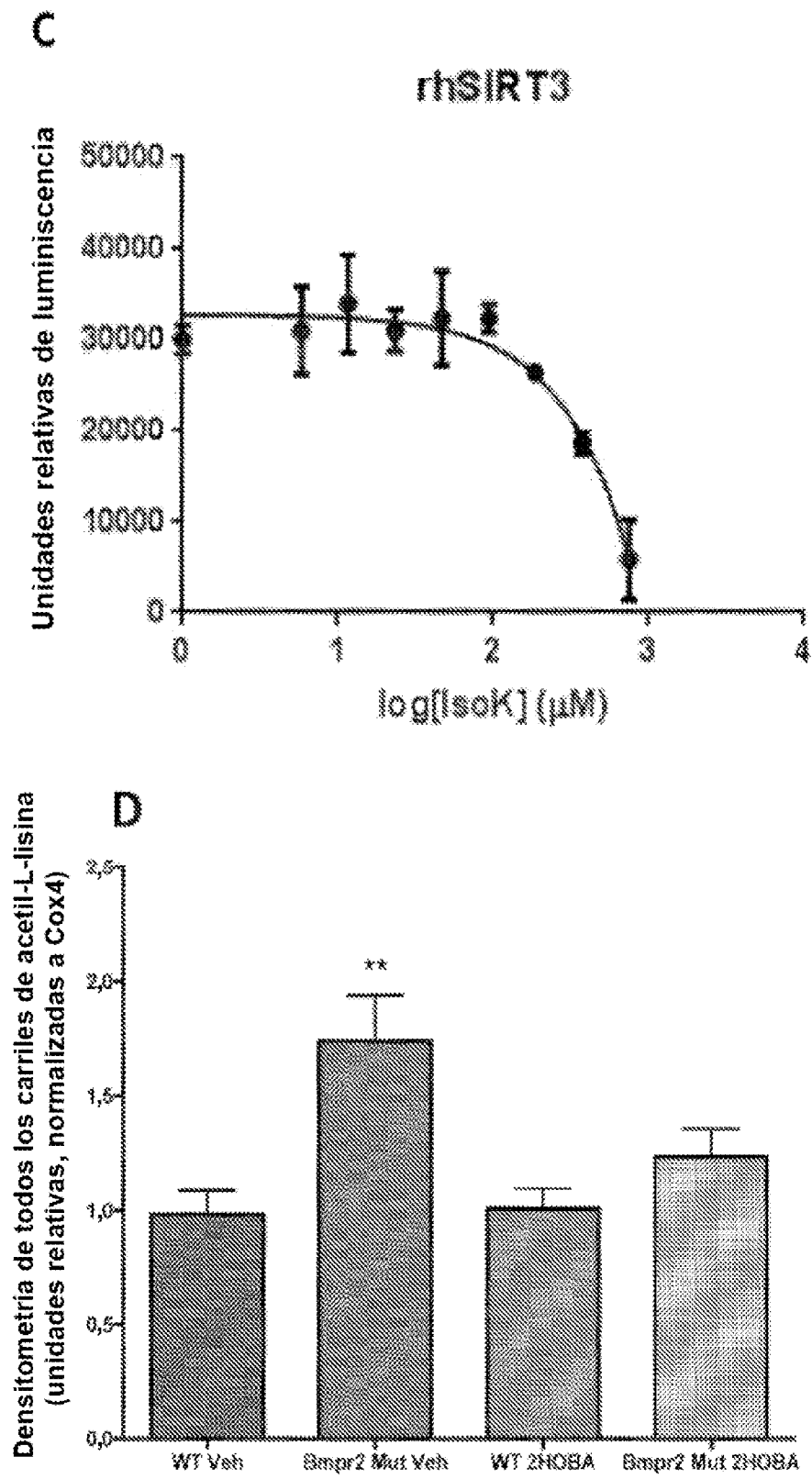


FIGURA 6C-6D

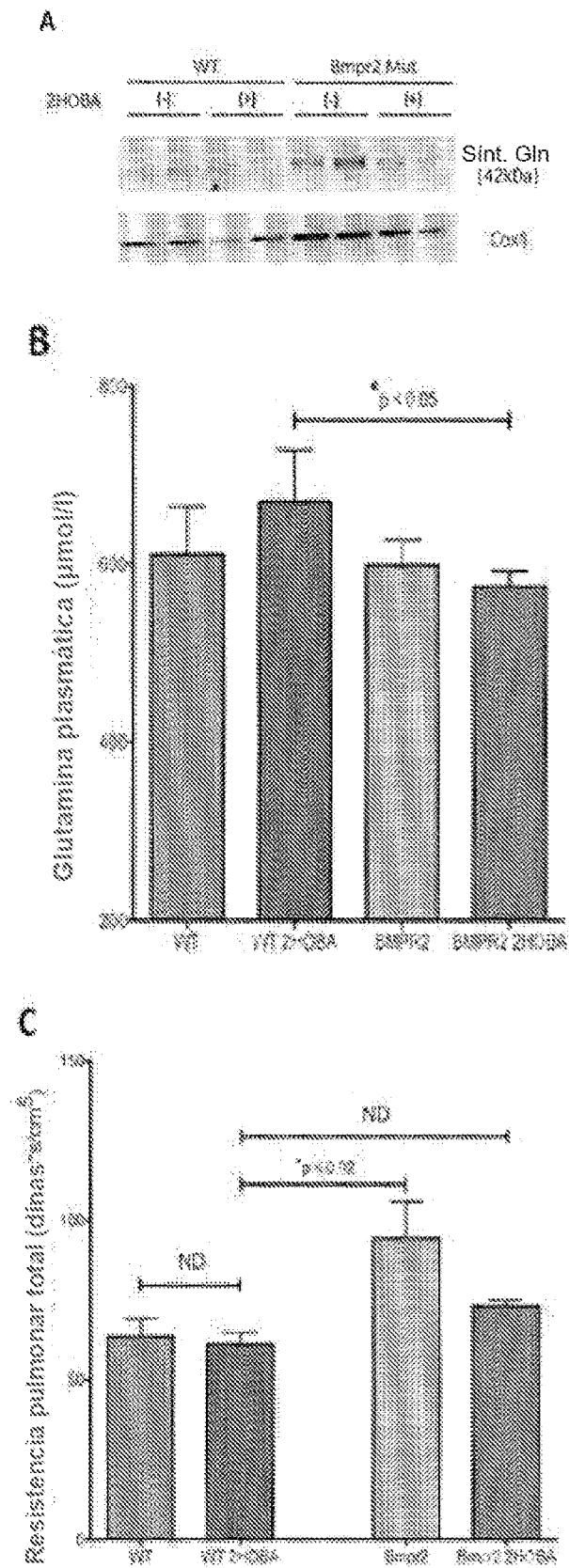


FIGURA 7

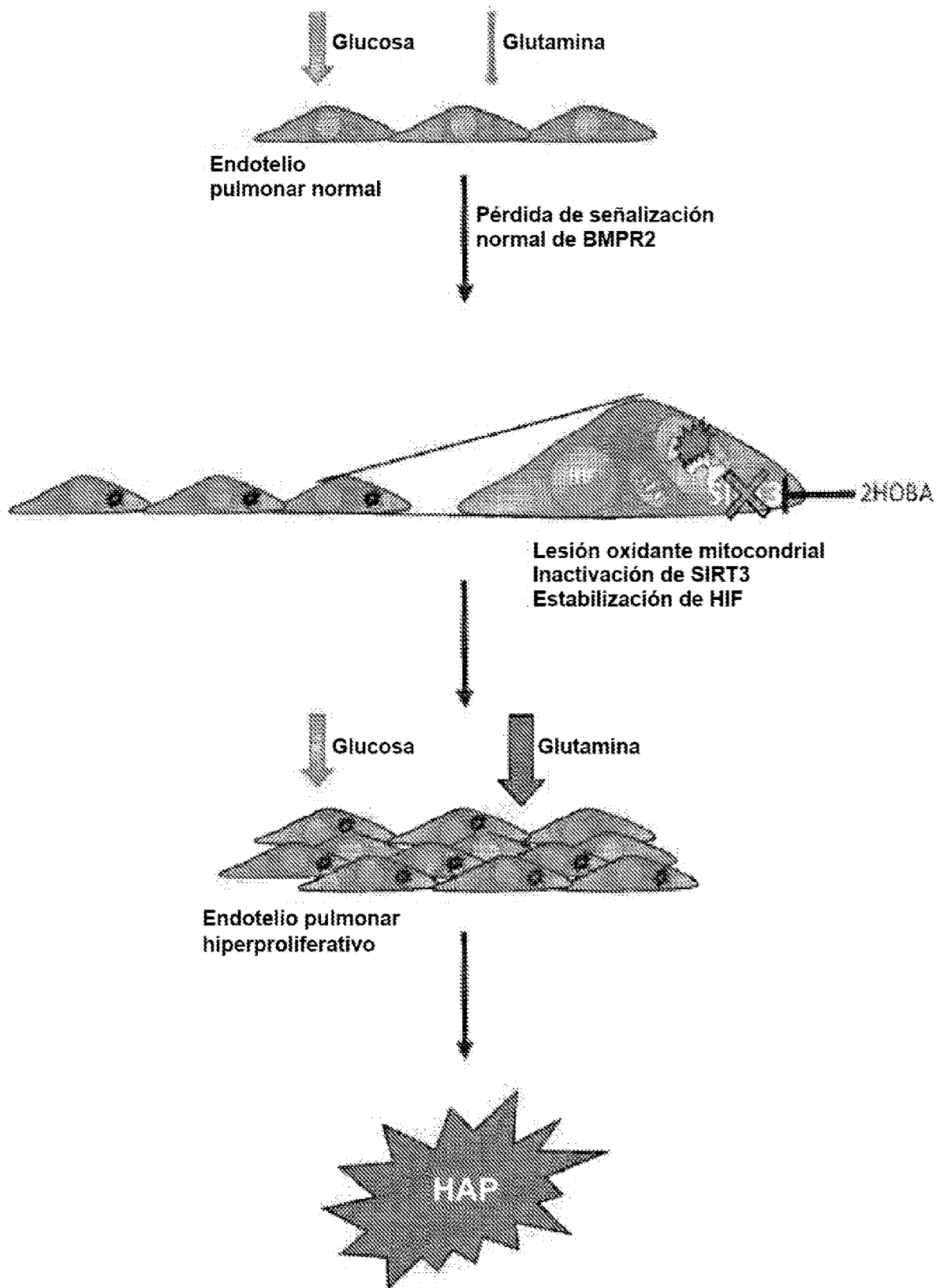
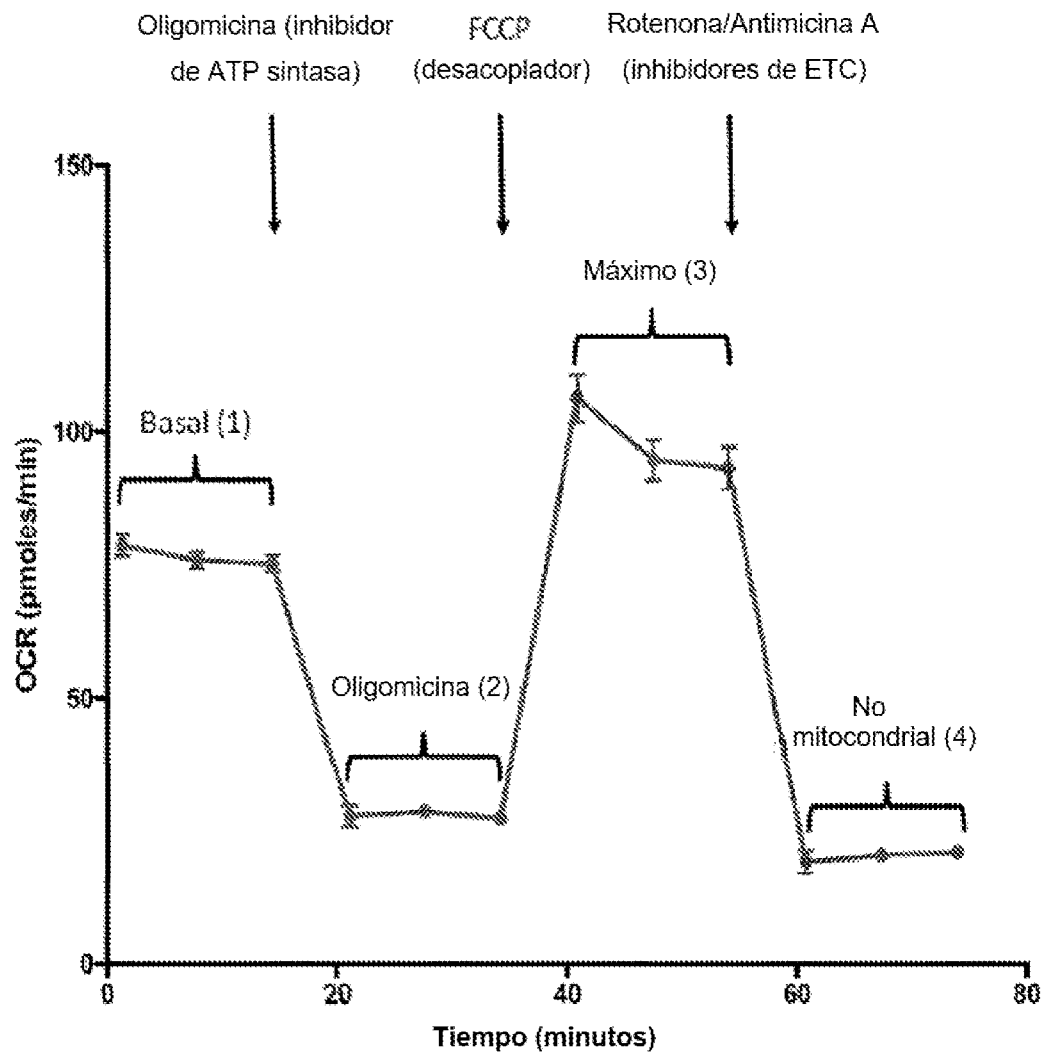


FIGURA 8



Respiración ligada a ATP = (1) – (2)

Respiración de fuga = (2) – (4)

Eficiencia de acoplamiento = $\frac{[(1) - (2)]}{(1)} \times 100\%$

FIGURA 9

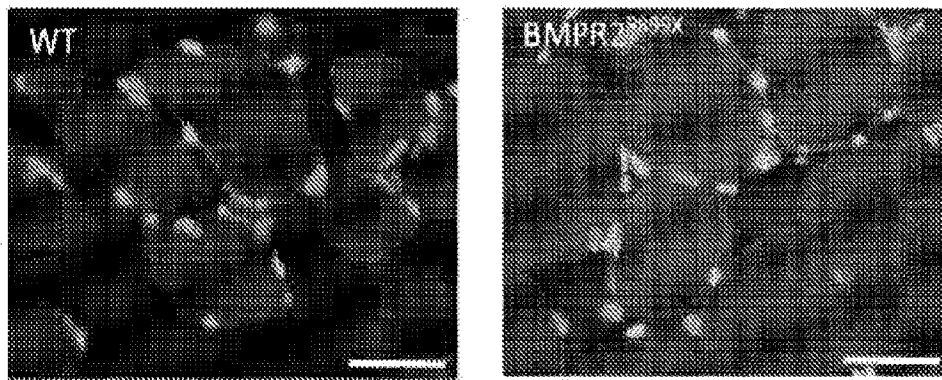


FIGURA 10

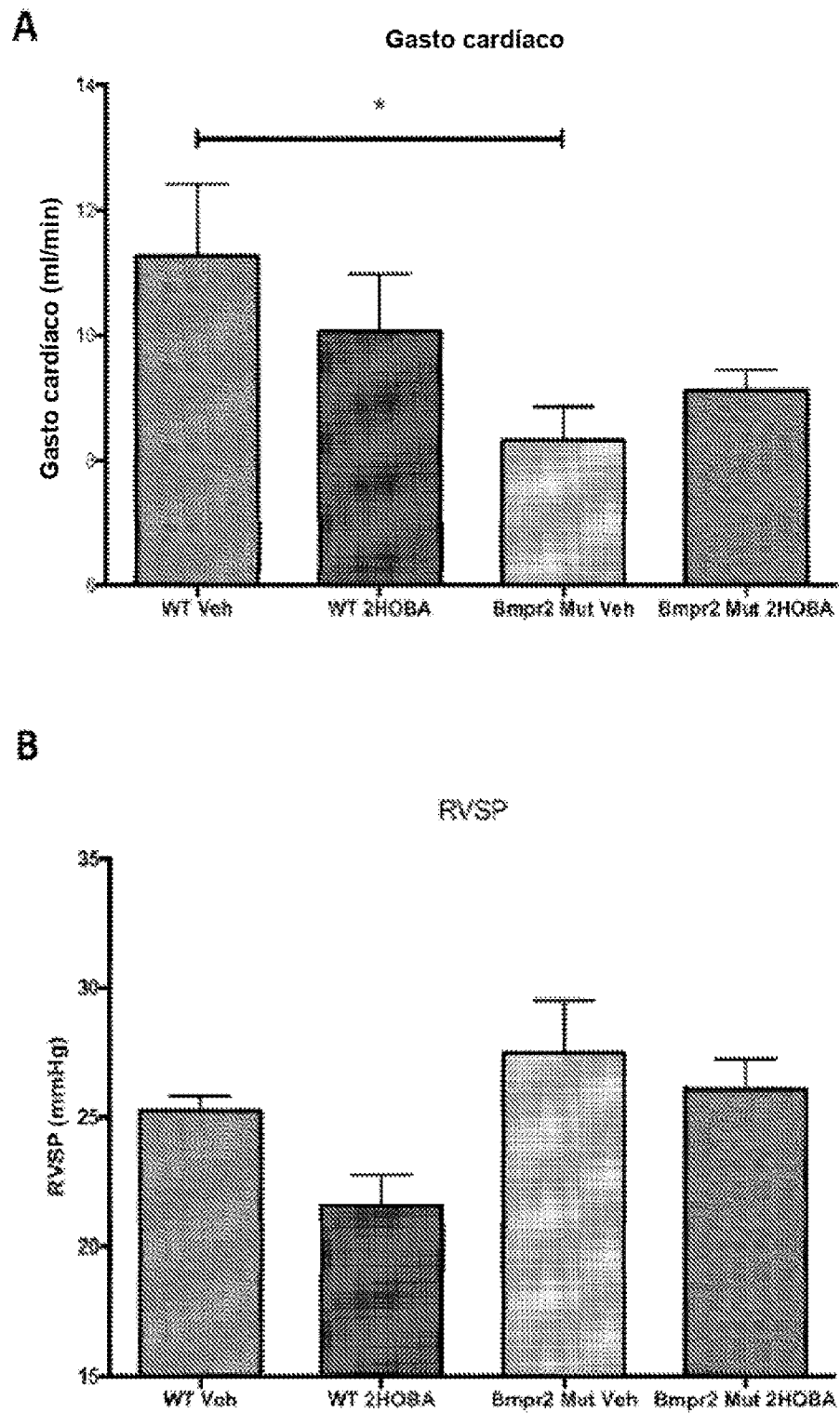


FIGURA 11

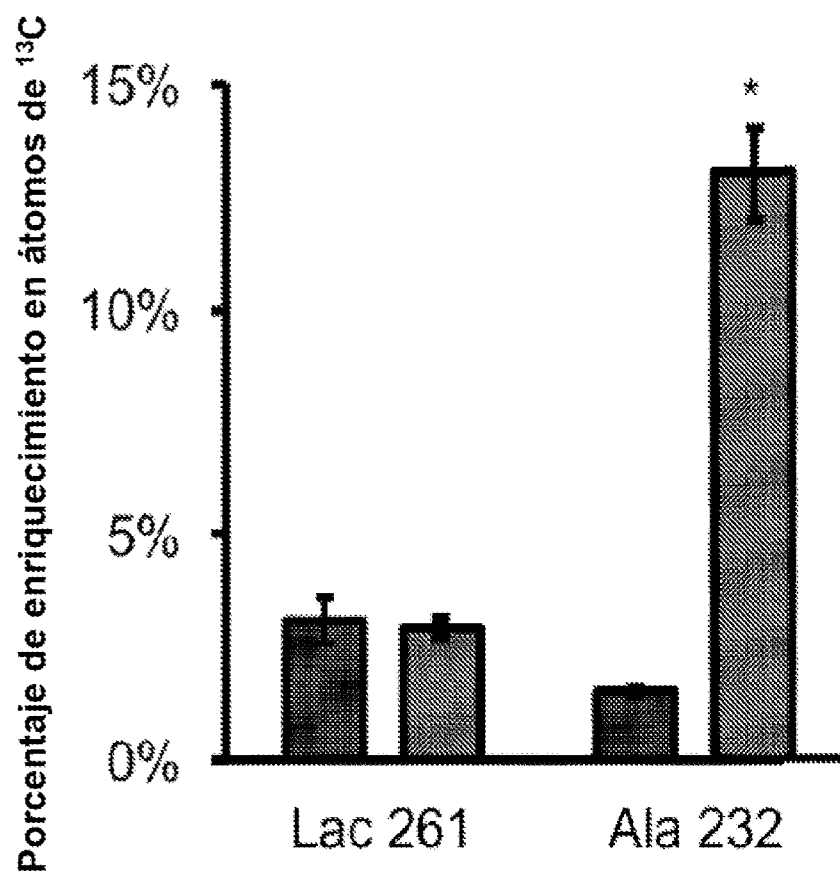


FIGURA 12