

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 028 538**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4439 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2019 PCT/IB2019/054696**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2019 WO19234664**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2019 E 19742480 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2025 EP 3801515**

54 Título: **5-[[4-[2-[5-(1-hidroxietil)piridin-2-il]etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona y sus sales para uso en el tratamiento de enfermedades mitocondriales**

30 Prioridad:

06.06.2018 EP 18382397

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

19.06.2025

73 Titular/es:

**MINORYX THERAPEUTICS S.L. (100.00%)
Av. Ernest Lluch 32
08302 Mataró, Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**MARTINELL PEDEMONTE, MARC;
PIZCUETA LALANZA, MARIA PILAR y
RODRÍGUEZ PASCAU, LAURA PILAR**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 3 028 538 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

5-[[4-[2-[5-(1-hidroxi-etil)piridin-2-il]etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona y sus sales para uso en el tratamiento de enfermedades mitocondriales

5

Referencia cruzada a solicitud relacionada

Esta solicitud reivindica la prioridad respecto a la solicitud europea No. 18382397.0, presentada el 6 de junio, 2018.

Campo de la divulgación

La presente divulgación se refiere a 5-[[4-[2-[5-(1-hidroxi-etil)piridin-2-il]etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona y sus sales farmacéuticamente aceptables para uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades mitocondriales.

Antecedentes

Las mitocondrias son subunidades diminutas presentes dentro de cada célula del cuerpo humano excepto los glóbulos rojos. El papel principal de las mitocondrias es transformar el alimento y oxígeno que entra en las células en energía útil. La absorción de piruvato a través de la membrana interna mitocondrial es un punto de ramificación central en el metabolismo de energía celular con la capacidad de equilibrar la glucólisis y la fosforilación oxidativa y equilibrar el metabolismo catabólico y anabólico (véase, por ejemplo, Divakaruni *et al.*, *PNAS* 110(14):5422-5427 (2013)). El transportador de piruvato mitocondrial (MPC) es un transportador de membrana interna que facilita la absorción de piruvato del citoplasma a la mitocondria. El MPC transporta piruvato a la matriz mitocondrial que se requiere para el metabolismo de piruvato y es crítico para rutas metabólicas. (Véase, por ejemplo, McCommis *et al.*, *Biochem. J.* 466: 443-454 (2015) y McCommis *et al.*, *Cell Metab.* 22(4):682-694 (2015)). Es un regulador central de la utilización de sustrato mitocondrial, y restricciones en la absorción de piruvato mitocondrial pueden potenciar el uso de ácidos grasos y una gama de aminoácidos para alimentar la energética celular y biosíntesis. (Véase, por ejemplo, Divakaruni *et al.*, *J. Cell Biol.* 216(4):1091-1105 (2017)).

El MPC contiene dos proteínas MPC1 y MPC2, que forman un complejo transportador en la membrana mitocondrial interna. MPC1 y MPC2 se han identificado como componentes de la diana mitocondrial de las tiazolidinadonas (TZD). Véase, por ejemplo, Colca *et al.*, *PLOS ONE* 8(5):e61551-e61551 (2013).

Las enfermedades mitocondriales son un grupo de trastornos, cada uno de los cuales implica una disfunción mitocondrial. Las enfermedades mitocondriales son trastornos crónicos, genéticos y con frecuencia hereditarios que se producen cuando las mitocondrias no pueden producir suficiente energía para que el cuerpo funcione apropiadamente. Las enfermedades mitocondriales pueden estar presentes en el nacimiento, pero también pueden producirse a cualquier edad. Estas enfermedades pueden afectar a las células del cerebro, nervios, músculos, riñones, corazón, hígado, ojos, oídos y/o páncreas. La disfunción mitocondrial se produce cuando las mitocondrias no funcionan tan bien como deberían debido a otra enfermedad o afección. Enfermedad mitocondrial se refiere a un grupo heterogéneo de trastornos que incluyen trastornos mitocondriales primarios y secundarios (Véase, por ejemplo, Niyazov *et al.*, *Mol. Syndromol.* 7:122-137 (2016)). Los trastornos mitocondriales primarios pueden deberse a mutaciones en la línea germinal en genes en el ADN mitocondrial (ADNmt) y/o ADN nuclear (ADNn) que codifican proteínas OXPHOS (fosforilación oxidativa) directamente o afectan a la función OXPHOS impactando la producción de la maquinaria compleja necesaria para correr el proceso OXPHOS. Los trastornos mitocondriales secundarios por el contrario se producen en muchos procesos patológicos que no implican OXPHOS incluyendo enfermedades hereditarias con mutaciones en la línea germinal en genes no OXPHOS. Los trastornos mitocondriales secundarios también se pueden adquirir secundarios a efectos medioambientales adversos que pueden producir estrés oxidativo.

Muchas afecciones pueden producir un trastorno mitocondrial secundario incluyendo autismo, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, distrofia muscular, enfermedad de Lou Gehrig, diabetes y cáncer.

Se ha descrito que la rosiglitazona, una tiazolidinadona, se une al transportador de piruvato mitocondrial (MPC) a concentraciones fisiológicas y suprime críticamente el metabolismo de piruvato (Véase, por ejemplo, Colca *et al.*, *PLOS ONE* 8(5):e61551-e61551 (2013)). Divakaruni *et al.* describen que las tiazolidinadonas son inhibidores específicos, agudos de MPC, refiriéndose a la Fig. 3C. Véase, Divakaruni *et al.*, *PNAS* 110(14):5424 (2013). Sin embargo, aunque se ha mencionado pioglitazona en la publicación, la figura 3C no proporciona ningún resultado de inhibición de MPC por pioglitazona.

La pioglitazona es un fármaco comercializado para uso en el tratamiento de diabetes mellitus de tipo 2. La pioglitazona es un potente agonista para receptor gamma activado por el proliferador del peroxisoma (PPAR-γ). Pero la pioglitazona se ha asociado con efectos secundarios indeseados incluyendo el potencial para interacciones fármaco a fármaco, efectos cardiovasculares, retención de líquidos, ganancia de peso y cáncer de vejiga (Véase, por ejemplo, Kus *et al.*, *PLoS ONE* 6(11): e27126 (2011)). Altas dosis y/o administración crónica de pioglitazona son, por tanto, indeseables ya que sería probable que la alta exposición sistémica produjera efectos secundarios graves.

La pioglitazona es un fármaco "sucio" que se convierte a muchos metabolitos in vivo. La ruta metabólica de pioglitazona después de administración oral se ha estudiado en varias especies animales y en seres humanos, y los metabolitos se han descrito en la bibliografía (véase, por ejemplo, Sohda *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* 43(12):2168-2172 (1995) y Maeshiba *et al.*, *Arzneim.-Forsch/Drug Res.* 47(1):29-35 (1997). Se han identificado al menos seis metabolitos, nombrados M-I a M-VI. Entre estos metabolitos, M-II, M-III y M-IV muestran alguna actividad farmacológica, pero son menos activos que la pioglitazona en modelos preclínicos diabéticos. 5-[[4-[2-[5-(1-hidroxi)etil]piridin-2-il]etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona ha mostrado ser eficaz en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central (véase, el documento WO 2015/150476 A1), y en el tratamiento de esquizofrenia y enfermedad de Alzheimer (véase el documento WO 2017/083739 A1).

Hay una necesidad urgente para nuevos tratamientos para enfermedades mitocondriales.

Compendio

La presente invención se expone en el conjunto adjunto de reivindicaciones. Los inventores han encontrado sorprendentemente que compuestos de fórmula (1), y sales de los mismos, inhiben MPC mientras la pioglitazona no inhibe directamente MPC.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa un gráfico lineal que muestra la comparación de los efectos inhibidores sobre MPC de 5-[[4-[2-[5-(R)-(1-hidroxi)etil]piridin-2-il]etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona HCl (MIN-102) y pioglitazona en un modelo de actividad inhibidora de MPC *in vitro* usando el ensayo BRET en células HEK.

La figura 2A es un gráfico lineal que muestra el efecto de MIN-102 en OCR en células Hela.

La figura 2B es un gráfico lineal que muestra el efecto de MIN-102 en OCR en células A549.

La figura 3A es un gráfico lineal que muestra el efecto de MIN-102 en OCR en células MDS MB231 de tipo salvaje.

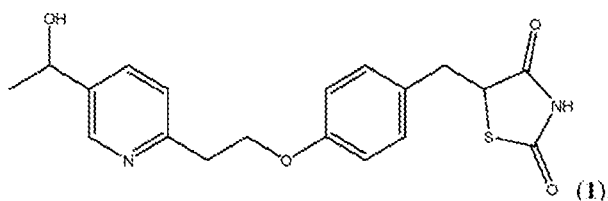
La figura 3B es un gráfico lineal que muestra el efecto de MIN-102 en OCR en células MDS MB231 KO.

La figura 4 representa una comparación de los niveles de adiponectina en ratas Sprague Dawley después del tratamiento con MIN-102.

Descripción detallada

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un compuesto de fórmula (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento y o prevención de una enfermedad mitocondrial que es un trastorno mitocondrial primario seleccionado del grupo que consiste en síndrome de Rett y síndrome de Leigh.

Se ha descubierto inesperadamente que compuestos de fórmula (1)

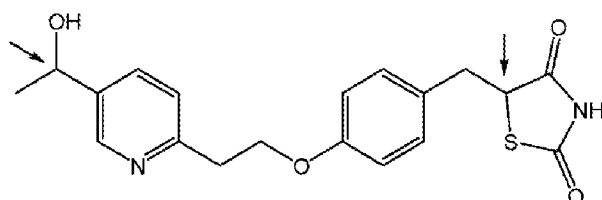


que tiene el nombre químico 5-[[4-[2-[5-(1-hidroxi)etil]piridin-2-il]etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona (también llamado 5-(4-(2-(5-(1-hidroxi)etil)piridina-2-il)etoxi)encil)tiazolidina-2,4-diona, hidroxipioglitazona, hidroxi pioglitazona, o M-IV), y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, colectivamente denominados en el presente documento "compuestos de la divulgación" (cada uno se denomina individualmente en el presente documento un "compuesto de la divulgación") muestran actividad como inhibidores de MPC y, por tanto, son útiles en un método de tratar o prevenir enfermedades mitocondriales. Se ha encontrado que los compuestos de la divulgación son inhibidores de MPC que tienen un valor de Cl_{50} de aproximadamente 4,1 μ M en la prueba de actividad inhibidora de MPC usando un ensayo BRET en células HEK como se describe por Compan *et al.* en *Molecular Cell* 59:491-501 (2015). Por el contrario, se encontró que el compuesto parental, pioglitazona no inhibía MPC cuando se ensayó en el mismo ensayo teniendo un valor de Cl_{50} de más de 100 μ M. También se ha encontrado que los compuestos de la divulgación inhiben el consumo de oxígeno de una manera dependiente de MPC medido como se describe por Compan *et al.*, anteriormente.

La solicitud internacional No. PCT/IB2017/057587 divulga que los compuestos de la divulgación poseen una variabilidad PK menor que pioglitazona y, por tanto, el tratamiento con los compuestos de la divulgación es más seguro

que el tratamiento con pioglitazona. Dosis mayores de pioglitazona aumentarían el riesgo de desarrollar sucesos adversos. La solicitud internacional No. PCT/IB2017/057587 divulga el compuesto de fórmula (1), y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, para el tratamiento de enfermedad del hígado graso no alcohólica ("EHGNA"), esteatohepatitis no alcohólica ("EHNA"), y otras enfermedades y trastornos.

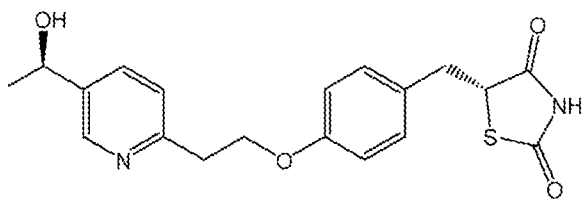
5 El compuesto de fórmula (1), 5-[[4-[2-[5-(1-hidroxi-etil)piridin-2-il]etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona, tiene dos centros quirales. Uno de ellos es el átomo de carbono en la posición 5 del anillo de tiazolidina-diona y el otro átomo asimétrico está en la posición 1 del grupo hidroxietilo como se muestra mediante las flechas:



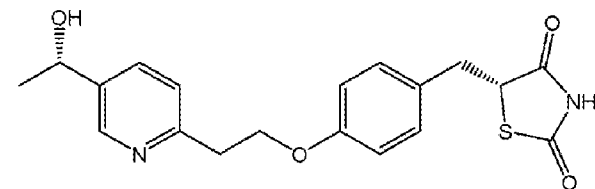
10 Como se usa en el presente documento, el término "compuesto de fórmula (1)" se usa para designar todos los posibles estereoisómeros, incluyendo enantiómeros y diastereómeros, y mezclas incluyendo mezclas racémicas de los mismos.

15 En una forma de realización, el compuesto de fórmula (1) se selecciona del grupo que consiste en:

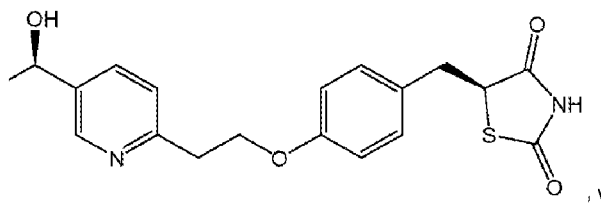
Compuesto (2): (R)-5-[[4-[2-[5-(R)-(1-hidroxi-etil)piridin-2-il]etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona



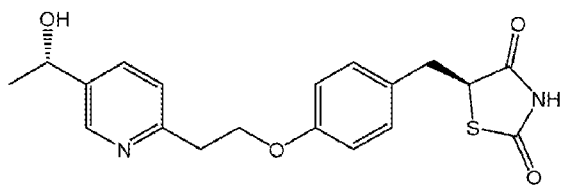
20 Compuesto (3): (R)-5-[[4-[2-[5-(S)-(1-hidroxi-etil)piridin-2-il]etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona



25 Compuesto (4): (S)-5-[[4-[2-[5-(R)-(1-hidroxi-etil)piridin-2-il]etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona



30 Compuesto (5): (S)-5-[[4-[2-[5-(S)-(1-hidroxi-etil)piridin-2-il]etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Aunque los compuestos (2) a (5) se han preparado como se describe en el documento WO 2015/150476 A1 y aislado, su configuración absoluta (R/S) aún no se ha determinado. El tiempo de retención de cada enantiómero se ha medido por HPLC quiral.

5 La referencia a los compuestos (1) a (5) en la presente divulgación se pretende para designar los compuestos (1) a (5) que tienen átomos de hidrógeno que están predominantemente en la forma de su isótopo ^1H , es decir, no más del 1% del número total de átomos de hidrógeno por mol de compuesto están en la forma del isótopo ^2H (deuterio). En una forma de realización, no más del 0,015% (que es la abundancia natural del deuterio) del número total de átomos de hidrógeno por mol de compuesto están en la forma del isótopo ^2H (deuterio).

10 En una forma de realización, al paciente se le puede administrar una mezcla que comprende una cantidad no equimolar de cada compuesto (2), (3), (4) y (5), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. En otra forma de realización, la mezcla comprende cada uno del compuesto (2), (3), (4) y (5), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en una cantidad del $20\% \pm 10\%$ p/p. En otra forma de realización, la mezcla comprende cada uno del compuesto (2), (3), (4) y (5), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en una cantidad del $25\% \pm 5\%$ p/p.

15 En otra forma de realización, al paciente se le puede administrar una mezcla que comprende cada compuesto (2), (3), (4) y (5), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde la mezcla comprende un exceso enantiomérico de uno o más del compuesto (2), (3), (4) y (5). En otra forma de realización, al paciente se le puede administrar una mezcla que comprende una cantidad equimolar de cada compuesto (2), (3), (4) y (5), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, es decir, cada compuesto en una cantidad del 25% p/p.

20 En una forma de realización, al paciente se le puede administrar una mezcla de dos o más compuestos seleccionados del compuesto (2), compuesto (3), compuesto (4) y compuesto (5), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde la mezcla es ópticamente activa. En otra forma de realización, la mezcla comprende dos o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en:

- 25
- 30 (a) el compuesto (2) y el compuesto (3);
 - (b) el compuesto (4) y el compuesto (5);
 - (c) el compuesto (2) y el compuesto (4); y
 - (d) el compuesto (3) y el compuesto (5),
- o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

35 En otra forma de realización, al paciente se le administra la mezcla (c) o la mezcla (d).

En otra forma de realización, al paciente se le administra una mezcla que consiste esencialmente en:

- 40
- (a) el compuesto (2) y el compuesto (3), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, como los agentes activos;
 - (b) el compuesto (4) y el compuesto (5), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, como los agentes activos;
 - (c) el compuesto (2) y el compuesto (4), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, como los agentes activos; y
 - 45 (d) el compuesto (3) y el compuesto (5), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, como los agentes activos.

50 En otra forma de realización de las mezclas (a) a (d) mencionadas anteriormente, los dos compuestos mencionados en cada una de las mezclas están presentes en cantidades equimolares. Dichas mezclas pueden comprender también cantidades minoritarias (por ejemplo, menos del 10% en peso, menos del 3% en peso, menos del 1% en peso, y menos del 0,1% en peso de otro estereoisómero de fórmula (1)). Dichas mezclas también pueden estar enantioméricamente enriquecidas con respecto a uno o más compuestos (2), (3), (4) y (5).

55 Otro aspecto de la divulgación, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la divulgación incluyen, por ejemplo, sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la divulgación se pueden preparar de los siguientes ácidos incluyendo sin limitación los ácidos fórmico, acético, propiónico, benzoico, acético, propiónico, benzoico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, maleico, málico, tartárico, cítrico, nítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fumárico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, isocítrico, xinafoico, tartárico, trifluoroacético, pamoico, propiónico, antranílico, mesílico, napadisilato, oxalacético, oleico, esteárico, salicílico, p-hidroxibenzoico, nicotínico, fenilacético, mandélico, embónico (pamoico), metanosulfónico, fosfórico, fosfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, pantoténico, toluenosulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, sulfanílico, sulfúrico, salicílico, ciclohexilaminosulfónico, algénico, β -hidroxibutírico, galactárico y galacturónico. En una forma de realización, las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de ácido clorhídrico y ácido bromhídrico. En una forma de realización, la sal farmacéuticamente aceptable incluye la sal del ácido clorhídrico.

60

65

Los compuestos de la divulgación se pueden preparar por cualquier método adecuado conocido en la técnica, tal como mediante los procesos descritos en los documentos WO 2015/150476 A1 y WO 2018/116281 A1. 5-[[4-[2-[5-(1-hidroxi)etil]piridin-2-il]etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona también está comercialmente disponible de, por ejemplo, Santa Cruz Biotechnology y Toronto Research Chemicals (Toronto, Ontario, Canadá).

Varios ejemplos y formas de realización del objeto inventivo divulgado aquí son posibles y serán aparentes para un experto en la materia, dado el beneficio de esta divulgación.

Los artículos “un”, “una”, “el” y “la” se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

La palabra “comprender” se usa de una manera consistente con su significado abierto, es decir, para significar que un producto o proceso determinado puede opcionalmente también tener características o elementos adicionales más allá de los expresamente descritos. Se entiende que siempre que se describen formas de realización con el vocabulario “comprender” formas de realización de otra manera análogas descritas en términos de “consistir en” y/o “consistir esencialmente en” también se contemplan y están dentro del ámbito de esta divulgación.

El término “mejorar” en el contexto de esta presente divulgación se entiende como que significa cualquier mejora en la situación del paciente tratado.

El término “administración bid” o “BID” significa administración dos veces al día de un agente terapéutico.

El término “SAD” significa administración de dosis oral única de un agente terapéutico.

En la presente divulgación, cada uno de los términos “compuesto de fórmula (1)”, “hidroxipioglitazona”, “hidroxi pioglitazona (M-IV)”, “hidroxi pioglitazona” y “5-[4-[2-(5-(1-hidroxi)etil)-2-piridinil]etoxi]bencil]-2,4-tiazolidinadiona” se refieren a 5-[[4-[2-[5-(1-hidroxi)etil]piridin-2-il]etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona, que tiene la estructura representada anteriormente, y cualquier estereoisómero de la misma. El término “MIN-102” se refiere a la sal clorhidrato de 5-[[4-[2-[5-(1-hidroxi)etil]piridin-2-il]etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona racémica.

Mediante una “cantidad eficaz” o una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un fármaco o agente farmacológicamente activo se quiere decir una cantidad no tóxica, pero suficiente del fármaco o agente para proporcionar el efecto deseado. La cantidad que es “eficaz” variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la edad y estado general del individuo, el agente o agentes activo(s) particular(es), y similares. Por tanto, no siempre es posible especificar una “cantidad eficaz” exacta. Sin embargo, una cantidad “eficaz” apropiada en cualquier caso individual la puede determinar un experto en la materia usando experimentación rutinaria.

El término “tratamiento” o “tratar” en el contexto de esta especificación significa mejorar o eliminar la enfermedad o uno o más síntomas asociados con dicha enfermedad. “Tratamiento” también abarca mejorar o eliminar las secuelas fisiológicas de la enfermedad.

Como se usa en el presente documento, la frase “variabilidad PK” o “variabilidad farmacocinética” se refiere a variaciones interindividuales de los parámetros farmacocinéticos de un fármaco, que produce diferentes perfiles de concentración en plasma-tiempo después de la administración de la misma dosis a diferentes pacientes.

El término “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a sales preparadas de ácidos inorgánicos y orgánicos farmacéuticamente aceptables.

El término “prevención” o “prevenir” se refiere a la reducción en el riesgo de adquirir o desarrollar una enfermedad o trastorno determinado, o la reducción o inhibición de la recurrencia de una enfermedad o trastorno.

Como se usa en el presente documento, el término “estereoisómeros” es un término general para todos los isómeros de moléculas individuales que se diferencian en la orientación de sus átomos en el espacio. Incluye enantiómeros e isómeros de compuestos con más de un centro quiral que no son imágenes especulares entre sí (diastereómeros).

El término “centro quiral” o “átomo de carbono asimétrico” se refiere a un átomo de carbono al que están unidos cuatro grupos diferentes.

Los términos “enantiómero” y “enantiomérico” se refieren a una molécula que no puede superponerse sobre su imagen especular y por tanto es ópticamente activa en donde el enantiómero rota el plano de luz polarizada en una dirección y su compuesto imagen especular rota el plano de la luz polarizada en la dirección opuesta.

El término “racémico” se refiere a una mezcla de partes iguales de enantiómeros y mezcla que es ópticamente inactiva.

El término "configuración absoluta" se refiere a la organización espacial de los átomos de una entidad (o grupo) quiral y su descripción estereoquímica, por ejemplo, R o S.

5 Los términos y convenciones estereoquímicos usados en la especificación se pretende que sean consistentes con los descritos en *Pure & Appl. Chem* 68:2193 (1996), a menos que se indique otra cosa.

10 El término "exceso enantiomérico" o "ee" se refiere a una medida para cuanto de un enantiómero está presente comparado con el otro. Para una mezcla de enantiómeros R y S, el porcentaje de exceso enantiomérico se define como $|R - S| * 100$, donde R y S son las respectivas fracciones molares o de peso de los enantiómeros en una mezcla tal que $R + S = 1$. Con conocimiento de la rotación óptica de una sustancia quiral, el porcentaje de exceso enantiomérico se define como $([\alpha]_{\text{obs}}/[\alpha]_{\text{max}})*100$, donde $([\alpha]_{\text{obs}}$ es la rotación óptica de la mezcla de enantiómeros y $[\alpha]_{\text{max}}$ es la rotación óptica del enantiómero puro. La determinación del exceso enantiomérico es posible usando una variedad de técnicas analíticas, incluyendo espectroscopía de RMN, cromatografía en columna quiral o polarimetría óptica.

15 Los términos "enantioméricamente puro" o "enantiopuro" se refieren a una muestra de una sustancia quiral todas cuyas moléculas (dentro de los límites de detección) tienen el mismo sentido de quiralidad.

20 Los términos "enantioméricamente enriquecido" o "enantioenriquecido" se refieren a una muestra de una sustancia quiral cuya proporción enantiomérica es mayor que 50:50. Los compuestos enantioméricamente enriquecidos pueden ser enantioméricamente puros.

25 El término "trastorno mitocondrial primario" o "PMD" se refiere a una enfermedad mitocondrial que se produce debido a mutaciones en la línea germinal en genes de ADN mitocondrial (ADNmt) y/o ADN nuclear (ADNn) que codifican las proteínas de la cadena de transporte de electrones (ETC) y por tanto la producción de adenosina trifosfato (ATP), el principal portador de energía celular.

30 El término "trastorno mitocondrial secundario" o "SMD" se refiere a una enfermedad mitocondrial que acompaña a muchos procesos patológicos que no implican la fosforilación oxidativa (OXPHOS), incluyendo enfermedades hereditarias con mutaciones en la línea germinal de genes no OXPHOS. El SMD también puede ser adquirido secundario a efectos medioambientales adversos que pueden causar estrés oxidativo.

Tratamiento o prevención

35 La utilidad del compuesto de fórmula (1) en la presente invención, incluyendo los estereoisómeros (2) a (5), las mezclas (a) a (d), y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos se puede demostrar en ensayos *in vitro* o *in vivo* apropiados, tal como los descritos, por ejemplo, en Compañ *et al.*, *Molecular Cell* 59:491-501 (2015); Abou-Samra *et al.*, *Skeletal Muscle* 5:25 (2015); (McGreevy *et al.*, *Disease Models & Mechanisms* 8:195-213 (2015); Bostick *et al.*, *Circulation Research Han.* 4/18:121-130 (2008); Bostick *et al.*, *Molecular Therapy* 17(2):253-261 (2009); Zanou *et al.*, *J. Physiol.* 593.17:3849-3863 (2010); y Signorini *et al.*, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volumen 2014*, Artículo ID 195935, 10 páginas (2014).

45 Como se muestra en el ejemplo 1, el potencial inhibitorio sobre MPC de MIN-102 se estudió usando el ensayo BRET en células HEK según Compañ *et al.*, *Molecular Cell* 59:491-501 (2015). La curva de respuesta a la dosis de la figura 1 muestra que MIN-102 tiene un valor de CI_{50} de 4,1 μM en el ensayo BRET, mientras pioglitazona tiene un valor de CI_{50} de más de 100 μM . Según esto, MIN-102 muestra un efecto inhibitorio sobre MPC y pioglitazona no inhibe MPC. Basado en su actividad inhibitoria sobre MPC, los compuestos de la divulgación pueden ser útiles en el tratamiento o la prevención de enfermedades mitocondriales. Véase, por ejemplo, Divakaruni *et al.*, *PNAS* 110(14):5422-5427 (2013).

50 Además, los compuestos de la divulgación tienen actividad como agonistas de PPAR- γ . Véase, por ejemplo, el documento WO 2015/150476 A1. La actividad combinada de los compuestos de la invención como inhibidores de MPC y agonistas de PPAR- γ se espera que haga los compuestos de la divulgación especialmente útiles en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades mitocondriales descritas en el presente documento.

55 El ejemplo 1 también muestra que MIN-102 inhibe el consumo de oxígeno de una manera dependiente de MPC.

60 Además, como se discute en la solicitud internacional No. PCT/IB2017/057587, en seres humanos MIN-102 tiene menos variabilidad en exposición que pioglitazona y, por tanto, están implicados menos riesgos para los pacientes con el tratamiento con los compuestos de la divulgación, tal como MIN-102.

Composiciones farmacéuticas y uso como un medicamento

65 Las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la divulgación se pueden administrar por cualquier ruta de administración adecuada. Por ejemplo, cualquiera de las rutas de administración oral, intraoral, tópica, epicutánea, subcutánea, transdérmica, intramuscular, parenteral, ocular, rectal, vaginal, inhalación, yugal,

sublingual e intranasal puede ser adecuada. La presente divulgación también se refiere al compuesto de fórmula (1), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad mitocondrial que es un trastorno mitocondrial primario seleccionado del grupo que consiste en síndrome de Rett y síndrome de Leigh,

En una forma de realización, los compuestos de la divulgación se pueden administrar por vía oral. Las formas orales de las composiciones farmacéuticas pueden ser sólidas o líquidas. Las formas posológicas orales adecuadas incluyen comprimidos, cápsulas, píldoras, gránulos, suspensiones, emulsiones, jarabes o soluciones. Las composiciones farmacéuticas pueden ser una forma sólida seleccionada de, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, píldoras, o gránulos. En una forma de realización, la forma oral es un comprimido. En otra forma de realización, la forma oral es una solución o suspensión oral. Estas son ventajosas cuando el paciente tiene dificultad en tragar, por ejemplo, como resultado de la enfermedad o para uso geriátrico o pediátrico. Las preparaciones sublinguales también son ventajosas.

La cantidad que es "eficaz" variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la edad y el estado general del individuo, el agente o agentes activo(s) particular(es), y similares. Por tanto, no es siempre posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, una cantidad "eficaz" apropiada en cualquier caso individual la puede determinar un experto en la materia usando experimentación de rutina. Por tanto, la dosis del agente activo dependerá de la naturaleza y grado de la afección, la edad y estado del paciente, y otros factores que conocen los expertos en la materia. Una dosis diaria típica es desde 0,1 a 200 mg, tal como de 20 a 200 mg, por ejemplo, para un adulto 10-100 mg dado como una única dosis sin dosificación adicional o en dosis múltiples, por ejemplo, de una a tres veces al día. Los compuestos de la descripción descritos en el presente documento también se pueden administrar en dosis diarias para adultos desde 80 a 600 mg. En una forma de realización la dosis diaria para adultos es desde aproximadamente 50 mg hasta aproximadamente 300 mg. En otra forma de realización la dosis diaria para adultos es desde aproximadamente 150 mg hasta aproximadamente 180 mg. Se pueden usar dosis diarias menores para niños y adolescentes, tal como, por ejemplo, de 0,1 mg a 200 mg o de 10 mg a 100 mg.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener excipientes convencionales conocidos en la técnica y se pueden preparar por métodos convencionales. Un compuesto específico o mezcla de compuestos se puede seleccionar para una ruta de administración particular. Algunos compuestos o mezclas de compuestos también pueden ser adecuados basado en su uso para tratar enfermedades mitocondriales.

Las formas posológicas orales se pueden preparar combinando uno o más compuestos de la divulgación en una mezcla estrecha con al menos un excipiente según técnicas de combinación farmacéutica convencionales. Los excipientes pueden tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de la composición deseada para administración. Por ejemplo, los excipientes adecuados para uso en formas posológicas líquidas orales o aerosoles incluyen, pero no están limitados a, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, conservantes, y agentes colorantes. Los ejemplos de excipientes adecuados para uso en formas posológicas orales sólidas (por ejemplo, polvos, comprimidos, cápsulas, y comprimidos oblongos) incluyen, pero no están limitados a, almidones, azúcares, celulosa microcristalina, caolín, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, estabilizantes, y agentes disgregantes.

Debido a su facilidad de administración, los comprimidos, comprimidos oblongos y cápsulas (tal como cápsulas de gelatina duras, HPMC o almidón) representan una forma de realización de las formas posológicas unitarias orales sólidas, en cuyo caso se usan excipientes farmacéuticos sólidos. Si se desea, los comprimidos o comprimidos oblongos, pueden estar recubiertos por técnicas acuosas o no acuosas estándar. Estas formas posológicas se pueden preparar por cualquiera de los métodos de farmacia. En general, las composiciones farmacéuticas y las formas posológicas se preparan mezclando uniforme y estrechamente uno o más compuestos de la divulgación con soportes líquidos, soportes sólidos finamente divididos, o ambos, y después dando forma al producto en la presentación deseada si es necesario.

Por ejemplo, un comprimido se puede preparar por compresión o moldeo. Los comprimidos de compresión se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada uno o más compuestos de la divulgación en forma libre, tal como polvo o gránulos, opcionalmente mezclados con uno o más excipientes. Los comprimidos moldeados se pueden hacer moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

Las composiciones farmacéuticas pueden además comprender uno o más otros agentes terapéuticos. Los tratamientos de combinación se pueden administrar simultáneamente, secuencialmente o por separado, por la misma o diferentes rutas, o antes, durante, y después de procedimiento quirúrgicos o de intervención.

Los compuestos de la divulgación se pueden usar según la divulgación cuando al paciente también se le administra o en combinación con uno o más de otro agente terapéutico seleccionado de agentes antiinflamatorios y analgésicos, antidiabéticos (por ejemplo, metformina), agonistas de dopamina (por ejemplo, levodopa), inhibidores de MAO-B, inhibidores de catecol O-metiltransferasa (COMT), anticolinérgicos, otros antiparkinsonianos (por ejemplo, amantadina), anti-receptores de NMDA (por ejemplo, memantina), inhibidores de colinesterasa, inhibidores ACE, antagonistas de glutamato (por ejemplo, riluzol), antioxidantes, inmunomoduladores (por ejemplo, fingolimod, anticuerpos monoclonales anti CD52, CD25 y CD20, interferón-β-1a, natalizumab, laquinimod, dimetilfumarato)

quimioterapéuticos, agentes de terapia de reemplazo de enzimas, agentes de terapia de reducción de sustrato, corticosteroides, antiproliferativos (por ejemplo, metotrexato), medicaciones antiepilépticas, anticoagulantes, antihipertensivos y neuroprotectores. Los compuestos de la divulgación también se pueden usar cuando el paciente experimenta terapia génica, trasplante de médula ósea, estimulación cerebral profunda o radioterapia.

El uno o más agentes terapéuticos incluyen una sulfonilurea (por ejemplo, glimepirida, glipizida, gliburida), una glinidina (también conocidas como meglitinidas), una tiazolidinadiona (por ejemplo, pioglitazona, rosiglitazona, lobeglitazona), un inhibidor de dipeptidil peptidasa 4 (DPP4) (por ejemplo sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina, linagliptina, gemigliptina, anagliptina, teneligliptina, alogliptina, trelagliptina, dutogliptina, omarigliptina), un inhibidor del cotransportador de sodio/glucosa 2 (SGLT2) (por ejemplo, canagliflozina, dapagliflozina), un agonista del receptor de péptido de tipo glucagón 1 (GLP1) (por ejemplo, exenatida, liraglutida, lixisenatida, albiglutida, dulaglutida, taspoglutida, semaglutida), péptido de tipo glucagón 1 (GLP-1), e insulina (por ejemplo, preparaciones de insulina animal extraídas del páncreas de ganado o cerdos; preparaciones de insulina humana sintetizada por ingeniería genética usando *Escherichia coli* o levadura; insulina zinc; protamina insulina zinc; fragmentos o derivados de insulina (por ejemplo, INS-1), y preparaciones orales de insulina.

Ejemplos

Los usos descritos en el presente documento se detallan ahora adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan para los fines de ilustración solo y las formas de realización descritas en el presente documento no deben en modo alguno interpretarse como que están limitadas a estos ejemplos.

Ejemplo 1

Evaluación de la actividad inhibidora sobre el transportador de piruvato mitocondrial (MPC) de MIN-102

Ensayo BRET

Para seguir la actividad del MPC en tiempo real, es decir, la actividad inhibidora de MPC (CI_{50}), se usó un ensayo BRET transfectando las proteínas quiméricas apropiadas en células HEK como se describe en Compañ *et al.*, *Molecular Cell* 59:491-501 (2015).

El MPC es un heterodímero compuesto de dos subunidades, MPC1 y MPC2. MPC1 y MPC2 interactúan para formar un transportador activo. En el ensayo, MPC2 se fusionó a Rluc8 (donante) y MPC1 a Venus (aceptor). Estas proteínas quiméricas se expresaron establemente en células HEK. La actividad BRET se midió después de la adición de coelenteracina en el medio de cultivo. La coelenteracina entra en las células y en contacto con la luciferasa Rluc8 emite luz, que activa la emisión de fluorescencia por el aceptor, siempre que la distancia entre donante y aceptor sea < 100 nm. Si la distancia entre donante y aceptor es > 100 nm, no se mide actividad BRET. El nivel de actividad BRET refleja un cambio en la conformación del MPC: es alta cuando el transportador está en una conformación cerrada, baja cuando el transportador está en reposo e intermedia cuando transporta piruvato. En este caso, la actividad BRET es el valor medio entre el valor BRET cuando el transportador está en reposo (distancia máxima entre el donante y el aceptor) y el valor BRET cuando está cerrado (la distancia más corta entre el donante y el aceptor).

Se usó un amplio intervalo de concentraciones de cada compuesto ensayado desde 1 nM a 100 μ M. Las curvas de respuesta a la dosis de los compuestos ensayados MIN-102 y pioglitazona se muestran en la figura 1.

La actividad BRET medida para cada compuesto ensayado se comparó con la actividad BRET obtenida cuando las células HEK se incuban en PBS (estado de reposo) y en PBS + piruvato, que corresponde al valor intermedio entre el estado de reposo y el estado cerrado (cierre máximo obtenido con UK5099). La tabla 1 a continuación proporciona los valores de CI_{50} para los compuestos ensayados MIN-102, pioglitazona, rosiglitazona y UK5099 obtenidos en el ensayo BRET descrito anteriormente.

Tabla 1

Compuesto	CI_{50}
MIN-102	4,1 μ M
Rosiglitazona	2 μ M
UK5099	17 nM
Pioglitazona	> 100 μ M

MIN-102 inhibe la actividad de MPC en el ensayo BRET con un valor de CI_{50} de 4,1 μ M. La actividad de MIN-102 es ligeramente menor que la actividad de rosiglitazona ($CI_{50} = 2$ μ M). Según esto, MIN-102 es un inhibidor de MPC con una CI_{50} de 4,1 μ M, mientras pioglitazona no inhibe MPC teniendo un valor de CI_{50} de más de 100 μ M.

Respiración mitocondrial

Para determinar si MIN-102 tiene algún efecto sobre la respiración mitocondrial mediada por piruvato, el analizador de flujo extracelular Seahorse se usó como se describe en Compan *et al.* Los experimentos de Seahorse se realizaron en las siguientes líneas celulares: HeLa (células de cáncer de cuello uterino), A549 (células de cáncer pulmonar), MDA MB 231 de tipo salvaje, y MDA MB 231 en las que MPC2 se ha deletado, produciendo la inactivación del MPC (MDA MB231 KO). Las células MDA MB231 son células de cáncer de mama epitelial. Las células se incubaron con concentraciones crecientes de los compuestos durante una hora a 37°C antes de las medidas de la velocidad de consumo de oxígeno (OCR). El analizador Seahorse permitió medir la respiración basal y máxima medida tras la despolarización con CCCP 1 μ M. Los resultados se muestran en la figura 2 y la figura 3.

10 Efectos de MIN-102 sobre las velocidades de consumo de oxígeno (OCR) en células HeLa (Figura 2A) y células A549 (Figura 2B) en un experimento representativo de $n = 3$. Los valores de OCR se expresan como proporciones de OCR en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos sobre el OCR en PBS solo. La CI_{50} en ambas líneas celulares era alrededor de 5 μ M.

15 La figura 3 muestra los efectos de MIN-102 sobre células MDA MB231 de tipo salvaje (Figura 3A) y células MDA MB231 KO (Figura 3B). En las células KO se ha deletado el gen MPC2 y por tanto no muestran actividad MPC. El panel superior muestra un experimento representativo de las líneas celulares de tipo salvaje (WT) o KO. El panel inferior muestra los valores medios de OCR máximo en 3 experimentos diferentes. Los valores de OCR se expresan como proporciones de OCR en presencia de diferentes concentraciones del compuesto ensayado sobre el OCR en PBS solo.

Conclusión

25 MIN-102 inhibe la actividad de MPC con un valor de CI_{50} de 4,1 μ M e inhibe el consumo de oxígeno de una manera dependiente de MPC. En efecto, MIN-102 no inhibe el consumo de oxígeno cuando la actividad de MPC se ha deletado genéticamente, apoyando que MIN-102 es un inhibidor específico de MPC. La actividad inhibitoria de MIN-102 sobre el MPC es baja comparada con la actividad de UK5099 ($CI_{50} = 17$ nM), un potente inhibidor compuesto químico de MPC, y ligeramente menor, pero en el mismo intervalo que la actividad de rosiglitazona ($CI_{50} = 2$ μ M). Los compuestos de la divulgación, tal como MIN-102, son significativamente más potentes que pioglitazona.

30 Basado en los resultados, se puede concluir que los compuestos de la divulgación, tal como MIN-102, ofrecerían un tratamiento mucho mejor que pioglitazona para enfermedades en las que los requisitos energéticos están modificados.

Ejemplo 2

35 MIN-102 aumenta significativamente los niveles de adiponectina en plasma

La función mitocondrial está vinculada a la síntesis de adiponectina en adipocitos, y la disfunción mitocondrial en tejido adiposo puede explicar los niveles de adiponectina en plasma disminuidos en obesidad. La función mitocondrial deteriorada activa una serie de mecanismos que implican estrés de ER, JNK y ATF3 para disminuir la síntesis de adiponectina. Véase, Eun Hee Koh *et al.*, *Diabetes* 56(12):2973-2981 (2007). Además, los receptores de adiponectina hepáticos están disminuidos en pacientes de EHNA y ratones deficientes en adiponectina desarrollan una fibrosis hepática más extensa comprados con animales de tipo salvaje, mientras la sobreexpresión mediada por adenovirus de adiponectina mejora el daño hepático en ratones de tipo salvaje. (Véase, por ejemplo, Kamada *et al.*, *Gastroenterology* 125:1796-1807 (2003)).

La evaluación del efecto de los compuestos de la divulgación sobre adiponectina se realizó en ratas Sprague Dawley. Las ratas se trataron durante 7 días con dosis repetidas de MIN-102 a 54 mg/kg/día. Se obtuvo plasma 1 h después de la última administración de MIN-102. Los niveles de adiponectina se midieron por ELISA. Los resultados se representaron como media + error estándar de la media de $n = 8$. Los datos se analizaron por Kruskal-Wallis seguido por la prueba de Dunn a posteriori frente al grupo de vehículo (****, $p < 0,0001$).

Como se muestra en la figura 4, el tratamiento con MIN-102 aumentó significativamente los niveles de adiponectina. Según esto, se puede concluir basado en estos datos que puesto que el tratamiento con MIN-102 aumenta significativamente los niveles de adiponectina, MIN-102 también podría corregir la deficiencia de adiponectina observada en pacientes que padecen una enfermedad mitocondrial, tal como en pacientes de NOHL. Véase, Abou-Samra *et al.*, *Skeletal Muscle* 5:25 (2015).

Ejemplo 3

60 Modelo *in vivo* de Duchenne

Se puede ensayar la eficacia de los compuestos de la divulgación en tratar distrofia muscular de Duchenne (DMD) como sigue:

65

Ratones deficientes en distrofina: El ratón *mdx* es un modelo animal natural para DMD y se descubrió a principios de la década de 1980 en una colonia de ratones C57BL/10ScSn debido a la creatina quinasa (CK) en suero elevada y evidencia histológica de miopatía (McGreevy *et al.*, *Disease Models & Mechanisms* 8:195-213 (2015)). La mutación en el ratón *mdx* es una mutación puntual sin sentido (transición C a T) en el exón 23 que abortaba la expresión de distrofina de longitud completa.

Entre 3 a 6 semanas, el músculo *mdx* experimenta necrosis llamativa. Posteriormente, la mayoría del músculo esquelético entra en una fase relativamente estable debido a la regeneración robusta. Los músculos de las extremidades *mdx* con frecuencia se vuelven hipertróficos durante esta fase. Los fenotipos distróficos graves, tal como desgaste muscular, escoliosis e insuficiencia cardíaca, no se producen hasta que los ratones tienen 15 meses de edad o mayores (Bostick *et al.*, *Circulation Research Han.* 4/18:121-130 (2008); Bostick *et al.*, *Molecular Therapy* 17(2):253-261 (2009)).

En esta prueba, los ratones C57BL/10ScSn se tratan o bien con un vehículo o con un compuesto de la divulgación tal como clorhidrato de 5-[[4-[2-[5-(R)-(1-hidroxietil)piridin-2-il]etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona (MIN-102). Estos animales se mantienen con una dieta de laboratorio estándar y enjaulados a una temperatura constante con un ciclo de luz-oscuridad fijo. Al final de los experimentos, los ratones se sacrifican por dislocación cervical. Se guardan muestras de sangre. Pares de músculos anteriores tibiales (TA) o almohadillas grasas inguinales se pesan, congelan en nitrógeno líquido, y almacenan a -80°C para análisis posteriores. Para algunos experimentos que se refieren a la evaluación de lesión muscular, se pueden muestrear músculos adicionales.

Estudios *in vivo* de fuerza global o resistencia: Los ratones se someten a tres pruebas principales:

Prueba del alambre: Los animales se suspenden por sus extremidades anteriores de un alambre metálico de 1,5 mm de espesor, 60 cm de largo a 45 cm por encima de suelo blando. El tiempo (segundos) hasta que el ratón libera por completo su agarre y cae se registra. Se realizan tres ensayos por sesión, con un periodo de recuperación de 30 s entre ensayos. El tiempo máximo por ensayo se ajusta a 180 segundos. Para cada ratón, se promedian las puntuaciones de los tres ensayos (Zanou *et al.*, *J. Physiol.* 593.17:3849-3863 (2010)).

Prueba de agarre: La prueba de la fuerza de agarre mide la fuerza muscular de la extremidad anterior o músculos de extremidades anteriores y posteriores combinadas. La fuerza de la extremidad se registra usando una rejilla conectada a un sensor (Panlab-Bioseb, Vitrolles, Francia). Los ratones se tumban suavemente en la parte superior de la rejilla de modo que sus garras frontales (prueba de extremidades anteriores) o tanto las garras anteriores como posteriores (prueba combinada) pueden agarrar la rejilla. Después, los ratones se echan hacia atrás continuamente hasta que el agarre se libera la longitud completa de la rejilla. Cada prueba se repite tres veces a un intervalo de 20 min. Los resultados se presentan como la media de los dos valores más altos de fuerza registrados, relativos al peso corporal.

Cuantificación de marcadores de daño muscular en plasma: Las actividades de creatina quinasa (CK) y lactato deshidrogenasa (LDH) en plasma se pueden cuantificar para evaluar el daño al músculo esquelético ya que los músculos dañados liberan CK y LDH al torrente sanguíneo a altos niveles. Los kits se basan en métodos colorimétricos (Gentaur, Kampenhout, Bélgica). Las actividades de CK y LDH se expresan como UI/l.

Ejemplo 4

Análisis de la respiración mitocondrial *in vitro*

El efecto de los compuestos de la divulgación sobre células relevantes tal como neuronas derivadas de iPSC o fibroblastos de enfermedades de ADN mitocondrial, incluyendo NOLH, SKS, MELAS, Pearson, Leigh y MILS, se pueden ensayar para consumo de oxígeno.

El análisis del potencial respiratorio mitocondrial se realiza usando un analizador de flujo (Analizador de flujo extracelular Seahorse XF^e24, Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, EE UU) con un kit Seahorse XF Cell Mito Stress Test (Seahorse Bioscience) según las instrucciones del fabricante. La respiración basal y la producción de ATP se calculan para evaluar la función respiratoria mitocondrial según las instrucciones del fabricante. Después de la medida, las células se recogen para contar el número de células, y cada valor representado se normaliza relativo al número de células usadas.

Ejemplo 5

Estudios *in vitro* en fibroblastos

Los fibroblastos son el modelo celular preferido para estudiar alteraciones celulares *ex vivo* de pacientes en una primera línea, porque crecen rápidamente, son fáciles de manipular y requieren una única extracción, que es un buen elemento para dibujar un primer escenario del que parámetros de la función mitocondrial se recuperan por el tratamiento con un compuesto de la divulgación, tal como MIN-102. Se pueden usar fibroblastos de pacientes que padecen síndrome de Rett, atrofia óptica dominante (DOA), atrofia óptica dominante autosómica (ADOA), tal como

enfermedad de mutación OPA-1, y deficiencia de complejo I (deficiencia en NADH deshidrogenasa (NADH-CoQ reductasa)), incluyendo deficiencia en NDUFS1, para los siguientes estudios:

5 1. Análisis de la función mitocondrial y proteínas dinámicas:

Se pueden estudiar dos grupos de proteínas: por una parte, las proteínas que se han descrito en la regulación transcripcional de PPAR gamma, y por otra parte proteínas que indican función y dinámica mitocondrial, tal como mitofusinas, dinaminas, ATP sintasa, e IF1. Este análisis se puede realizar por inmunotransferencia de cultivos de fibroblastos antes y después de exposición al compuesto de la divulgación, tal como MIN-102.

10 2. Estudios del estado de energía celular:

Se pueden estudiar los siguientes parámetros para analizar la capacidad respiratoria mitocondrial en fibroblastos:

15 Medida de la concentración de ATP celular (kit comercial ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II, Roche) y consumo de oxígeno y liberación de CO2 por ensayo de respirometría de placa en tiempo real (tecnología Seahorse XF, Agilent).

Estos parámetros pueden proporcionar una imagen completa de la actividad de energía mitocondrial, antes y después de la exposición a un compuesto de prueba, tal como MIN-102.

20 3. Estudio de la presencia de especies de oxígeno reactivo (ROS) en células en cultivo:

Basado en la bibliografía (véase, por ejemplo, Signorini *et al.*, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2014*, Artículo ID 195935, 10 páginas (2014)), la presencia de ROS se asocia con disfunción mitocondrial y se mide en modelos de síndrome de Rett. El efecto de un compuesto de la divulgación sobre la concentración de ROS se puede medir mediante el uso de sondas específicas, tal como MitoSOX, H2DCFDA y JM1, que se analizarán por microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. En presencia de ROS, se analizarán sistemas antioxidantes celulares por inmunotransferencia, evaluando la expresión de las proteínas MnSOD, GPX y GSH.

30 4. Visualización de la red y ultraestructura mitocondrial:

El efecto del compuesto de la divulgación en el estado de la red mitocondrial se puede analizar por medio de la incubación con la sonda fluorescente MitoTracker y el análisis de la longitud, organización y densidad de crestas mitocondriales visualizando la ultraestructura mitocondrial por microscopía electrónica.

35 Ejemplo 6

Estudios *in vitro* en linfoplastos

40 Los linfoblastos de trastornos mitocondriales primarios y secundarios, tal como ataxia de Friedreich y Huntington, se pueden estudiar para observar la potencial reversión de la disfunción mitocondrial por tratamiento con un compuesto de la divulgación, tal como MIN-102. Los cultivos celulares de linfoblastos se establecen por inmortalización de las células de muestras de sangre periférica de muestras de pacientes por el virus de Epstein Barr (EBV) que sirve como cultivos que crecen rápidamente y permanentes para estudios.

45 El deterioro mitocondrial se puede ensayar midiendo los niveles de ATP en un medio de galactosa sin glucosa que fuerza la generación de ATP a través de OXPHOS. Los resultados de este estudio se pueden comparar con los obtenidos en medio sin glucosa. Además, el grado de síntesis de ATP dirigida por el complejo I se puede seguir en significativamente disminuidos por cultivos de linfoblastos.

50 Ejemplo 7

Efectos de MIN-102 en ratones alimentados con dieta deficiente en metionina colina

55 Los efectos preventivos de MIN-102 se evaluaron en un modelo de ratón de EHNA de dieta deficiente en metionina y colina (MCD) (Verdelho Machado *et al.*) durante 7 semanas. Después del periodo de aclimatación, ratones macho C57BL6/J (n = 20) se pesaron y aleatorizaron en 2 grupos de tratamiento homogéneos basado en peso corporal (n = 10/grupo), puestos en una dieta MCD, y tratados BID por vía oral con vehículo o MIN-102 durante 7 semanas.

60 MIN-102 se dosificó a 62,5 mg/kg BID por vía oral por sonda.

Cuando los ratones C57BL6/J se alimentan una dieta MCD, rápidamente desarrollan esteatosis hepática, inflamación y fibrosis con aumento concomitante en los niveles en plasma de alanina transaminasa (ALT)/aspartato aminotransferasa (AST).

65

Materiales y métodos

Después del periodo de aclimatación, ratones macho C57BL6/J (n = 20) se pesaron y aleatorizaron en 2 grupos de tratamiento homogéneos basado en peso corporal (n = 10/grupo), puestos en una dieta NCD, y tratados BID por vía oral con vehículo o MIN-102 (125 mg/kg/día) durante 7 semanas. El peso corporal se midió 3 veces/semana hasta el final de la fase experimental.

A las 7 semanas de dieta/tratamiento, los ratones se pesaron y trataron a ~08:00 am por la mañana, después se sangraron (volumen máximo/EDTA) a ~1:00 pm. El plasma se aisló entonces inmediatamente y se almacenó a -80°C antes de ensayar ALT y AST en plasma. El volumen de plasma restante se almacenó a -80°C para análisis adicional eventual.

Después de la recogida de sangre, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical con anestesia de isoflurano y se desangraron con solución salina estéril.

Resultados

Como se esperaba, los ratones con dieta MCD mostraron pérdida de peso corporal sustancial. Los ratones tratados con MIN-102 mostraron una disminución menos grave en pérdida de peso corporal, desde el día 14 al día 50, produciendo diferencias significativas entre el día 30 y el día 50.

Como también se esperaba, la dieta MCD produjo niveles en plasma de ALT y AST muy altos (valores medios de 480 U/l y 455 U/l, respectivamente) al final del tratamiento. El tratamiento con MIN-102 sustancialmente redujo los niveles en plasma tanto de ALT como AST en el 78% y 55%, respectivamente (ambos $p < 0,01$ frente a vehículo).

Los ratones tratados con MIN-102 no mostraron un cambio en los niveles de colesterol hepático, pero mostraron una reducción drástica en los niveles de triglicéridos hepáticos en el 92% ($p < 0,001$ frente a vehículo).

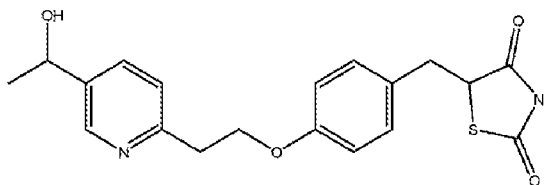
Se realizó un análisis histológico (tinción de rojo aceite O, H&E y sirius red) para el sistema de puntuación de EHGNA (NAS) para esteatosis hepática, inflamación, fibrosis e hinchamiento de hepatocitos.

Las puntuaciones del grupo NAS media fueron $3,40 \pm 0,3$ y $0,44 \pm 0,1$ en vehículo y MIN-102, respectivamente ($p < 0,001$ frente a vehículo). La fuerte reducción en la puntuación NAS estaba relacionada con la puntuación de esteatosis suavizada ($p < 0,001$ frente a vehículo), que se confirmó por un % de tinción de rojo aceite o extremadamente baja en comparación con el vehículo ($p < 0,001$), y una desaparición total de inflamación.

En conclusión, el presente estudio demuestra una fuerte reducción en esteatosis hepática e inflamación en ratones MCD tratados con MIN-102.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (1), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad mitocondrial



(1),

en donde dicha enfermedad mitocondrial es un trastorno mitocondrial primario seleccionado del grupo que consiste en síndrome de Rett y síndrome de Leigh.

2. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde la enfermedad mitocondrial el síndrome de Rett.
3. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde la enfermedad mitocondrial el síndrome de Leigh.
4. El compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el compuesto de fórmula (1) es:

compuesto (2): (R)-5-[[4-[2-[5-(R)-(1-hidroxi)etil]piridin-2-il]etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona;
 compuesto (3): (R)-5-[[4-[2-[5-(S)-(1-hidroxi)etil]piridin-2-il]etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona;
 compuesto (4): (S)-5-[[4-[2-[5-(R)-(1-hidroxi)etil]piridin-2-il]etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona; o
 compuesto (5): (S)-5-[[4-[2-[5-(S)-(1-hidroxi)etil]piridin-2-il]etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. El compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde no más del 1% del número total de átomos de hidrógeno por mol del compuesto de fórmula (1) están en forma del isótopo ^2H .
6. El compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el compuesto se administra a un niño o un adolescente a una dosis diaria de 0,1 mg a 200 mg o de 10 mg a 100 mg.
7. Una mezcla de dos o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en compuesto (2), compuesto (3), compuesto (4), y compuesto (5) como se define en la reivindicación 4, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o disfunción mitocondrial seleccionada del grupo que consiste en síndrome de Rett y síndrome de Leigh.

8. La mezcla según la reivindicación 7, en donde dicha mezcla comprende:

- (a) el compuesto (2) y el compuesto (3);
 (b) el compuesto (4) y el compuesto (5);
 (c) el compuesto (2) y el compuesto (4); o
 (d) el compuesto (3) y el compuesto (5),

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

9. Una mezcla de un compuesto (2), compuesto (3), compuesto (4), y compuesto (5) como se define en la reivindicación 4, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o disfunción mitocondrial seleccionada del grupo que consiste en síndrome de Rett y síndrome de Leigh, en donde la mezcla comprende cada compuesto en una cantidad del $25\% \pm 5\%$ p/p.
10. La mezcla para uso según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde la enfermedad o disfunción mitocondrial es síndrome de Rett.
11. La mezcla para uso según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde la enfermedad o disfunción mitocondrial es síndrome de Leigh.

Inhibición de MPC

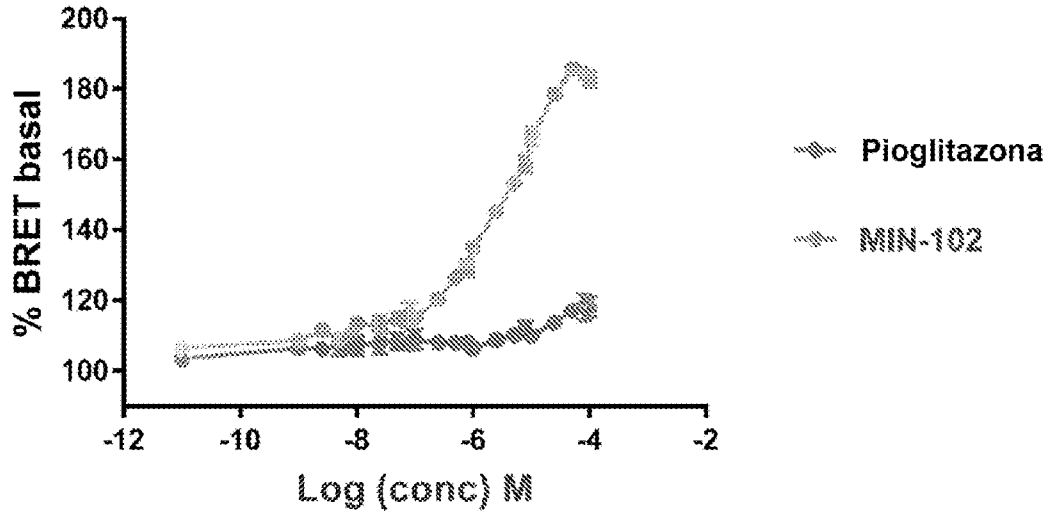


FIG. 1

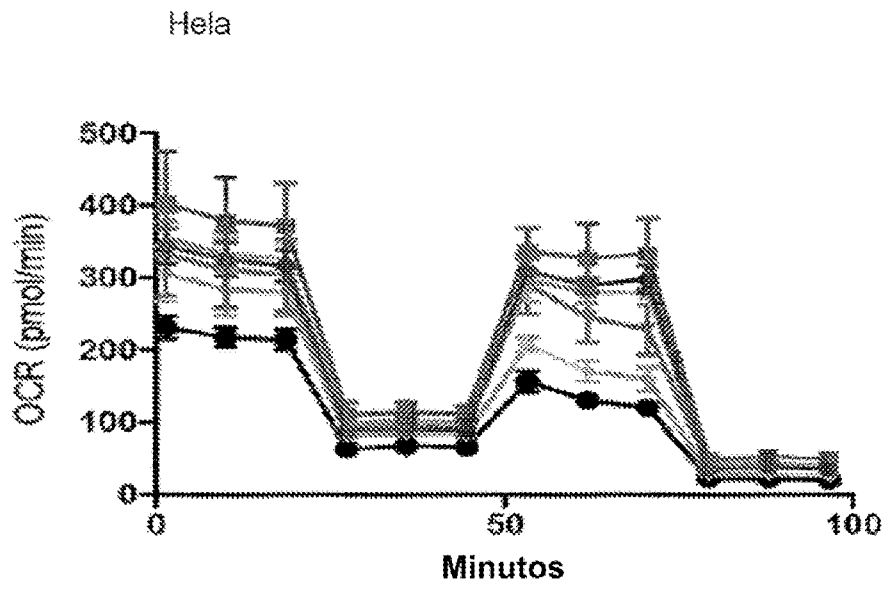


FIG. 2A

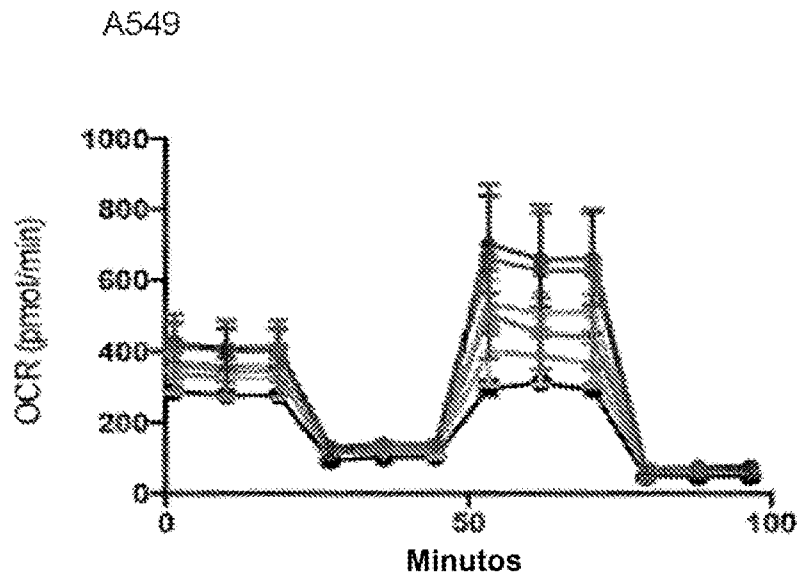


FIG. 2B

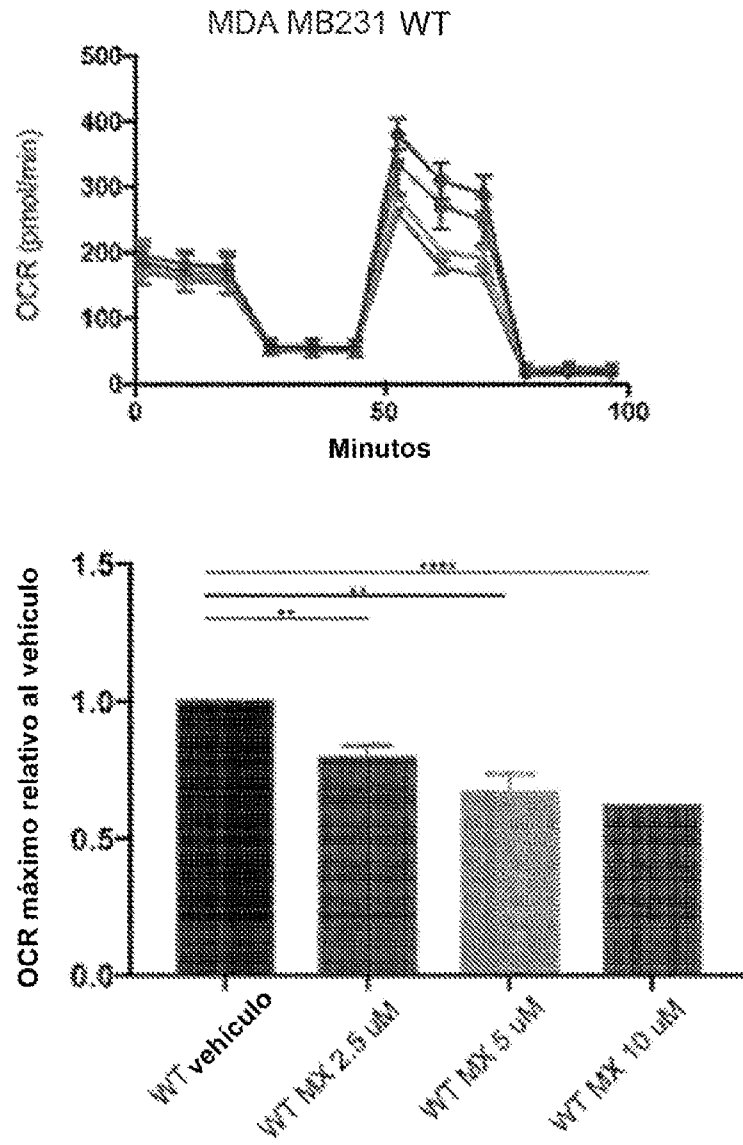


FIG. 3A

MDA MB231 KO

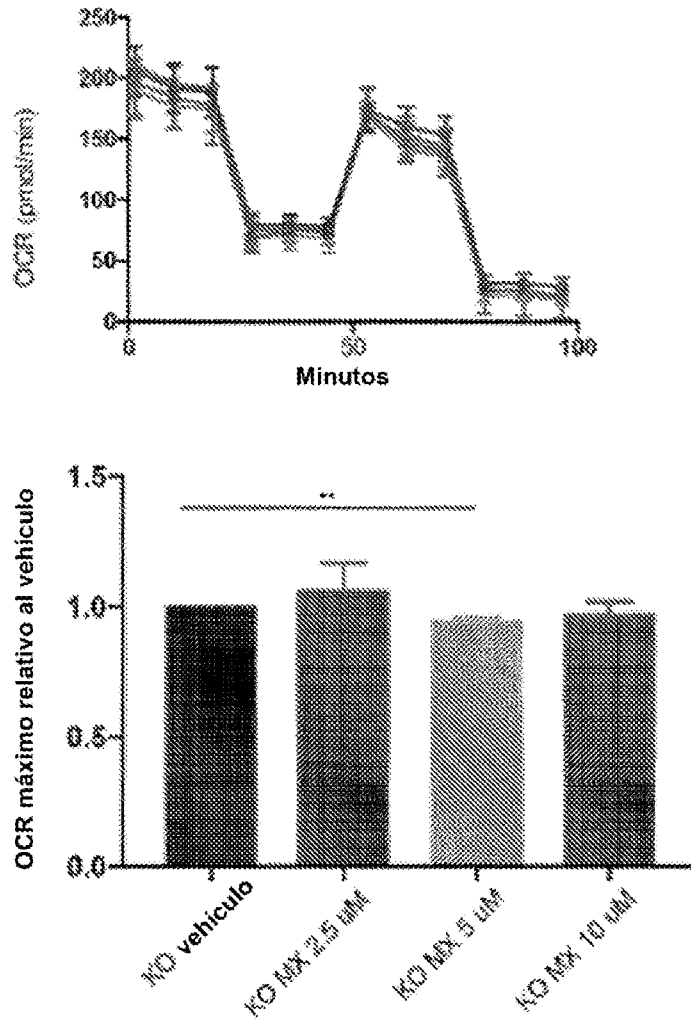


FIG. 3B

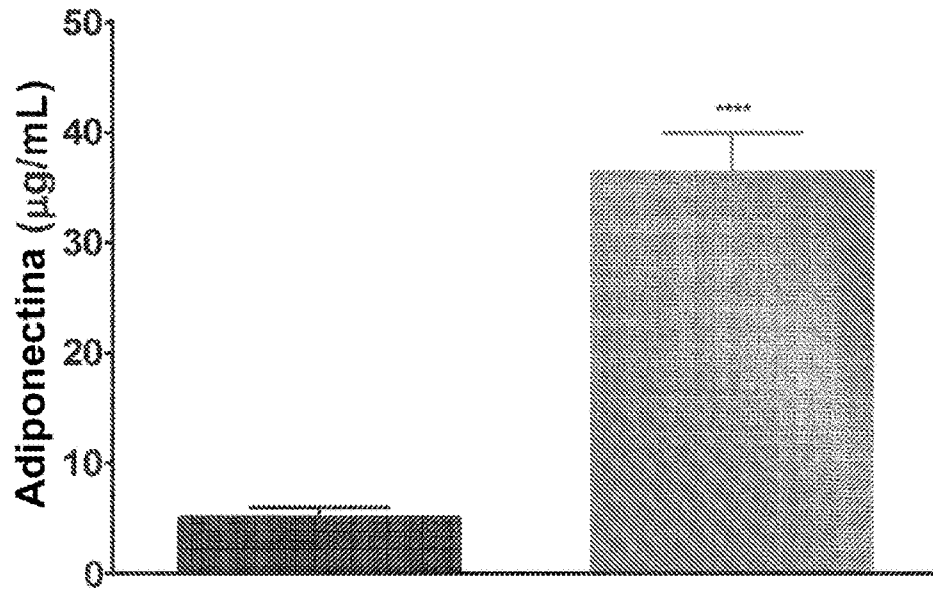


FIG. 4