

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 382**

51 Int. Cl.:

A61K 31/225 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)
A61K 31/194 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2015 PCT/US2015/015304**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2015 WO15123229**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2015 E 15749364 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2024 EP 3104852**

54 Título: **Composiciones y métodos para tratar el envejecimiento y enfermedades y síntomas relacionados con la edad**

30 Prioridad:

12.02.2014 US 201461939092 P
19.03.2014 US 201461955463 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.12.2024

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US

72 Inventor/es:

HUANG, JING;
CHIN, RANDALL;
DIEP, SIMON;
PAI, MELODY Y.;
LOMENICK, BRETT E.;
FU, XUDONG;
REUE, KAREN;
VERGNES, LAURENT;
JUNG, MICHAEL E.;
DENG, GANG;
HWANG, HEEJUN y
JIANG, MEISHENG

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 992 382 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

Composiciones y métodos para tratar el envejecimiento y enfermedades y síntomas relacionados con la edad

5 Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere al tratamiento del envejecimiento y de las enfermedades relacionadas con la edad.

2. Descripción de la técnica relacionada

El metabolismo y el envejecimiento están íntimamente relacionados. En comparación con la alimentación a libre demanda, la restricción dietética (RD) o la restricción calórica (RC) prolongan sistemáticamente la esperanza de vida y retrasan las enfermedades relacionadas con el envejecimiento en organismos evolutivamente diversos. Condiciones similares de limitación de nutrientes y perturbaciones genéticas o farmacológicas del metabolismo de los nutrientes o la energía también tienen beneficios para la longevidad. Se han identificado varios compuestos que modulan el envejecimiento con mecanismos moleculares en gran medida indefinidos.

La patente WO 2009/005464 describe el uso de alfa-cetoglutarato, amidas, y sales y mezclas de los mismos para la fabricación de una preparación farmacéutica o un suplemento alimenticio o alimento para la mejora terapéutica in vivo de la elasticidad de los vasos sanguíneos.

La patente WO2015/049365 describe la inducción de la autofagia en una célula que comprende poner en contacto la célula con al menos un agente agotador de acetil-CoA (AcCoA).

Sin embargo, todavía existe la necesidad de tratamientos para enfermedades relacionadas con la edad, que incluye cáncer, diabetes, y enfermedades cardiovasculares, y para prolongar la esperanza de vida de los sujetos.

30 Resumen de la invención

La presente invención se expone en las reivindicaciones adjuntas.

En algunas realizaciones, el uno o más compuestos se administran en una cantidad efectiva o en una cantidad terapéuticamente efectiva. En algunas realizaciones, la cantidad efectiva o la cantidad terapéuticamente efectiva del uno o más compuestos se administra como varias dosis durante un período de tiempo dado, p. ej., una dosis diaria durante una semana o más. En algunas realizaciones, la cantidad del uno o más compuestos administrados al sujeto aumenta los niveles de α -cetoglutarato en el sujeto en aproximadamente un 30-60 %, preferiblemente aproximadamente un 45-55 %, más preferiblemente aproximadamente un 50 %. En algunas realizaciones, el compuesto se administra como una dosis diaria de aproximadamente 0,25-2, preferiblemente aproximadamente 0,5-2, más preferiblemente aproximadamente 1-2, con la máxima preferencia aproximadamente 2 gramos por kilogramo de peso del sujeto por día. En algunas realizaciones, el sujeto es un animal, que puede ser o no un modelo animal de envejecimiento o una enfermedad relacionada con la edad. En algunas realizaciones, el sujeto es un nematodo, un roedor, o un primate no humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, la ATP sintasa es ATP sintasa de mamíferos, ATP sintasa humana, ATP sintasa mitocondrial de mamíferos, o ATP sintasa mitocondrial humana.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto de glutarato o un compuesto de glutamato para usar en inhibir, reducir, retrasar, o prevenir el envejecimiento de un sujeto; tratar, inhibir, reducir, o prevenir una enfermedad relacionada con la edad en el sujeto; y/o aumentar la esperanza de vida del sujeto. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de glutarato o un compuesto de glutamato. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de glutarato y un compuesto de glutamato. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de α -KG. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de 2-HG. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de α -KG y un compuesto de 2-HG. En algunas realizaciones, el compuesto se proporciona en una cantidad efectiva o en una cantidad terapéuticamente efectiva. En algunas realizaciones, el medicamento se proporciona como dosis divididas. En algunas realizaciones, la cantidad efectiva o la cantidad terapéuticamente efectiva se proporciona como dosis divididas. En algunas realizaciones, el sujeto es un animal, que puede ser o no un modelo animal de envejecimiento o una enfermedad relacionada con la edad. En algunas realizaciones, el sujeto es un nematodo, un roedor, o un primate no humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, la ATP sintasa es ATP sintasa de mamíferos, ATP sintasa humana, ATP sintasa mitocondrial de mamíferos, o ATP sintasa mitocondrial humana.

Tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son únicamente ejemplares y explicativas y están destinadas a proporcionar una explicación adicional de la invención tal como se reivindica. Los dibujos adjuntos se incluyen para proporcionar una mejor comprensión de la invención y se incorporan y forman parte de esta

especificación, ilustran varias realizaciones de la invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

Descripción de los dibujos

Esta invención se entiende mejor haciendo referencia a los dibujos en donde:

la figura 1, paneles a-f, muestra que a-KG prolonga la esperanza de vida de *C. elegans* adultos.

La figura 2, paneles a-i, muestra que a-KG se une a e inhibe la ATP sintasa.

La figura 3, paneles a-g, muestra que la longevidad de a-KG está mediada por ATP sintasa y el eje DR/TOR.

La figura 4, paneles a-e, muestra que la inhibición de ATP sintasa por a-KG provoca una disminución conservada de la actividad de la vía TOR.

La figura 5, paneles a-h, muestra que la suplementación con a-KG prolonga la esperanza de vida de *C. elegans* adultos, pero no cambia la tasa de crecimiento de las bacterias, o la ingesta de alimentos, la velocidad de bombeo faríngeo, ni el tamaño de las crías de los gusanos. En el panel h, las primeras barras de cada conjunto son el vehículo.

La figura 6, paneles a-h, muestra que a-KG se une a la subunidad b de ATP sintasa e inhibe la actividad del complejo V, pero no de los otros complejos de ETC.

La figura 7, paneles a-c, muestra que el tratamiento con oligomicina prolonga la esperanza de vida de *C. elegans* y mejora la autofagia de una manera que depende de *let-363*.

La figura 8, paneles a-b, muestra los análisis de estrés oxidativo en gusanos tratados con iARN de a-KG o *atp-2*.

La figura 9, paneles a-c, muestra la esperanza de vida de a-KG en ausencia de *aak-2*, *daf-16*, *hif-1*, *vhl-1* o *egl-9*.

La figura 10, paneles a-f, muestra que a-KG disminuye la actividad de la vía TOR, pero no interactúa directamente con TOR.

La figura 11, paneles a-b, muestra que la autofagia está mejorada en *C. elegans* tratados con iARN de *ogdh-1*.

La figura 12 es una tabla que muestra proteínas enriquecidas en la muestra de α -KG de DARTS. Solo se muestran aquellas proteínas con al menos 15 espectros en una muestra de α -KG y enriquecidas al menos 1,5 veces.

La figura 13 es una tabla que resume los datos de esperanza de vida de los experimentos con α -KG.

La figura 14, paneles A-C, muestra que 2-HG prolonga la esperanza de vida de *C. elegans* adultos.

La figura 15, paneles A-D, muestra que 2-HG se une a e inhibe la ATP sintasa. En el panel B, los puntos de datos superiores son vehículos, los puntos de datos intermedios son (R)-2-HG de octilo, y los puntos de datos inferiores son (S)-2-HG de octilo.

La figura 16, paneles A-E, muestra la inhibición de ATP sintasa en células IDH1(R132H).

La figura 17A muestra células U87/IDH1(R132H) tienen sensibilidad aumentada a la falta de glucosa ($***P < 0,001$). La línea superior es IDH1(WT).

La figura 17B muestra que las células U87 tratadas con α -KG de octilo exhiben una viabilidad disminuida a la falta de glucosa ($****P < 0,0001$). A la derecha, las líneas de arriba a abajo son 0 μ M, 400 μ M y 800 μ M.

La figura 17C muestra que las células U87 tratadas con (R)-2-HG de octilo exhiben una viabilidad disminuida a la falta de glucosa ($****P < 0,001$). A la derecha, las líneas de arriba a abajo son 0 μ M, 400 μ M y 800 μ M.

La figura 17D muestra que las células U87 tratadas con (S)-2-HG de octilo exhiben una viabilidad disminuida a la falta de glucosa ($*P < 0,05$). A la derecha, las líneas de arriba a abajo son 0 μ M, 400 μ M y 800 μ M.

La figura 17E muestra que la inactivación de ATP5B inhibe el crecimiento de las células U87 ($***P = 0,0004$). La primera línea es el control.

La figura 17F muestra células HCT 116 IDH1(R132H/+) que exhiben una vulnerabilidad aumentada al medio sin glucosa suplementado con (R)-3-hidroxibutirato ($***P < 0,001$). Mediante una prueba t no apareada, varianza desigual

con dos colas y dos muestras. La media $\pm$ s.d. se representa gráficamente en todos los casos. La línea superior es IDH1(+/+).

La figura 17G muestra que las células U87 con la inactivación de ATP5B exhiben una actividad disminuida del complejo 1 de mTOR en un medio sin glucosa que contiene galactosa.

La figura 17H muestra que las células U87 tratadas con análogos hidrolizables por esterasa permeables a la membrana de α -KG o 2-HG exhiben una actividad disminuida del complejo 1 de mTOR en un medio sin glucosa que contiene galactosa.

La figura 17I muestra que las células U87 que expresan de forma estable IDH1 (R132H) exhiben una actividad disminuida del complejo 1 de mTOR en un medio sin glucosa que contiene galactosa.

La figura 18, paneles A-B, muestra que 2-HG no afecta al flujo de electrones a través de la cadena de transporte de electrones y no afecta a la importación de ADP. En el panel A, los puntos de datos superiores son vehículos, los puntos de datos intermedios son (R)-2-HG de octilo, y los puntos de datos inferiores son (S)-2-HG de octilo.

La figura 19, paneles A-C, muestra que 2-HG inhibe la respiración celular.

La figura 20, paneles A-D, muestra los perfiles energéticos y metabólicos celulares de las células acumuladas de 2-HG. En los paneles C y D, las primeras barras de cada conjunto son el vehículo.

La figura 21, paneles A-B, muestra que las células HCT 116 IDH1 (R132H/+) exhiben vulnerabilidad metabólica e inhibición del crecimiento. En el panel A, ** es IDH1(R132H/+); y el panel B, ** es IDH1(R132H/+).

La figura 22, paneles A-E, muestra la inhibición del crecimiento celular tras la inactivación de ATP5B, el tratamiento con α -KG de octilo u 2-HG de octilo, o la mutación IDH1(R132H). En el panel A, * es ARNip de ATP5b; el panel B, *** es de 400 μ M y **** es de 800 μ M; el panel C, *** es de 400 μ M y ** es de 800 μ M; el panel D, *** es de 400 μ M y ** es de 800 μ M; y el panel E** es IDH1(R132H).

La figura 23 son gráficos que muestran que α -KG de octilo (200 μ M) abolió por completo la hipertrofia inducida por ISO (isoproterenol) (panel izquierdo), así como suprimió la sobreexpresión inducida por ISO y (fenilefrina) PE (panel superior derecho) de ANF (factor natriurético auricular) (panel central), y BNP (péptido natriurético cerebral) (panel derecho).

La figura 24 es un gráfico de OCR que muestra que las mitocondrias aisladas de los corazones de ratones alimentados con α -KG (S1, S2) exhibieron una respiración en el estado 3 más baja en comparación con la de los ratones de control (C1, C2). En el estado 3u, los puntos de datos de arriba a abajo son C2, C1, S2, y S3.

La figura 25 son gráficos que muestran el efecto cardioprotector de α -KG *in vivo*.

Las versiones en color de varios de estos dibujos se pueden encontrar en Chin, y col., (2014) Nature 510:397-401 y en las figuras de datos ampliadas relacionadas con los mismos.

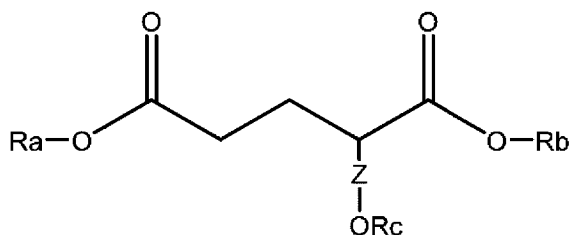
Descripción detallada de la invención

En algunas realizaciones, la presente invención se dirige a composiciones para usar en el tratamiento o la inhibición del envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad en un sujeto, dichas composiciones comprenden al menos un compuesto de glutarato, al menos un compuesto de glutamato, o ambos. En algunas realizaciones, la presente invención se dirige a composiciones para aumentar la esperanza de vida de un sujeto, dichas composiciones comprenden al menos un compuesto de glutarato, al menos un compuesto de glutamato, o ambos. En algunas realizaciones, el sujeto es un animal, que puede ser o no un modelo animal de envejecimiento o una enfermedad relacionada con la edad. En algunas realizaciones, el sujeto es un nematodo, un roedor, o un primate no humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

Tal como se utiliza en la presente memoria, “enfermedades relacionadas con la edad” se refiere a enfermedades y trastornos frecuentemente asociados con el envejecimiento e incluye cánceres (p. ej., gliomas, leucemia, linfoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, y similares), enfermedades neurodegenerativas (p. ej., enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, demencia, y similares), sarcopenia, osteopenia, osteoporosis, artritis, aterosclerosis, enfermedad cardiovascular, hipertensión, cataratas, presbicia, glaucoma, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, alopecia, inflamación crónica, inmunosenescencia, deterioro visual relacionado con la edad, pérdida de cabello relacionada con la edad, adelgazamiento y/o encanecimiento, y similares. Como se utiliza en la presente memoria, una “afección cardíaca relacionada con la edad” se refiere a hipertrofia cardíaca, miocardiopatía, insuficiencia cardíaca, hipertrofia cardíaca, miocardiopatía, insuficiencia cardíaca, y enfermedad cardiovascular.

Como se utiliza en la presente memoria, los métodos y composiciones que tratan o inhiben el “envejecimiento” en sujetos son aquellos que tratan o inhiben los síntomas relacionados con el envejecimiento. Los síntomas relacionados con el envejecimiento incluyen cánceres, acumulación de colesterol, endurecimiento de la pared arterial, aumento de la presión arterial, inmunosenescencia, pérdida muscular, pérdida de masa ósea, artritis, osteoporosis, pérdida de memoria, pérdida de la audición, deterioro visual, aumento de las arrugas, caída/adegazamiento/encanecimiento del

Tal como se utiliza en la presente memoria, un “compuesto de glutarato” se refiere a compuestos de α -KG, compuestos de 2-HG y compuestos que tienen la siguiente fórmula estructural I:



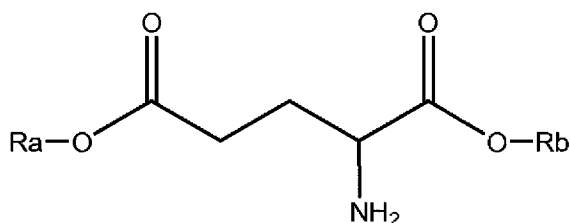
en donde

Ra y Rb son cada uno independientemente una carga negativa, H, un alquilo C1-C10 lineal o ramificado, o un alquenilo C1-C10 lineal o ramificado, y

Rc está presente opcionalmente, y si está presente, Rc es H, un alquilo C1-C10 lineal o ramificado, o un alquenilo C1-C10 lineal o ramificado, y si está ausente, Z es un doble enlace,

y solvatos, sales, profármacos y metabolitos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un “compuesto de glutamato” se refiere a compuestos que tienen la siguiente fórmula estructural II:



en donde

Ra y Rb son cada uno independientemente una carga negativa, H, un alquilo C1-C10 lineal o ramificado, o un alquenilo C1-C10 lineal o ramificado, y

y solvatos, sales, profármacos y metabolitos farmacéuticamente aceptables de los mismos. Dado que α -KG se puede producir anapleróticamente a partir del glutamato mediante desaminación oxidativa utilizando glutamato deshidrogenasa, y como producto de reacciones de transaminación dependientes del fosfato de piridoxal donde el glutamato es un donante de aminos común, el glutamato es un profármaco de α -KG.

Como se utiliza en la presente memoria, un “alquilo C1-C10” se refiere a un alquilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, y un “alquenilo C1-C10” se refiere a un alquenilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un “compuesto de α -KG” se refiere a α -cetoglutarato (α -cetoglutarato), derivados de α -cetoglutarato (p. ej., los derivados establecidos en MacKenzie, y col. (2007) Mol Cell Biol 27(9):3282-3289), análogos de α -cetoglutarato (p. ej., análogos de fosfonato (p. ej., los citados en Bunik, y col. (2005) Biochemistry 44(31):10552-61), ésteres de α -cetoglutarato (p. ej., α -cetoglutarato de dimetilo y α -cetoglutarato de octilo), y diversos análogos específicos de especies, p. ej., α -cetoglutarato humano, α -cetoglutarato porcino, α -cetoglutarato murino, α -cetoglutarato bovino, y similares. Tal como se utiliza en la presente memoria, la abreviatura “KG” puede utilizarse para referirse al término “cetoglutarato”, p. ej., α -cetoglutarato se abrevia como α -KG.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un “compuesto de 2-HG” se refiere a ácido 2-hidroxi-glutarico, 2-hidroxipentanodioato, y compuestos que tienen 2-hidroxipentanodioato como parte de su estructura principal e incluye 1-alquil-(S)-2-hidroxipentanodioato, 1-alquil-(R)-2-hidroxipentanodioato, 1-alquenil-(S)-2-hidroxipentanodioato, 1-alquenil-(R)-2-hidroxipentanodioato, 5-alquil-(S)-2-hidroxipentanodioato, 5-alquil-(R)-2-hidroxipentanodioato, 5-alquenil-(S)-2-hidroxipentanodioato y 5-alquenil-(R)-2-hidroxipentanodioato, en donde el alquilo es un alquilo C1-C10 lineal o ramificado y el alquenilo es un alquenilo C1-C10 lineal o ramificado. En algunas realizaciones, el compuesto de 2-HG es 1-octil-(S)-2-hidroxipentanodioato, 1-octil-(R)-2-hidroxipentanodioato, 5-octil-(S)-2-hidroxipentanodioato, o 5-octil-(R)-2-hidroxipentanodioato. Tal como se utiliza en la presente memoria, la abreviatura “HG” puede utilizarse para referirse al término “hidroxipentanodioato”, p. ej., 2-hidroxipentanodioato se abrevia como 2-HG.

Un “solvato farmacéuticamente aceptable” se refiere a una forma de solvato de un compuesto específico que conserva la efectividad biológica de tal compuesto. Los ejemplos de solvatos incluyen compuestos de la invención en combinación con agua, isopropanol, etanol, metanol, sulfóxido de dimetilo, acetato de etilo, ácido acético, etanolamina, o acetona. Los expertos en la técnica de la química orgánica apreciarán que muchos compuestos orgánicos pueden formar complejos con disolventes en los que reaccionan o a partir de los cuales precipitan o cristalizan. Estos complejos se conocen como “solvatos”. Por ejemplo, un complejo con agua se conoce como “hidrato”. Los solvatos de los compuestos de las fórmulas I y II están dentro del alcance de la invención. Los expertos en química orgánica también apreciarán que muchos compuestos orgánicos pueden existir en más de una forma cristalina. Por ejemplo, la forma cristalina puede variar de un solvato a otro. Por lo tanto, todas las formas cristalinas de los compuestos de las fórmulas I y II o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos están dentro del alcance de la presente invención.

El término “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a formas de sal que son farmacológicamente aceptables y sustancialmente no tóxicas para el sujeto que se trata con el compuesto de la invención. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácidos o sales de adición de bases convencionales formadas a partir de ácidos orgánicos o inorgánicos o bases inorgánicas no tóxicos adecuados. Las sales de adición de ácido ejemplares incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido sulfámico, ácido fosfórico, y ácido nítrico, y las derivadas de ácidos orgánicos tales como ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido etanodisulfónico, ácido isetiónico, ácido oxálico, ácido p-bromofenilsulfónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido acético, ácido fenilacético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido esteárico, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido glutámico, ácido salicílico, ácido sulfanílico, y ácido fumárico. Las sales de adición de bases ejemplares incluyen las derivadas de hidróxidos de amonio (p. ej., un hidróxido de amonio cuaternario tal como hidróxido de tetrametilamonio), las derivadas de bases inorgánicas tales como hidróxidos de metales alcalinos o alcalinotérreos (p. ej., sodio, potasio, litio, calcio, o magnesio), y las derivadas de bases orgánicas no tóxicas, tales como aminoácidos básicos.

Un “profármaco farmacéuticamente aceptable” es un compuesto que se puede convertir en condiciones fisiológicas o mediante solvolisis en el compuesto especificado o en una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto. “Un metabolito farmacéuticamente activo” se refiere a un producto farmacológicamente activo producido a través del metabolismo en el cuerpo de un compuesto específico o una sal del mismo. Los profármacos y los metabolitos activos de un compuesto pueden identificarse utilizando técnicas rutinarias conocidas en la materia. Véase, p. ej., Bertolini, G. y col, (1997) J. Med. Chem. 40:2011-2016; Shan, D. y col, J. Pharm. Sci., 86(7):765-767; Bagshawe K., (1995) Drug Dev. Res. 34:220-230; Bodor, N., (1984) Advances in Drug Res. 13:224-331; Bundgaard, H., Design of Prodrugs (Elsevier Press, 1985) y Larsen, I. K., Design and Application of Prodrugs, Drug Design and Development (Krogsgaard-Larsen y col., eds., Harwood Academic Publishers, 1991).

En algunas realizaciones, la cantidad del compuesto de glutarato administrada al sujeto es una cantidad terapéuticamente efectiva o una cantidad efectiva. Tal como se utiliza en la presente memoria, una “cantidad efectiva” es una dosis que da como resultado una diferencia observable en comparación con un placebo. Una “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad de uno o más compuestos de la presente invención que, cuando se administra a un sujeto, (i) trata o inhibe la enfermedad, afección, o trastorno particular, (ii) atenúa, mejora, o elimina uno o más síntomas de la enfermedad, afección, o trastorno particular, y/o (iii) inhibe o retrasa la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad, afección particular, o trastorno, en comparación con un control. Una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos de la presente invención variará dependiendo de factores tales como el (los) compuesto(s) dado(s), la formulación farmacéutica, la vía de administración, el tipo de enfermedad o trastorno, el grado de la enfermedad o trastorno, y la identidad del sujeto que se está tratando, pero no obstante puede determinarla fácilmente un experto en la materia. Por ejemplo, una “cantidad terapéuticamente efectiva” de un compuesto de glutarato, un compuesto de glutamato, o ambos es aquella que retrasa o inhibe la aparición de los síntomas relacionados con la edad y/o prolonga la esperanza de vida de un sujeto dado en comparación con uno o más sujetos de control.

En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva del uno o más compuestos de glutarato y/o el uno o más compuestos de glutamato se administra como una dosis diaria de aproximadamente 0,25-2, aproximadamente 0,5-2, aproximadamente 1-2, o aproximadamente 2 gramos, por kilogramo de peso del sujeto por día. El experto en la técnica apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación requerida para tratar efectivamente a un sujeto,

que incluyen, pero no se limitan a, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos anteriores, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes.

- 5 Como se muestra en la presente memoria, las dosis que aumentaron los niveles de α -KG en los sujetos en aproximadamente un 50 % dieron como resultado los mayores aumentos en la esperanza de vida (hasta aproximadamente un 70 %). Por lo tanto, en algunas realizaciones, la cantidad del uno o más compuestos de glutarato y/o el uno o más compuestos de glutamato administrada a un sujeto es una que da como resultado un aumento de aproximadamente el 50 % en los niveles de α -KG en el sujeto.
- 10 La cantidad terapéuticamente efectiva se puede administrar como una dosis única o como dosis múltiples durante un período de tiempo. Por ejemplo, un sujeto puede tratarse con uno o más compuestos de glutarato y/o uno o más compuestos de glutamato al menos una vez. Sin embargo, el sujeto puede tratarse con el uno o más compuestos de glutarato y/o el uno o más compuestos de glutamato de aproximadamente una vez por semana a aproximadamente una vez al día durante un período de tratamiento dado. La duración del período de tratamiento dependerá de una
- 15 variedad de factores tales como la gravedad de la enfermedad o trastorno, la concentración y la actividad del uno o más compuestos de la presente invención, o una combinación de los mismos. También se apreciará que la dosificación efectiva del uno o más compuestos utilizados para el tratamiento puede aumentar o disminuir a lo largo de un tratamiento particular.
- 20 El uno o más compuestos de glutarato y/o el uno o más compuestos de glutamato que se van a administrar a un sujeto se pueden proporcionar como una formulación farmacéutica. Las formulaciones farmacéuticas se pueden preparar en una forma de dosificación unitaria apropiada para el modo de administración deseado. Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía adecuada, incluyendo la oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal, y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa,
- 25 e intradérmica). Se apreciará que la vía de administración puede variar con la afección y la edad del receptor, la naturaleza de la afección que se va a tratar, y el (los) compuesto(s) dado(s) de la presente invención. En algunas realizaciones, la vía de administración es oral. En algunas realizaciones, el uno o más compuestos de glutarato y/o el uno o más compuestos de glutamato se proporcionan en forma de un producto alimenticio.
- 30 Se apreciará que las dosificaciones reales de los compuestos de glutarato y/o los compuestos de glutamato utilizados en las formulaciones farmacéuticas variarán según el (los) compuesto(s) particular(es) que se utilicen, la composición particular formulada, el modo de administración, y el sitio, sujeto y enfermedad particulares que se estén tratando. Los expertos en la técnica pueden determinar las dosificaciones óptimas para un conjunto dado de condiciones utilizando pruebas de determinación de la dosis en vista de los datos experimentales para un compuesto dado. La administración
- 35 de profármacos se puede dosificar a niveles de peso que son químicamente equivalentes a los niveles de peso de las formas completamente activas.
- Las formulaciones farmacéuticas de esta invención comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos de la presente invención, y un portador o diluyente inerte farmacéuticamente aceptable. Tal como se
- 40 utiliza en la presente memoria, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El portador farmacéutico empleado puede ser sólido o líquido. Ejemplos de portadores sólidos son lactosa, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, estearato de magnesio, ácido esteárico, y similares. Ejemplos de portadores líquidos son jarabe, aceite
- 45 de cacahuete, aceite de oliva, agua, y similares. Similarmente, el portador o diluyente puede incluir material de retardo o liberación temporal conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solos o con una cera, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metacrilato de metilo, y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica.
- 50 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos de glutarato y los compuestos de glutamato se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, p. ej., para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y el ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren los compuestos que exhiben índices terapéuticos grandes.
- 55 Si bien se pueden utilizar compuestos que exhiben efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado al diseñar un sistema de suministro que dirija tales compuestos al sitio del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.
- Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y los estudios en animales se pueden utilizar para formular un
- 60 intervalo de dosificación para usar en humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen el ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluya la IC₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de la prueba que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) según lo determinado en el cultivo
- 65

celular. Tal información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

α -KG prolonga la esperanza de vida *C. elegans* adultos

Para obtener información sobre la regulación del envejecimiento por parte de moléculas pequeñas endógenas, se examinaron los efectos de los metabolitos normales y los metabolitos aberrantes asociados a enfermedades en la vida adulta utilizando el modelo de *C. elegans*. Se descubrió que el intermedio α -KG del ciclo de TCA (pero no el isocitrato ni el citrato) retrasa el envejecimiento y prolonga la esperanza de vida de *C. elegans* en aproximadamente un 50 % (figura 1, panel a, figura 5, panel a). En la célula, α -KG (o 2-oxoglutarato, figura 1, panel b) se produce a partir del isocitrato mediante descarboxilación oxidativa catalizada por isocitrato deshidrogenasa (IDH). α -KG prolonga la esperanza de vida de *N2* silvestre de manera dependiente de la concentración, y 8 mM de α -KG produjeron la máxima extensión de esperanza de vida (figura 1, panel c); 8 mM fue la concentración utilizada en todos los experimentos con *C. elegans*. Existe un aumento de aproximadamente 50 % en la concentración de α -KG en los gusanos en las placas de 8 mM de α -KG en comparación con las de las placas de vehículos (figura 5, panel b), o aproximadamente 160 μ M frente a aproximadamente 110 μ M suponiendo una distribución homogénea. El α -KG no solo prolonga la esperanza de vida, sino que también retrasa los fenotipos relacionados con la edad, tal como la disminución del movimiento corporal rápido y coordinado (vídeos complementarios 1 y 2, disponibles en Internet en WorldWideWeb.natureDOTCOM/nature/journal/v510/n7505/fig_tab/nature13264_SV1. HyperTextMarkupLanguage and WorldWideWeb.natureDOTCOM/nature/journal/v510/n7505/fig_tab/nature13264_SV2. HyperTextMarkupLanguage, en donde “WorldWideWeb” es “www”, “DOTCOM” es “.com”, y “HyperTextMarkupLanguage” es “.html”). La suplementación de α -KG en el estado adulto es suficiente para la longevidad (figura 5, panel c).

Se ha demostrado que la dilución o destrucción del alimento bacteriano prolonga la esperanza de vida de gusanos, pero el aumento de la esperanza de vida en α -KG no se debe a una alteración de la proliferación, la viabilidad o el metabolismo de las bacterias (figura 1, paneles d-e, figura 5, panel d). Los animales tampoco consideraron que los alimentos tratados con α -Kg fueran menos favorables (figura 5, paneles e-f), y no hubo cambios significativos en la ingesta de alimentos, el bombeo faríngeo, el comportamiento de búsqueda de alimento, el tamaño corporal, o el tamaño de las crías en presencia de α -KG (figura 5, paneles e-h, no se muestran los datos).

En la célula, α -KG deshidrogenasa (codificada por *ogdh-1*), un punto de control clave en el ciclo de TCA, descarboxila α -KG a succinil-CoA y CO₂. Aumentar los niveles de α -KG por iARN de *ogdh-1* (figura 5, panel b) también prolonga la esperanza de vida de los gusanos (figura 1, panel f), lo que es consistente con un efecto directo de α -Kg en la longevidad independientemente del alimento bacteriano.

Para investigar el (los) mecanismo(s) molecular(es) de longevidad por α -KG, se utilizó el enfoque bioquímico imparcial DARTS. Se utilizó una línea celular humana (Jurkat), que es fácil de cultivar, como fuente de proteína para DARTS (figura 2, panel a). La espectrometría de masas identificó la ATP5B, la subunidad beta del núcleo catalítico de la ATP sintasa, entre las proteínas más abundantes y enriquecidas presentes en la muestra tratada con α -KG (figura 12); la subunidad alfa homóloga ATP5A también se enriqueció, aunque en menor medida. La interacción entre α -KG y ATP5B se verificó utilizando líneas celulares adicionales (figura 2, panel b, los datos no se muestran) y se corroboró para la ATP-2 ortóloga de *C. elegans* (figura 6, panel a).

El α -KG inhibe la actividad del complejo V, pero no del complejo IV, de las mitocondrias del corazón bovino (figura 2, panel c, figura 6, panel b, los datos no se muestran). Esta inhibición también se detecta fácilmente en células de mamíferos vivos (figura 2, panel d, los datos no se muestran) y en nematodos vivos (figura 2, panel e), como lo demuestran los niveles reducidos de ATP. Al mismo tiempo, se reducen las tasas de consumo de oxígeno (figura 2, paneles f-g) de forma similar al escenario con la inactivación de *atp-2* (figura 6, panel c). La inhibición específica del complejo V, pero no de los otros complejos de ETC, por α -KG se confirma además mediante el análisis del control respiratorio (figura 2, panel h, figura 6, paneles d-h).

Para entender el mecanismo de inhibición por α -KG, se estudió la cinética de inhibición enzimática de ATP sintasa. El α -KG (liberado de α -KG de octilo) disminuye tanto el $V_{\max}$ como el K_m efectivos de ATP sintasa, lo que indica una inhibición no competitiva (figura 2, panel i).

Para determinar la importancia de ATP-2 para la longevidad de α -KG, se midió la esperanza de vida de los adultos con *atp-2(iARN)* que recibieron α -KG. Los animales con *atp-2(iARN)* viven más tiempo que los controles (figura 3, panel a). Sin embargo, su esperanza de vida no se prolonga además con α -KG (figura 3, panel a), lo que indica que ATP-2 participa en el beneficio de longevidad de α -KG. Por el contrario, la esperanza de vida de los gusanos mutantes *daf-2(e1370)* del receptor de insulina/IGF-1, aún más longevos, aumenta además por α -KG (figura 3, panel b). Sorprendentemente, la oligomicina, un inhibidor de la ATP sintasa, también prolonga la esperanza de vida de los gusanos adultos (figura 7, panel a). En conjunto, la unión directa de ATP-2 por α -KG, la inhibición enzimática relacionada, la reducción de los niveles de ATP y el consumo de oxígeno, el análisis de la esperanza de vida, y otras similitudes (véase también la figura 8) con la inactivación de *atp-2* o el tratamiento con oligomicina demuestran que α -KG probablemente prolonga la esperanza de vida al dirigirse a ATP-2.

Se descubrió que α -KG no prolonga la esperanza de vida de los animales con *eat-2(ad1116)* (figura 3, panel c), que es un modelo de DR con problemas de bombeo faríngeo y, por lo tanto, una ingesta reducida de alimentos. La longevidad de los mutantes *eat-2* implica *TOR/let-363*, un importante mediador de los efectos de DR en la longevidad. Del mismo modo, α -KG no aumenta la esperanza de vida de los animales *CeTOR (iARN)* (figura 3, panel d). La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) es otro sensor importante conservado del estado energético celular. Tanto AMPK/*aak-2* como el factor de transcripción FoxO DAF-16 median la longevidad inducida por DR en *C. elegans* se alimenta con bacterias diluidas, pero ninguno de los dos es necesario para prolongar la esperanza de vida en el modelo *eat-2*. Se encontró que, en los mutantes *aak-2* (figura 9, panel a) y *daf-16* (figura 3, panel e), el efecto de longevidad de α -KG es menor que en N2 ($P < 0,0001$), lo que sugiere que la longevidad de α -KG involucra parcialmente a AMPK y FoxO; no obstante, la esperanza de vida aumenta significativamente con α -KG en animales con iARN o mutantes *aak-2* (24,3 %, $P < 0,0001$) y *daf-16* (29,5 %, $P < 0,0001$) (figura 3, panel e, figura 9, paneles a-b, los datos no se muestran), lo que indica un efecto independiente de AMPK-FoxO por parte de α -KG en la longevidad.

La incapacidad de α -KG para prolongar aún más la esperanza de vida de los animales con *CeTOR(iARN)* indica que el tratamiento con α -KG y la inactivación de TOR prolongan la esperanza de vida, ya sea por la misma vía (con α -KG actuando sobre TOR o corriente arriba de TOR), o mediante mecanismos independientes o vías paralelas que convergen en un efector descendente. El primer modelo predice que la vía TOR será menos activa tras el tratamiento con α -KG, mientras que si el último modelo fuera cierto, TOR no se vería afectada por el tratamiento con α -KG. En apoyo del primer modelo, se descubrió que la actividad de la vía TOR disminuye en células humanas tratadas con α -KG de octilo (figura 4, panel a, figura 10, paneles a-b). Sin embargo, α -KG no interactúa directamente con TOR (figura 10, paneles d-e). Según la participación de TOR en la longevidad de α -KG, el factor de transcripción FoxA PHA-4 también participa en la longevidad inducida por α -KG (figura 3, pf). Además, la autofagia, que se activa tanto por la inhibición de TOR como por DR, aumenta notablemente en los gusanos tratados con α -KG (o iARN de *ogdh-1*) y en los animales con *atp-2 (iARN)* (figura 4, paneles b-c, figura 10, panel c, figura 11), como lo indica la prevalencia de puntos de GFP::LGG-1. La autofagia también se indujo en células de mamíferos tratadas con α -KG de octilo (figura 10, panel f). Además, α -KG no produce una autofagia significativamente mayor en los gusanos *atp-2 (iARN)* o *CeTOR(iARN)* (figura 4, paneles b-c). Los datos proporcionan además pruebas de que α -KG disminuye la actividad de la vía TOR mediante la inhibición de ATP sintasa. Similarmente, la autofagia es inducida por oligomicina, y la oligomicina no aumenta la autofagia en los gusanos *CeTOR(iARN)* (figura 7, paneles b-c).

EL α -KG no es solo un metabolito, sino también un cosustrato para una gran familia de dioxigenasas. El factor inducible por hipoxia (HIF-1) es modificado por una de estas enzimas, la prolil 4-hidroxilasa (PHD) EGL-9, y posteriormente es degradado por la proteína von Hippel-Lindau (VHL). Se descubrió que α -KG prolonga la esperanza de vida de los animales con mutaciones con pérdida de función en *hif-1*, *egl-9* y *vhl-1* (figura 3, panel g, figura 9, panel c) y, por lo tanto, sugiere que esta vía no desempeña un papel importante en la prolongación de la esperanza de vida del α -KG. Sin embargo, otras dianas de unión de α -KG también pueden influir en la prolongación de la esperanza de vida.

Se examinaron los efectos protectores de α -KG de octilo contra la hipertrofia inducida por el isoproterenol en cardiomiocitos de rata neonatales aislados. Los cardiomiocitos de ratas neonatales se aislaron mediante digestión con colagenasa y se cultivaron durante la noche en DMEM que contenía suero fetal de ternera (FCS, por sus siglas en inglés) al 10 %, y después el medio de cultivo se cambió por insulina-transferrina-selenito de sodio (ITS) sin suero con alto contenido de glucosa. La hipertrofia de los cardiomiocitos se indujo tratando las células con 1 mM de isoproterenol (ISO) o fenilefrina (PE) durante 48 horas. Como se muestra en la figura 23, α -KG de octilo (200 μ M) abolió por completo la hipertrofia inducida por ISO (panel izquierdo) y suprimió la sobreexpresión inducida por ISO y PE (panel derecho) de los marcadores asociados a la hipertrofia, el factor natriurético auricular (ANF, por sus siglas en inglés) y el péptido natriurético cerebral (BNP, por sus siglas en inglés), lo que indica un efecto cardioprotector y antihipertrofia de α -KG.

Para comprobar la biodisponibilidad y disponibilidad oral de α -KG de octilo en animales, se les administró α -KG de octilo y se evaluó si los efectos moleculares y celulares de α -KG de octilo podían recapitularse *in vivo*, en particular su inhibición de la actividad de la ATP sintasa mitocondrial (complejo V). Los ratones fueron alimentados con una dieta de pienso premezclada con α -KG de octilo (1,5 mg/g de peso corporal) u octanol (control) durante una semana. Los animales no mostraron ninguna anomalía ni fisiológica ni conductual después de 5 días de alimentación con α -KG de octilo u octanol. Los ratones se sacrificaron, se extrajeron los corazones, y se aislaron las mitocondrias. La tasa de consumo de oxígeno (OCR, por sus siglas en inglés) se midió utilizando un analizador Seahorse XF-24 (Seahorse Bioscience). Como se muestra en la figura 24, las mitocondrias aisladas de ratones alimentados con α -KG (S1, S2) exhibieron una respiración en estado 3 más baja en comparación con las de los ratones de control (C1, C2), reflejando directamente los efectos de α -KG de octilo en las mitocondrias aisladas. La disminución en la respiración en estado 3 en ratones alimentados con α -KG de octilo indica que α -KG de octilo puede tomarse, distribuirse y absorberse en el cuerpo para liberar α -KG para que actúe sobre su diana celular.

Se examinó el efecto cardioprotector de α -KG *in vivo*. La hipertrofia y la insuficiencia cardíaca se indujeron mediante infusión crónica de isoproterenol durante 3 semanas a una dosis de 30 μ g por gramo de peso corporal al día utilizando minibombas osmóticas (Alzet, modelo 1004). Para este estudio se utilizaron ratones hembra DBA2/J de 8 semanas de edad. Los ratones fueron alimentados con α -KG de octilo a razón de 0,5 mg/g de peso corporal al día en forma de pienso durante las tres semanas del estudio. La hipertrofia cardíaca y la miocardiopatía inducidas por ISO se

determinaron al final del experimento evaluando el tamaño del corazón y la relación entre el corazón y el peso corporal. Como se muestra en el panel izquierdo de la figura 25, al final del experimento, la relación corazón (mg)/cuerpo (g) es de $5,32 \pm 0,26$ ($n = 4$) para el grupo de control, $7,26 \pm 0,12$ ($n = 3$) para el grupo tratado con ISO y octanol, y $6,81 \pm 0,24$ ($n = 6$) (media, STEDV) para el grupo tratado con ISO y α -KG de octilo. Los ratones tratados con ISO mostraron un marcado aumento en el tamaño del corazón y la relación entre corazón y peso corporal, mientras que los ratones tratados con ISO, cuando también fueron tratados con α -KG de octilo, exhibieron una reducción significativa del tamaño del corazón y de la relación entre el corazón y el peso corporal.

Más importante, se evaluó el gasto cardíaco y se determinaron las fracciones de eyección cardíaca mediante ecocardiografía. La FE cardíaca para los niveles basales antes del tratamiento es $55,1 \% \pm 2,6$ ($n = 14$). Como se muestra en el panel derecho de la figura 25, al final del estudio (3 semanas), las EF cardíacas fueron del $54,5 \% \pm 0,9$ para el grupo de control sin ISO ($n = 2$), del $49,2 \% \pm 1,9$ para el grupo tratado con ISO (con octanol) ($n = 3$), y del $53,8 \% \pm 2,3$ para el tratado con ISO más α -KG de octilo ($n = 6$). La FE del grupo de control (sin ISO, más octanol) después de tres semanas es comparable a la basal antes del tratamiento. La FE del grupo tratado con ISO se reduce significativamente en comparación con el grupo sin ISO. Sorprendentemente, la FE del ISO más el α -KG de octilo se restablece a los niveles del grupo sin ISO. Estos resultados muestran que α -KG puede reducir significativamente la hipertrofia cardíaca inducida por ISO y restablecer el gasto cardíaco en un modelo animal experimental de insuficiencia cardíaca.

2-HG prolonga la esperanza de vida de los *C. elegans* adultos

Aunque 2-HG exhibe una similitud estructural con α -KG (figura 14, panel A), el 2-HG se asocia con trastornos neurológicos, cáncer y diversas enfermedades relacionadas con la edad. Por lo tanto, se realizaron varios experimentos con 2-HG para determinar si el 2-HG provoca una disminución de la longevidad. Sorprendentemente, tanto (R)-2-HG como (S)-2-HG aumentan la esperanza de vida de *C. elegans* en una medida comparable a α -KG (figura 14, panel B-C).

El análisis DARTS muestra que 2-HG se dirige a ATP5B. Específicamente, se encontró que tanto (R)-2-HG como (S)-2-HG se unen a ATP5B (figura 15, panel A, y los datos no se muestran). Al igual que α -KG, el 2-HG inhibe la ATP sintasa (Complejo V) (figura 15, panel B). Esta inhibición es específica ya que 2-HG no inhibe otros complejos de cadena de transporte de electrones (ETC) (figura 18, panel A) ni la importación de ADP a las mitocondrias (figura 18, panel B). La inhibición de ATP sintasa por 2-HG también se detecta fácilmente en las células vivas; el tratamiento de las células del glioblastoma U87 (IDH1/2 silvestre) con ésteres octílicos permeables a la membrana de α -KG o 2-HG da como resultado un contenido de ATP celular disminuido en condiciones de fosforilación oxidativa mitocondrial (figura 15, panel C), al igual que con el inhibidor bien establecido de la ATP sintasa oligomicina (figura 19, panel A). Las tasas de consumo de oxígeno total y vinculado a la ATP sintasa disminuyen en las células tratadas (figura 15, panel D y figura 19, panel B-C).

En concentraciones celulares normales de aproximadamente $200 \mu\text{M}$, es poco probable que (R)-2-HG cause una inhibición significativa de la ATP sintasa. Sin embargo, en pacientes con glioma con las mutaciones IDH1 o IDH2 donde (R)-2-HG se acumula entre 10 y 100 veces los niveles endógenos naturales, sería posible la inhibición de la ATP sintasa. Para probar esta idea, se utilizaron células U87 que expresan de manera estable la IDH1 (R132H), la mutación de la IDH más común en el glioma. De manera similar a las células tratadas con 2-HG de octilo descritas anteriormente, las células U87/IDH1 (R132H) exhibieron un contenido de ATP y tasas de consumo de oxígeno reducidas en comparación con las células U87 isogénicas que expresan IDH1(WT) (Figura 16, paneles A-B). Se obtuvieron resultados similares en células HCT 116 IDH1(R132H/+) (figura 20, panel A). Los niveles intracelulares de (l)-2-HG son aproximadamente 50-100 veces más altos en las células U87 y HCT 116 que expresan IDH1 (R132H) que en las células de control (figura 16, panel C, y figura 20, panel B), y son comparables al aumento en los niveles de (R)-2-HG encontrado en las células con tratamiento con (R)-2-HG de octilo (figura 16, panel D) y muestras de tumores mutantes de IDH1. Estos datos son consistentes con la inhibición de la ATP sintasa y la respiración mitocondrial por (R)-2-HG en las células cancerosas IDH1 mutantes.

El metabolito 2-HG está vinculado al ciclo de TCA y a las vías metabólicas de los aminoácidos relacionadas (figura 16, panel E). Para explorar los posibles cambios metabólicos tras el tratamiento con 2-HG de octilo, se midieron los niveles de metabolitos en las células tratadas con 2-HG de octilo mediante LC-MS. Se encontró que 2-HG se acumula aproximadamente 20-100 veces después del tratamiento con 2-HG de octilo (figura 16, panel D, y figura 20, panel C). En comparación con la acumulación de 2-HG, no existe cambio dramático (< 2 veces) en metabolitos de ciclo de TCA o aminoácidos relacionados (figura 16, panel D, y figura 20, panel C). Similarmente, en las muestras tratadas con α -KG de octilo, la acumulación de α -KG es el cambio más profundo en el perfil metabólico (figura 20, panel D). El perfil metabólico estático apoya la idea de que el cambio bioenergético (y el cambio de señalización, véase más adelante) observado en las células tratadas con 2-HG (o α -KG) es el resultado de la inhibición directa de ATP sintasa por 2-HG (o α -KG) y no de los efectos metabólicos globales.

Como componente final (complejo V) de la cadena de transporte de electrones (ETC, por sus siglas en inglés) mitocondrial, la ATP sintasa es una fuente importante de energía celular y el único sitio para la fosforilación oxidativa. Cuando se inhibe la glucólisis, tal como en condiciones de insuficiencia de glucosa, las células se ven obligadas a

5 depender de la respiración mitocondrial como fuente de ATP. La inhibición inherente de la ATP sintasa y la respiración
mitocondrial en las células cancerosas IDH1 mutantes sugiere, por lo tanto, un posible talón de Aquiles para estos
cánceres. Apoyando esta idea, cuando se cultivan en un medio sin glucosa que contiene galactosa, p. ej., cuando la
respiración es la principal fuente de energía, las células IDH1(R132H) exhiben una viabilidad celular drásticamente
10 reducida (figura 17, panel a y figura 21, panel A). Estos resultados indican una sensibilidad especial de las células
mutantes IDH1(R132H) a la privación de glucosa. La línea celular mutante no es sensible a la privación de FBS (no
se muestran los datos), lo que indica que su mayor vulnerabilidad a la falta de glucosa es específica. Una vulnerabilidad
metabólica similar es evidente en las células U87 tratadas con α -KG de octilo u 2-HG de octilo (figura 17, paneles B-
D) y en las células inactivadas con ATP5B (figura 17, panel E). Estos hallazgos indican que las células cancerosas
15 con la mutación IDH1(R132H), debido a la incapacidad de utilizar la respiración mitocondrial como resultado del cierre
de la ATP sintasa, también pueden ser particularmente sensibles a las condiciones nutricionales análogas a la
limitación de la glucosa.

En organismos complejos, la limitación de la glucosa se puede lograr mediante la cetosis, en donde las células utilizan
15 cuerpos cetónicos (en lugar de glucosa) para obtener energía. La cetosis se induce naturalmente tras una inanición
prolongada (o ayuno), en un modo de supervivencia para que el cuerpo obtenga energía de su reserva de grasa
relativamente duradera, mientras evita el catabolismo de las proteínas de los músculos y otros tejidos. La cetosis
también se puede implementar a través de una “dieta cetogénica” baja en carbohidratos y alta en grasas, que ha
20 demostrado ser beneficiosa contra el cáncer. Una razón para esto puede ser que las células tumorales dependen en
gran medida de la glucosa para crecer y sobrevivir. Dado que el metabolismo de los cuerpos cetónicos depende
completamente de la fosforilación oxidativa mitocondrial, una predicción es que la inhibición de la ATP sintasa (u otros
componentes del ETC) en las células cancerosas conferiría una desventaja de supervivencia si los cuerpos cetónicos
fueran su única fuente de energía. Dado que las células U87 no pueden utilizar los cuerpos cetónicos para obtener
25 energía para evaluar directamente el efecto de la mutación IDH1 se utilizaron células HCT 116 que expresan la IDH1
mutante. Cuando se cultivaron en un medio cetogénico (sin glucosa) que contenía el cuerpo cetónico (R)-3-
hidroxibutirato, las células HCT 116 mutantes en IDH1 mostraron una disminución profunda de la viabilidad en
comparación con las células parentales (figura 17, panel F), lo que confirma la supuesta debilidad metabólica de las
células mutantes IDH. Estos resultados no solo respaldan además el hallazgo de que la acumulación de 2-HG en las
30 células cancerosas IDH mutantes da como resultado la inhibición de la ATP sintasa, sino que también sugieren nuevas
estrategias terapéuticas metabólicas en el tratamiento del cáncer.

Al igual que el tratamiento con los inhibidores de la ATP sintasa, α -KG de octilo o oligomicina, que reduce la
señalización de TOR, se descubrió que la fosforilación de los sustratos del complejo mTOR 1, incluidos S6K y 4E-
BP1, disminuye en las células inactivadas de ATP5B (figura 17, panel G), en las células tratadas con ésteres octílicos
35 de 2-HG (figura 17, panel H) y en el IDH1(R132H) que expresan células (figura 17, panel I). Estos resultados indican
que la inhibición de la ATP sintasa provoca una actividad de mTOR disminuida en las células, lo que concuerda con
los resultados obtenidos en gusanos y moscas. Como el TOR es un importante regulador del crecimiento celular, la
disminución de la actividad de la vía mTOR en las células inhibidas por la ATP sintasa predice una posible detención
del crecimiento celular. De hecho, el crecimiento se detiene por completo cuando las células de inactivación de ATP5B
40 se cultivan con galactosa como única fuente de azúcar, p. ej., cuando se ven obligadas a depender de la respiración
mitocondrial para la producción de ATP (figura 17, panel E). Incluso en un medio de glucosa, la disminución del
crecimiento celular es fácilmente detectable (figura 22, panel A). El tratamiento con α -KG de octilo o 2-HG de octilo
inhibe de forma similar el crecimiento de las células U87 (figura 22, paneles B-D). La inhibición del crecimiento por 2-
HG (y por α -KG) también se observa en otras líneas celulares cancerosas analizadas, tal como A549 y Jurkat, en
45 células HEK 293 no malignas immortalizadas, y en los fibroblastos diploides humanos normales WI-38 (los datos no
se muestran), lo que sugiere que el mecanismo de inhibición del crecimiento puede ser universal y que un exceso de
2-HG puede actuar como metabolito inhibidor del crecimiento. Una inhibición del crecimiento similar es evidente tanto
en las células U87 como en HCT 116 que expresan IDH1(R132H) mutante (figura 22, panel E y figura 21, panel B).
Estos datos en conjunto sugieren un estado de inhibición constante de la ATP sintasa y mTOR en células IDH1
50 mutantes.

En resumen, al igual que α -KG, ambos enantiómeros de 2-HG se unen e inhiben la ATP sintasa y prolongan la
esperanza de vida de *C. adultos*. La inhibición de ATP sintasa por estos metabolitos relacionados disminuye la
respiración mitocondrial y la señalización de mTOR. Tanto 2-HG como α -KG exhiben amplios efectos inhibidores del
55 crecimiento y reducen la viabilidad de las células cancerosas en condiciones limitantes de la glucosa. Los
experimentos de la presente memoria descritos sugieren que, si bien 2-HG es un oncometabolito que interfiere con
diversos factores de unión a α -KG importantes en cáncer, 2-HG también actúa, mediante la inhibición de ATP sintasa
y la señalización de mTOR corriente arriba, para disminuir el crecimiento y la viabilidad de las células tumorales.

60 Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar pero no limitar la invención.

Ejemplos

Cepas de nematodos y mantenimiento. Las cepas *Caenorhabditis elegans* se mantuvieron utilizando métodos
65 conocidos en la técnica. Se utilizaron las siguientes cepas:

	Cepa	Genotipo	Fuente
	Bristol N2	Silvestre	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Center (CGC), Universidad de Minnesota
5	DA1116	<i>eat-2(ad1116)II</i>	CGC
	CB1370	<i>daf-2(e1370)III</i>	CGC
	CF1038	<i>daf-16(mu86)I</i>	CGC
10	PD8120	<i>smg-1(cc546ts)I</i>	CGC
	SM190	<i>smg-1(cc546ts)I;pha-4(zu225)V</i>	CGC
	RB754	<i>aak-2(ok524)X</i>	CGC
	ZG31	<i>hif1(ia4)V</i>	CGC
15	ZG596	<i>hif1(ia7)V</i>	CGC
	JT307	<i>egl-9(sa307)V</i>	CGC
	CB5602	<i>vhl-1(ok161)X</i>	CGC
20	DA2123	<i>adls2122[lgg-1::GFP + rol-6(su1006)]</i>	CGC

Cultivo de células

Las células U87 se cultivaron en DMEM sin glucosa (Life technologies, 11966-025) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 % y 10 mM de glucosa, o en DMEM sin glucosa complementado con FBS al 10 % y 10 mM de galactosa cuando estaba indicado. Las células U87 mutantes IDH1(R132H) o que expresan IDH1(WT) fueron como se reportó (Li, y col. *Neuro Oncol* 15, 57-68). Los fibroblastos diploides humanos normales WI-38 (ATCC, CCL-75) se cultivaron con EMEM (ATCC, 30-2003) suplementado con FBS al 10 %. Las células HEK 293, A549, y HeLa se cultivaron con DMEM (Life technologies, 11966-065) suplementado con FBS al 10 %. Las células Jurkat y HCT 116 se cultivaron en RPMI (Life technologies, 11875-093) suplementado con FBS al 10 %. Todas las células se cultivaron a 37 °C y con CO₂ al 5 %. Las células se transfectaron con ARNip indicado utilizando el reactivo 1 de transfección DharmaFect de Thermo Scientific siguiendo las instrucciones del fabricante. La eficacia de la reducción se confirmó mediante inmunotransferencia el primer y el último día del ensayo de inhibición del crecimiento.

Compuestos

El α -KG de 1-octilo, (S)-2-HG de octilo, y el (R)-2-HG de octilo se sintetizaron utilizando métodos conocidos en la técnica. Véase Jung y Deng, *J Org Chem* 77, 11002-11005 (2012); Albert y col. *Synthesis-Stuttgart*, 635-637 (1987); y *Cancer Cell* 19, 17-30 (2011). Las modificaciones de los métodos sintéticos son las siguientes:

Síntesis de α -KG de octilo

En resumen, se añadieron 1-octanol (0,95 ml, 6,0 mmol), DMAP (37 mg, 0,3 mmol), y DCC (0,743 g, 3,6 mmol) a una solución de ácido 1-ciclobuteno-1-carboxílico (0,295 g, 3,0 mmol) en CH₂Cl₂ seco (6,0 ml) a 0 °C. Después de agitar durante 1 hora, la solución se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante otras 8 horas. El precipitado se filtró y se lavó con acetato de etilo (3 x 100 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. La cromatografía ultrarrápida en columna sobre gel de sílice eluyendo con 80/1 hexano/acetato de etilo dio ciclobut-1-enocarboxilato de octilo en forma de un aceite transparente (0,604 g, 96 %). A una solución a -78 °C de este aceite (0,211 g, 1,0 mmol) en CH₂Cl₂ (10 ml) se burbujeó O₃/O₂ hasta que la solución se volvió azul. El ozono residual se descargó mediante burbujeo con O₂ y la reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante otra 1 hora. Se añadió sulfuro de dimetilo (Me₂S, 0,11 ml, 1,5 mmol) a la mezcla y se agitó durante otras 2 horas. Se eliminó CH₂Cl₂ al vacío y el producto crudo se disolvió en una solución de 2-metil-2-buteno (0,8 ml) en t-BuOH (3,0 ml). A esto se añadió gota a gota una solución que contenía clorito de sodio (0,147 g, 1,3 mmol) y dihidrogenofosfato de sodio monohidratado (0,179 g, 1,3 mmol) en H₂O (1,0 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y después se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. La cromatografía ultrarrápida en columna sobre gel de sílice eluyendo con 5/1 de hexano/acetato de etilo dio α -KG de octilo, que se convirtió en un sólido pálido cuando se almacenó en el refrigerador (0,216 g, 84 %).

Síntesis de L-Glu de 5-octilo (ácido (S)-2-amino-5-(octiloxi)-5-oxopentanoico)

El ácido L-glutámico (0,147 g, 1,0 mmol) y el sulfato de sodio anhidro (0,1 g) se disolvieron en octanol (2,0 ml) y después se añadió el complejo de ácido tetrafluorobórico-éter dimetílico (0,17 ml). La mezcla suspendida se agitó a 21 °C durante la noche. Se añadió THF anhidro (5 ml) a la mezcla y se filtró a través de una almohadilla gruesa de carbón activado. Se añadió trietilamina anhidra (0,4 ml) al filtrado transparente para obtener una suspensión blanca lechosa. Tras la trituration con acetato de etilo (10 ml), el monoácido monoéster se precipitó. El precipitado se recogió,

se lavó con acetato de etilo adicional (2 x 5 ml) y se secó al vacío para dar el producto deseado L-Glu de 5-octilo (0,249 g, 96 %) en forma de un sólido blanco. ^1H NMR (500 MHz, ácido acético- d_4): δ 4,12 (dd, $J = 6,6, 6,6$ Hz, 1H), 4,11 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,64 (m, 2H), 2,26 (m, 2H), 1,64 (m, 2H), 1,30 (m, 10H), 0,89 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, ácido acético- d_4): 175,0, 174,3, 66,3, 55,0, 32,7, 30,9, 30,11, 30,08, 29,3, 26,7, 26,3, 23,4, 14,4.

Síntesis de D-Glu de 5-octilo (ácido (R)-2-amino-5-(octiloxi)-5-oxopentanoico)

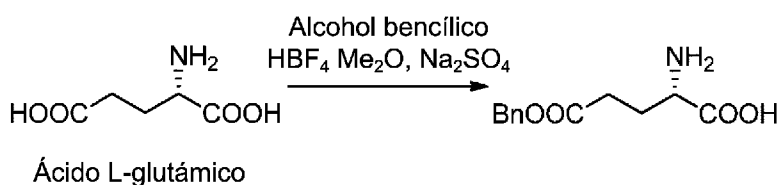
La síntesis del enantiómero opuesto, es decir, D-Glu de 5-octilo, se llevó a cabo exactamente por el mismo procedimiento a partir del ácido D-glutámico. Los datos espectroscópicos eran idénticos a los del compuesto enantiomérico.

Síntesis de α -KG de 5-octilo (ácido 5-(octiloxi)-2,5-dioxopentanoico)

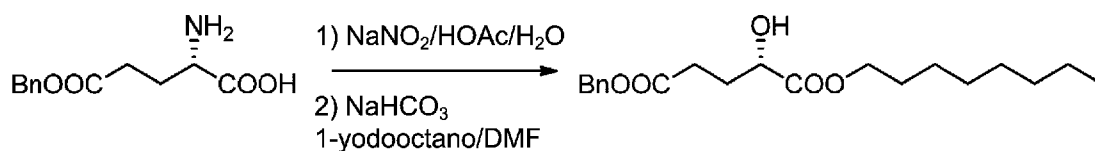
2-oxopentanodioato de 1-bencil 5-octilo: A una solución de L-Glu de 5-octilo (0,249 g) en H_2O (6,0 ml) y ácido acético (2,0 ml) enfriada hasta 0 °C se añadió lentamente una solución de nitrito de sodio acuoso (0,207 g, 3,0 mmol en 4 ml de H_2O). La mezcla de reacción se dejó calentar lentamente hasta temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla se concentró. El residuo resultante se disolvió en DMF (10 ml) y se añadieron NaHCO_3 (0,42 g, 5,0 mmol) y bromuro de bencilo (0,242 ml, 2,0 mmol) a la mezcla. La mezcla se agitó a 21 °C durante la noche y después se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 ml). La fase orgánica combinada se lavó con agua y salmuera, y se secó sobre MgSO_4 anhidro. La cromatografía ultrarrápida en columna sobre gel de sílice eluyendo con 7/1 de hexanos/acetato de etilo dio ζ -(S)-2-hidroxipentanodioato de diéster mixto de 1-bencil 5-octilo en forma de un aceite incoloro. A este aceite disuelto en diclorometano (10,0 ml), se añadieron NaHCO_3 (0,42 g, 5,0 mmol) y peryodinato de Dess-Martin (0,509 g, 1,2 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 ml). La fase orgánica combinada se lavó con agua y salmuera, y se secó sobre MgSO_4 anhidro. La cromatografía ultrarrápida en columna sobre gel de sílice eluyendo con 5/1 de hexanos/acetato de etilo dio 2-oxopentanodioato de 1-bencil 5-octilo deseado (0,22 g, 66 %) en forma de un sólido blanco. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 7,38 (m, 5H), 5,27 (s, 2H), 4,05 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 3,14 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,64 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 1,59 (m, 2H), 1,28 (m, 10H), 0,87 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 192,2, 171,9, 160,1, 134,3, 128,7, 128,6, 128,5, 67,9, 65,0, 34,2, 31,7, 29,07, 29,05, 28,4, 27,5, 25,7, 22,5, 14,0.

α -KG de 5-octilo (ácido 5-(octiloxi)-2,5-dioxopentanoico): A una solución de 2-oxopentanodioato de 1-bencil 5-octilo (0,12 g, 0,344 mmol) en acetato de etilo (15 ml) se añadió Pd/C al 5 % (80 mg). Sobre la mezcla se hizo pasar una corriente de argón y, a continuación, el argón se sustituyó por gas hidrógeno y la mezcla se agitó vigorosamente durante 15 minutos. La mezcla se filtró a través de una almohadilla gruesa de Celite para dar el producto deseado α -KG de 5-octilo (0,088 g, 99 %) en forma de un sólido blanco. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 8,16 (br s, 1H), 4,06 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 3,18 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,69 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H), 1,59 (m, 2H), 1,26 (m, 10H), 0,85 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 193,8, 172,7, 160,5, 65,5, 33,0, 31,7, 29,08, 29,06, 28,4, 27,8, 25,8, 22,5, 14,0.

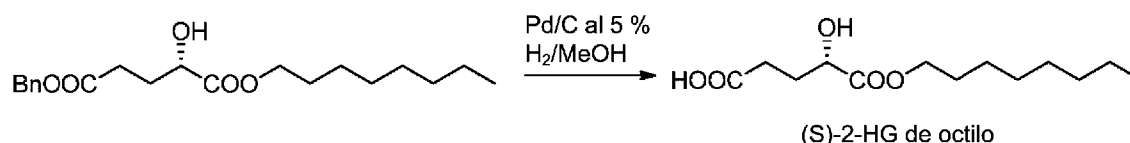
Síntesis de (S)-2-hidroxipentanodioato de 1-octilo ((S)-2-HG de octilo)



Ácido (S)-2-amino-5-(benciloxi)-5-oxopentanoico: El ácido L-glutámico (2,0 g, 13,6 mmol) y el sulfato de sodio anhidro (2,0 g) se disolvieron en alcohol bencílico (25 ml) y después se añadió el complejo de dietil éter del ácido tetrafluorobórico (3,7 ml, 27,2 mmol). La mezcla suspendida se agitó a 21 °C durante la noche. Se añadió THF anhidro (75 ml) a la mezcla y se filtró a través de una almohadilla gruesa de carbón activado. Se añadió trietilamina anhidra (4,1 ml) al filtrado transparente para obtener una suspensión blanca lechosa. Tras la trituración con acetato de etilo (100 ml), el monoácido monoéster se precipitó. Se recogió, se lavó con acetato de etilo adicional (2 x 10 ml) y se secó al vacío para dar el producto deseado ácido (S)-2-amino-5-(benciloxi)-5-oxopentanoico (3,07 g, 95 %) en forma de un sólido blanco. ^1H NMR (500 MHz, ácido acético- d_4): δ 7,41 - 7,25 (m, 5H), 5,14 (s, 2H), 4,12 (m, 1H), 2,75 - 2,60 (m, 2H), 2,27 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, ácido acético- d_4): δ 174,6, 174,4, 136,9, 129,5, 129,2, 129,1, 67,7, 55,0, 30,9, 26,3.



2-hidroxipentanodioato de (S)-5-bencil 1-octilo: A una solución de ácido (S)-2-amino-5-(benciloxi)-5-oxopentanoico (1,187 g, 5,0 mmol) en H₂O (25 ml) y ácido acético (10 ml) enfriada hasta 0 °C se añadió lentamente una solución de nitrito de sodio acuoso (1,07 g en 15 ml de H₂O). La mezcla de reacción se dejó calentar lentamente hasta temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla se concentró. El residuo resultante se disolvió en DMF (15 ml) y se añadieron NaHCO₃ (1,26 g, 15 mmol) y 1-yodooctano (1,84 ml, 10 mmol) a la mezcla. La mezcla se agitó a 21 °C durante la noche y después se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 ml). La fase orgánica combinada se lavó con agua y salmuera, y se secó sobre MgSO₄ anhidro. La cromatografía ultrarrápida en columna sobre gel de sílice, eluyendo con 7/1 de hexanos/acetato de etilo, dio 2-hidroxipentanodioato de (S)-5-bencil 1-octilo de diéster mixto deseado (0,785 g, 45 %) en forma de un aceite incoloro. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7,37 - 7,28 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 4,26 - 4,19 (m, 1H), 4,16 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H), 3,11 (d, *J* = 4,1 Hz, 1H), 2,61 - 2,46 (m, 2H), 2,26 - 2,14 (m, 1H), 1,95 (dtd, *J* = 14,2, 8,3, 6,1 Hz, 1H), 1,71 - 1,57 (m, 2H), 1,39 - 1,20 (m, 10H), 0,88 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 174,6, 172,8, 135,8, 128,4, 128,1, 128,0, 69,3, 66,2, 65,8, 31,6, 29,6, 29,2, 29,0 (2C's), 28,4, 25,6, 22,5, 13,9.



(S) 2-hidroxipentanodioato de 1-octilo ((S)-2-hidroxiylglutarato de octilo; (S)-2-HG) de octilo: A una solución de 2-hidroxipentanodioato de (S)-5-bencil 1-octilo (0,71 g, 2,0 mmol) en MeOH (50 ml) se añadió Pd/C al 5 % (80 mg). Se pasó por encima de la mezcla la condición de argón y, a continuación, el argón se substituyó por hidrógeno, y la mezcla se agitó vigorosamente durante 1 hora. La mezcla se filtró a través de una almohadilla gruesa de Celite y la fase orgánica se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en columna sobre gel de sílice eluyendo con 25/1 de CH₂Cl₂/MeOH para dar (S)-2-HG de octilo (0,495 g, 48 %) en forma de un sólido blanco. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 4,23 (dd, *J* = 8,0, 4,2 Hz, 1H), 4,16 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H), 2,60 - 2,42 (m, 2H), 2,15 (m, 1H), 1,92 (dtd, *J* = 14,2, 8,2, 6,1 Hz, 1H), 1,69 - 1,59 (m, 2H), 1,38 - 1,16 (m, 10H), 0,86 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 178,8, 174,8, 69,3, 66,1, 31,7, 29,4, 29,1 (2C's), 28,9, 28,4, 25,7, 22,5, 14,0.

Síntesis de (R) 2-hidroxipentanodioato de 1-octilo ((R)-2-HG de octilo)

La síntesis del enantiómero opuesto, es decir, (R)-2-HG de octilo, se llevó a cabo exactamente por el mismo procedimiento a partir del ácido D-glutámico. Los datos espectroscópicos eran idénticos a los de los compuestos enantioméricos.

iARN en *C. elegans* adultos

iARN en *C. elegans* se logró alimentando a los gusanos con bacterias HT115(DE3) que expresaban el ARN bicatenario (ARNbc) del gen diana a partir del vector pL4440. Véase Timmons y Fire, Nature 395, 854 (1998). La producción de ARNbc se indujo durante la noche en placas que contenían 1 mM de IPTG. Todos los clones que se alimentan de iARN se obtuvieron de la genoteca de ORF-iARN de *C. elegans* (Thermo Scientific/Open Biosystems), a menos que se indique lo contrario. Se obtuvo el clon de iARN de *C. elegans* de TOR (CeTOR) (Long y col. Curr Biol 12, 1448-1461 (2002) de Joseph Avruch (MGH/Harvard). La inactivación eficiente se confirmó mediante transferencia Western de la proteína correspondiente o mediante qRT-PCR del ARNm. Las secuencias de cebadores utilizadas para qRT-PCR son las siguientes:

atp-2 directo: TGACAACATTTTCGGTTTCACC (Id de sec. n.º 1)

atp-2 inverso: AAATAGCCTGGACGGATGTGAT (Id de sec. n.º 2)

let-363/CeTOR directo: GATCCGAGACAAGATGAACGTG (Id de sec. n.º 3)

let-363/CeTOR inverso: ACAATTTGGAACCCAACCAATC (Id de sec. n.º 4)

ogdh-1 directo: TGATTTGGACCGAGAATTCCTT (Id de sec. n.º 5)

ogdh-1 inverso: GGATCAGACGTTTGAACAGCAC (Id de sec. n.º 6)

La inactivación de iARN tanto de *ogdh-1* como de *atp-2* se validó mediante RT-PCR cuantitativa y la inactivación de *atp-2* también se validó mediante transferencia Western. Las transcripciones de *ogdh-1* se redujeron en un 85 %, y las transcripciones y los niveles de proteína de *atp-2* se redujeron en un 52 % y un 83 %, respectivamente, en las larvas que se cultivaron en bacterias que expresaban los ARNbc correspondientes. Además, se descubrió que el iARN de *atp-2* estaba asociado con un retraso en el desarrollo posembriionario y la detención de las larvas, lo que concuerda con los fenotipos de los animales con *atp-2(ua2)*. El análisis mediante qRT-PCR indicó una disminución modesta pero significativa del 26 % en las transcripciones de *CeTOR* en larvas sometidas a iARN; además, se indujeron marcadores

moleculares para la autofagia en estos animales, y prolonga la esperanza de vida de los adultos, lo que concuerda con la inactivación parcial de la quinasa.

En experimentos sobre la esperanza de vida, el iARN se utilizó para inactivar *atp-2*, *ogdh-1* y *CeTOR* en animales maduros en presencia o ausencia de α -KG exógeno. Se determinó empíricamente que la concentración de α -KG utilizada en estos experimentos (8 mM) era la más beneficiosa para los animales silvestres (figura 1, panel c). Este enfoque permitió evaluar la contribución de las proteínas y vías esenciales a la longevidad que confiere el α -KG suplementario. Específicamente, fue posible la inactivación sustancial, pero no completa, de *atp-2* en animales adultos que habían completado el desarrollo embrionario y larvario. Como se describe en la presente memoria, la suplementación con 8 mM de α -KG no prolongó aún más (y de hecho, en una ocasión, incluso disminuyó) la esperanza de vida de los animales con *atp-2(iARN)* (Figura 13), lo que indica que *atp-2* está involucrado. Por otro lado, una inactivación completa de *atp-2* sería letal y, por lo tanto, enmascararía el beneficio de la inhibición de la ATP sintasa por parte de α -KG.

15 Análisis de esperanza de vida

Los ensayos de esperanza de vida se realizaron a 20 °C en medios de crecimiento de nematodos sólidos (NGM, por sus siglas en inglés) utilizando protocolos estándar y se replicaron en al menos dos experimentos independientes. *C. elegans* se sincronizó realizando una puesta de huevos cronometrada (Sutphin y Kaeberlein, J Vis Exp (2009)) o una preparación de huevos (lisando aproximadamente 100 gusanos grávidos en 70 μ l de regulador M9, 25 μ l de lejía (solución de hipoclorito de sodio al 10 %) y 5 μ l de 10 N NaOH (Brenner Genetics 77, 71-94 (1974))). Los animales adultos jóvenes se recogieron en placas de ensayo NGM que contenían sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 1,5 %; Sigma, D8418), 49,5 μ M de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (Sutphin y Kaeberlein J, Vis Exp (2009)) (FUDR; Sigma, F0503), D-2-HG (Sigma, H8378), o L-2-HG (Sigma, 90790), y α -KG (Sigma, K1128) o control de vehículo (H₂O). Se incluyó FUDR para prevenir la producción de progenie. Los medios que contenían α -KG se ajustaron a un pH 6,0 (el mismo pH que las placas de control) mediante la adición de NaOH. Todos los compuestos se mezclaron en el medio de NGM después del tratamiento en autoclave y antes de la solidificación del medio. Las placas de ensayo se sembraron con OP50 (o un clon de alimentación de iARN designado, véase más adelante). Los gusanos se trasladaron a nuevas placas de ensayo cada 4 días (para garantizar que hubiera suficiente alimento en todo momento y reducir el riesgo de contaminación por moho). Para evaluar la supervivencia de los gusanos, se pinchó a los animales con un alambre de platino cada 2-3 días, y los que no respondieron se puntuaron como muertos. Para el análisis relativo a las cepas mutantes, la cepa original correspondiente se utilizó como control en el mismo experimento.

Para los experimentos de esperanza de vida con iARN, las placas también contenían 1 mM de β -D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG); Acros, CAS 367-93-1) y 50 μ g/ml de ampicilina (Fisher, BP1760-25). El iARN se logró alimentando a los gusanos N2 con bacterias HT115(DE3) que expresaban el ARNbc del gen diana a partir de pL4440 (Timmons y Fire, Nature 395, 854 (1998)); El iARN de control se realizó en paralelo para cada experimento alimentando a los gusanos N2 con bacterias HT115(DE3) que expresaban el ARNbc de GFP o un vector vacío (lo que arrojó resultados de vida idénticos).

Los experimentos de esperanza de vida con oligomicina (Cell Signaling Technology, 9996) se realizaron como se describe para placas de α -KG (NGM) con DMSO al 1,5 % y 49,5 μ M de FUDR; gusanos N2; bacterias OP50).

Para experimentos de esperanza de vida relacionados con *smg-1(cc546ts);pha-4(zu225)* y *smg-1(cc546ts)* (Timmons y Fire, Nature 395, 854 (1998); y Gaudet y Mango, Science 295, 821-825 (2002)), las cepas se cultivaron desde el huevo hasta la fase L4 a 24 °C, lo que inactiva el alelo *smg-1* sensible a la temperatura, y evita la degradación de ARNm de *PHA-4(zu225)* mediado por la vigilancia de ARNm, que contiene un codón de parada prematuro y, por lo tanto, produce un factor de transcripción PHA-4 truncado pero completamente funcional (Gaudet y Mango, Science, 295, 821-825 (2002)). Después, en la etapa L4, la temperatura se cambió a 20 °C, lo que restaura la función de *smg-1* y, por lo tanto, da como resultado la degradación del ARNm de *pha-4(zu225)*. El tratamiento con α -KG comenzó en la fase L4.

Los datos de esperanza de vida se proporcionan en la figura 13, incluidos los tamaños de las muestras. El tamaño de la muestra se eligió sobre la base de los estándares establecidos en el campo en los manuscritos publicados. No se utilizó ningún método estadístico para predeterminar el tamaño de la muestra. Los animales se asignaron de forma aleatoria a los grupos experimentales. Se censuraron los gusanos que se rompieron, se embolsaron (p. ej., exhibieron la eclosión de su progenie interna), o se arrastraron fuera de los platos. Los datos de esperanza de vida se analizaron utilizando GraphPad Prism; Los valores de *P* se calcularon utilizando la prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox).

60 Ensayo de preferencia alimentaria

Un protocolo adaptado de Abada y col. (Mol Cells 28, 209-213 (2009)) se realizó de la siguiente manera. Se sembró una placa de 10 cm de NGM con dos puntos de OP50, como se muestra en la figura 5, panel e. Tras dejar que el césped OP50 se secase durante 2 días a temperatura ambiente, se añadió vehículo (H₂O) o α -KG (8 mM) a la parte superior del césped y se dejó secar durante 2 días a temperatura ambiente. Se colocaron aproximadamente 50-100

gusanos adultos sincronizados del día 1 en el centro de la placa y su preferencia por cualquier césped bacteriano se registró después de 3 horas a temperatura ambiente.

Identificación de dianas utilizando la estabilidad de dianas sensible a la afinidad de los fármacos (DARTS, por sus siglas en inglés)

La identificación de la diana utilizando DARTS se llevó a cabo según los métodos conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Lomenick y col. PNAS USA 106, 21984-21989 (2009). Para una identificación diana imparcial (figura 2, panel a), las células Jurkat humanas se lisaron utilizando M-PER (Thermo Scientific, 78501) con la adición de inhibidores de proteasa (Roche, 11836153001) e inhibidores de fosfatasa (Lomenick, y col. Curr Protoc Chem Biol 3, 163-180 (2011)). Se añadió regulador TNC (50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM de NaCl, 10 mM de CaCl_2) al lisado y, a continuación, se determinó la concentración de proteína utilizando el kit BCA Protein Assay (Pierce, 23227). Los lisados celulares se incubaron con vehículo (H_2O) o α -KG durante 1 hora en hielo, seguida de 20 minutos adicionales a temperatura ambiente. La digestión se realizó utilizando Pronasa (Roche, 10165921001) a temperatura ambiente durante 30 minutos y se detuvo utilizando inhibidores de proteasa en exceso con transferencia inmediata a hielo. Las digestiones resultantes se separaron mediante SDS-PAGE y se visualizaron utilizando el tinte de gel proteico SYPRO Ruby (Invitrogen, S12000). La banda con una tinción aumentada en el carril α -KG (correspondiente a las posibles dianas proteicas que están protegidas de la proteólisis por la unión de α -KG) y el área correspondiente del carril de control se extirparon, se digirieron con tripsina en gel, y se sometieron a un análisis de LC-MS/MS como se describe (Lomenick, y col. PNAS USA 106, 21984-21989 (2009); y Lomenick y col. ACS Chem Biol 6, 34-46 (2011)). Los resultados de la espectrometría de masas se buscaron en la base de datos Swissprot humana (versión 57.15) utilizando la versión 2.3.0 de Mascot, y todos los péptidos alcanzaron un umbral de significación de 0,05.

Para la verificación de la diana mediante DARTS-transferencia Western (figura 2, panel b), las células HeLa se lisaron en regulador M-PER (Thermo Scientific, 78501) con la adición de inhibidores de proteasa (Roche, 11836153001) e inhibidores de fosfatasa (50 mM de NaF, 10 mM de β -glicerofosfato, 5 mM de pirofosfato de sodio, 2 mM de Na_3VO_4). Se añadió un regulador TNC enfriado (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 50 mM de NaCl, 10 mM de CaCl_2) al lisado de proteínas, y la concentración de proteína del lisado se midió mediante el kit BCA Protein Assay (Pierce, 23227). A continuación, la proteína lisada se incubó con el vehículo de control (H_2O) o con concentraciones variables de α -KG durante 3 horas a temperatura ambiente con agitación a 600 rpm en un termomezclador Eppendorf. Las digestiones con pronasa (Roche, 10165921001) se realizaron durante 20 minutos a temperatura ambiente, y se detuvieron añadiendo regulador de carga de SDS y calentando inmediatamente a 70 °C durante 10 minutos. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE en gel con gradiente de Bis-Tris al 4-12 % (Invitrogen, NP0322BOX) y se sometieron a transferencia Western para detectar las subunidades de ATP sintasa ATP5B (Sigma, AV48185), ATP5O (Abcam, ab91400), y ATP5A (Abcam, ab110273). La unión entre α -KG y PHD-2/Egln1 (D31E11) mAb de conejo (Cell Signaling Technology, 4835), del que α -KG es un cosustrato (Stubbs, y col. J Med Chem 52, 2799-2805 (2009)), se confirmó mediante DARTS. Se utilizó GAPDH (Ambion, AM4300) como control negativo.

Para DARTS utilizando *C. elegans* (figura 6, panel a), se cultivaron animales silvestres de diversas edades en placas NGM/OP50, se lavaron 4 veces con regulador M9 y se colocaron inmediatamente en el congelador a -80 °C. Los animales se lisaron en regulador HEPES (40 mM de HEPES pH 8,0, 120 mM de NaCl, glicerol al 10 %, Triton X-100 al 0,5 %, 10 mM de β -glicerofosfato, 50 mM de NaF, 0,2 mM de Na_3VO_4 , inhibidores de proteasa (Roche, 11836153001)) utilizando tubos Lysing Matrix C (MP Biomedicals, 6912-100) y el banco de alta velocidad FastPrep-24 (MP Biomedicals). homogeneizador superior en la sala a 4 °C (romper gusanos durante 20 segundos a 6,5 m/s, dejar reposar sobre hielo durante 1 minuto); repetir dos veces). Los animales lisados se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar los restos del gusano, y se recogió el sobrenadante para DARTS. La concentración de proteína se determinó mediante el kit BCA Protein Assay (Pierce, 23223). Para el experimento DARTS se utilizó una concentración de lisado de gusanos de 1,13 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Todas las etapas se realizaron en hielo o a 4 °C para ayudar a prevenir la degradación prematura de las proteínas. Se añadió regulador TNC (50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM de NaCl, 10 mM de CaCl_2) a los lisados de gusanos. Los lisados de gusanos se incubaron con un vehículo de control (H_2O) o α -KG durante 1 hora en hielo y después 50 minutos a temperatura ambiente. Las digestiones con pronasa (Roche, 10165921001) se realizaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se detuvieron añadiendo regulador de carga de SDS y calentando a 70 °C durante 10 minutos. A continuación, las muestras se sometieron a SDS-PAGE en geles con gradiente de Bis-Tris del 4 al 12 % de NuPAGE Novex (Invitrogen, NP0322BOX), y se llevó a cabo la transferencia Western con un anticuerpo contra el ATP5B (Sigma, AV48185) que también reconoce el ATP-2.

Para los experimentos con 2-HG, el DARTS se realizó como se ha descrito anteriormente. En resumen, las células U87 se lisaron en regulador M-PER (Thermo Scientific, 78501) con la adición de inhibidores de proteasa (Roche, 11836153001) y fosfatasa (50 mM de NaF, 2 mM de Na_3VO_4). Se añadió regulador TNC enfriado (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 50 mM de NaCl, 10 mM de CaCl_2) al lisado, y la concentración de proteína de la solución se midió en una alícuota mediante el kit de ensayo de proteína BCA (Pierce, 23227). El lisado restante se incubó después con el vehículo de control (H_2O) o con concentraciones variables de 2 HG o α -KG durante 0,5 horas a temperatura ambiente. Las muestras se sometieron después a digestiones con pronasa (Roche, 10165921001, 5 minutos a temperatura ambiente) que se detuvieron mediante la adición de regulador de carga de SDS y calentamiento inmediato (95 °C, 5 minutos). Las muestras se sometieron a SDS-PAGE en gel con gradiente de Bis-Tris al 4-12 % (Invitrogen,

NP0322BOX), y la transferencia Western se llevó a cabo con anticuerpos contra ATP5B (Sigma, AV48185) o GAPDH (Santa Cruz, SC25778).

Ensayo de actividad del complejo V

La actividad del complejo V se ensayó utilizando el kit de actividades del complejo V MitoTox OXPHOS (Abcam, ab109907). El vehículo (H₂O) o α -KG se mezcló con la enzima antes de añadir los fosfolípidos. En experimentos con α -KG de octilo, se añadieron fosfolípidos a vehículo (DMSO al 1 %) o α -KG de octilo. La actividad relativa del complejo V se comparó con la del vehículo. Se utilizó oligomicina (Sigma, O4876) como control positivo para el ensayo.

Aislamiento de mitocondrias del hígado de ratón

Los estudios en animales se realizaron según los protocolos de investigación con animales aprobados por la UCLA. Las mitocondrias de ratones C57BL/6 de 3 meses de edad se aislaron como se describe (Rogers, y col. PLoS One 6, e21746 (2011)). En resumen, se extrajeron los hígados, se trituraron a 4 °C en MSHE+BSA (70 mM de sacarosa, 210 mM de manitol, 5 mM de HEPES, 1 mM de EGTA, y BSA sin ácido graso al 0,5 %, pH 7,2), y se enjuagaron varias veces para eliminar la sangre. Todas las etapas posteriores se realizaron en hielo o a 4 °C. El tejido se rompió en 10 volúmenes de MSHE+BSA con un homogeneizador Dounce de vidrio (5-6 pasadas) y el homogeneizado se centrifugó a 800 x g durante 10 minutos para eliminar los restos tisulares y los núcleos. El sobrenadante se decantó a través de un colador celular y se centrifugó a 8.000 x g durante 10 minutos. El sedimento mitocondrial oscuro se volvió a suspender en MSHE+BSA y se volvió a centrifugar a 8.000 x g durante 10 minutos. Los sedimentos mitocondriales finales se utilizaron para varios ensayos como se describe a continuación.

Ensayo de ATPasa con partículas submitocondriales (SMP)

La hidrólisis de ATP por la ATP sintasa se midió utilizando partículas submitocondriales (véase Alberts, B. Molecular Biology of the Cell). 3.^a ed., (Garland Pub., 1994) y referencias en el mismo). Las mitocondrias se aislaron del hígado de ratón como se ha descrito anteriormente. El sedimento mitocondrial final se volvió a suspender en el regulador A (250 mM de sacarosa, 10 mM de Tris-HCl, 1 mM de ATP, 5 mM de MgCl₂, y 0,1 mM de EGTA, pH 7,4) a 10 µg/µl, y se sometió a sonicación en hielo (Fisher Scientific Model 550 Sonic Dismembrator); potencia media, alternando entre intervalos de 10 segundos de sonicación y reposando sobre hielo durante un total de 60 segundos de sonicación), y después se centrifugó a 18.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recogió y se centrifugó a 100.000 x g durante 45 minutos a 4 °C. El sedimento final (partículas mitocondriales) se volvió a suspender en el regulador B (250 mM de sacarosa, 10 mM de Tris-HCl y 0,02 mM de EGTA, pH 7,4).

La actividad de la ATPasa de SMP se ensayó utilizando el regulador de actividad del complejo V como se ha indicado anteriormente. La producción de ADP está acoplada a la oxidación de NADH a NAD⁺ a través de la piruvato quinasa y la lactato deshidrogenasa. La adición de α -KG (hasta 10 mM) no afectó a la actividad de la piruvato quinasa o lactato deshidrogenasa cuando se añadió ADP externo. La disminución de la absorbancia de NADH a 340 nm se correlaciona con la actividad de la ATPasa. Las SMP (2,18 ng/µl) se incubaron con vehículo o α -KG durante 90 minutos a temperatura ambiente antes de añadir el regulador de actividad y, a continuación, se midió la disminución de la absorbancia de NADH a 340 nm cada 1 minuto durante 1 hora. Se utilizó oligomicina (Cell Signaling Technology, 9996) como control positivo para el ensayo.

Análisis de niveles de ATP

Se sembraron células de fibroblastos diploides humanos normales WI-38 (ATCC, CCL-75) en placas de 96 pocillos a razón de 2 x 10⁴ células por pocillo. Las células se trataron con DMSO (control de vehículo) u α -KG de octilo a concentraciones variables durante 2 horas por triplicado. Los niveles de ATP se midieron utilizando el ensayo de ATP luminiscente CellTiter-Glo (Promega, G7572); La luminiscencia se leyó utilizando Analyst HT (Molecular Devices). Paralelamente, las células tratadas de forma idéntica se lisaron en M-PER (Thermo Scientific, 78501) para obtener la concentración de proteína mediante el kit BCA Protein Assay (Pierce, 23223). Los niveles de ATP se normalizaron con respecto al contenido de proteínas. El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism (prueba t no apareada).

Ensayo de niveles de ATP en *C. elegans* adultos. Día 1 sincronizado para *C. elegans* silvestres adultos se colocaron en placas de NGM que contenían vehículo o 8 mM de α -KG. En los días 2 y 8 de la edad adulta, se recolectaron 9 réplicas y 4 réplicas, respectivamente, de aproximadamente 100 gusanos de placas de α -KG o de control del vehículo, se lavaron 4 veces en regulador M9 y se congelaron a -80 °C. Los animales se lisaron utilizando tubos de la matriz C para lisado (MP Biomedicals, 6912-100) y el homogeneizador de sobremesa de alta velocidad FastPrep-24 (MP Biomedicals) (romper los gusanos durante 20 segundos a 6,5 m/s, reposar sobre hielo durante 1 minuto); repetir dos veces). Los animales lisados se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar los restos de gusanos, y el sobrenadante se guardó para la cuantificación de ATP utilizando la plataforma de ensayo de quinasa luminiscente Quinasa-Glo (Promega, V6713) según las instrucciones del fabricante. El ensayo se realizó en placas de cultivo tisular blancas opacas de 96 pocillos (Falcon, 353296) y la luminiscencia se midió utilizando Analyst HT

(Molecular Devices). Los niveles de ATP se normalizaron con respecto al número de gusanos. El análisis estadístico se realizó con Microsoft Excel (prueba t, varianza desigual con dos colas y dos muestras).

Para los experimentos con 2-HG, las células U87 se sembraron en placas de 96 pocillos a razón de 2×10^4 células por pocillo y se trataron con el compuesto indicado durante 2 horas por triplicado. Los niveles de ATP se midieron utilizando el ensayo de ATP luminiscente CellTiter-Glo (Promega, G7572); La luminiscencia se leyó utilizando Analyst HT (Molecular Devices). Para confirmar que el número de células era constante entre los tratamientos, los lisados celulares se sometieron además a tinción con ADNbc utilizando el sistema de ADNbc QuantiFluor (Promega). El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism (prueba t no apareada).

Medición de las tasas de consumo de oxígeno (OCR) y las tasas de acidificación extracelular (ECAR)

Las mediciones de OCR se realizaron utilizando un analizador Seahorse XF-24 (Seahorse Bioscience) (Wu, y col. Am J Physiol Cell Physiol 292, C125-136 (2007)). Las células se sembraron en microplacas de cultivo celular Seahorse XF-24 a 50.000 células/pocillo en medio DMEM suplementado con FBS al 10 % y 10 mM de glucosa, y se incubaron a 37 °C y CO₂ al 5 % durante la noche. El tratamiento con α -KG de octilo o DMSO (control del vehículo) duró 1 hora. Las células se lavaron en medio DMEM no regulado (pH 7,4, 10 mM de glucosa) justo antes de la medición y se mantuvieron en este regulador con las concentraciones indicadas de α -KG de octilo. Las tasas de consumo de oxígeno se midieron 3 veces en condiciones basales y se normalizaron a la concentración de proteína por pocillo. El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism.

Medición de las tasas de consumo de oxígeno (OCR) en *C. elegans* vivos se realizó utilizando un protocolo adaptado de Yamamoto, y col. (Cell 147, 827-839 (2011)) y Pathare, y col. (PLoS Genet 8, e1002645 (2012)). Los gusanos N2 silvestres adultos del día 1 se colocaron en placas de NGM que contenían 8 mM de α -KG o H₂O (control del vehículo) sembradas con *E. coli* OP50 o HT115. La OCR se evaluó el día 2 de la edad adulta. El día 2 de la edad adulta, se recolectaron gusanos y se lavaron 4 veces con M9 para eliminar las muestras de bacterias (verificamos además que α -KG no afecta el consumo de oxígeno de las bacterias; por lo tanto, incluso si quedaran bacterias sobrantes después de los lavados, los cambios en OCR observados seguirían siendo específicos de gusanos), y después los animales se sembraron por cuadruplicados en microplacas de cultivo celular Seahorse XF-24 (Seahorse Bioscience, V7-PS) en 200 μ l de M9 a aproximadamente 200 gusanos por pocillo. Las tasas de consumo de oxígeno se midieron 7 veces en condiciones basales y se normalizaron según el número de gusanos contados por pocillo. El experimento se repitió dos veces. El análisis estadístico se realizó con Microsoft Excel (prueba t, varianza desigual con dos colas y dos muestras).

Para los experimentos con 2-HG, las mediciones de OCR y ECAR se realizaron utilizando un analizador Seahorse XF-24 (Seahorse Bioscience) (Wu, y col. Am J Physiol Cell Physiol 292, C125-136 (2007)). Las células U87 se sembraron en microplacas de cultivo celular Seahorse XF-24 a 50.000 células por pocillo en DMEM suplementado con FBS al 10 % y 10 mM de glucosa o 10 mM de galactosa, y se incubaron O/N a 37 °C en CO₂ al 5 %. El tratamiento con α -KG de octilo, (R)-2-HG de octilo, (S)-2-HG de octilo o DMSO (control del vehículo) duró 1 hora. Las células se lavaron en DMEM no regulado (pH 7,4, 10 mM de glucosa) inmediatamente antes de la medición, y se mantuvieron en este regulador con las concentraciones indicadas del compuesto. La OCR o el ECAR se midieron 3 veces en condiciones basales y se normalizaron a la concentración de proteína por pocillo. El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism (prueba t no apareada, varianza desigual con dos colas y dos muestras).

Medición de la relación de control respiratorio (RCR) mitocondrial

La RCR mitocondrial se analizó utilizando mitocondrias de hígado de ratón aisladas (véase Brand, y col. Biochem J 435, 297-312 (2011) y sus referencias). Las mitocondrias se aislaron del hígado de ratón como se ha descrito anteriormente. El sedimento mitocondrial final se volvió a suspender en 30 μ l de regulador MAS (70 mM de sacarosa, 220 mM de manitol, 10 mM de KH₂PO₄, 5 mM de MgCl₂, 2 mM de HEPES, 1 mM de EGTA, y BSA sin ácido graso al 0,2 %, pH 7,2).

La respiración mitocondrial aislada se midió realizando ensayos de acoplamiento y flujo de electrones como se describe (Rogers, y col. PLoS One 6, e21746 (2011)). Para el ensayo de acoplamiento, se sembraron 20 μ g de mitocondrias en regulador MAS completo (regulador MAS suplementado con 10 mM de succinato y 2 μ M de rotenona) en una placa XF24 Seahorse mediante centrifugación a 2000 $\times$ g durante 20 minutos a 4 °C. Justo antes del ensayo, las mitocondrias se complementaron con un regulador MAS completo hasta un total de 500 μ l (con DMSO al 1 %, octanol, α -KG de octilo o 2-HG de octilo) y se calentaron a 37 °C durante 30 minutos antes de iniciar las mediciones de la tasa de consumo de oxígeno. La respiración mitocondrial comienza en un estado acoplado 2; el estado 3 se inicia con 2 mM de ADP; el estado 4o (insensible a la oligomicina, es decir, independiente del complejo V) es inducido por 2,5 μ M de oligomicina y el estado 3u (capacidad respiratoria máxima desacoplada del FCCP) por 4 μ M de FCCP. Finalmente, se inyectaron 1,5 μ g/ml de antimicina A al final del ensayo. La relación del estado 3/estado 4o da la relación de control respiratorio (RCR).

Para el ensayo de flujo de electrones, el regulador MAS se suplementó con 10 mM de piruvato de sodio (sustrato del complejo I), 2 mM de malato (inhibidor del complejo II) y 4 μ M de FCCP, y las mitocondrias se sembraron de la misma

manera que se describió para el ensayo de acoplamiento. Tras las lecturas basales, las inyecciones secuenciales fueron las siguientes: 2 μ M de rotenona (inhibidor del complejo I), 10 mM de succinato (sustrato del complejo II), 4 μ M de antimicina A (inhibidor del complejo III), y 10 mM/100 μ M de ascorbato/tetrametilfenilendiamina (sustrato del complejo IV).

Cinética de inhibición de la enzima ATP sintasa

El análisis cinético de inhibición de la enzima de síntesis de ATP se realizó utilizando mitocondrias aisladas. Las mitocondrias se aislaron del hígado de ratón como se ha descrito anteriormente. El sedimento mitocondrial final se volvió a suspender en regulador MAS suplementado con 5 mM de ascorbato de sodio (Sigma, A7631) y 5 mM de TMPD (Sigma, T7394).

La reacción se llevó a cabo en un regulador MAS que contenía 5 mM de ascorbato de sodio, 5 mM de TMPD, reactivo de luciferasa (Roche, 11699695001), octanol o α -KG de octilo, cantidades variables de ADP (Sigma, A2754), y 3,75 ng/ μ l de mitocondrias. La síntesis de ATP se controló mediante el aumento de la luminiscencia a lo largo del tiempo mediante un luminómetro (Analyst HT, Molecular Devices). La formación de ATP independiente de la ATP sintasa, derivada de la luminiscencia insensible a la oligomicina, se restó como fondo. La velocidad inicial de la síntesis de ATP se calculó a partir de la pendiente de los primeros 3 minutos de la reacción, antes de que la velocidad comience a disminuir. La cinética de inhibición enzimática se analizó mediante regresión no lineal, ajuste de mínimos cuadrados utilizando GraphPad Prism.

Ensayo para determinar la actividad de la vía TOR (mTOR) en mamíferos

La actividad de la vía mTOR en las células tratadas con α -KG de octilo, 2-HG, u oligomicina se determinó mediante los niveles de fosforilación de los sustratos de mTOR conocidos, incluidos S6K (T389), 4E-BP1 (S65), AKT (S473), y ULK1 (S757) (Pullen y Thomas, FEBS Lett 410, 78-82 (1997); Burnett, y col. PNAS USA 95, 1432-1437 (1998); Gingras, y col. Genes Dev 15, 2852-2864 (2001); Sarbassov, y col. Science 307, 1098-1101 (2005); y Kim y col. Nat Cell Biol 13, 132-141 (2011)). Anticuerpos específicos utilizados: P-S6K T389 (tecnología de señalización celular, 9234), S6K (Cell Signaling Technology, 9202S), P-4E-BP1 S65 (Cell Signaling Technology, 9451S), 4E-BP1 (Cell Signaling Technology, 9452S), P-AKT S473 (Cell Signaling Technology, 4060S), AKT (Cell Signaling Technology, 4691S), P-ULK1 S757 (Cell Signaling Technology, 6888), ULK1 (Cell Signaling Technology, 4773S), y GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, 25778).

Ensayo de autofagia

Animales DA2123 que portan un gen de fusión traduccional GFP::LGG-1 integrado (Kang, y col. Genes Dev 21, 2161-2171 (2007); Hansen, y col. PLoS Genet 4, e24 (2008); y Alberti, y col. Autophagy 6, 622-633 (2010)), se utilizaron para cuantificar los niveles de autofagia. Para obtener una población sincronizada de DA2123, se preparó una preparación de huevos de adultos grávidos (lisando aproximadamente 100 gusanos grávidos en 70 μ l de regulador M9, 25 μ l de lejía y 5 μ l de 10N NaOH), y se dejó que los huevos eclosionaran durante la noche en M9, lo que provocó una diapausa L1 inducida por inanición. Las larvas L1 se depositaron en placas de tratamiento NGM que contenían vehículo, 8 mM de α -KG o 40 μ M de oligomicina, y se sembraron con *E. coli* OP50, HT115 (DE3) con un vector vacío, o HT115(DE3) que expresa los ARNbc dirigidos a *atp-2*, *CeTOR/let-363*, o *ogdh-1*, según se indica. Cuando la mayoría de los animales de una muestra dada alcanzaron por primera vez la fase L3 media, las larvas L3 individuales se montaron en portaobjetos de microscopio y se anestesiaron con 1,6 mM de levamisol (Sigma, 31742). Los nematodos se observaron utilizando un microscopio confocal Zeiss Axiovert 200M con un láser LSM5 Pascal, y las imágenes se capturaron utilizando LSM Image Examiner (Zeiss). Para cada espécimen, se contaron los puntos GFP::LGG-1 (autofagosomas) de la epidermis, incluidas las células del borde lateral y Hyp7, en tres regiones separadas de 140,97 μ m² utilizando *partículas de análisis* en ImageJ (Schneider, y col. Nat Methods 9, 671-675 (2012)). Las mediciones se realizaron a ciegas tanto para el genotipo como para el suplemento. El análisis estadístico se realizó con Microsoft Excel (prueba t, varianza desigual con dos colas y dos muestras).

Ensayo de autofagia en células de mamíferos. Las células HEK-293 se sembraron en placas de 6 pocillos a 2.5 $\times$ 10⁵ células/pocillo en medio DMEM suplementado con FBS al 10 % y 10 mM de glucosa, y se incubaron durante la noche antes del tratamiento con octanol (control de vehículo) o α -KG de octilo durante 72 horas. Las células se lisaron en regulador M-PER con inhibidores de proteasa y fosfatasa. Los lisados se sometieron a SDS-PAGE en un 4-12 % de gel con gradiente de Bis-Tris con un regulador MES y se sometieron a transferencia Western para determinar LC3 (Novus, NB100-2220). LC3 es el homólogo mamífero del gusano LGG-1, y la conversión de la LC3-I soluble en la LC3-II lipídica se activa en la autofagia, p. ej., al morir de hambre (Kabeya, y col. EMBO J 19, 5720-5728 (2000)).

Relaciones de bombeo faríngeo de *C. elegans* tratado con 8 mM de α -KG

Se evaluaron las tasas de bombeo faríngeo de 20 gusanos N2 silvestres por afección. Las contracciones faríngeas se registraron durante 1 minuto utilizando un microscopio Zeiss M2BioDiscovery y una cámara de vídeo Sony NDR-XR500V adjunta con un zoom óptico de 12 veces. Los vídeos resultantes se reprodujeron a una velocidad de 0,3x con

MPlayerX y se contaron las bombas faríngeas. El análisis estadístico se realizó con Microsoft Excel (prueba t, varianza desigual con dos colas y dos muestras).

Ensayo de niveles de α -KG en *C. elegans* adultos

Los gusanos adultos sincronizados se recolectaron de placas con vehículo (H_2O) o 8 mM de α -KG, se lavaron 3 veces con regulador M9 y se congelaron instantáneamente. Los gusanos se lisaron en M9 utilizando tubos de matriz C para lisado (MP Biomedicals, 6912-100) y el homogeneizador de sobremesa de alta velocidad FastPrep-24 (MP Biomedicals) en una sala a 4 °C (romper gusanos durante 20 segundos a 6,5 m/s, reposar sobre hielo durante 1 minuto; repetir tres veces). Los animales lisados se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar los restos de gusanos, y se guardó el sobrenadante. La concentración de proteína del sobrenadante se determinó mediante el kit de ensayo de proteína de BCA (Pierce, 23223); no hubo diferencias en el nivel de proteína por gusano en los animales tratados con α -KG y los tratados con vehículos (los datos no se muestran). El contenido de α -KG se evaluó como se ha descrito anteriormente (MacKenzie, y col. Mol Cell Biol 27, 3282-3289 (2007)) con modificaciones. Los lisados de gusanos se incubaron a 37 °C en 100 mM de KH_2PO_4 (pH 7,2), 10 mM de NH_4Cl , 5 mM de $MgCl_2$, y 0,3 mM de NADH durante 10 minutos. A continuación, se añadió glutamato deshidrogenasa (Sigma, G2501) para alcanzar una concentración final de 1,83 unidades/ml. En estas condiciones, la glutamato deshidrogenasa utiliza α -KG y NADH para producir glutamato. La disminución de la absorbancia se monitorizó a 340 nm. El nivel intracelular de α -KG se determinó a partir de la disminución de la absorbancia en NADH. La molaridad aproximada de α -KG presente en los animales se estimó utilizando el contenido promedio de proteína (aproximadamente 245 ng/gusano del ensayo BCA) y el volumen (aproximadamente 3 nL para los gusanos adultos de 1,1 mm de longitud y 60 μm de diámetro (WorldWideWeb.wormatlasDOTORG/hermaphrodite/introduction/Introframeset.HyperTextMarkupLanguage, en donde “WorldWideWeb” es “www”, “DOTORG” es “.org”, y “HyperTextMarkupLanguage” es “html”)).

Para el análisis cuantitativo de α -KG en gusanos utilizando UHPLC-ESI/MS/MS, los gusanos adultos sincronizados del día 1 se colocaron en placas de vehículos con o sin bacterias durante 24 horas, y después se recolectaron y lisaron de la misma manera que se mencionó antes. El análisis de α -KG mediante LC/MS/MS se llevó a cabo en un sistema UHPLC Agilent 1290 Infinity y un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo 6460 (Agilent Technologies) utilizando fuente de ionización por pulverización (ESI, por sus siglas en inglés) con tecnología Agilent Jet Stream. Los datos se adquirieron con el software Agilent MassHunter Data Acquisition, versión B.06.00, y se procesaron para la selección de iones precursores y productos con el software MassHunter Qualitative Analysis, versión B.06.00, y para la calibración y cuantificación con el software MassHunter Quantitative Analysis for QQQ, versión B.06.00.

Para UHPLC, se inyectaron 3 μl de estándares de calibración y muestras en el sistema UHPLC, que incluía una bomba binaria G4220A con un desgasificador de vacío incorporado y un muestreador automático G4226A de alto rendimiento termoestatizado. Se utilizaron una columna analítica de amida ACQUITY UPLC BEH (2,1 $\times$ 50 mm, 1,7 μm) y una precolumna de amida VanGuard BEH (2,1 $\times$ 5 mm, 1,7 μm) de Waters Corporation a un caudal de 0,6 ml/min utilizando 50/50/0,04 de acetonitrilo/agua/hidróxido de amonio con 10 mM de acetato de amonio como fase móvil A y 95/5/0,04 de acetonitrilo/agua/hidróxido de amonio con 10 mM de acetato de amonio como fase móvil B. La columna se mantuvo a temperatura ambiente. Se aplicó el siguiente gradiente: 0-0,41 min: 100 % B isocrático; 0,41-5,30 min: 100-30 % B; 5,3-5,35 min: 30-0 % B; 5,35-7,35 min: 0 % B isocrático; 7,35-7,55 min: 0-100 % B; 7,55-9,55 min: 100 % B isocrático.

Para la detección de EM, los datos del espectro de masas de ESI se registraron en un modo de ionización negativa mediante MRM. Las transiciones MRM de α -KG y su ISTD $^{13}C_4$ - α -KG (Cambridge Isotope Laboratories) se determinaron utilizando un método de UHPLC de 37 % B isocrático de 1 minuto a través de la columna a un caudal de 0,6 ml/min. Se observó que el ion precursor de $[M-H]^-$ y el ion producto de $[M-CO_2-H]^-$ tenían las relaciones señal/ruido más altas. Los iones precursor y producto son, respectivamente, 145,0 y 100,9 para AKG, y 149,0 y 104,9 para ISTD $^{13}C_4$ - α -KG. Se utilizó nitrógeno como gas de secado, revestimiento, y colisión. Todos los parámetros de la fuente y del analizador se optimizaron con los programas Agilent MassHunter Source e iFunnel Optimizer y Optimizer, respectivamente. Los parámetros de fuente son los siguientes: temperatura del gas de secado 120 °C, flujo de gas de secado de 13 l/min, presión del nebulizador de 55 psi, temperatura del gas de vaina de 400 °C, flujo de gas de vaina de 12 l/min, voltaje capilar de 2000 V y voltaje de la boquilla de 0 V. Los parámetros del analizador son los siguientes: voltaje del fragmentador de 55 V, energía de colisión de 2 V y voltaje del acelerador de celdas de 1 V. Los eluyentes de UHPLC antes de 1 minuto y después de 5,3 minutos se desviaron a la basura.

Ésteres permeables a la membrana de α -KG

α -KG de octilo, un éster de α -KG permeable a la membrana (MacKenzie, y col. Mol Cell Biol 27, 3282-3289 (2007); Zhao, y col. Science 324, 261-265 (2009); Xu, y col. Cancer Cell 19, 17-30 (2011); y Jin, y col. Cancer Res 73, 496-501 (2013)), se utilizó para suministrar α -KG a través de las membranas lipídicas en experimentos con células y mitocondrias. Tras la hidrólisis por las esterasas celulares, α -KG de octilo produce α -KG y el subproducto octanol. Se encontró que, si bien el control de octanol no tiene ningún efecto (figura 6, paneles e-f y figura 10, panel a), el α -KG por sí solo puede unirse e inhibir la ATP sintasa (figura 2, paneles a-b, figura 6, paneles a-b y los datos no se muestran), disminuir el ATP y la OCR (figura 2, panel e y figura 2, panel g), inducir la autofagia (figura 4, panel b), y aumentar la esperanza de vida de *C. elegans* (figura 1, figura 3, figura 5, figura 9 y figura 13). La existencia y la actividad de las

esterasas en los experimentos de cultivo celular y mitocondrial se confirmaron utilizando calceína AM (C1430, Molecular Probes), un sustrato de esterasa, que emite fluorescencia tras la hidrólisis, y también mediante espectrometría de masas (los datos no se muestran). La hidrólisis por esterasas explica por qué distintos ésteres de α -KG, tal como α -KG de 1-octilo, α -KG de 5-octilo, y α -KG de dimetilo, tienen efectos similares a los del α -KG (figura 6, paneles g-h y figura 13).

Ensayos de crecimiento y viabilidad celular

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos y, después de una incubación durante la noche, se trataron con las concentraciones indicadas de cada compuesto. Tras la recolección, las células se tiñeron con naranja acridina (AO) y DAPI. El número de células y la viabilidad se midieron basándose en la fluorescencia AO y DAPI medida por NC3000 (Chemometec) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis del perfil metabólico

Las células se cultivaron durante 24 horas, se enjuagaron con PBS, y se añadió medio que contenía [1,2-¹³C]glucosa (1 g/l). Después de 24 horas de cultivo, las células se enjuagaron con 150 mM de NH₄AcO enfriado con hielo (pH 7,3), seguido de la adición de 400 ml de metanol frío y 400 ml de agua fría. Las células se rasparon, se transfirieron a un tubo Eppendorf, y se añadieron 10 nmol de norvalina y 400 ml de cloroformo a cada muestra. Para la extracción del metabolito, las muestras se agitaron con vórtice durante 5 minutos en hielo, se centrifugaron y la capa acuosa se transfirió a un vial de vidrio y se secó. Los metabolitos se resuspendieron en ACN al 70 % y se cargaron 5 ml de muestra en una columna Phenomenex Luna 3u NH₂ 100A (150 × 2,0 mm). La separación cromatográfica se realizó en un UltiMate 300RSLC (Thermo Scientific) con las fases móviles A (5 mM de NH₄AcO, pH 9.9) y B (ACN) y un caudal de 300 ml/minuto. El gradiente osciló entre el 15 % de A y el 95 % de A durante 18 minutos, 9 minutos en 95 % de A isocrático y el reequilibrio durante 7 minutos. La detección de metabolitos se logró con un espectrómetro de masas Thermo Scientific Q Exactive en modo de cambio de polaridad (+3,0 kV/-2,25 kV). Se utilizó TraceFinder 3.1 (Thermo Scientific) para cuantificar los metabolitos como área bajo la curva mediante el tiempo de retención y mediciones de masa precisas (≤ 3 ppm). Las cantidades relativas de metabolitos se calcularon sumando todos los isotopómeros de un metabolito dado.

Ensayo para la importación de ADP

Las mitocondrias hepáticas de ratones recién preparadas se suspendieron en 1 μ g/ μ l en un medio que consistía en 220 mM de manitol, 70 mM de sacarosa, 2 mM de HEPES, 2,74 μ M de antimicina A, 5 μ M de rotenona, 1 mM de

EGTA y 10 mM de regulador de fosfato de potasio, pH 7,4. La suspensión de mitocondrias se incubó con el fármaco designado durante 30 minutos a 37 °C. Tras la incubación, la suspensión se transfirió a hielo durante 10 minutos de incubación. Posteriormente, se añadieron 100 μ M de [³H]ADP (radiactividad específica, 185 kBq/pmol), y la mezcla se agitó inmediatamente con vórtice y se incubó durante 20 segundos en hielo. La reacción se terminó mediante la adición de 10 μ M de carboxiatractilosido y la mezcla se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Tras la centrifugación, se recogió el sobrenadante para su lectura y el sedimento se lavó dos veces con el mismo medio complementado con 10 μ M de carboxiatractilosido. Tras el lavado, el sedimento se lisó mediante la adición de 0,2 ml de SDS al 1 %. La radiactividad del lisado y el sobrenadante se determinó mediante el analizador de centelleo líquido TRI-CARB 2300 TR. La velocidad de translocación de ADP-ATP se determinó mediante la relación del sedimento frente a la suma de la lectura del sedimento y el sobrenadante.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se repitieron al menos dos veces con resultados idénticos o similares. Los datos representan réplicas biológicas. Se utilizaron pruebas estadísticas apropiadas para cada figura. Los datos cumplen con los supuestos de las pruebas estadísticas descritas para cada figura. La media $\pm$ s.d. se representa en todas las figuras a menos que se indique lo contrario.

Resultados

Como se muestra en la figura 1, el α -KG prolonga la esperanza de vida de *C. elegans* adultos. El panel a muestra que α -KG prolonga la esperanza de vida de los gusanos adultos en la pantalla de longevidad de los metabolitos. Se usaron 8 mM para todos los metabolitos. El panel b muestra la estructura de α -KG. El panel c muestra la respuesta a la dosis de α -KG en longevidad. Los paneles d-e muestran que α -KG prolonga la esperanza de vida de los gusanos alimentados con bacterias detenidas con ampicilina (panel d) o muertas con irradiación γ (panel e) ($P < 0,0001$). El panel f muestra que α -KG no prolonga aún más la esperanza de vida de los gusanos *ogdh-1(iARN)* ($P = 0,65$).

Como se muestra en la figura 2, α -KG se une e inhibe la ATP sintasa. El panel a es un gel teñido con Sypro Ruby que identifica ATP5B como una proteína que se une a α -KG mediante DARTS. Punta de flecha = banda protegida. El panel b es un gel que confirma la unión específica de α -KG a ATP5B mediante DARTS y transferencia Western. El panel c es un gráfico que muestra la inhibición de ATP sintasa por α -KG (liberado de α -KG de octilo). Esta inhibición fue

reversible (no se muestra). Los paneles d-g muestran niveles reducidos de ATP en (panel d) fibroblastos humanos normales tratados con α -KG de octilo ($**P = 0,0016$, $***P < 0,0001$) y (panel e) gusanos tratados con α -KG (día 2, $P = 0,969$; día 8, $*P = 0,012$). Las tasas de consumo de oxígeno reducido se muestran en el panel f para las células tratadas con α -KG de octilo ($***P = 0,0004$, $****P < 0,0001$) y en el panel g para los gusanos tratados con α -KG ($P < 0,0001$). RLU, unidad de luminiscencia relativa. El panel h muestra que α -KG, liberado por α -KG de octilo (800 μ M), disminuye el estado 3, pero no el estado 4o o 3u ($P = 0,997$), la respiración en las mitocondrias aisladas del hígado de un ratón. La relación de control respiratorio disminuye en el α -KG de octilo ($3,1 \pm 0,6$) en comparación con el vehículo ($5,2 \pm 1,0$) ($*P = 0,015$). El panel i es un gráfico de Eadie-Hofstee de la cinética de inhibición en estado estacionario de la ATP sintasa por α -KG (producida por la hidrólisis *in situ* de α -KG de octilo). [S] es la concentración de sustrato (ADP), y V es la velocidad inicial de síntesis de ATP en presencia de 200 μ M de octanol (control de vehículo) u α -KG de octilo. α -KG (producido a partir de α -KG de octilo) disminuye $V_{\max}$ aparente (53,9 a 26,7) y K_m (25,9 a 15,4), mediante un ajuste de mínimos cuadrados por regresión no lineal. Número de experimentos independientes, paneles c-i: 2. La media $\pm$ s.d. se representa gráficamente. Mediante una prueba t, varianza desigual con dos colas y dos muestras. Para el panel e, la primera barra de cada conjunto es el vehículo.

Como se muestra en la figura 3, la longevidad de α -KG está mediada por la ATP sintasa y el eje DR/TOR. El efecto de α -KG en la esperanza de vida se muestra en: Gusanos *atp-2(iARN)* (panel a), *daf-2(e1370)* (panel b), *eat-2(ad1116)* (panel c), *CeTOR(iARN)* (panel d), *daf-16(mu86)* (panel e), *pha-4(zu225)* (panel f), o *hif-1(ia4)* (panel g). El número de experimentos independientes: Control de iARN (6), *atp-2* (2), *CeTOR* (3), *N2* (5), *daf-2* (2), *eat-2* (2), *pha-4* (2), *daf-16* (2), *hif-1* (5).

Como se muestra en la figura 4, la inhibición de la ATP sintasa por α -KG provoca una disminución conservada de la actividad de la vía TOR. El panel a muestra una disminución de la fosforilación de los sustratos de mTOR en las células U87 tratadas con α -KG de octilo u oligomicina. Se obtuvieron resultados similares en HEK-293, fibroblastos humanos normales, y MEF (no se muestran). El panel b muestra un aumento de la autofagia en animales tratados con α -KG o iARN para *atp-2* o *CeTOR*. El panel c muestra los puntos GFP::LGG-1 cuantificados utilizando ImageJ. 2-3 experimentos independientes. Las barras indican la media. $****P < 0,0001$; NS, no significativo. El panel d muestra que los niveles de α -KG aumentan en los gusanos hambrientos ($**P < 0,01$). La media $\pm$ s.d. se representa gráficamente. Mediante la prueba t, varianza desigual con dos colas y dos muestras en los paneles c-d. El panel e es un modelo esquemático de la longevidad mediada por α -KG. A medida que los niveles de α -KG están elevados en *C. elegans* famélicos (panel d), el α -KG puede mediar en la prolongación de la esperanza de vida mediante un mecanismo similar a la vía de la inanición y la DR (panel e).

Como se muestra en la figura 5, la suplementación con α -KG prolonga la esperanza de vida de *C. elegans* adultos, pero no cambia la tasa de crecimiento de bacterias, la ingesta de alimentos, la velocidad de bombeo faríngeo, ni el tamaño de las crías de los gusanos. El panel a muestra una sólida extensión de la esperanza de vida *C. elegans* adultos de α -KG. 8 mM de α -KG aumentó la esperanza de vida media de N2 en un promedio de 47,3 % en tres experimentos independientes ($P < 0,0001$ para cada experimento, mediante prueba de rango logarítmico). Expt. n.^o 1, $m_{veh} = 18,9$ ($n = 87$), $m_{\alpha-KG} = 25,8$ ($n = 96$); Expt. n.^o 2, $m_{veh} = 17,5$ ($n = 119$), $m_{\alpha-KG} = 25,4$ ($n = 97$); Expt. n.^o 3, $m_{veh} = 16,3$ ($n = 100$), $m_{\alpha-KG} = 26,1$ ($n = 104$). m , esperanza de vida media (días de adultez); n , número de animales en la prueba. El panel b muestra que los gusanos suplementados con 8 mM de α -KG y los gusanos con la inactivación de α -KGDH por iARN (codificado por *ogdh-1*) tienen niveles elevados de α -KG. Los gusanos adultos jóvenes se colocaron en placas de tratamiento sembradas con *E. coli* HT115 de control o ARNbc de *ogdh-1* que expresaba HT115, y se analizó el contenido de α -KG después de 24 horas. El panel c muestra que el tratamiento con α -KG que comienza en la fase del óvulo y que comienza en la edad adulta produjo incrementos idénticos en la esperanza de vida. Vehículo, vehículo, tratamiento con control del vehículo durante las fases larvaria y adulta ($m = 15,6$, $n = 95$); Vehículo, α -KG, tratamiento con vehículo durante las etapas de larva y con 8 mM de α -KG en la edad adulta ($m = 26,3$, $n = 102$), $P < 0,0001$ (prueba de rango logarítmico); α -KG, α -KG, tratamiento con 8 mM de α -KG en todas las etapas de larva y adulto ($m = 26,3$, $n = 102$), $P < 0,0001$ (prueba de rango logarítmico). m , esperanza de vida media (días de edad adulta); n , número de animales en la prueba. El panel d muestra que α -KG no altera la tasa de crecimiento de *E. coli* OP50, que es la fuente de alimento estándar de laboratorio para los nematodos. Se añadió α -KG (8 mM) o vehículo (H_2O) al medio LB estándar y el pH se ajustó a 6,6 mediante la adición de NaOH. Las células bacterianas del mismo cultivo de OP50 durante la noche se añadieron a la mezcla LB $\pm$ α -KG a una dilución de 1:40, y después se colocaron en la incubadora a 37 °C a 300 rpm. La absorbancia a 595 nm se leyó a intervalos de tiempo de 1 hora para generar la curva de crecimiento. El panel e es una representación esquemática del ensayo de preferencia alimentaria. El panel f es un gráfico que muestra que los gusanos N2 no muestran preferencia entre alimentos con *E. coli* OP50 tratados con vehículo o α -KG ($P = 0,85$, según la prueba t, varianza desigual con dos colas y dos muestras), ni entre *E. coli* OP50 tratadas de forma idéntica. El panel g muestra la velocidad de bombeo faríngeo de *C. elegans* en 8 mM de α -KG no se altera significativamente (mediante la prueba t, varianza desigual con dos colas y dos muestras). El panel h muestra el tamaño de la cría de *C. elegans* tratados con 8 mM de α -KG. El análisis del tamaño de las crías se realizó a 20 °C. Se colocaron 10 gusanos L4 silvestres cada uno por separado en una placa NGM que contenía un vehículo o 8 mM de α -KG. Los gusanos se transfirieron una por placa a una placa nueva todos los días y se dejó que los huevos puestos eclosionaran y se desarrollaran en la placa anterior. Las crías se contaron a medida que se utilizaba una aspiradora para sacarlas de la placa. Los animales con 8 mM de α -KG no mostraron diferencias significativas en el tamaño de las crías en comparación con los animales con placas de vehículos ($P = 0,223$, según la prueba t, varianza desigual con dos colas y dos muestras). La media $\pm$ s.d. se representa gráficamente en todos los casos.

Como se muestra en la figura 6, α -KG se une a la subunidad beta de la ATP sintasa e inhibe la actividad del complejo V, pero no de los otros complejos de ETC. El panel a es una transferencia Western que muestra la protección de la proteína ATP-2 contra la digestión con pronasa tras la unión a α -KG en el ensayo DARTS. El anticuerpo para ATP5B humano (Sigma, AV48185) reconoce el epítipo ¹⁴⁴IMNVIGEPIDERGPIKTKQFAPIHAEPEFMEMSVEQEILVTGIKVVDDL¹⁹³ (id. de sec. n.º 7) que tiene un 90 % de identidad con el ATP-2 de *C. elegans*. La banda de menor peso molecular, cercana a los 20 kDa, es un fragmento proteolítico de la proteína de longitud completa que corresponde al dominio unido directamente por α -KG. El panel b muestra que α -KG no afecta a la actividad del complejo IV. La actividad del complejo IV se ensayó utilizando el kit de actividades MitoTox OXPHOS del complejo IV (Abcam, ab109906). La actividad relativa del complejo IV se comparó con los controles del vehículo (H_2O). Se utilizó cianuro de potasio (Sigma, 60178) como control positivo para el ensayo. La actividad del complejo V se ensayó utilizando el ensayo de microplacas MitoTox Complex V OXPHOS Activity (Abcam, ab109907). El panel c muestra que los gusanos *atp-2(iARN)* tienen un menor consumo de oxígeno en comparación con el control (*gfp* en el vector iARN), $P < 0,0001$ (prueba *t*, dos colas, varianza desigual de dos muestras) para toda la serie temporal (2 experimentos independientes); similar a los gusanos tratados con α -KG que se muestran en la figura 2, panel g. El panel d muestra que el α -KG no afecta al flujo de electrones a través de la cadena de transporte de electrones. La OCR de mitocondrias aisladas de hígado de ratón en estado basal (piruvato y malato como sustrato del complejo I e inhibidor del complejo II, respectivamente, en presencia de FCCP) y en respuesta a la inyección secuencial de rotenona (Rote; inhibidor del complejo I), succinato (Succ; complejo II (sustrato), antimicina A (AA; inhibidor del complejo III), ascorbato/tetrametilfenilendiamina (ASC/TMPD; sustrato del citocromo c (complejo IV)). No se observó ninguna diferencia en la respiración del complejo I (C I), el complejo II (C II), o el complejo IV (C IV) después de 30 minutos de tratamiento con 800 μ M de α -KG de octilo, mientras que el complejo V se inhibió (véase figura 2, panel h) mediante el mismo tratamiento (2 experimentos independientes). Los paneles e-f no muestran ninguna diferencia significativa en el acoplamiento (panel e) o en el flujo de electrones (panel f) que se observó con el control del vehículo con octanol o DMSO. Los paneles g-h muestran que el tratamiento con α -KG de 1-octilo o α -KG de 5-octilo arrojó resultados idénticos en los ensayos de acoplamiento (panel g) o flujo de electrones (panel h). La media $\pm$ s.d. se representa gráficamente en todos los casos.

Como se muestra en la figura 7, el tratamiento con oligomicina prolonga la esperanza de vida de *C. elegans* y mejora la autofagia de una manera que depende de let-363. El panel a muestra que la oligomicina prolonga la esperanza de vida de *C. elegans* adultos de una manera dependiente de la concentración. El tratamiento con oligomicina se inició en la etapa de adulto joven. 40 μ M de oligomicina aumentó la esperanza de vida media de gusanos N2 en 32,3 % ($P < 0,0001$, mediante prueba de rango logarítmico); véase la figura 13 para obtener más detalles. El panel b muestra imágenes confocales de puntos GFP::LGG-1 en la epidermis L3 de *C. elegans* con vehículo, oligomicina (40 μ M) o α -KG (8 mM) y número de puntos que contienen GFP::LGG-1 cuantificados con ImageJ. Las barras indican la media. Autofagia en *C. elegans* tratada con oligomicina o α -KG es significativamente mayor que en los animales de control tratados con vehículos (prueba *t*, varianza desigual con dos colas y dos muestras). El panel c muestra que no hay diferencias significativas (n.s.) entre los gusanos de control tratados con oligomicina y los gusanos *CeTOR(iARN)* tratados con vehículo, ni entre los gusanos *CeTOR(iARN)* tratados con α -KG según los experimentos independientes de la figura 4, paneles b-c; también, la oligomicina no aumenta la autofagia en los gusanos *CeTOR(iARN)* (en todo caso, puede haber una pequeña disminución*); mediante una prueba *t*, varianza desigual con dos colas y dos muestras. Las barras indican la media.

La figura 8 muestra los análisis del estrés oxidativo en gusanos tratados con iARN de α -KG o *atp-2*. El panel a muestra que los gusanos *atp-2(iARN)* tienen niveles más altos de fluorescencia DCF que los gusanos de control *gfp* ($P < 0,0001$, mediante prueba *t*, varianza desigual con dos colas y dos muestras). La suplementación con α -KG también provoca una mayor fluorescencia del DCF, tanto en los gusanos alimentados con HT115 (para iARN) como con OP50 ($P = 0,0007$ y $P = 0,0012$, respectivamente). Los niveles de ROS se midieron utilizando diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCF -DA). Dado que se utilizaron lisados de gusanos enteros, aquí se midió el estrés oxidativo celular total. El H_2DCF -DA (Molecular Probes, D399) se disolvió en etanol hasta una concentración de materia prima de 1,5 mg/ml. Se preparó materia prima cada vez antes de su uso. Para medir ROS en los lisados de gusanos, se hidrolizó una concentración operativa de H_2DCF -DA a 30 ng/ml con 0,1 M NaOH a temperatura ambiente durante 30 minutos para generar 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) antes de mezclarla con los lisados de gusanos enteros en una placa negra de 96 pocillos (Greiner Bio-One). La oxidación de DCFH por ROS produce 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) altamente fluorescente. La fluorescencia de DCF se leyó a una excitación/emisión de 485/530 nm utilizando SpectraMax MS (Molecular Devices). Se utilizó H_2O_2 como control positivo (no se muestra). Para preparar los lisados de gusanos, se cultivaron animales adultos jóvenes sincronizados en placas que contenían vehículo o 8 mM de α -KG y OP50 o HT115 *E. coli* durante 1 día, y después se recolectaron y lisaron como se describe en la presente memoria. La media $\pm$ s.d. se representa gráficamente. El panel b muestra que no hubo ningún cambio significativo en la oxidación de las proteínas tras el tratamiento con α -KG o con *atp-2(iARN)*. Los niveles de proteína oxidada se determinaron mediante OxyBlot. Se colocaron animales N2 adultos jóvenes sincronizados en placas que contenían vehículo o 8 mM de α -KG y se sembraron con bacterias OP50 o HT115 que expresaban control o ARNbc de *atp-2*. Los gusanos adultos del día 2 y del día 3 se recolectaron y se lavaron 4 veces con regulador M9, y después se almacenaron a -80 °C durante al menos 24 horas. Se añadió regulador Laemmli (Biorad, 161-0737) a cada muestra y los animales se lisaron mediante ciclos alternativos de ebullición y congelación. Los animales lisados se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar los restos del gusano, y se recogió el sobrenadante para el

análisis Oxyblot. La concentración de proteína de las muestras se determinó mediante el ensayo de proteínas de 660 nm (Thermo Scientific, 1861426) y se normalizó para todas las muestras. La carbonilación de las proteínas en cada muestra se detectó utilizando el kit de detección de oxidación de proteínas OxyBlot (Millipore, S7150).

La figura 9 muestra la esperanza de vida de α -KG en ausencia de *aak-2*, *daf-16*, *hif-1*, *vhl-1* o *egl-9*. El panel a muestra los gusanos N2, $m_{veh} = 17,5$ ($n = 119$), $m_{\alpha-KG} = 25,4$ ($n = 97$), $P < 0,0001$; o mutantes *aak-2(ok524)*, $m_{veh} = 13,7$ ($n = 85$), $m_{\alpha-KG} = 17,1$ ($n = 83$), $P < 0,0001$. El panel b muestra los gusanos N2 se alimentaron de control de iARN de *gfp*, $m_{veh} = 18,5$ ($n = 101$), $m_{\alpha-KG} = 23,1$ ($n = 98$), $P < 0,0001$; o iARN de *daf-16*, $m_{veh} = 14,3$ ($n = 99$), $m_{\alpha-KG} = 17,6$ ($n = 99$), $P < 0,0001$. El panel c muestra los gusanos N2, $m_{veh} = 21,5$ ($n = 101$), $m_{\alpha-KG} = 24,6$ ($n = 102$), $P < 0,0001$; mutantes *hif-1(ia7)*, $m_{veh} = 19,6$ ($n = 102$), $m_{\alpha-KG} = 23,6$ ($n = 101$), $P < 0,0001$; mutantes *vhl-1(ok161)*, $m_{veh} = 20,0$ ($n = 98$), $m_{\alpha-KG} = 24,9$ ($n = 100$), $P < 0,0001$; o mutantes *egl-9(sa307)*, $m_{veh} = 16,2$ ($n = 97$), $m_{\alpha-KG} = 25,6$ ($n = 96$), $P < 0,0001$. m, vida útil media (días de adultez); n, número de animales en la prueba. Los valores de p se determinaron mediante la prueba de rango logarítmico. Número de experimentos independientes: N2 (8), *hif-1* (5), *vhl-1* (1), y *egl-9* (2); véase la figura 13 para obtener más detalles. Dos alelos mutantes de *hif-1* diferentes (Zhang, y col. PLoS One 4, e6348 (2009)) se han utilizado: *ia4* (se muestra en la figura 3, panel g) es una delección en varios intrones y exones; *ia7* (se muestra arriba) es un codón de parada temprana que provoca una proteína truncada. Ambos alelos tienen el mismo efecto en la esperanza de vida. Ambos alelos se probaron para determinar la longevidad de α -KG y se obtuvieron los mismos resultados.

Como se muestra en la figura 10, α -KG disminuye la actividad de la vía TOR, pero no interactúa directamente con TOR. El panel a muestra que la fosforilación de S6K (T389) disminuyó en las células U87 tratadas con α -KG de octilo, pero no en las células tratadas con control de octanol. Se obtuvieron los mismos resultados utilizando células HEK-293 y MEF. El panel b muestra que la fosforilación de AMPK (T172) se regula al alza en las células WI-38 tras la inhibición del complejo V por parte de α -KG, lo que concuerda con la disminución del contenido de ATP en las células y animales tratados con α -KG. Sin embargo, esta activación de AMPK parece implicar una inhibición más severa del complejo V que la inactivación de mTOR ya que la oligomicina o una mayor concentración de α -KG de octilo aumentó la P-AMPK, mientras que las concentraciones de α -KG de octilo comparables a aquellas que disminuyeron el ATP celular. El contenido (figura 2, panel d) o el consumo de oxígeno (figura 2, panel f) también fueron suficientes para disminuir P-S6K. Se obtuvieron los mismos resultados utilizando células U87. La transferencia Western se realizó con anticuerpos específicos contra P-AMPK T172 (Cell Signaling Technology, 2535S) y AMPK (Cell Signaling Technology, 2603S). El panel c muestra que el α -KG todavía induce la autofagia en los gusanos *aak-2* (iARN); $**P < 0,01$ (prueba t, varianza desigual con dos colas y dos muestras). El número de puntos que contenían GFP::LGG-1 se cuantificó utilizando ImageJ. Las barras indican la media. Los paneles d-e muestran que α -KG no se une directamente a TOR según lo determinado por DARTS. Las células HEK-293 (panel d) o HeLa (panel e) se lisaron en regulador M-PER (Thermo Scientific, 78501) con la adición de inhibidores de proteasa (Roche, 11836153001) e inhibidores de fosfatasa (50 mM de NaF, 10 mM de β -glicerofosfato, 5 mM de pirofosfato de sodio, 2 mM de Na_2VO_4). La concentración de proteína del lisado se midió mediante el kit de ensayo de proteína de BCA (Pierce, 23227). Se añadió un regulador TNC enfriado (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 50 mM de NaCl, 10 mM de CaCl_2) al lisado de proteína y, a continuación, el lisado de proteína se incubó con control de vehículo (DMSO) o concentraciones variables de α -KG durante 1 hora (para el panel d) o 3 horas (para el panel e) a temperatura ambiente. Las digestiones con pronasa (Roche, 10165921001) se realizaron durante 20 minutos a temperatura ambiente y se detuvieron añadiendo regulador de carga de SDS y calentando inmediatamente a 95 °C durante 5 minutos (para el panel d) o 70 °C durante 10 minutos (para el panel e). Las muestras se sometieron a SDS-PAGE en gel con gradiente de Bis-Tris al 4-12 % (Invitrogen, NP0322BOX) y se transfirieron por Western con anticuerpos específicos contra ATP5B (Santa Cruz, sc58618), mTOR (Cell Signaling Technology, 2972) o GAPDH (Ambion, AM4300). ImageJ se utilizó para cuantificar las relaciones mTOR/GAPDH y ATP5B/GAPDH. La susceptibilidad de la proteína mTOR a la digestión con pronasa no cambia en presencia de α -KG, mientras que, como era de esperar, la resistencia a la pronasa en presencia de α -KG aumenta en el caso del ATP5B. El panel f muestra un aumento de la autofagia en las células HEK-293 tratadas con α -KG de octilo, lo que se confirmó mediante el análisis de transferencia Western de MAP1 LC3 (Novus, NB100-2220), lo que concuerda con una disminución de la fosforilación de la quinasa ULK1 iniciadora de la autofagia (figura 4, panel a).

Como se muestra en la figura 11, la autofagia se potencia en *C. elegans* tratados con iARN de *ogdh-1*. El panel a muestra imágenes confocales de puntos GFP::LGG-1 en la epidermis de la etapa L3 media, control o desactivación de *ogdh-1*, *C. elegans* tratados con vehículo o α -KG (8 mM). El panel b muestra el número de puntos GFP::LGG-1 cuantificados utilizando ImageJ. Las barras indican la media. Los gusanos *ogdh-1* (iARN) tienen niveles de autofagia significativamente más altos, y el α -KG no aumenta significativamente la autofagia en los gusanos *ogdh-1* (iARN) (prueba t, varianza desigual con dos colas y dos muestras).

Como se muestra en la figura 14, 2-HG prolonga la esperanza de vida de *C. elegans* adultos. El panel A muestra las estructuras químicas de ácido 2-hidroxiglutarico y ácido α -cetoglutarico. El panel B muestra que la esperanza de vida de los gusanos suplementados con (R)-2-HG es similar a la de los gusanos suplementados con α -KG. La esperanza de vida media (días de la edad adulta) con tratamiento en el vehículo $m_{veh} = 14,0$ ($n = 112$ animales en la prueba); $m_{\alpha-KG} = 20,7$ ($n = 114$), $P < 0,0001$ (prueba de rango logarítmico); $m_{(R)-2-HG} = 20,0$ ($n = 110$), $P < 0,0001$ (prueba de rango logarítmico); $m_{Met} = 14,7$ ($n = 116$), $P = 0,4305$ (prueba de rango logarítmico); $m_{Leu} = 13,2$ ($n = 110$), $P = 0,3307$ (prueba de rango logarítmico). El panel C muestra que la esperanza de vida de los gusanos suplementados con (S)-2-HG es similar a la de los gusanos suplementados con α -KG. $m_{veh} = 15,7$ ($n = 85$); $m_{Na2\alpha-KG} = 21,5$ ($n = 99$), $P <$

0,0001 (prueba de rango logarítmico); $m_{(S)-2-HG} = 20,7$ ($n = 87$), $P < 0,0001$ (prueba de rango logarítmico). Todos los metabolitos se administraron a una concentración de 8 mM.

Como se muestra en la figura 15, 2-HG se une e inhibe la ATP sintasa. El panel A es un gel que muestra que ATP5B es una proteína de unión a 2-HG identificada mediante DARTS y transferencia Western. El panel B muestra la inhibición de la ATP sintasa por 2-HG. El 2-HG, liberado de 2-HG de octilo (600 μ M), disminuye el estado 3 (iniciado por 2 mM de ADP), pero no el estado 4o (insensible a la oligomicina, es decir, independiente del complejo V) o 3u (capacidad respiratoria máxima desacoplada del FCCP), en las mitocondrias aisladas del hígado de ratón. El octanol se utiliza como vehículo. Oligo, oligomicina; FCCP, cianuro-4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona de carbonilo; AA, antimicina A. El panel C muestra contenido de ATP disminuido en células U87 tratadas con 2-HG de octilo o α -KG de octilo ($*P < 0,05$, $***P < 0,001$; prueba t no apareada, varianza desigual con dos colas y dos muestras). El octanol no tiene ningún efecto sobre el contenido de ATP. El panel D muestra una respiración disminuida como lo indica la OCR ($**P < 0,01$, prueba t no apareada, varianza desigual con dos colas y dos muestras) en células U87 tratadas con 2-HG de octilo en medios de glucosa. El octanol no muestra ningún efecto sobre la OCR en comparación con DMSO. La media $\pm$ s.d. se representa gráficamente.

La figura 16 muestra la inhibición de la ATP sintasa en células IDH1(R132H). El panel A muestra la disminución de los niveles de ATP en las células U87 IDH1 (R132H) ($**P = 0,0071$). Mediante una prueba t no apareada, varianza desigual con dos colas y dos muestras. La media $\pm$ s.d. se representa gráficamente en todos los casos. Panel B) Disminución de la respiración en las células U87 IDH1(R132H) ($**P = 0,0037$). El panel C muestra la acumulación de 2-HG en las células U87/IDH1 (R132H) ($***I = 0,0003$). El panel D muestra el perfil metabólico de las células U87 tratadas con (R)-2-HG de octilo ($***P < 0,001$, $*P = 0,0435$). El panel E es un modelo esquemático de la señalización de metabolitos por α -KG y 2-HG a través de la inhibición de la ATP sintasa.

Las figuras 17A-I muestran la vulnerabilidad metabólica en células con inactivación de ATP5B, acumulación de 2-HG, o mutaciones de IDH. La figura 17A que muestra células U87/IDH1(R132H) tienen sensibilidad aumentada a la falta de glucosa ($***P < 0,001$). Las figuras 17B-D muestran que las células U87 tratadas con α -KG de octilo o 2-HG de octilo exhiben una viabilidad disminuida tras la privación de glucosa ($****P < 0,0001$, $***P < 0,001$, $**P < 0,01$, $*P < 0,05$). El octanol no tiene ningún efecto sobre la viabilidad. Figura 17E) Inactivación de ATP5B inhibe el crecimiento de las células U87 ($***P = 0,0004$). La figura 17F muestra que células HCT 116 IDH1(R132H/+) exhiben una vulnerabilidad aumentada al medio sin glucosa suplementado con (R)-3-hidroxibutirato ($***P < 0,001$). Mediante una prueba t no apareada, varianza desigual con dos colas y dos muestras. La media $\pm$ s.d. se representa gráficamente en todos los casos. Las figuras 17G-I muestran que las células U87 con inactivación de ATP5B, análogos hidrolizables con esterasa permeable a la membrana del tratamiento con α -KG o 2-HG, o que expresan establemente IDH1(R132H) exhiben una actividad disminuida del complejo 1 de mTOR en un medio que contienen galactosa y sin glucosa. S6K (T389) y 4E-BP1 (S65) son sustratos del complejo mTOR 1. El octanol no exhibe ningún efecto sobre la actividad de TOR.

Como se muestra en la figura 18, 2-HG no afecta al flujo de electrones a través de la cadena de transporte de electrones y no afecta a la importación de ADP. El panel A muestra la OCR de mitocondrias aisladas de hígado de ratón en estado basal (piruvato y malato como sustrato del complejo I e inhibidor del complejo II, respectivamente, en presencia de FCCP) y en respuesta a la inyección secuencial de rotenona (Rote; inhibidor del complejo I), succinato (sustrato del complejo II), antimicina A (AA; inhibidor del complejo III), tetrametilfenilenediamina (TMPD; sustrato del citocromo c (complejo IV)). No se observa ninguna diferencia en la respiración del complejo I (C I), el complejo II (C II), o el complejo IV (C IV) después de 30 minutos de tratamiento con 600 μ M de 2-HG de octilo, mientras que el complejo V se inhibe (figura 15, panel B) mediante el mismo tratamiento (2 experimentos independientes). El octanol se utiliza como vehículo. El panel B muestra que la importación de ADP se midió en presencia de octanol (control del vehículo) o 2-HG de octilo (600 μ M). (R)-2-HG de octilo, $P = 0,4237$; (S)-2-HG de octilo, $P = 0,1623$). El CATR (carboxiatractilósido), un conocido inhibidor de la importación de ADP, se utilizó como control positivo para el ensayo ($***P = 0,0003$). Mediante una prueba t no apareada, varianza desigual con dos colas y dos muestras. La media $\pm$ s.d. se representa gráficamente en todos los casos.

Como se muestra en la figura 19, 2-HG inhibe la respiración celular y disminuye los niveles de ATP. El panel a muestra oligomicina, un inhibidor conocido de sintasa ATP, se utiliza como un control positivo $*P < 0,05$; prueba t no apareada, varianza desigual con dos colas y dos muestras). Los paneles B-C muestran que las células U87 tratadas con 2-HG de octilo tienen una tasa de consumo de oxígeno (OCR) dependiente de la ATP sintasa (sensible a oligomicina) disminuida ($*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$; prueba t no apareada, varianza desigual con dos colas y dos muestras). La media $\pm$ s.d. se representa gráficamente en todos los casos.

La figura 20 muestra los perfiles energéticos y metabólicos celulares de las células acumuladas de 2-HG. El panel A muestra que las células HCT 116 IDH1(R132H/+) exhiben una disminución de la respiración ($**P = 0,0015$). El panel B muestra que los niveles de 2-HG son aproximadamente 100 veces más altos en las células HCT 116/IDH1 (R132H/+) que en las células de control parental ($****P < 0,0001$). El panel C muestra el perfil metabólico de los intermedios del ciclo de TCA y los aminoácidos relacionados en células U87 tratadas con (S)-2-HG de octilo ($*P < 0,05$). El panel D muestra el perfil metabólico de los intermedios del ciclo de TCA y los aminoácidos relacionados en células U87 tratadas

con α -KG de octilo ($***P < 0,001$, $**P < 0,01$). Prueba t no apareada, varianza desigual con dos colas y dos muestras. La media $\pm$ s.d. se representa gráficamente en todos los casos.

5 Como se muestra en la figura 21, las células HCT 116 IDH1(R132H/+) presentan vulnerabilidad metabólica e inhibición del crecimiento. El panel A muestra que las células HCT 116 IDH1(R132H/+) tienen una mayor sensibilidad a la falta de glucosa. El panel B muestra que las células HCT 116 IDH1(R132H/+) presentan una tasa de crecimiento reducida. $**P < 0,01$; prueba t no apareada, varianza desigual con dos colas y dos muestras. La media $\pm$ s.d. se representa gráficamente en todos los casos.

10 La figura 22 muestra la inhibición del crecimiento celular tras la inactivación de ATP5B, el tratamiento con 2-HG de octilo o α -KG de octilo, o mutación IDH1 (R132H). El panel A muestra que incluso en medio de glucosa, la inactivación de ATP5B disminuye la tasa de crecimiento de las células U87. Los paneles B-D muestran que las células U87 exhiben una tasa de crecimiento reducida tras el tratamiento con α -KG de octilo o 2-HG de octilo en un medio sin glucosa. La tasa de crecimiento también se redujo en el medio de glucosa, aunque en menor medida (no se muestra). El panel E muestra que las células U87 que expresan IDH1 (R132H) exhiben una tasa de proliferación reducida incluso en medio de glucosa. $****P < 0,0001$, $***P < 0,001$, $**P < 0,01$, $*P < 0,05$; prueba t no apareada, varianza desigual con dos colas y dos muestras. La media $\pm$ s.d. se representa gráficamente en todos los casos.

20 En experimentos similares a los realizados con compuestos α -KG y 2-HG, la administración de D-glutamato y L-glutamato aumenta la esperanza de vida de los sujetos (los datos no se muestran).

25 Por lo tanto, habiendo descrito las realizaciones ejemplares de la presente invención, los expertos en la técnica deberán señalar que las descripciones contenidas son solo ejemplares y que se pueden realizar otras diversas alternativas, adaptaciones y modificaciones dentro del alcance de la presente invención. Por consiguiente, la presente invención no se limita a las realizaciones específicas ilustradas en la presente memoria, sino que solo está limitada por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto para usar en el tratamiento de la hipertrofia cardíaca en un sujeto que lo necesita, dicho compuesto está seleccionado de alfa-cetoglutarato de 1-octilo y solvatos y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde el tamaño del corazón se reduce y el gasto cardíaco del sujeto se restablece a los niveles de gasto hipertrófico precardiaco.
5
2. Un compuesto para usar en el tratamiento de la hipertrofia cardíaca en un sujeto que lo necesita, dicho compuesto está seleccionado de alfa-cetoglutarato de 5-octilo y solvatos y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde el tamaño del corazón se reduce y el gasto cardíaco del sujeto se restablece a los niveles de gasto hipertrófico precardiaco.
10
3. Un compuesto para usar en el tratamiento de hipertrofia cardíaca en un sujeto que lo necesita, dicho compuesto está seleccionado de ácido 2-hidroxi-glutámico, 2-hidroxi-pentanodioato, 1-octil-(S)-2-hidroxi-pentanodioato, 1-octil-(R)-2-hidroxi-pentanodioato, 5-octil-(S)-2-hidroxi-pentanodioato, 5-octil-(R)-2-hidroxi-pentanodioato, y solvatos y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde el tamaño del corazón se reduce y el gasto cardíaco del sujeto se restablece a niveles de gasto hipertrófico precardiaco.
15
4. El compuesto para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto se administra como una dosis diaria de aproximadamente 0,25-2 gramos por kilogramo de peso del sujeto por día.
20
5. El compuesto para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto se administra como una dosis diaria de aproximadamente 0,5-2 gramos por kilogramo de peso del sujeto por día.
25
6. El compuesto para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto se administra como una dosis diaria de aproximadamente 1-2 gramos por kilogramo de peso del sujeto por día.
7. El compuesto para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto se administra como una dosis diaria de aproximadamente 2 gramos por kilogramo de peso del sujeto por día.
30

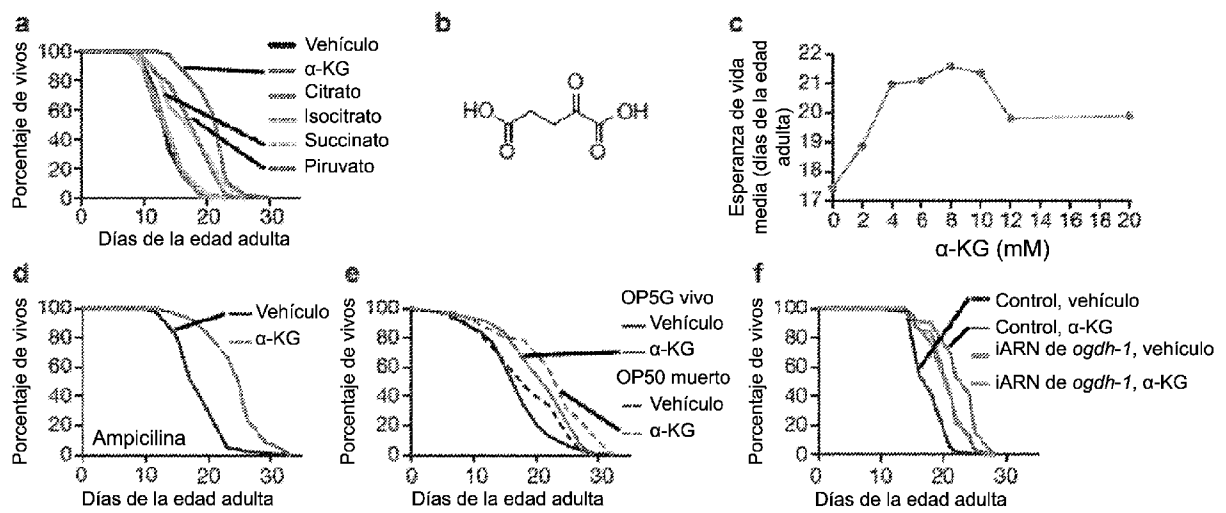


Figura 1

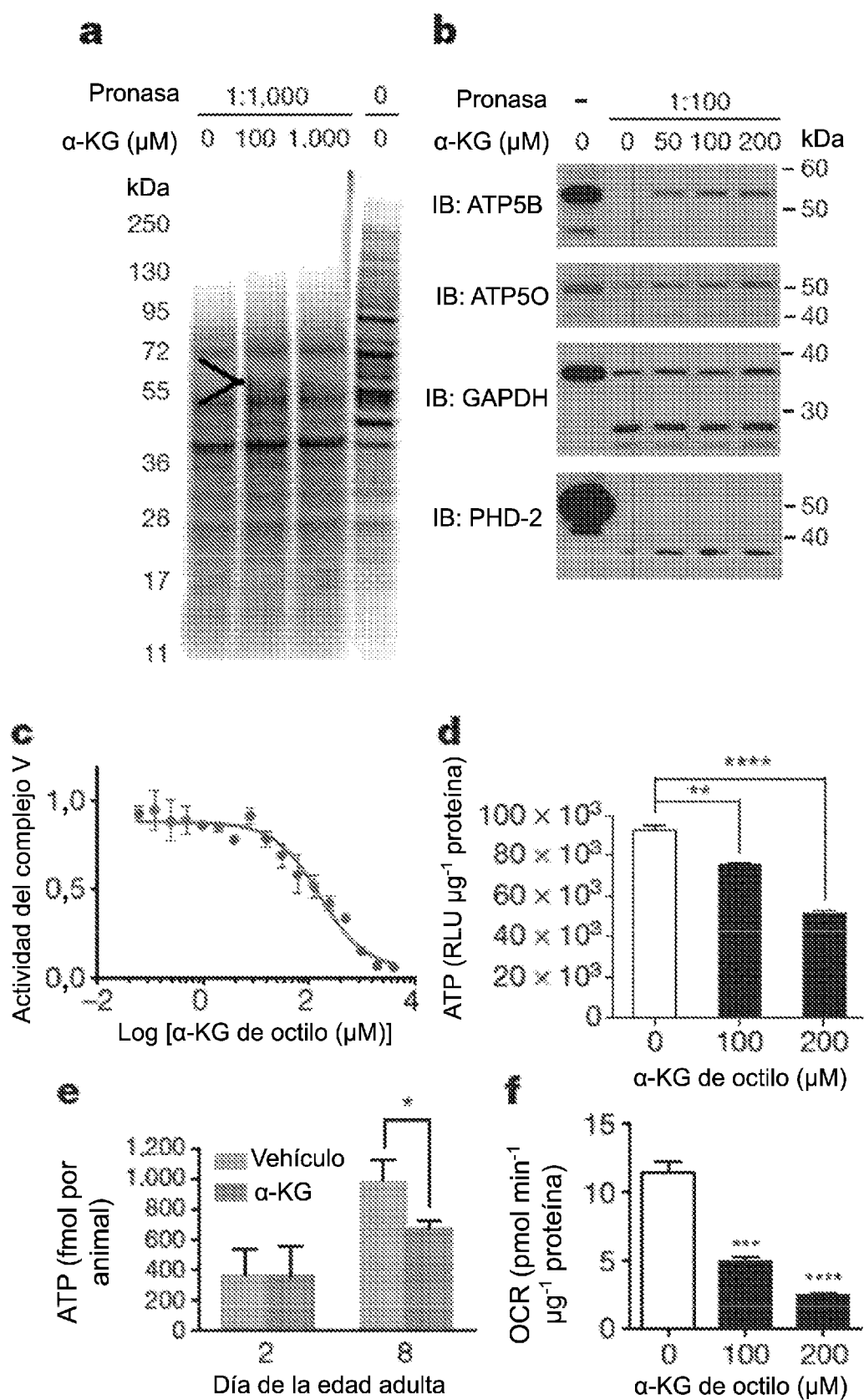


Figura 2

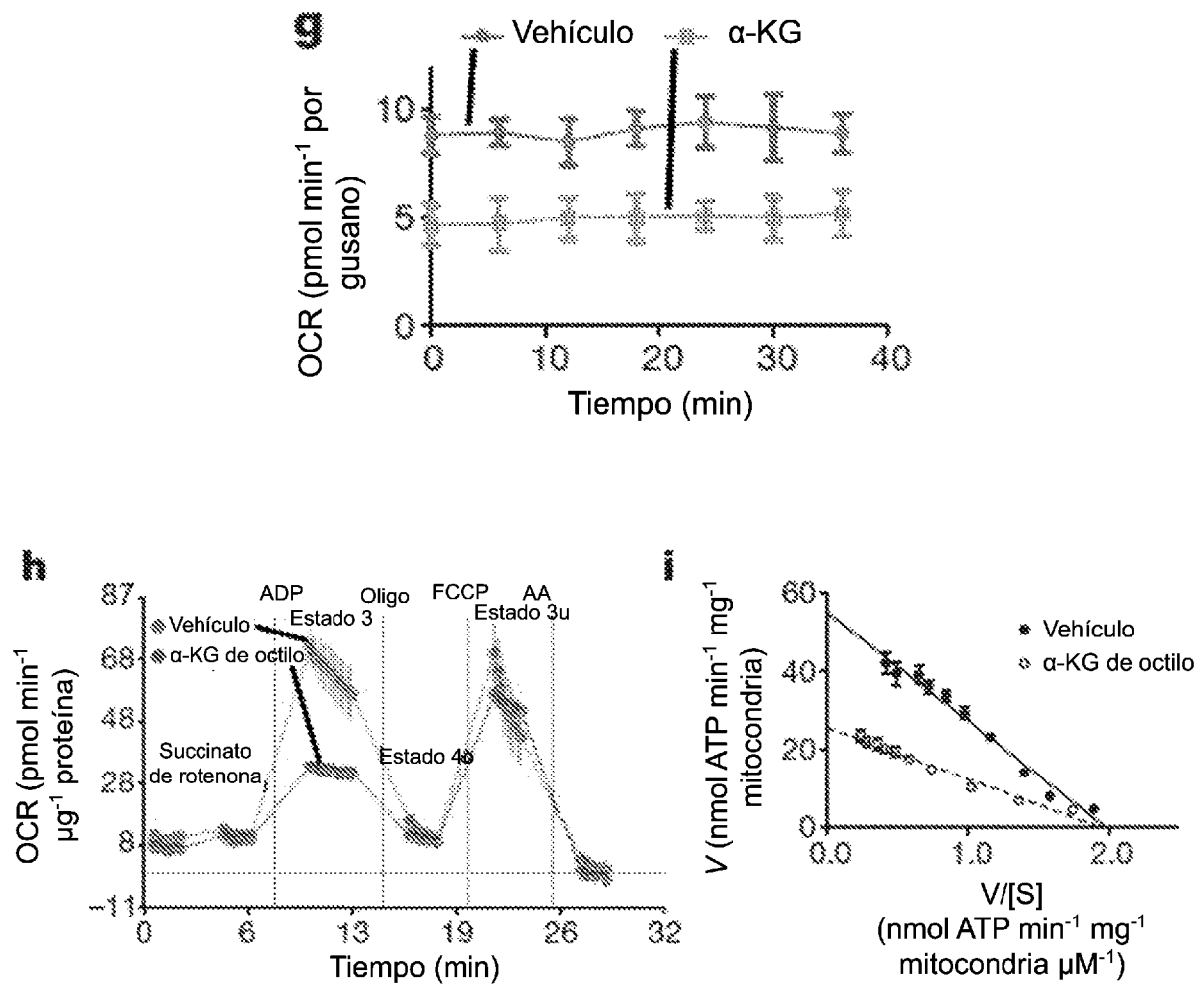


Figura 2 cont.

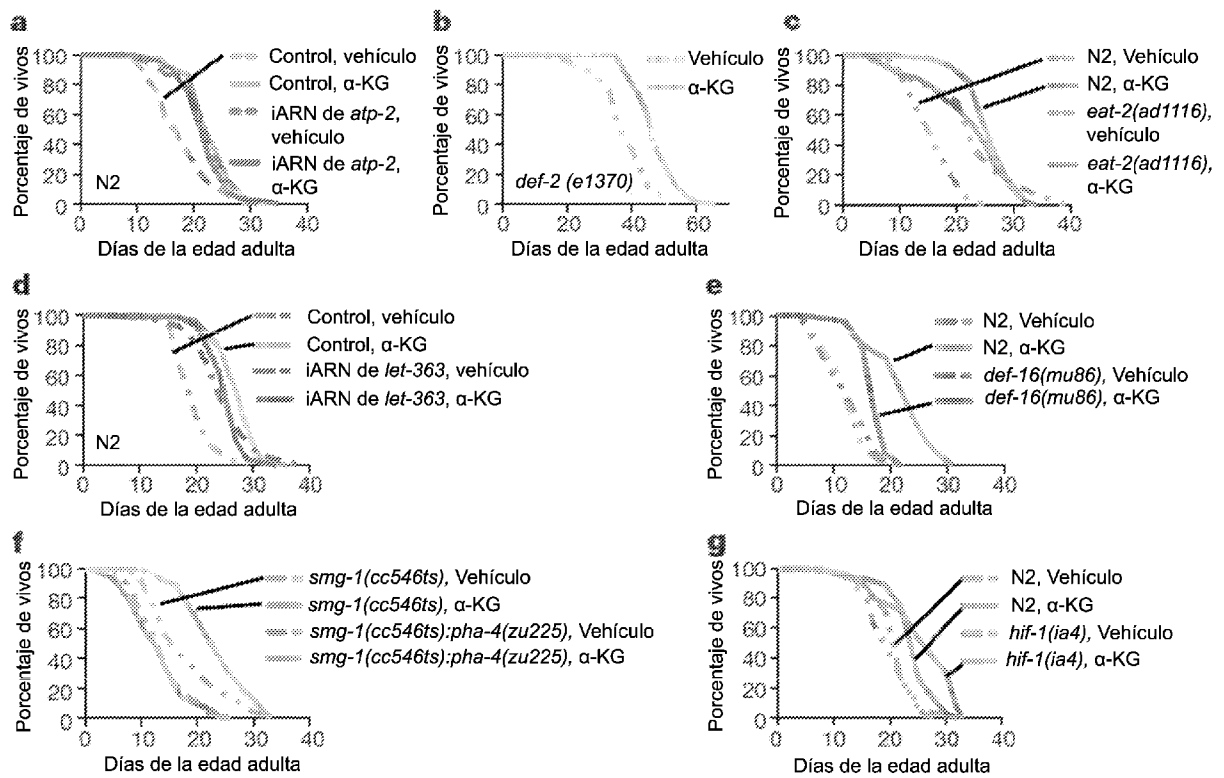


Figura 3

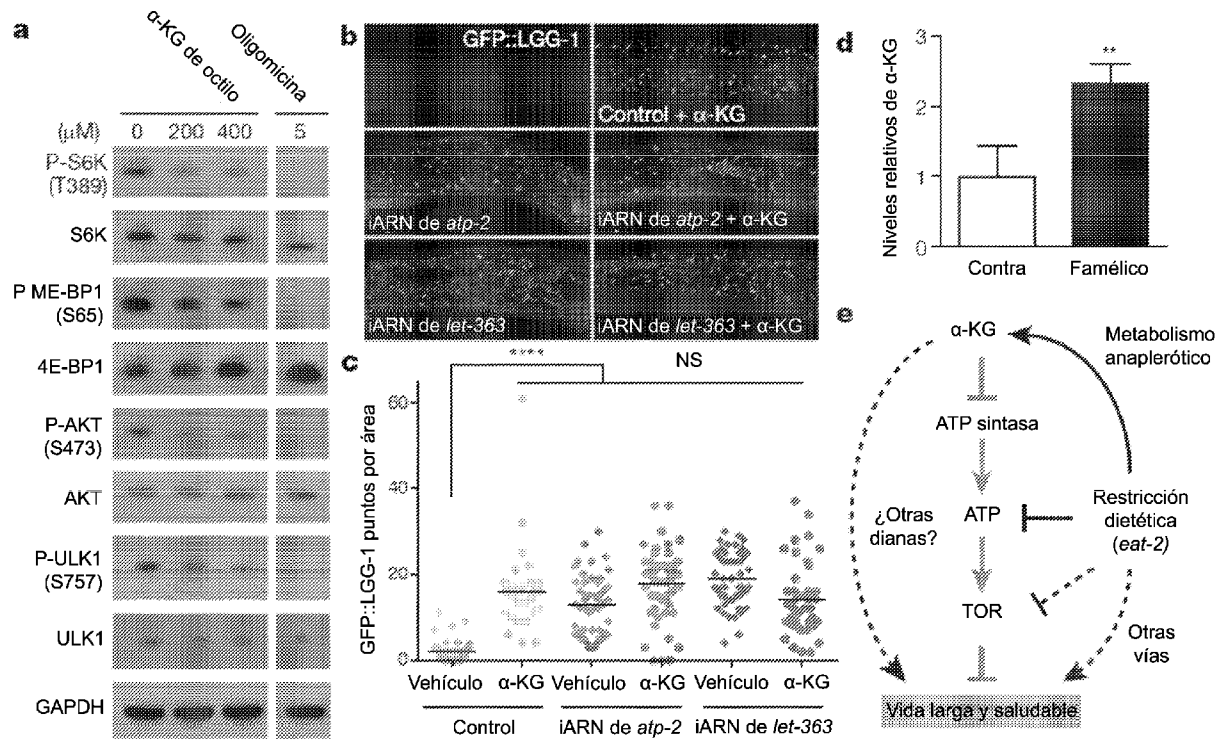


Figura 4

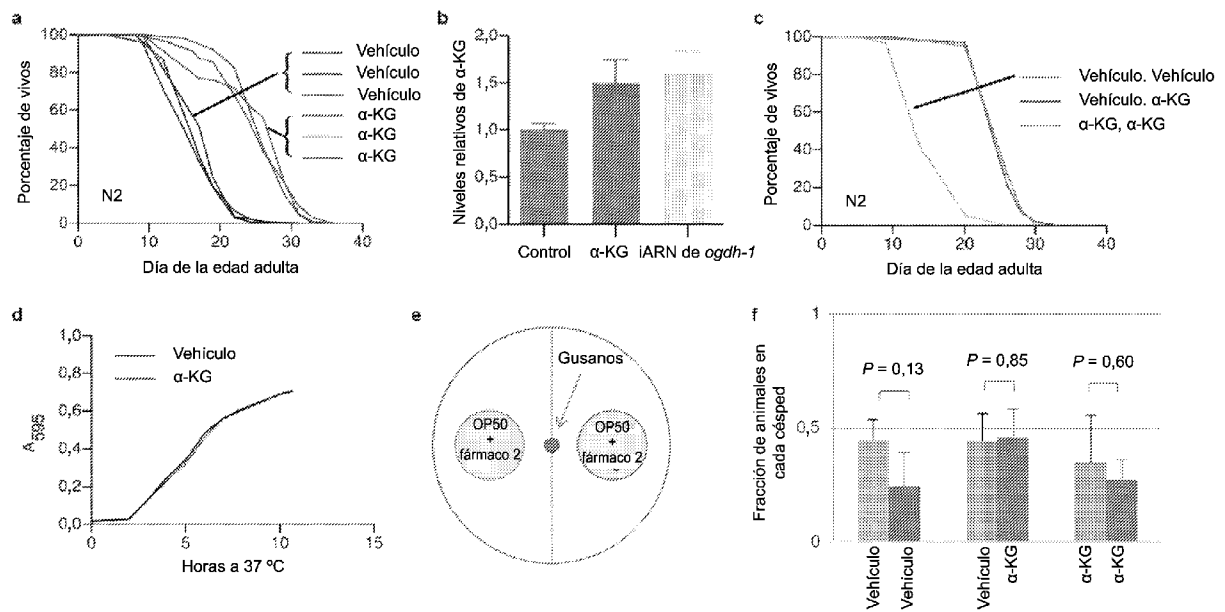
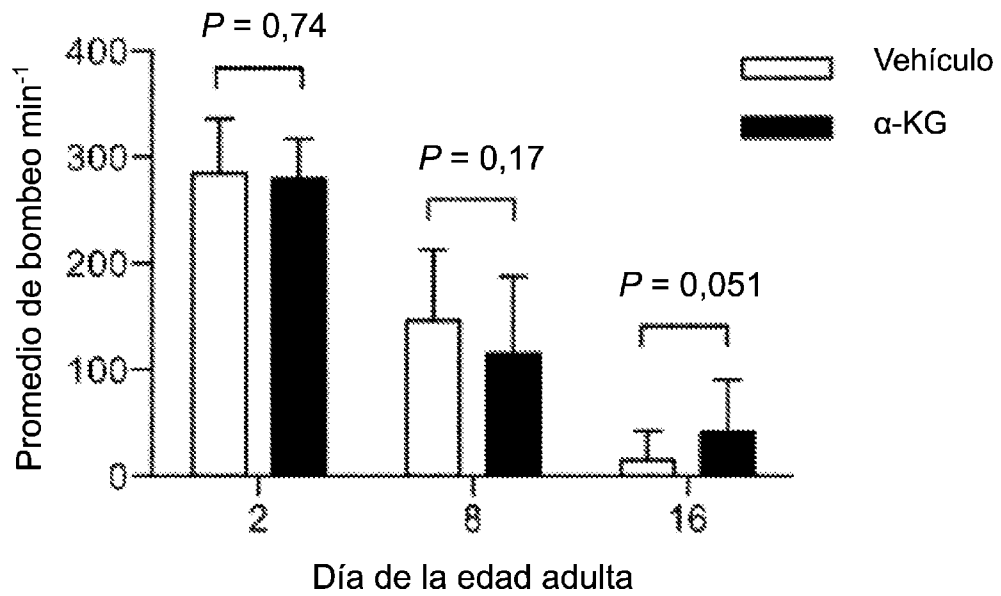


Figura 5

g



h

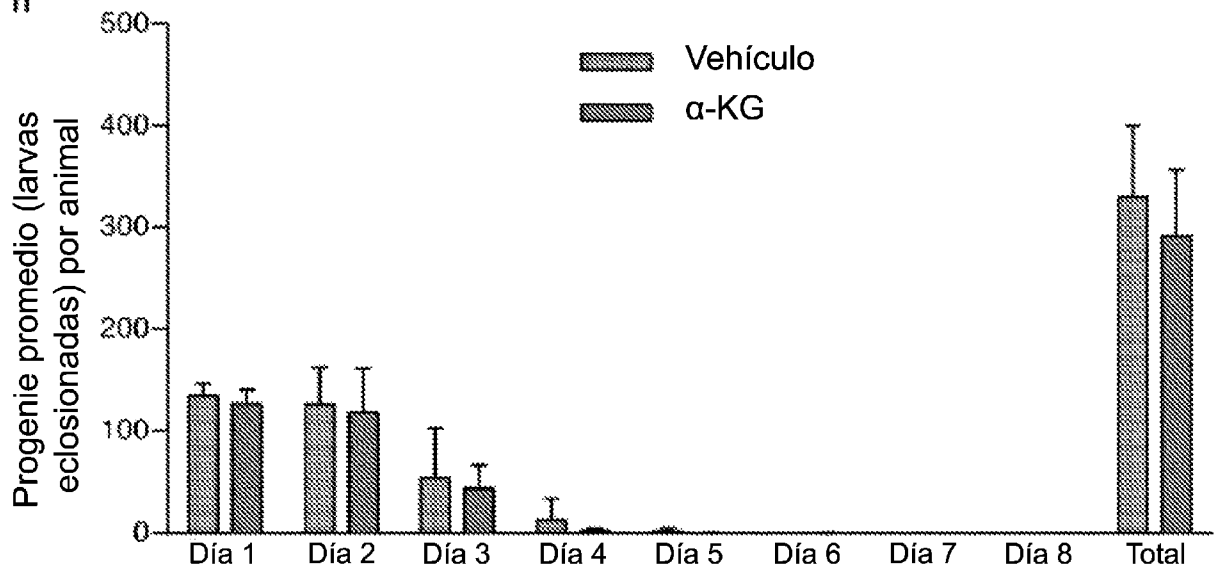


Figura 5 cont.

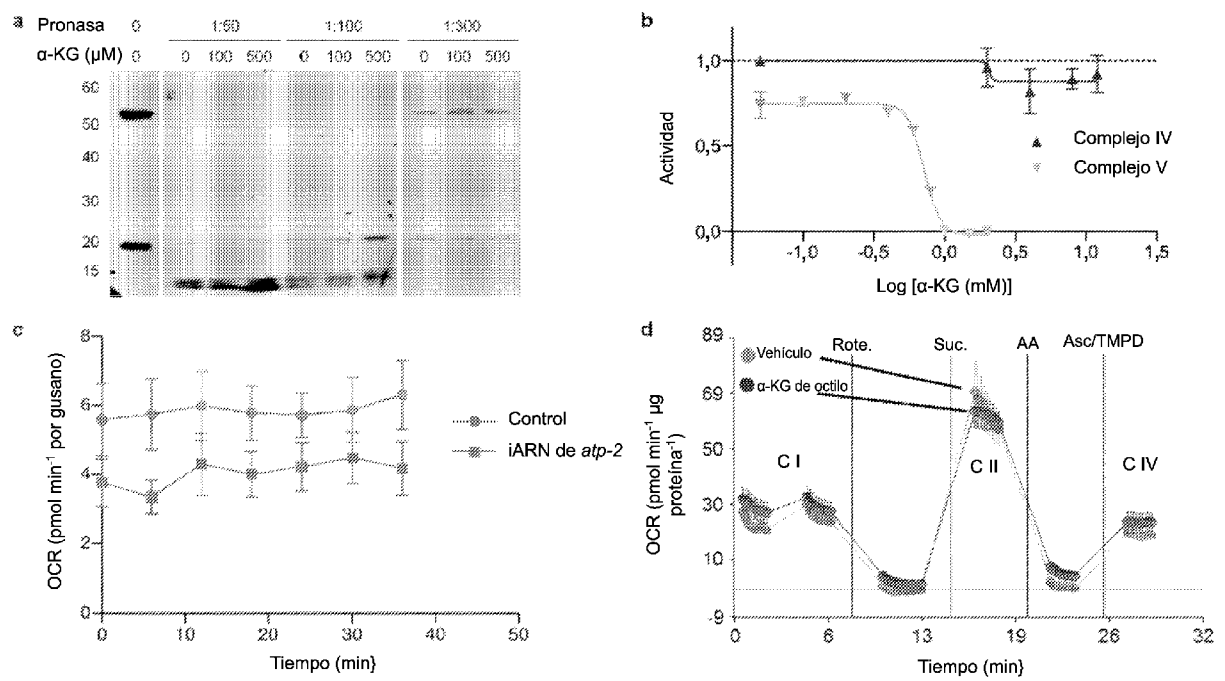


Figura 6

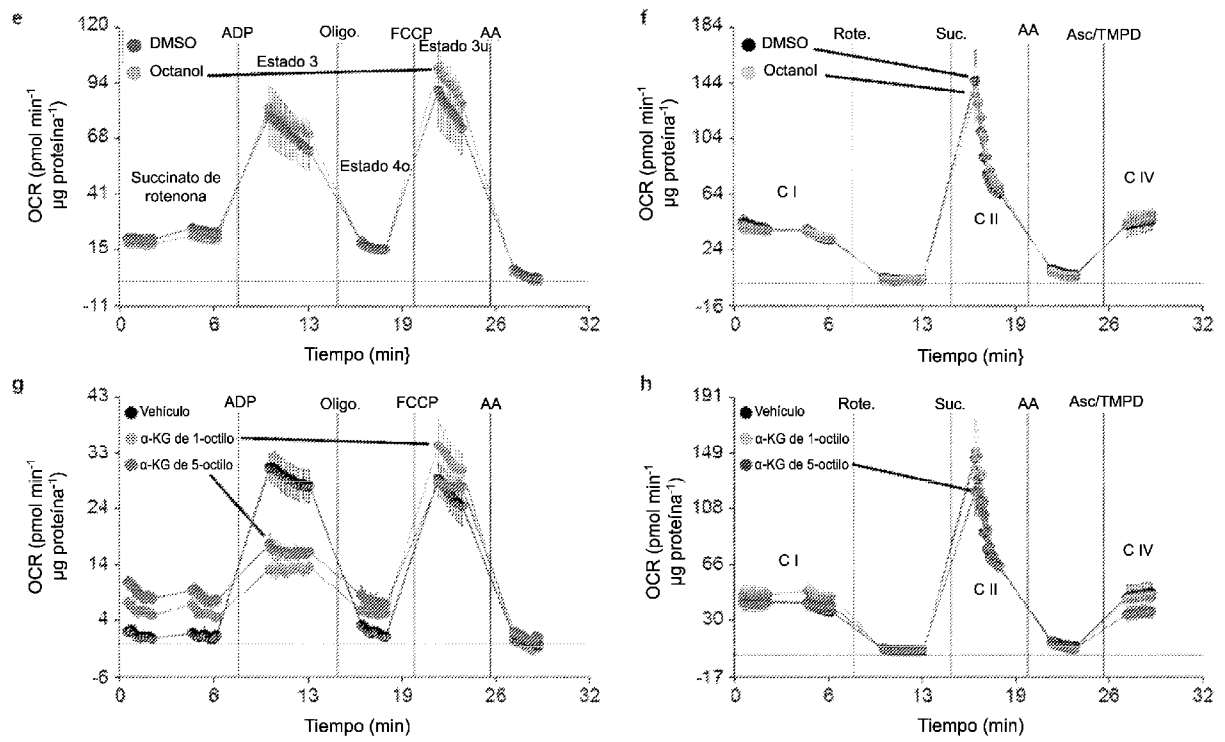


Figura 6 cont.

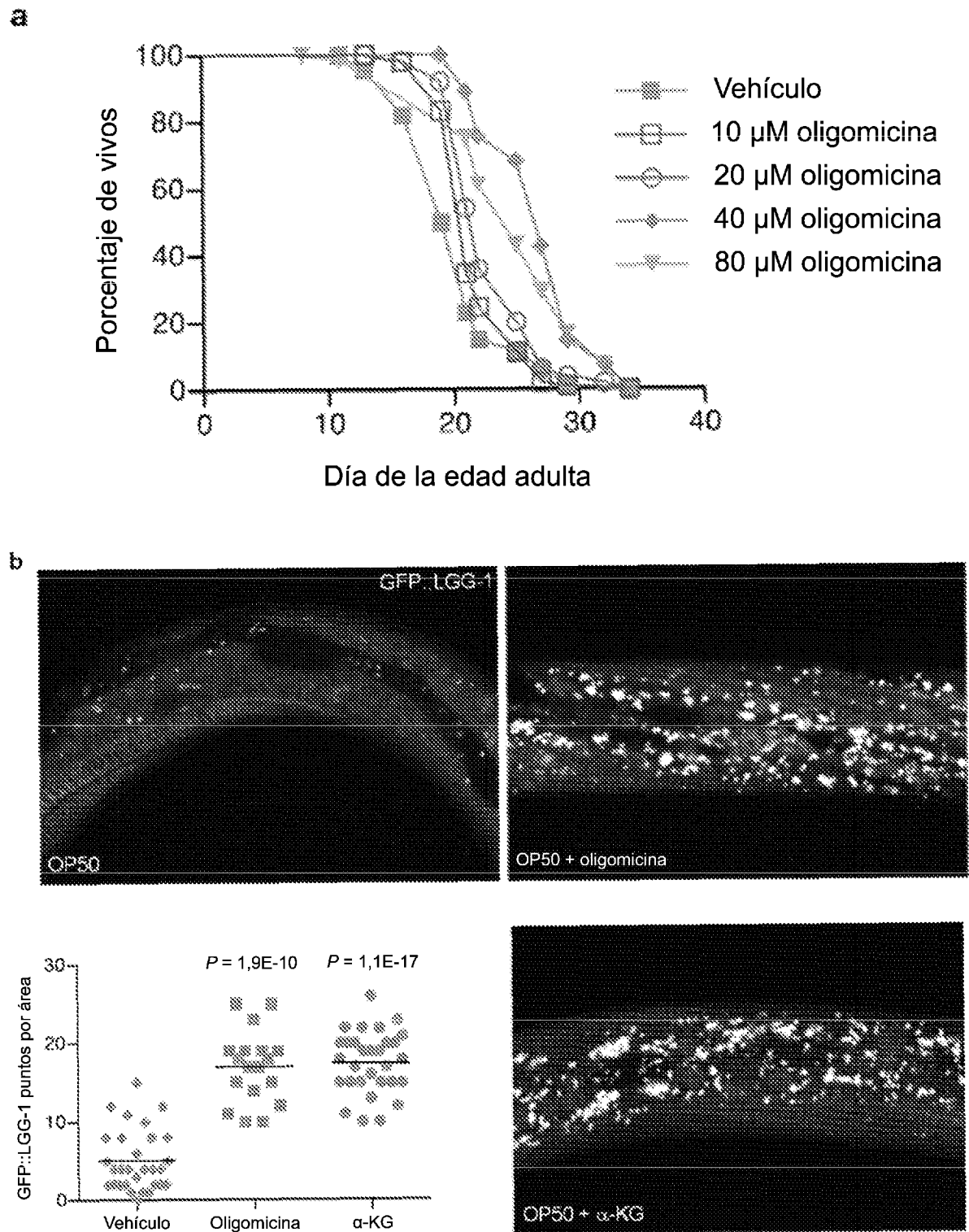


Figura 7

c

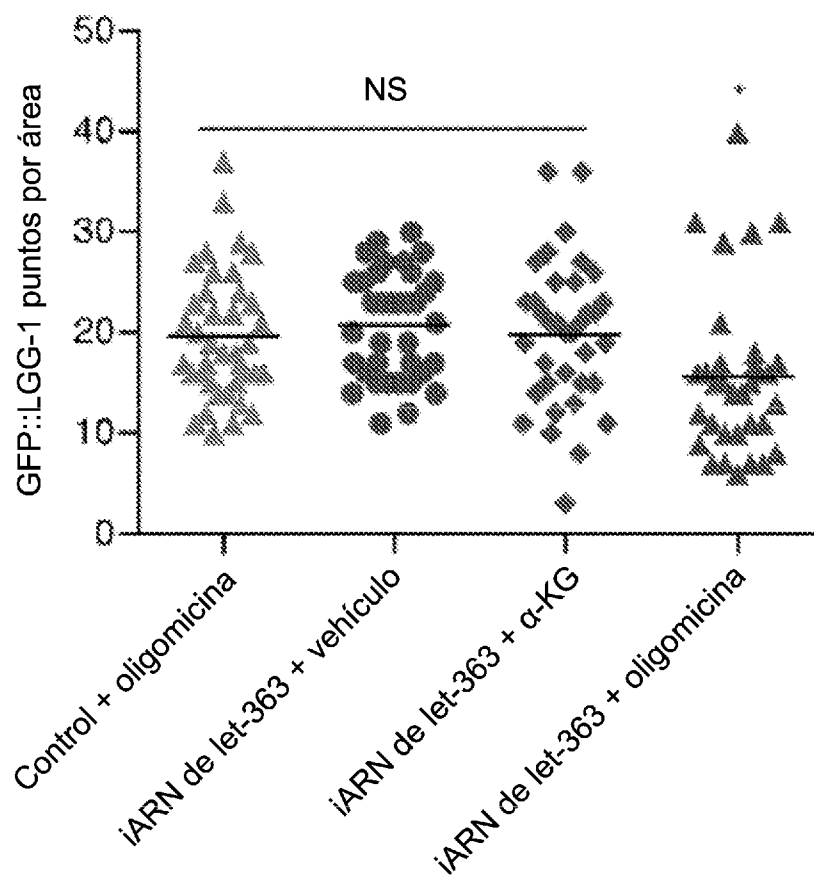
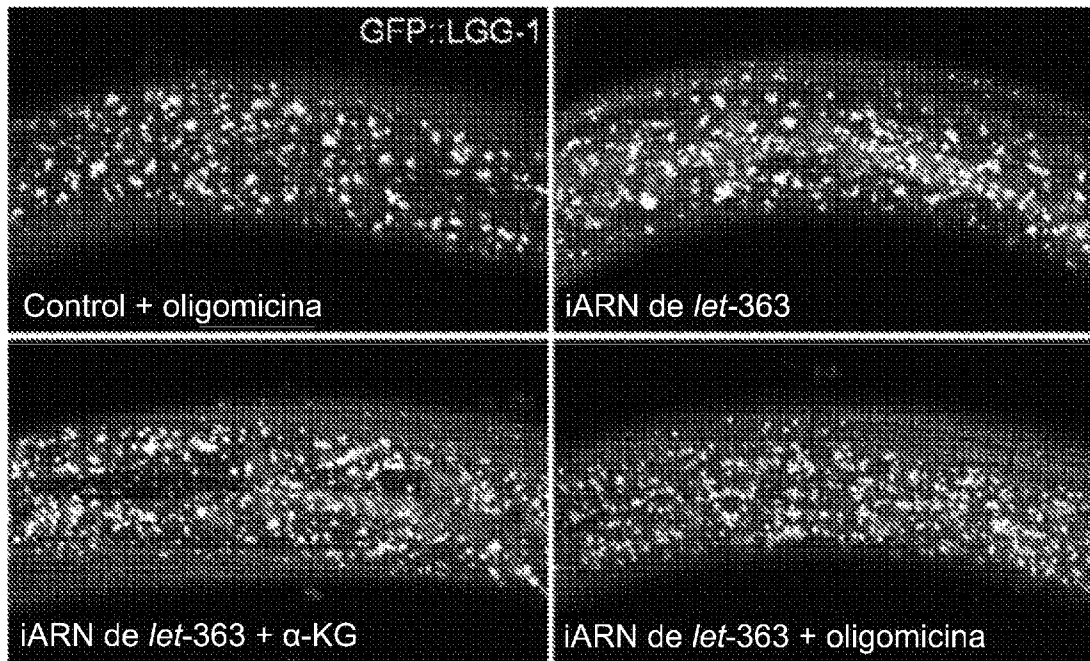


Figura 7 cont.

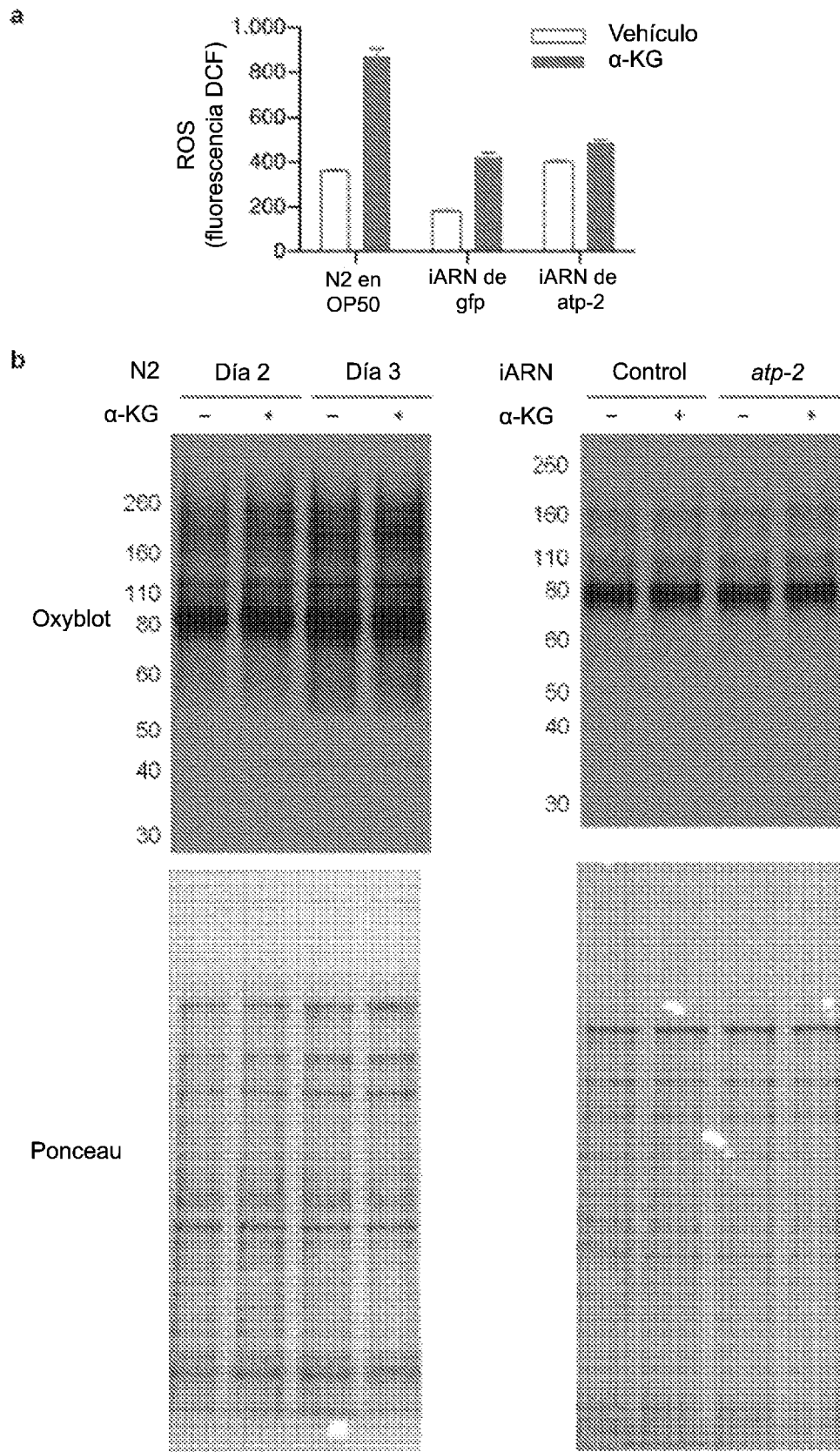


Figura 8

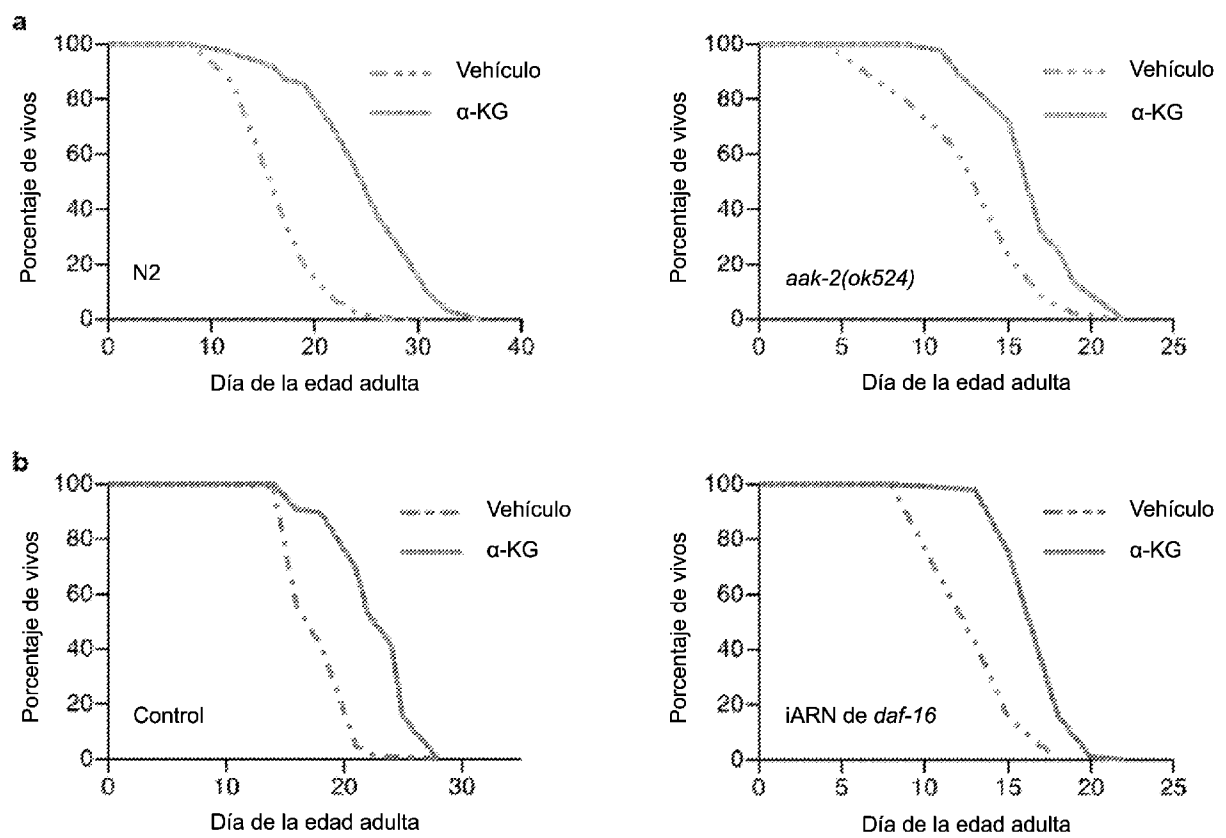


Figura 9

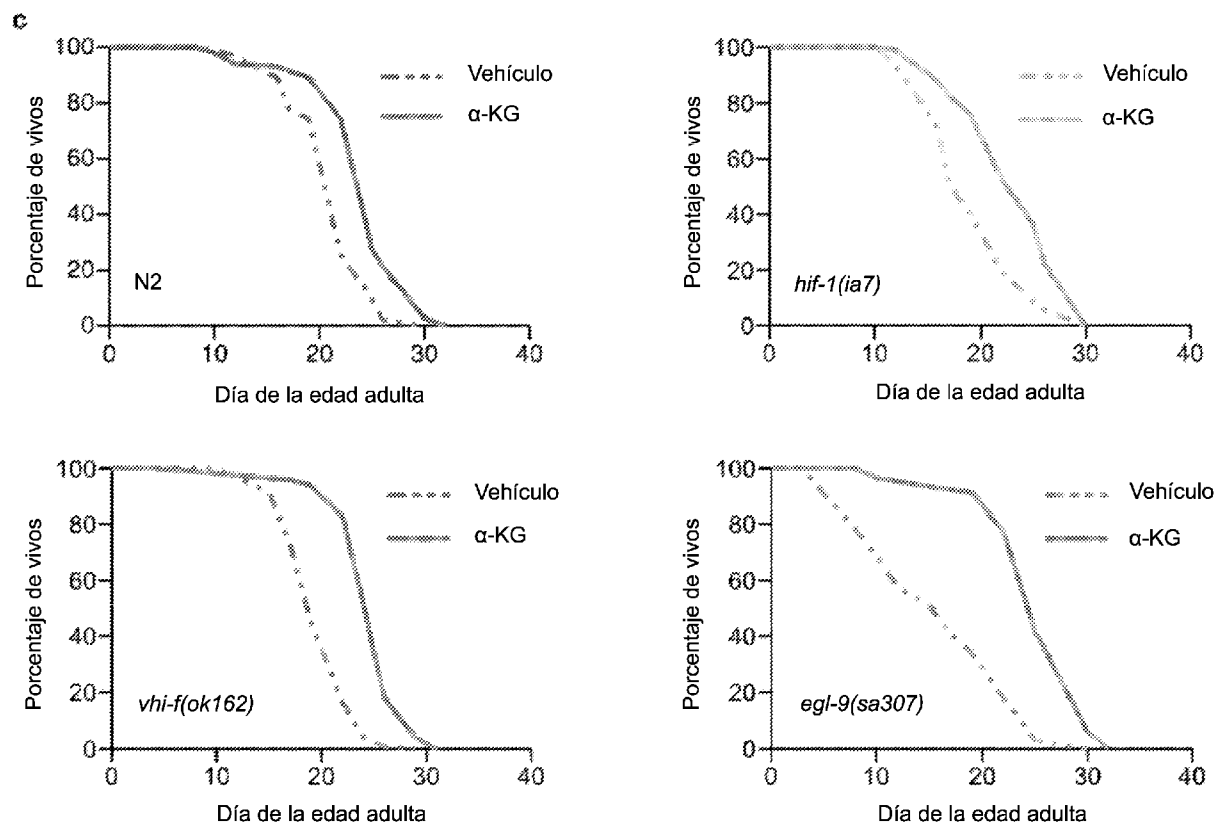


Figura 9 cont.

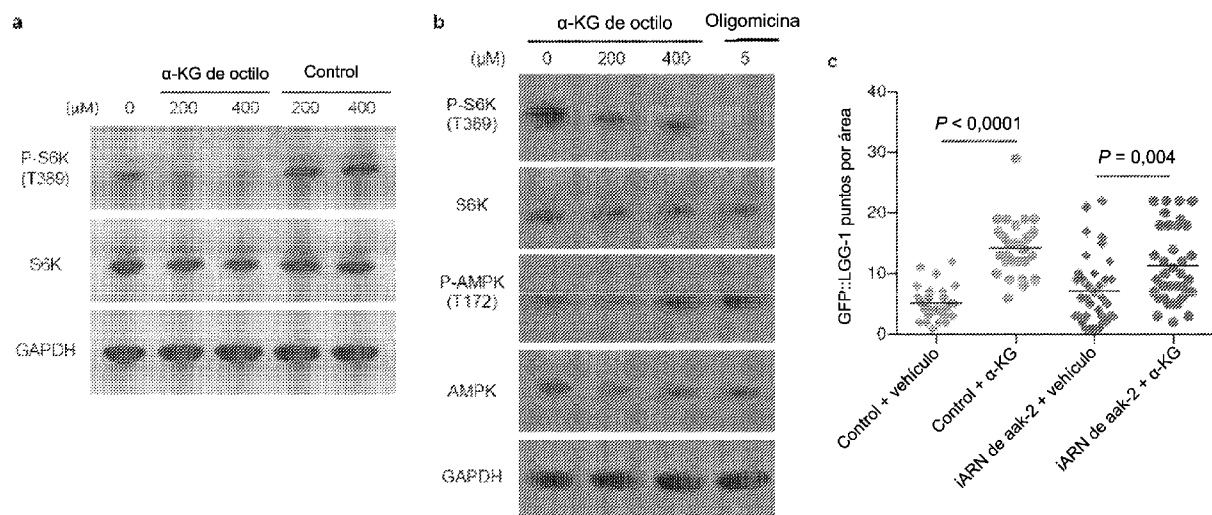


Figura 10

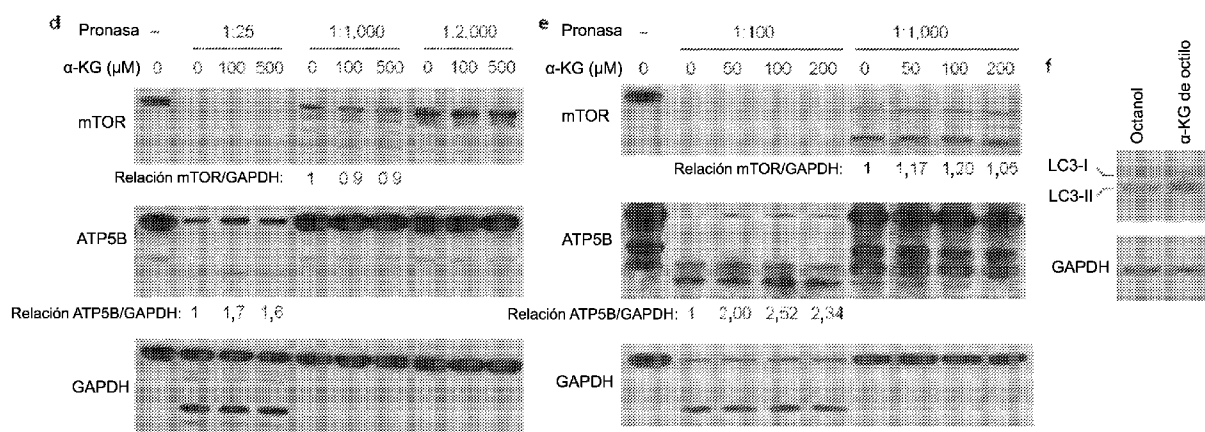


Figura 10 cont.

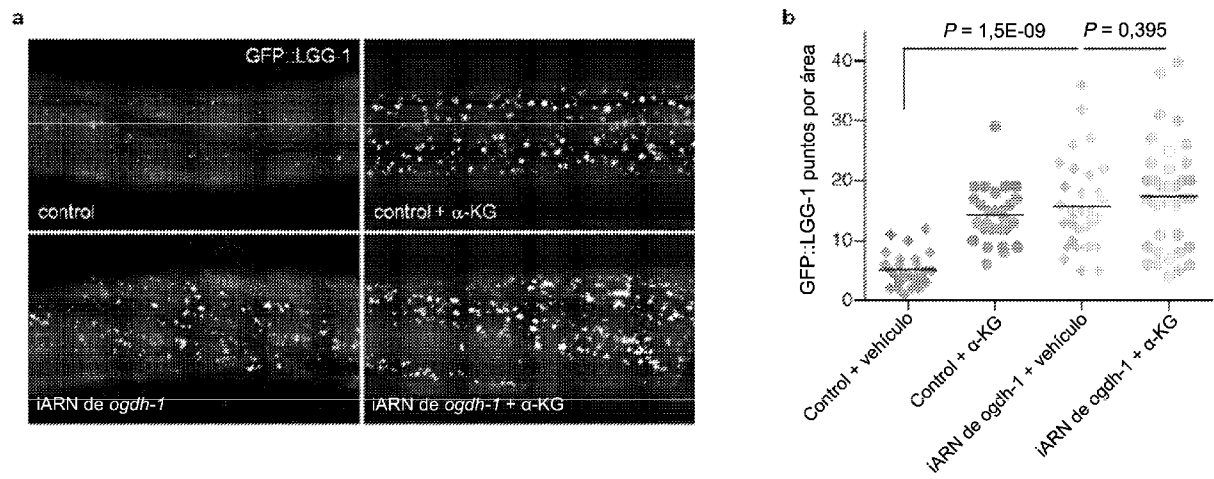


Figura 11

Proteínas enriquecidas en la muestra de DARTS de α-KG

Símbolo de la proteína	Nombre de la proteína	Puntuación	Muestra de control		Muestra de α-KG		Enriquecimiento
			Espectros	Péptidos	Espectros	Péptidos	
ATP5B	Subunidad beta de la ATP sintasa	4088	23	9	121	15	5,3
HSPD1	Proteína de choque térmico de 60 kDa	2352	31	11	138	29	4,5
PKM2	Isoenzimas M1/M2 de piruvato quinasa	2203			56	7	
LCP1	Plastim-2	1865	14	8	76	13	5,4
ATP5A1	Subunidad alfa de la ATP sintasa	1616	41	9	61	12	1,5
SHMT2	Serina hidroximetiltransferasa	1060	7	5	33	10	4,7
HSP90AA1	Proteína de choque térmico HSP 90-alfa	952	29	8	44	8	1,5
EEF2	Factor de elongación 2	943	4	2	37	9	9,3
DDX5	Probable helicasa DDX5 de ARN dependiente de ATP	652	7	3	33	10	4,7
HSPA6	Proteína de 71 kDa afin al choque térmico	615	4	2	35	10	6,8

Solo se muestran aquellas proteínas con al menos 15 espectros en la muestra α-KG y enriquecidas al menos 1,5 veces.

Figura 12

Resumen de los datos de esperanza de vida

Cepa	m (esperanza de vida media, días)		% de diferencia	Valor p	n (número de animales)	
	Vehículo	α -KG			Vehículo	α -KG
N2	16,9	25,8	36,3	< 0,0001	87	96
N2	17,5	25,4	45,6	< 0,0001	119	97
N2	16,3	26,1	60,2	< 0,0001	100	104
<i>eat-2(ad1116)</i>	22,8	22,9	0,5	0,79	59	40
<i>daf-16(mu86)</i>	16,3	18,8	15,1	< 0,0001	100	105
<i>aak-2(ad1116)</i>	21,1	24,0	13,4	0,23	39	59
<i>daf-2(e1370)</i>	28,0	47,6	25,1	< 0,0001	72	69
N2	13,2	22,3	69,8	< 0,0001	100	104
<i>daf-16(mu86)</i>	13,4	17,4	29,5	< 0,0001	71	72
iARN de <i>daf-16</i>	14,3	17,6	22,9	< 0,0001	99	99
N2	16,1	19,1	19,3	0,0003	97	96
<i>daf-2(e1370)</i>	38,3	43,9	14,6	< 0,0001	109	101
<i>aak-2(ok524)</i>	13,7	17,1	24,3	< 0,0001	85	83
<i>aak-2(ok524)</i>	16,4	17,5	6,7	< 0,0001	97	97
iARN de <i>aak-2</i>	16,2	19,9	23,3	< 0,0001	93	92
N2	15,6	26,3	68,8	< 0,0001	95	102
N2	15,6	26,3	68,5	< 0,0001	95	102
<i>egl-9(sa307)</i>	16,2	25,6	58,6	< 0,0001	97	96
<i>egl-9(sa307)</i>	19,5	27,3	40,3	< 0,0001	95	101
N2	14,7	21,6	46,9	< 0,0001	100	88
N2	14,0	20,7	47,9	< 0,0001	112	114
N2	21,5	24,6	14,6	< 0,0001	101	102
<i>hif-1(la4)</i>	20,5	26,0	26,5	< 0,0001	85	71
<i>hif-1(la7)</i>	19,6	23,6	20,4	< 0,0001	102	101
<i>hif-1(la4)</i>	21,5	24,7	14,7	< 0,0001	88	87
N2	16,7	23,4	39,7	< 0,0001	104	103
N2	15,8	22,2	40,5	< 0,0001	104	94
N2	18,4	24,6	33,4	< 0,0001	99	89
<i>whi-1(ok101)</i>	20,0	25,0	24,9	< 0,0001	98	100
<i>hif-1(la7)</i>	12,4	17,3	38,9	< 0,0001	97	90
<i>hif-1(la7)</i>	17,9	23,7	32,0	< 0,0001	58	55
N2	16,8	22,4	32,7	< 0,0001	104	101
N2	15,7	21,6	37,6	< 0,0001	85	99
<i>smg-1(cc546ts)</i>	18,4	23,8	29,5	< 0,0001	110	87
<i>smg-1(cc546ts) pha-4(zu225)</i>	14,2	13,5	-4,9	0,5482	94	109
<i>smg-1(cc546ts) pha-4(zu225)</i>	17,6	15,2	-14,0	0,0877	28	34
N2	13,6	20,7	51,8	< 0,0001	103	104
<i>smg-1(cc546ts)</i>	16,2	23,0	42,2	< 0,0001	114	121
<i>smg-1(cc546ts) pha-4(zu225)</i>	13,8	15,2	10,2	0,254	45	45
Control de iARN de EV	18,6	23,4	26,1	< 0,0001	94	91
iARN de <i>atp-2</i>	22,8	22,5	-1,3	0,3471	97	94
Control de iARN de EV	18,8	22,7	20,6	< 0,0001	97	94
Control de iARN de gfp	18,5	23,1	25,3	< 0,0001	101	98
iARN de <i>ogdh-1</i>	21,2	21,1	-0,7	0,65	98	100
iARN de <i>let-363</i>	22,1	23,6	6,8	0,02	94	95
Control de iARN de gfp	20,2	27,7	37,4	< 0,0001	99	81
iARN de <i>let-363</i>	25,1	25,7	2,1	0,9511	96	74
Control de iARN de EV	22,8	27,2	21,6	< 0,0001	70	72
iARN de <i>let-363</i>	27,4	27,2	-0,6	0,7239	64	80
Control de iARN de EV	19,7	24,3	23,8	< 0,0001	93	84
iARN de <i>atp-2</i>	25,3	23,4	-7,4	< 0,0001	97	83

Figura 13

Cepa	<i>n</i>		% de diferencia	Valor <i>p</i>	<i>n</i>		[Oligomicina]
	Vehículo	Oligomicina			Vehículo	Oligomicina	
N2		25,5	25,2	< 0,0001		72	80 μ M
N2	20,4	27,0	32,3	< 0,0001	88	82	40 μ M
N2		23,1	13,2	0,0005		50	20 μ M
N2		22,0	7,9	0,0106		90	10 μ M
Cepa	<i>n</i>		% de diferencia	Valor <i>p</i>	<i>n</i>		Tratamiento
	Vehículo	Tratamiento			Vehículo	Tratamiento	
N2	13,5	16,9	16,8	0,0005	73	71	α -KG de octilo (500 μ M)
N2	14,5	17,0	16,8	< 0,0001	73	60	α -KG
N2	14,0	18,8	33,9	< 0,0001	112	114	α -KG de dimetilo
N2	14,0	20,7	47,8	< 0,0001	112	114	α -KG
N2	15,7	21,6	37,6	< 0,0001	85	99	α -KG de disodio
Cepa	<i>n</i>		% de diferencia	Valor <i>p</i>	<i>n</i>		Fuente de alimento
	Vehículo	α -KG			Vehículo	α -KG	
N2	17,4	21,2	21,6	0,0001	108	55	OP50 vivo
N2	19,0	23,0	21,0	0,0003	88	46	OP50 muerto (irradiado con γ)

Figura 13 cont.

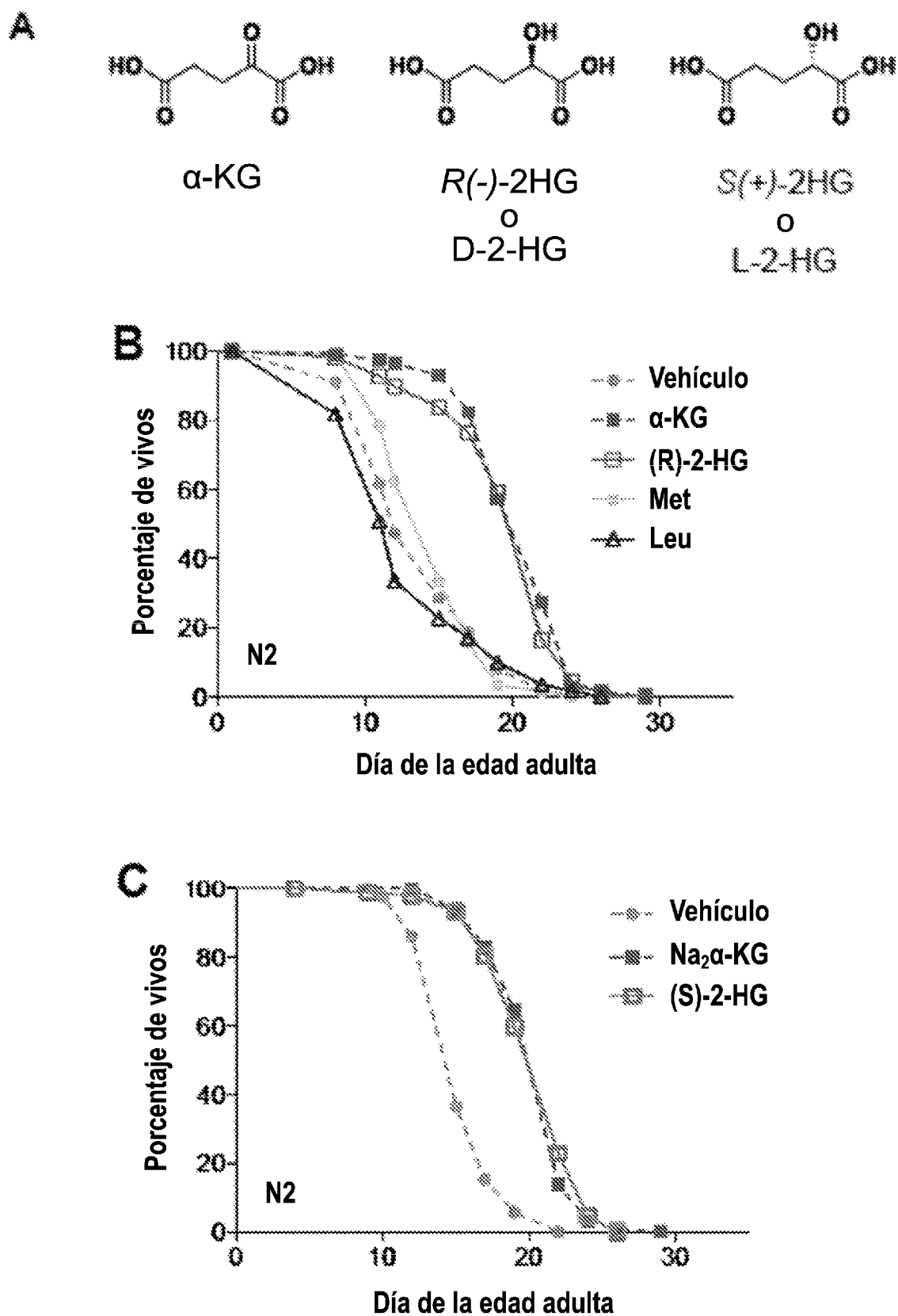
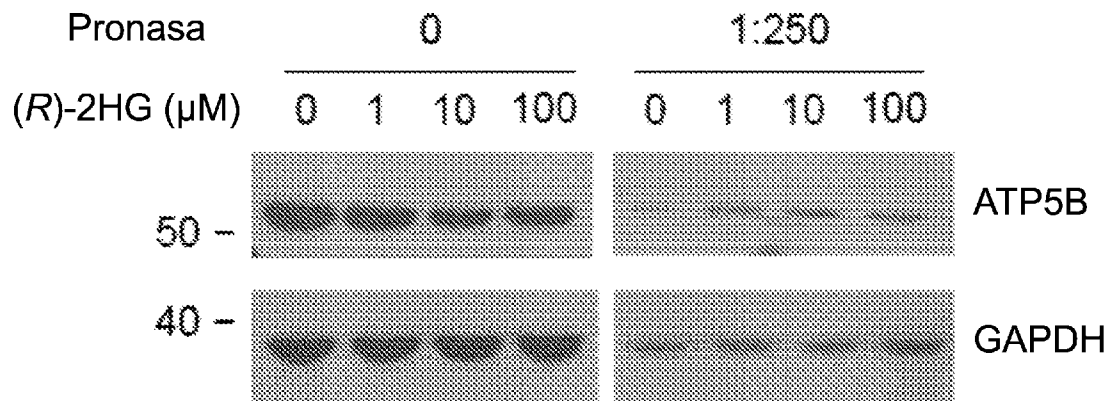


Figura 14

A



B

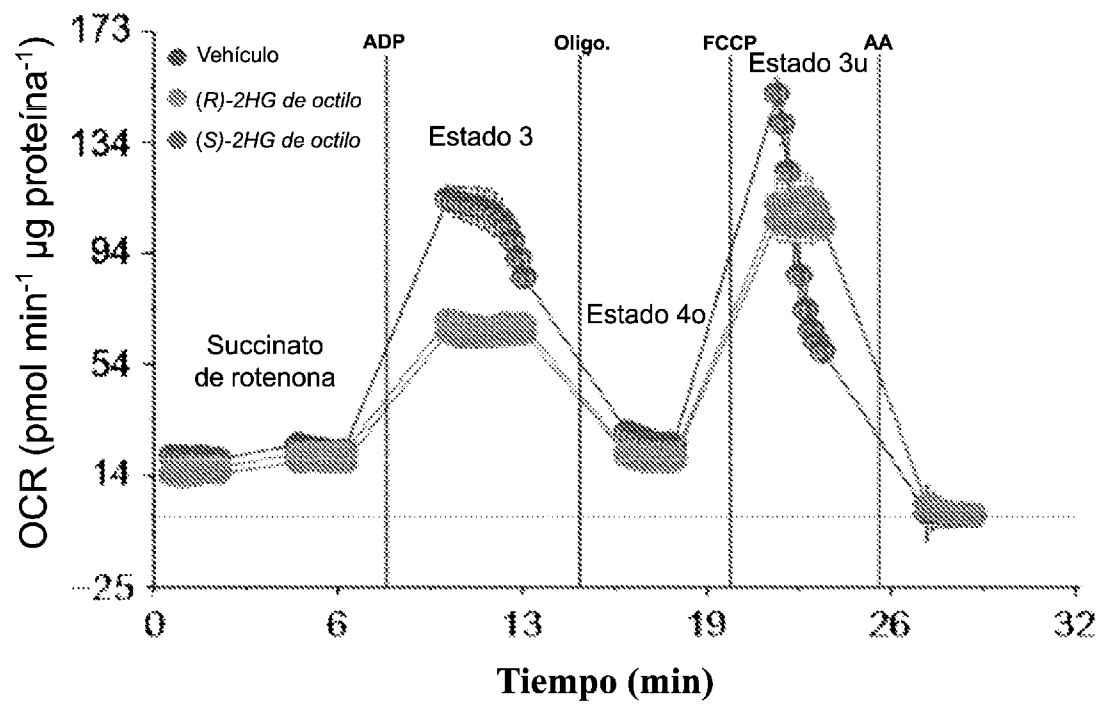
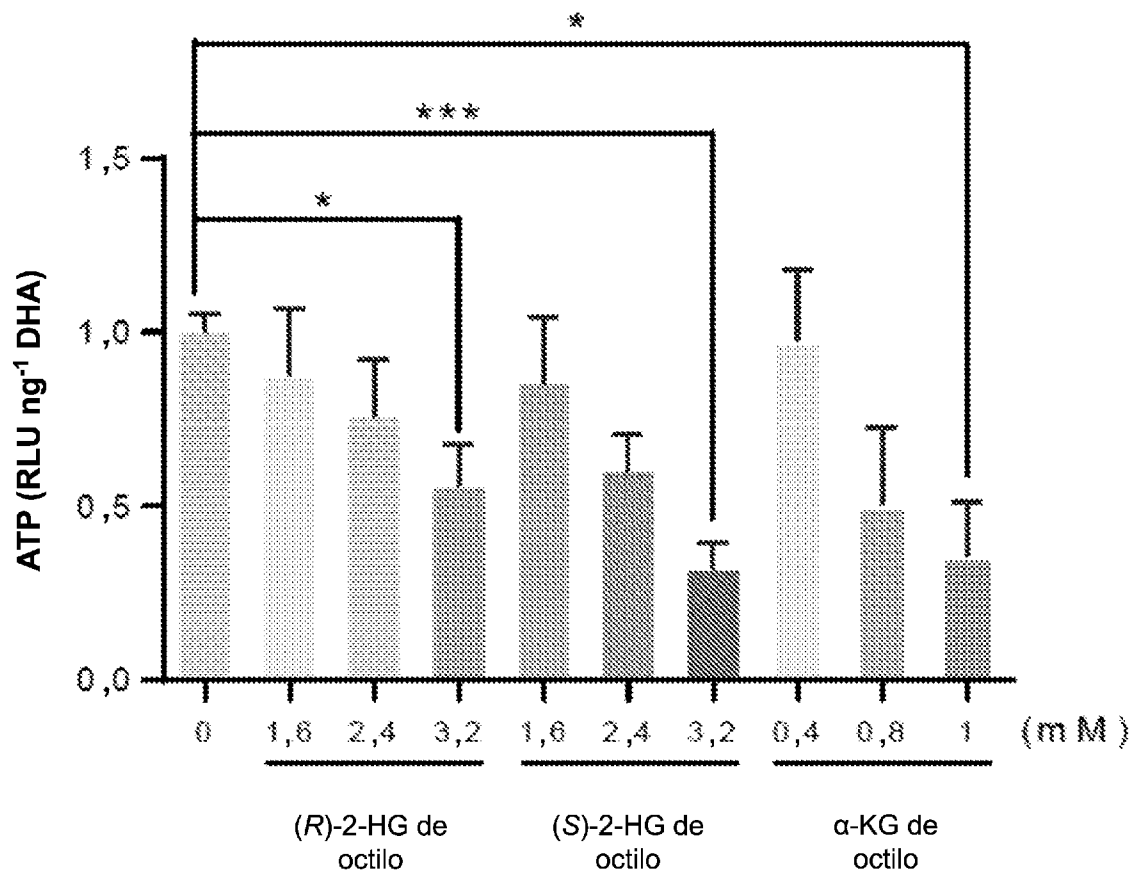


Figura 15

C



D

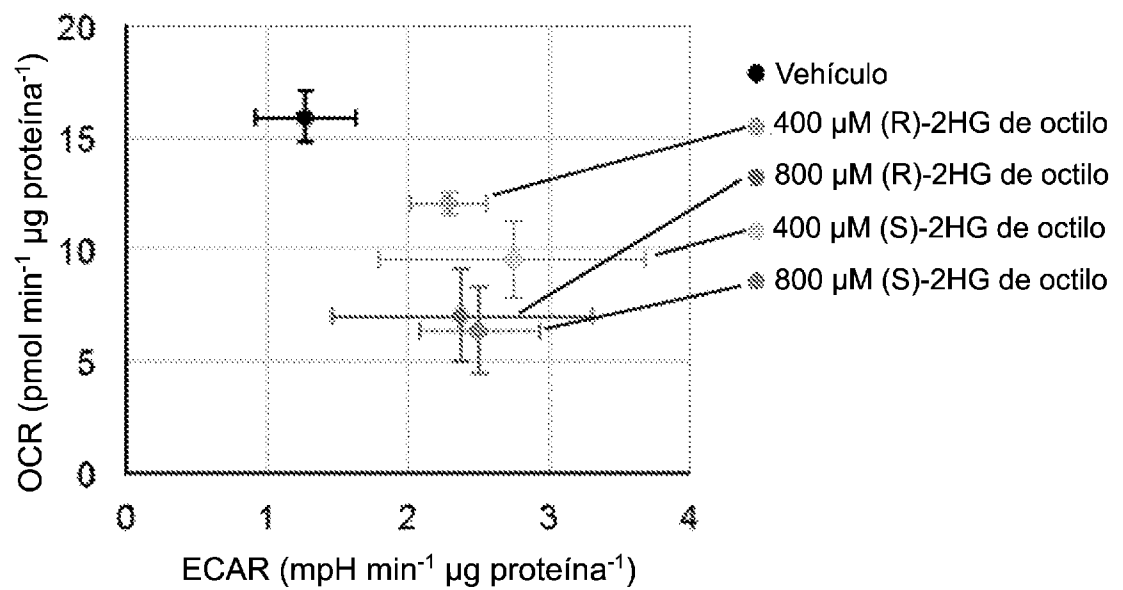


Figura 15 cont.

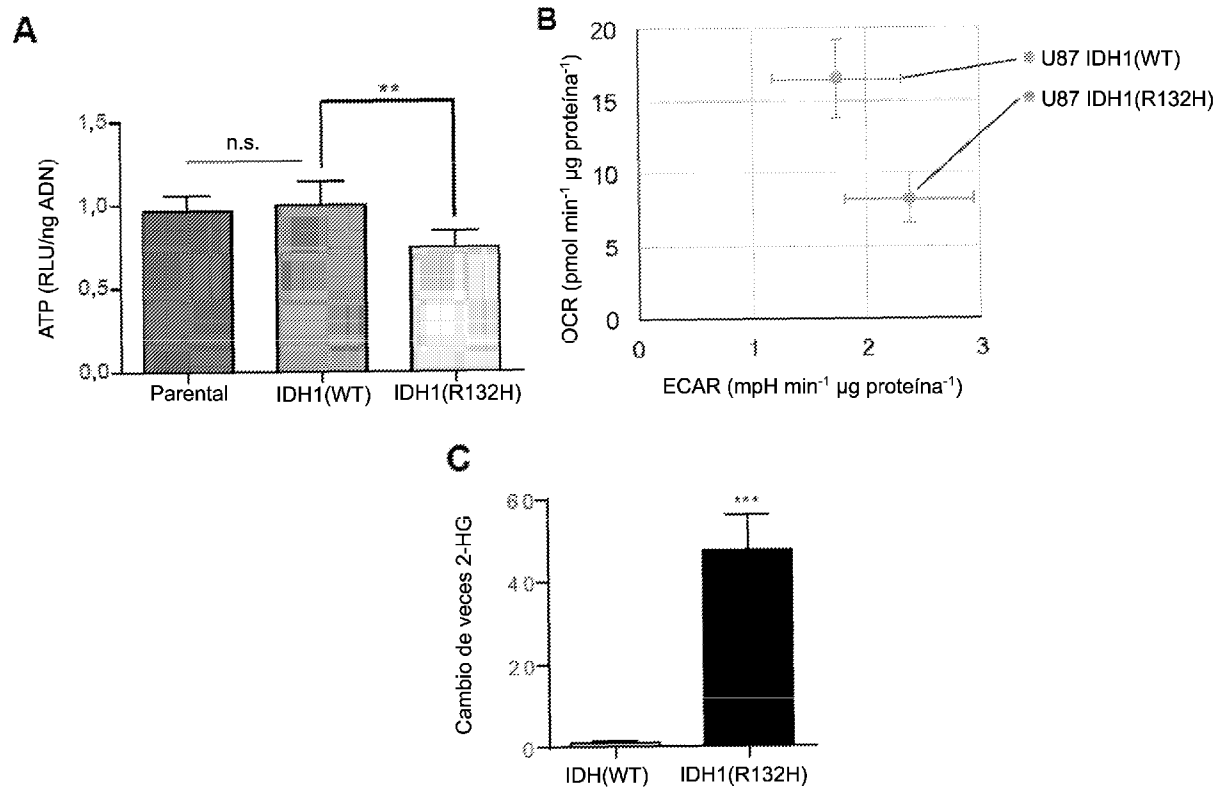


Figura 16

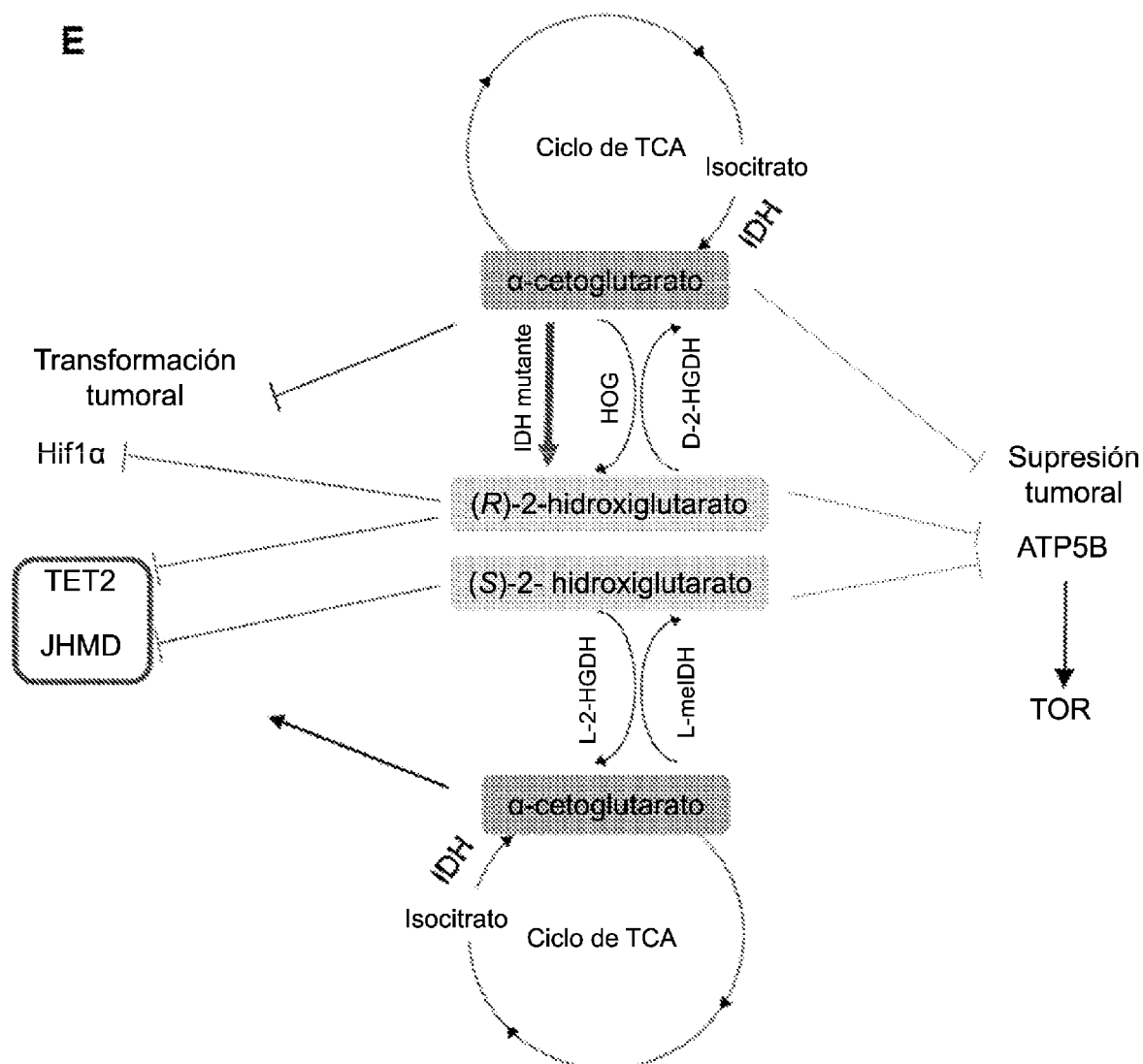
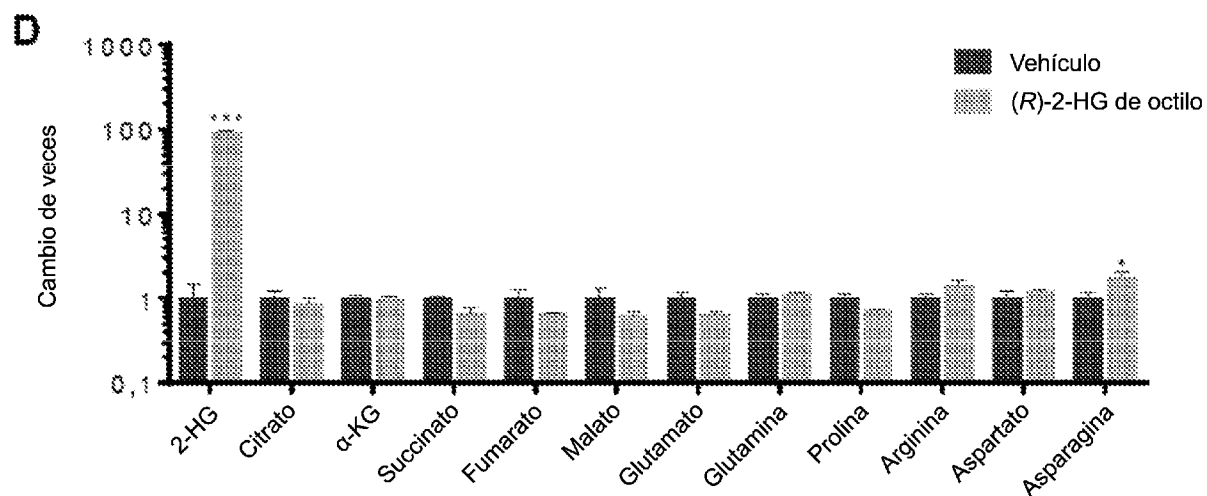


Figura 16 cont.

Figura 17A

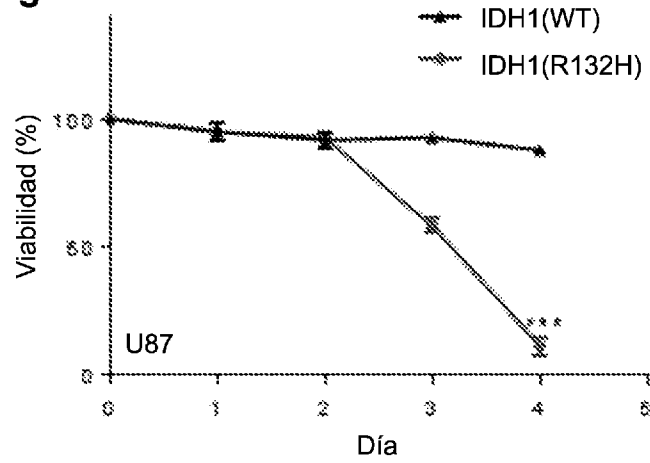


Figura 17B

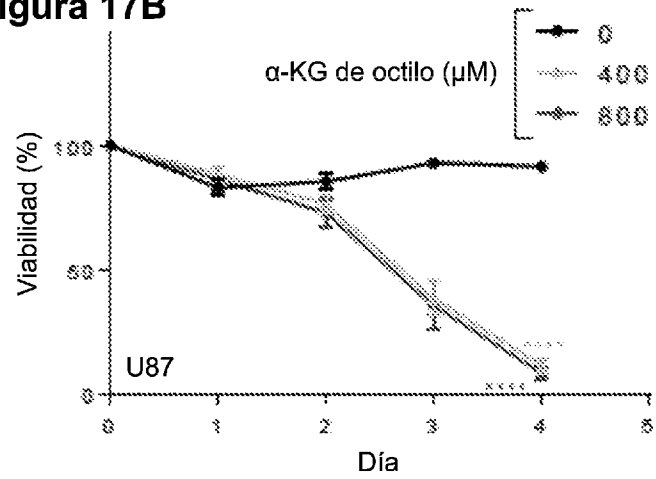


Figura 17C

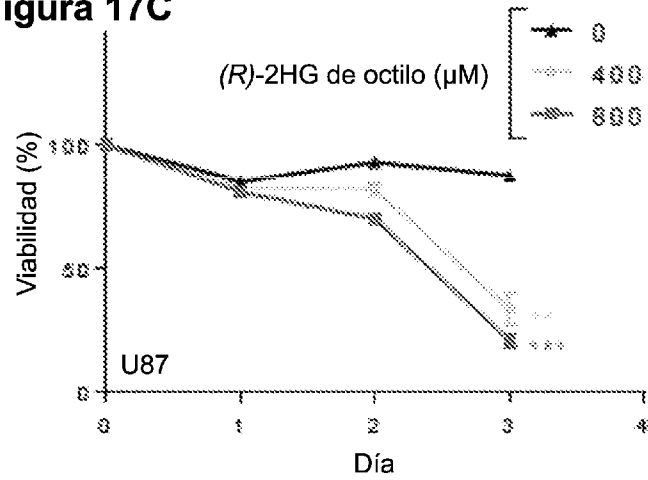


Figura 17D

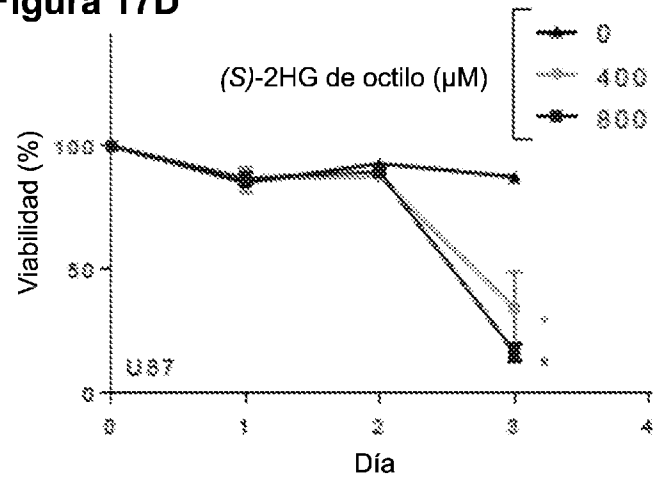


Figura 17E

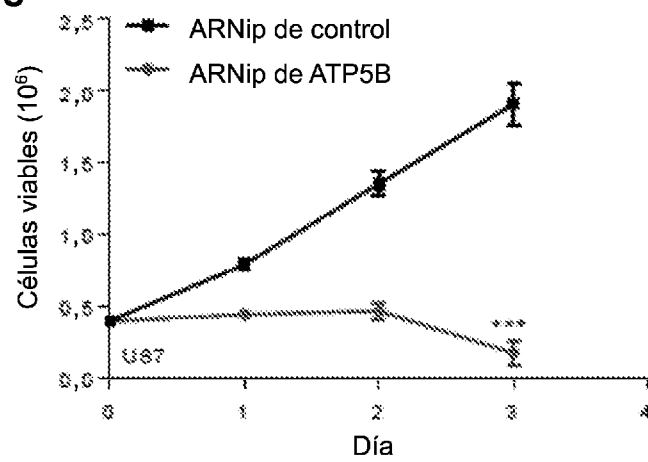


Figura 17F

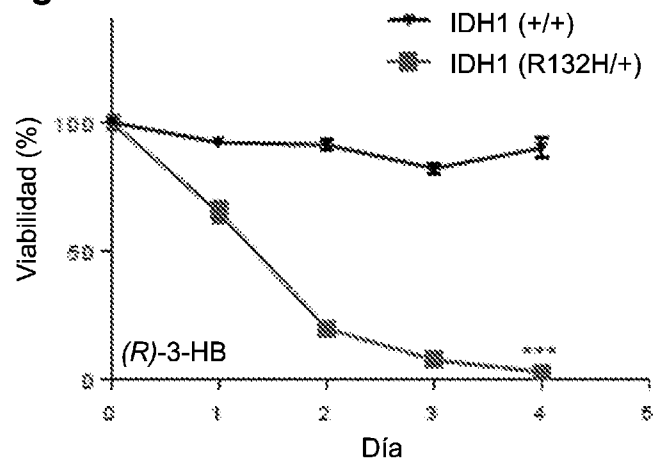


Figura 17G ^{iARNip de ATP5B}



Figura 17H ^{α-KG de octilo (R)-2HG de octilo (S)-2HG de octilo Oligomicina}

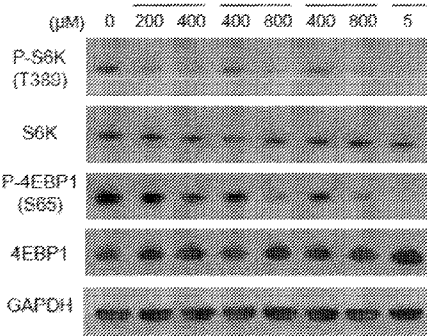
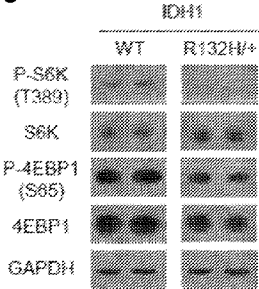
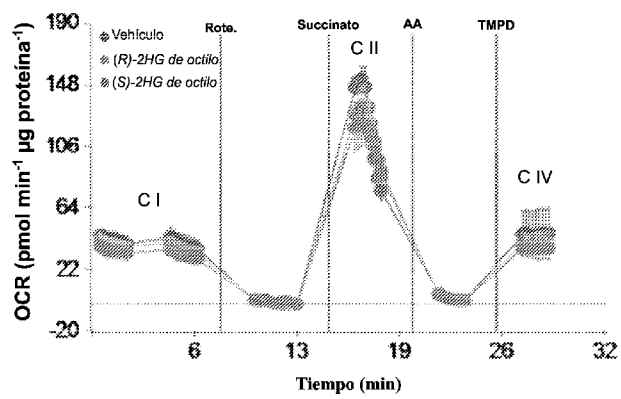


Figura 17I



A



B

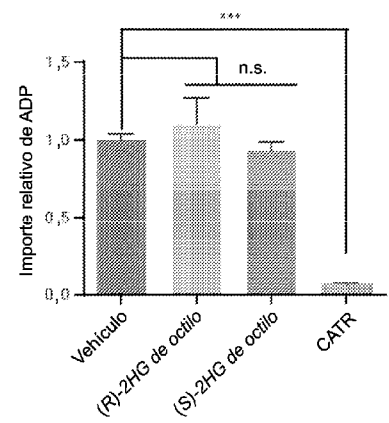


Figura 18

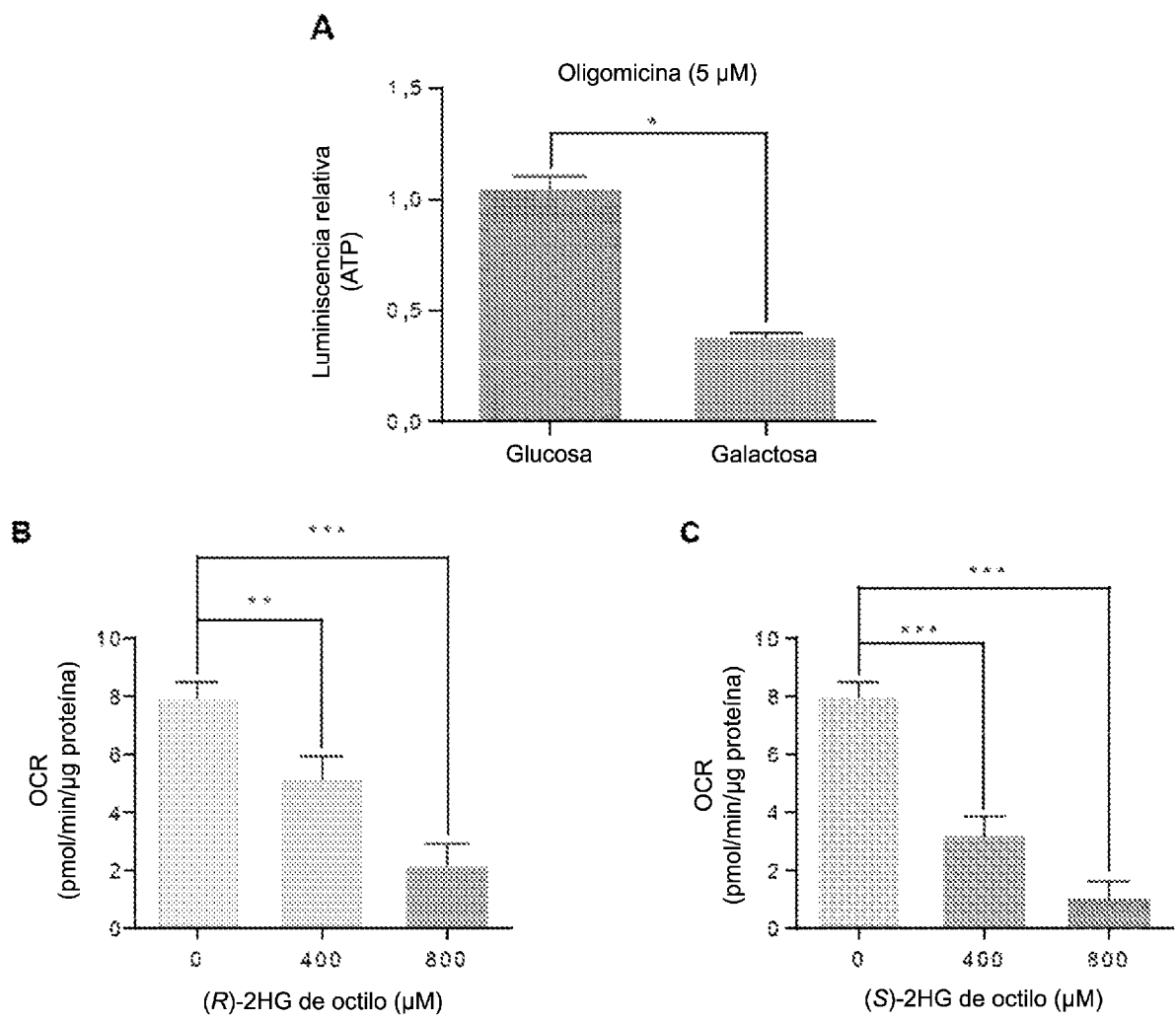


Figura 19

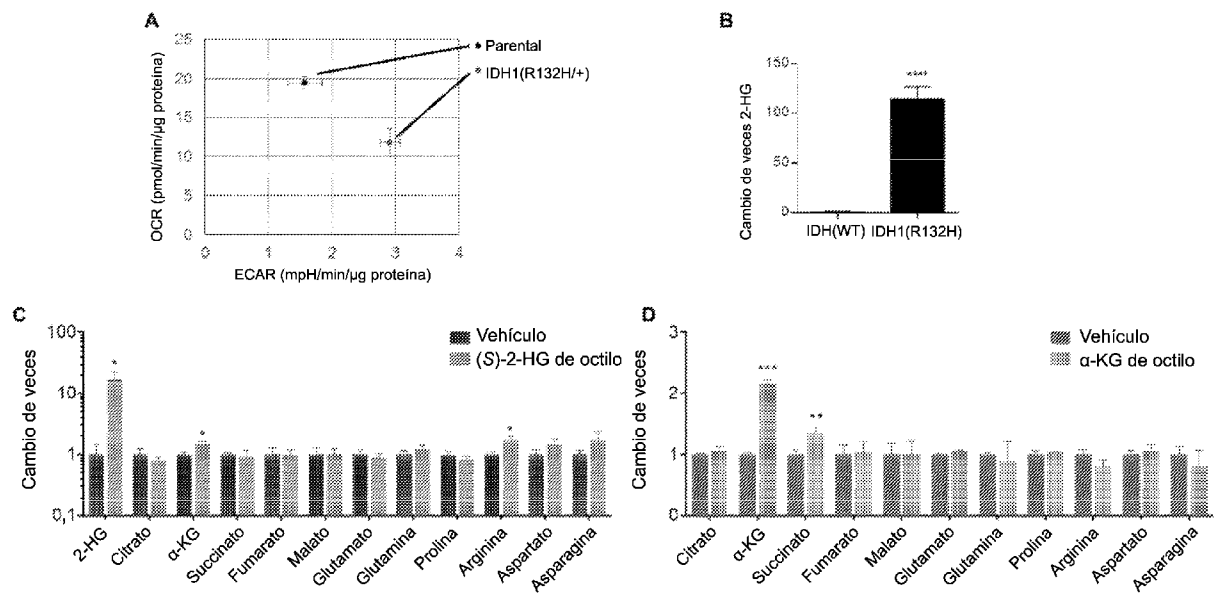


Figura 20

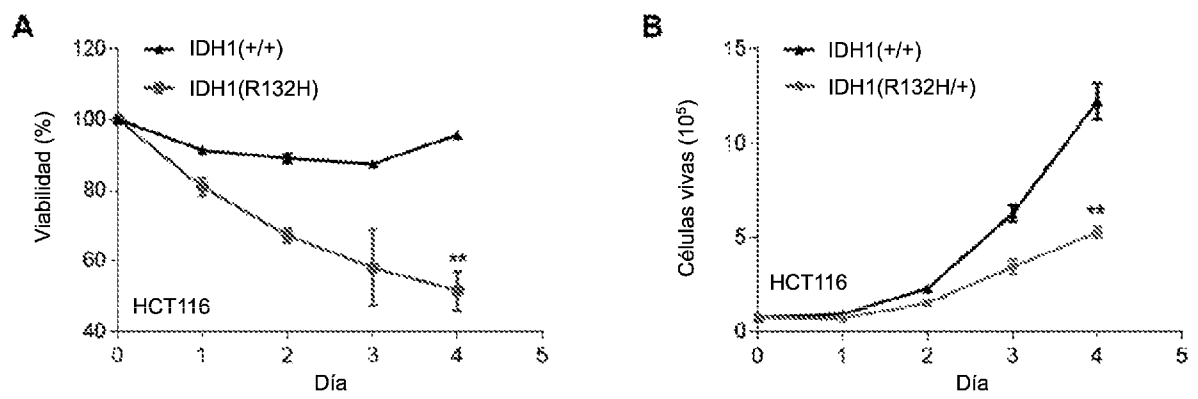


Figura 21

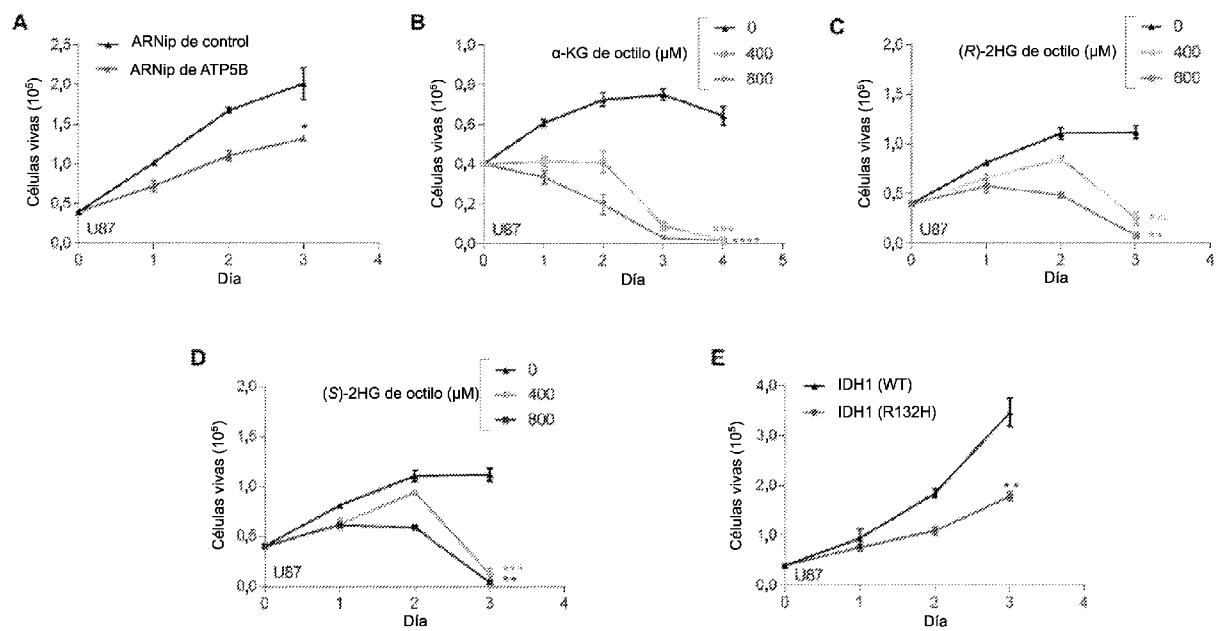
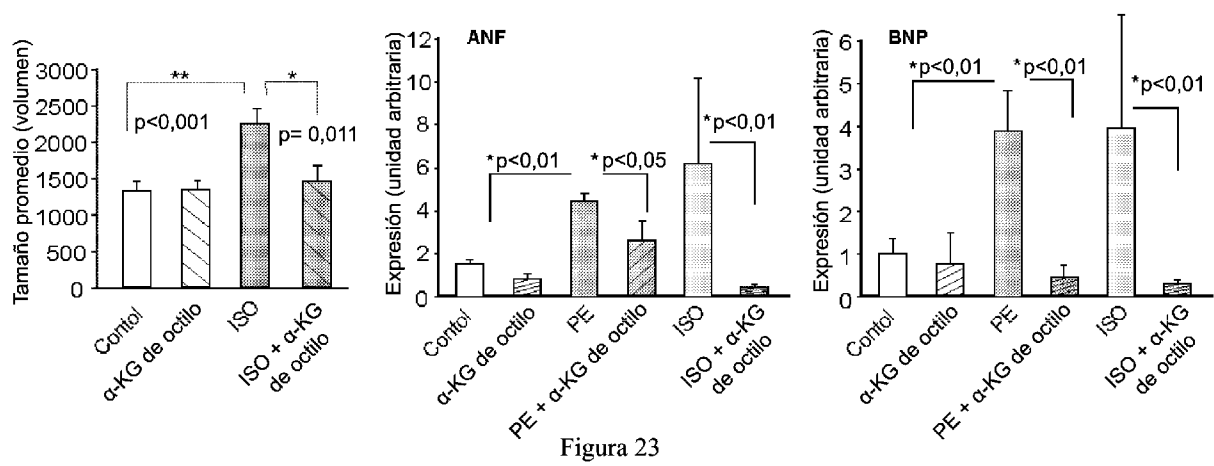


Figura 22



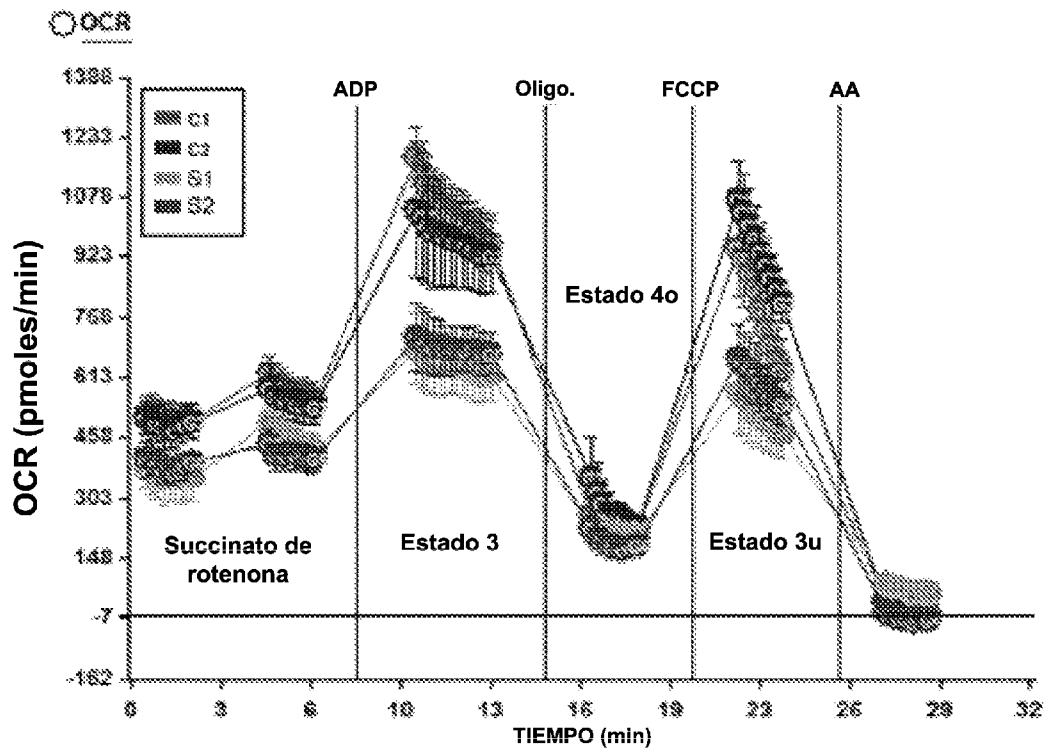


Figura 24

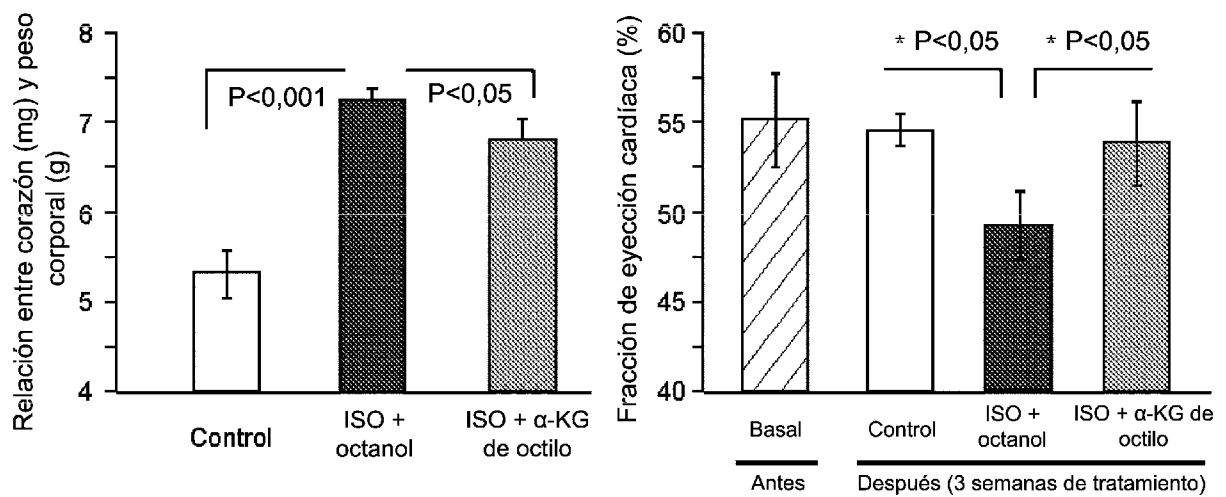


Figura 25