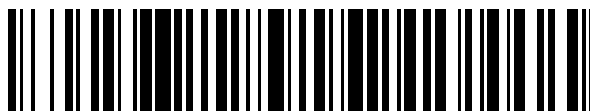


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 223**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4985 (2006.01)

C07D 498/04 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

A61P 9/04 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2013 PCT/US2013/046740**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013 WO13192388**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2013 E 13807833 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 2863910**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para regular la homeostasis de glucosa y la acción de insulina**

30 Prioridad:
20.06.2012 US 201261662268 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.09.2020

73 Titular/es:
**UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION
(100.0%)
250 West Main Street, Suite 300
Charlottesville, VA 22902, US**

72 Inventor/es:
**HOEHN, KYLE y
KENWOOD, BRANDON**

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 784 223 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 procedimientos para regular la homeostasis de glucosa y la acción de insulina

Antecedentes

5 La diabetes tipo 2 (T2D) es un trastorno metabólico crónico y progresivo caracterizado por hiperglucemia e hiperinsulinemia. La obesidad y la actividad física reducida son los principales contribuyentes a la resistencia a la insulina, la diabetes y las complicaciones relacionadas con la diabetes tales como enfermedades cardíacas e insuficiencia renal. Se estima que más de 300 millones de personas en todo el mundo y más del 8 % de los estadounidenses son prediabéticos con sobrepeso y resistentes a la insulina. Aunque el ejercicio y la restricción calórica son reversos muy efectivos de la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2, estas intervenciones tienen un cumplimiento deficiente del paciente. Los medicamentos actuales contra la diabetes encajan en muchas clases de agentes que aumentan la sensibilidad a la insulina, aumentan la secreción de insulina o reducen la ingesta/absorción de nutrientes. Estos medicamentos mejoran los síntomas de la diabetes tipo 2 y prolongan la vida útil del paciente; sin embargo, la mayoría de los pacientes diabéticos eventualmente sucumben a las complicaciones de su enfermedad. Los reveses recientes en la terapia para la diabetes incluyen las preocupaciones cardiovasculares con el medicamento contra la diabetes rosiglitazona (Avandia) y los avances mínimos informados en varios ensayos clínicos «mega» recientes (por ejemplo, ACCORD, NICE-SUGAR, ADVANCE y VADT). Como tal, se necesita una nueva intervención farmacológica en la diabetes.

20 En la década de 1930, el 2,4-dinitrofenol (DNP) del «desacoplador de protonóforo mitocondrial» (DNP) se prescribió ampliamente como un tratamiento contra la obesidad a decenas de miles de personas. El DNP imitó los efectos beneficiosos de la dieta y el ejercicio al agotar las reservas de nutrientes intracelulares y, al hacerlo, también tuvo efectos beneficiosos sobre el metabolismo de la glucosa. Los pacientes que consumen ~300 mg/d pierden constantemente un promedio de 1,5 libras por semana en el transcurso de varios meses sin cambios en la ingesta de alimentos. De manera similar, los ratones tratados con DNP demuestran niveles mejorados de glucosa, triglicéridos e insulina serológicos, así como disminución del daño oxidativo, reducción del peso corporal y mayor longevidad. El mecanismo de desacoplamiento mitocondrial es inherentemente un mecanismo antioxidante y, en consecuencia, los desacopladores mitocondriales como el DNP tienen efectos protectores sobre la lesión por reperfusión isquémica y otros trastornos relacionados con la producción de especies de oxígeno reactivo mitocondrial. Desafortunadamente, el DNP tiene efectos fuera del objetivo en otras membranas celulares que resultan en un índice terapéutico estrecho. El DNP fue retirado posteriormente del mercado de América del Norte por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos en 1938. Actualmente, no hay medicamentos desacopladores que sean lo suficientemente seguros para su uso en humanos.

35 Los desacopladores de protonóforos mitocondriales son moléculas pequeñas que transfieren protones a través de la membrana interna mitocondrial (MIM). Estas moléculas se denominan «desacopladores» porque permiten que los protones vuelvan a entrar en la matriz mitocondrial a través de una vía independiente de la ATP sintasa y, por lo tanto, desacoplan la oxidación de nutrientes de la producción de ATP. Los desacopladores farmacológicos, cuando se usan en concentraciones óptimas, mejoran la eficiencia de la cadena de transporte de electrones mitocondriales y disminuyen la producción de especies de oxígeno reactivo mitocondrial (ROS). La principal limitación de DNP y otros desacopladores de protonóforos es su actividad protonóforo no deseada en la membrana plasmática (MP). Esta actividad fuera del objetivo aumenta la acidificación intracelular, despolariza las células estimuladas eléctricamente y aumenta la demanda de energía necesaria para mantener el gradiente de iones celulares. Cuando estos efectos fuera del objetivo se combinan con una eficiencia reducida de la respiración mitocondrial, los efectos secundarios incluyen sobrecalentamiento y agotamiento de ATP. Esta historia clínica con sobredosis de DNP ha llevado a la idea errónea de que todos los desacopladores mitocondriales causarán estos efectos secundarios.

45 Las mitocondrias regulan el metabolismo celular y desempeñan un papel importante en la patogénesis de algunas de las enfermedades humanas más prevalentes incluyendo la obesidad, el cáncer, la diabetes, la neurodegeneración y las enfermedades cardíacas. Muchas de estas enfermedades pueden mejorarse mediante el uso de agentes farmacológicos como los transportadores de protones mitocondriales que disminuyen el daño oxidativo mitocondrial y aumentan el gasto de energía. El desacoplamiento genético y farmacológico tiene efectos beneficiosos sobre los trastornos que están relacionados con el estrés oxidativo mitocondrial, como la lesión por reperfusión isquémica, la enfermedad de Parkinson, la resistencia a la insulina, el envejecimiento y la insuficiencia cardíaca, y los trastornos que pueden beneficiarse del aumento del gasto energético, como la obesidad. El desarrollo de un desacoplador protonóforo mitocondrial selectivo que no afecta al potencial de la membrana plasmática ampliaría el margen de seguridad de los desacopladores mitocondriales y proporcionaría una esperanza renovada de que el desacoplamiento mitocondrial pueda ser el objetivo del tratamiento de la obesidad, la diabetes tipo II y otras enfermedades, trastornos, 55 y condiciones relacionadas con la función mitocondrial.

El documento WO 2007/005403A1 describe oxadiazolopirazinas y tiadiazolopirazinas 5,6-di-sustituidas y su uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por quimiocinas tales como la EPOC.

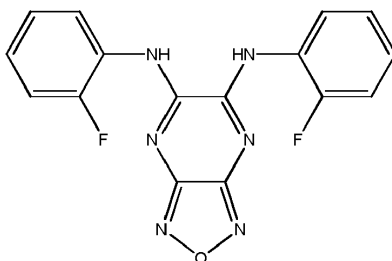
El documento WO 2005/044270A1 describe derivados de oxadiazolopirazina y su uso en enfermedades dependientes de proteínas quinasas.

Existe una larga necesidad en la técnica de composiciones y procedimientos útiles para tratar la diabetes, regular la homeostasis de la glucosa, reducir la adiposidad, proteger contra la lesión por reperfusión isquémica y regular la acción de la insulina mediante el uso de desacopladores mitocondriales, así como compuestos útiles como desacopladores mitocondriales. La presente solicitud satisface estas necesidades.

5 Resumen de la invención

En esta invención se describe el descubrimiento de que BAM15 es un desacoplador mitocondrial. BAM15 demuestra una potencia similar al desacoplador más potente conocido, el cianuro de carbonilo p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), pero no tiene actividad protonófora en la membrana plasmática. Como resultado, BAM15 causa menos acidificación intracelular, menos toxicidad mitocondrial, mejoras marcadas en la viabilidad celular y es eficaz en un intervalo de concentración mucho más amplio que FCCP. Estas propiedades sin precedentes se han buscado durante mucho tiempo y proporcionan un gran potencial para el tratamiento de trastornos relacionados con las mitocondrias, que incluyen, entre otros, obesidad, diabetes, resistencia a la insulina, enfermedad de Parkinson, envejecimiento, lesión cerebral traumática, lesión por reperfusión isquémica e insuficiencia cardíaca. Actualmente se describe que algunos compuestos conocidos, identificados por la exploración de la biblioteca, tienen las propiedades inesperadas de actuar como desacopladores mitocondriales y se describen además nuevos procedimientos para analizar estas propiedades, así como compuestos que son análogos y derivados de los compuestos con la actividad descrita en esta invención.

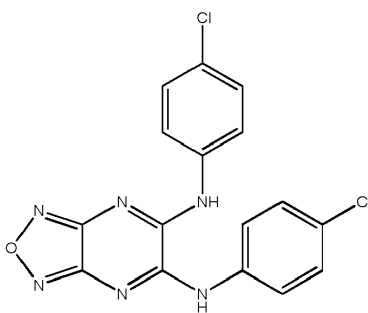
Según la invención, se proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección seleccionada del grupo que consiste en lesión por reperfusión isquémica, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, glucemia, tolerancia a la glucosa, sensibilidad a la insulina, adiposidad, resistencia a la insulina, obesidad, diabetes, neurodegeneración, lesión cerebral traumática, insuficiencia cardíaca, enfermedad de Parkinson; en el que dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



(2-fluorofenil){6-[(2-fluorofenil)amino](1,2,5-oxadiazolo[3,4-e]pirazin-5-il)}amina

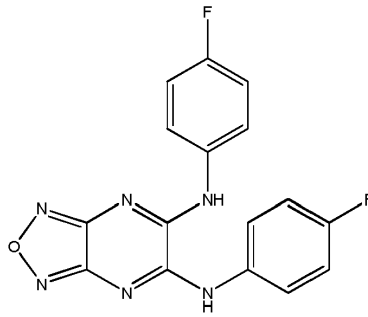
25

BAM15,



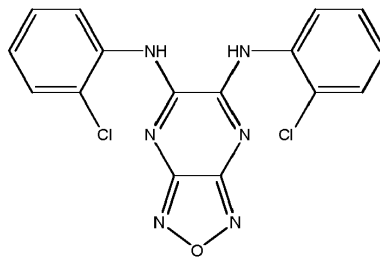
(4-clorofenil){6-[(4-clorofenil)amino](1,2,5-oxadiazolo[3,4-e]pirazin-5-il)}amina

BAM8,

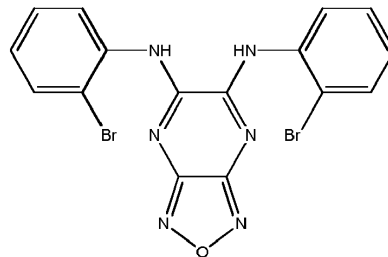


(4-fluorofenil){6-[(4-fluorofenil)amino](1,2,5-oxadiazolo[3,4-e]pirazin-5-il)}amina

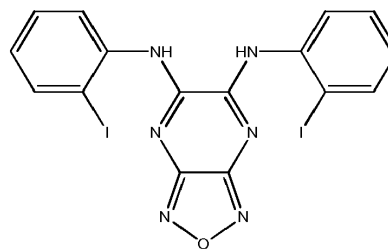
BAM9,



BAM15A,



BAM15B,



BAM15C.

5

y

10

15

20

En una realización, un compuesto para su uso en la invención es útil para tratar enfermedades, trastornos y afecciones que están asociadas con defectos en la función mitocondrial o que pueden tratarse con medicamentos o agentes que actúan como agentes de desacoplamiento.

En una realización, un compuesto para su uso en la invención puede estimular la tasa de consumo de oxígeno (OCR) cuando se inhibe la ATP sintasa. En una realización, un compuesto para su uso en la invención puede despolarizar la membrana interna mitocondrial. En una realización, un compuesto para su uso en la invención puede estimular la respiración en mitocondrias aisladas. En una realización, un compuesto para su uso en la invención puede aumentar el OCR sin donar electrones a la cadena de transporte de electrones. En un aspecto, el compuesto es BAM15. Como se describe en esta invención, BAM15 estimula la respiración mitocondrial en presencia del inhibidor de la ATP sintasa oligomicina en mioblastos de rata L6 y células hepáticas murinas normales NMuLi, tratamiento BAM15 de mitocondrias despolarizadas de mioblastos L6, como lo demuestra un desplazamiento hacia la izquierda en la fluorescencia del color potencial de la membrana mitocondrial catiónica TMRM, BAM15 estimuló la respiración en mitocondrias de hígado de ratón aisladas que respiraban piruvato y malato, o succinato en presencia del complejo inhibidor de rotenona I, y BAM15 no era un donante de electrones a la cadena de transporte de electrones según lo determinado mediante la realización de un ensayo de «flujo de electrones» en presencia de 5 μM de BAM15 o FCCP (control positivo). En

una realización, un compuesto para su uso en la invención es un agonista de gasto de energía. En un aspecto, un compuesto de la invención es un antioxidante.

Se describe en esta invención que BAM15 tiene propiedades superiores sobre otros desacopladores mitocondriales de protones porque actúa en las mitocondrias y carece de actividad de protones en la membrana plasmática. La selectividad de la membrana interna mitocondrial de estos medicamentos potenciales es importante porque el desacoplamiento reduce la fuerza motriz del protón y aumenta el flujo de electrones a través de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias para acelerar la respiración y mantener el potencial de membrana. BAM15 no está relacionado con los desacopladores conocidos y supera al desacoplador más potente conocido, FCCP, en los contextos de mejor viabilidad celular e intervalo terapéutico. Además, se describe en esta invención que BAM15 carece de actividad protonóforo de membrana plasmática.

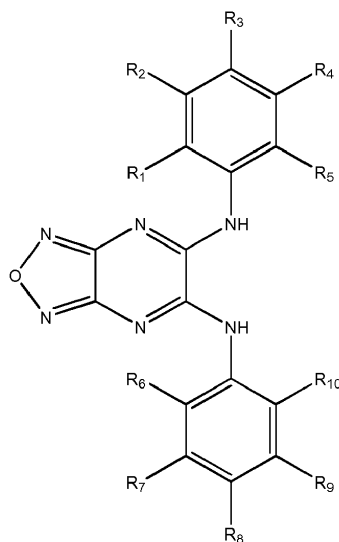
Muchos medicamentos contra la diabetes, como los sensibilizadores a la insulina, promueven la eliminación de glucosa de la sangre al «empujar» efectivamente la glucosa en los tejidos sobrecargados de nutrientes; sin embargo, en contraste con este enfoque, la estrategia de los inventores está dirigida a reducir las reservas de nutrientes celulares para que los tejidos «extraigan» la glucosa de la circulación. El procedimiento descrito en esta invención se basa en el ejercicio y las intervenciones de restricción calórica que también reducen las reservas de nutrientes celulares para mejorar la glucemia y la sensibilidad a la insulina. La prueba de principio está validada en humanos tratados con el desacoplador mitocondrial 2,4-dinitrofenol (DNP). DNP disminuye la adiposidad y mejora el metabolismo en humanos; sin embargo, también tiene una ventana terapéutica muy estrecha y se eliminó de la aprobación de la FDA en 1938. Otros medicamentos contra la diabetes, incluidos los agonistas de la hormona tiroidea y los inhibidores de la 11-β hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 1, tienen efectos fuera del objetivo de un mayor gasto de energía que puede mediar algunos de los efectos protectores de estos compuestos. Sin embargo, no hay medicamentos que se hayan dirigido específicamente para aumentar el gasto energético.

El compuesto BAM15 muestra prometedoros efectos de sensibilización a la insulina, anti-adiposidad y antioxidantes en células cultivadas y ratones. También se han probado otros compuestos mediante el uso de los procedimientos descritos en esta invención y, también, se describen en esta invención análogos y derivados de BAM15.

Los compuestos para su uso en la invención son BAM15, BAM8, BAM9, BAM15A, BAM15B y BAM15C. Algunos de estos compuestos son nuevos análogos de BAM15 y se describen en esta invención.

Un compuesto para su uso en la invención tiene al menos una de las siguientes propiedades o actividades: agonista de gasto de energía, desacoplador mitocondrial, antioxidante, aumenta el consumo de oxígeno, despolariza la membrana interna mitocondrial, estimula la respiración en mitocondrias aisladas, aumenta o estimula el consumo de oxígeno sin donar electrones a la cadena de transporte de electrones, carece de actividad protonóforo en la membrana plasmática, reduce el estrés oxidativo mitocondrial inducido por reperfusión y la fragmentación mitocondrial, reduce las especies reactivas de oxígeno celular, mejora la tolerancia a la glucosa, proporciona protección contra la alta tolerancia a la glucosa induce grasas, activa AMPK sin agotamiento de ATP, previene, revierte o trata la resistencia a la insulina, previene, revierte o trata la hiperinsulinemia, previene, revierte o trata la hiperlipidemia, mejora los perfiles de lípidos en la sangre, mejora la delgadez, mejora la sensibilidad a la insulina, protege contra las lesiones por reperfusión isquémica y es menos tóxico que otros inhibidores mitocondriales.

En esta invención se describen compuestos que tienen la fórmula general:

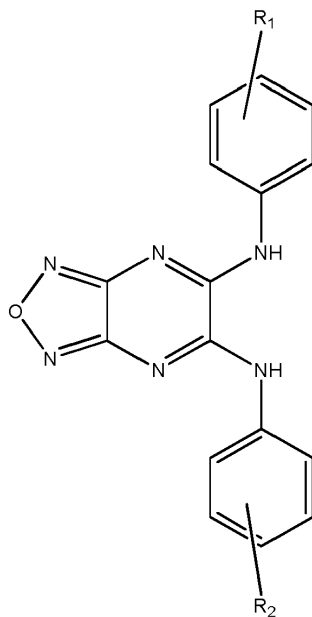


Fórmula I

así como análogos activos y derivados de los mismos.

Opcionalmente, R_1 - R_{10} son todos independientemente opcionales. Opcionalmente, cada uno de R_1 - R_{10} se selecciona independientemente del grupo que consiste en: H, halógeno, hidroxilo, acilo, alquilo, alquenoilo, alquínilo, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácidos y aminoácidos (cada grupo puede ser opcionalmente sustituido), o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable de los mismos. Opcionalmente, el halógeno es independientemente F, Cl, Br o I. En un aspecto, es F.

También se describe en esta invención un compuesto que tiene la fórmula general II:



Fórmula II

así como análogos activos y derivados de los mismos. Opcionalmente, R_1 - R_2 son independientemente opcionales. Opcionalmente, cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en: H, halógeno, hidroxilo, acilo, alquilo, alquenoilo, alquínilo, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxilo, cadena lateral de aminoácidos y aminoácidos (cada grupo puede ser opcionalmente sustituido), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Opcionalmente, el halógeno es independientemente F, Cl, Br o I. En un aspecto, es F.

Un experto en la materia apreciará que no todas las configuraciones necesitan ser efectivas o tan efectivas como otros compuestos del género.

Los expertos en la materia apreciarán que los compuestos para su uso en la invención que tienen un centro quiral pueden existir y aislarse en formas ópticamente activas y racémicas. Algunos compuestos pueden exhibir polimorfismo. Debe entenderse que la presente invención abarca cualquier forma racémica, ópticamente activa, polimórfica o estereoisomérica, o mezclas de las mismas, de un compuesto para su uso en la invención, que posee las propiedades útiles descritas en esta invención, siendo bien conocido en la técnica cómo preparar formas ópticamente activas (por ejemplo, mediante la resolución de la forma racémica mediante técnicas de recristalización, mediante síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos, mediante síntesis quiral o mediante separación cromatográfica con el uso de una fase estacionaria quiral) y cómo determinar la actividad del compuesto mediante el uso de las pruebas estándar descritas en esta invención, o mediante el uso de otras pruebas similares que son bien conocidas en la técnica.

También se describen en esta invención composiciones y procedimientos para prevenir o tratar una enfermedad, trastorno o afección, que comprenden la administración a un sujeto que lo necesita de una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, opcionalmente al menos un agente terapéutico adicional, y una cantidad efectiva de al menos un compuesto que tiene una estructura de Fórmula I o Fórmula II. La enfermedad, trastorno o afección puede seleccionarse del grupo que consiste en lesión por reperfusión isquémica, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, glucemia, tolerancia a la glucosa, sensibilidad a la insulina, adiposidad, resistencia a la insulina, obesidad, diabetes, cáncer, neurodegeneración, enfermedad cardíaca, enfermedad renal, insuficiencia cardíaca, enfermedad de Parkinson, traumatismo craneoencefálico, accidente cerebrovascular, envejecimiento y trastornos que se benefician del aumento del gasto energético. El compuesto puede ser un desacoplador mitocondrial. La diabetes

puede ser diabetes tipo II. La lesión por reperfusión isquémica puede ser lesión por reperfusión isquémica renal, lesión por reperfusión isquémica cardíaca o lesión por reperfusión isquémica cerebral. La lesión por reperfusión isquémica cerebral puede estar relacionada con un accidente cerebrovascular o una lesión cerebral traumática. Opcionalmente, el procedimiento descrito reduce el estrés oxidativo mitocondrial inducido por reperfusión y la fragmentación mitocondrial.

5

Los compuestos para su uso en la invención pueden administrarse a un sujeto en diversos momentos, dosis y más de una vez, dependiendo, por ejemplo, de la edad, el sexo, la salud y el peso del sujeto, así como de la enfermedad particular, trastorno o afección que se va a tratar o prevenir. Se puede administrar un compuesto a una dosis que varía de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. En otra opción, el compuesto se administra a una dosis que varía de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal. En otra opción más, el compuesto se administra a una dosis que varía de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 5,0 mg/kg de peso corporal. En una opción, se administran aproximadamente 3,0 mg/kg. En otra opción, se administran aproximadamente 5,0 mg/kg. En otra opción, el compuesto se administra como una dosis unitaria que varía de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 500 mg/dosis unitaria.

10

15

Un compuesto puede administrarse más de una vez. Opcionalmente, el compuesto es un desacoplador protonóforo mitocondrial que carece de actividad protonóforo en la membrana plasmática.

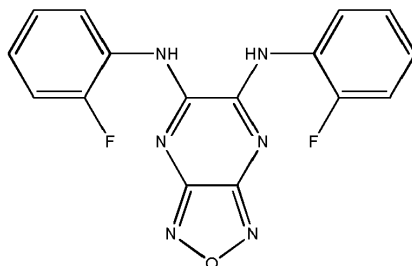
En los casos en que los compuestos son suficientemente básicos o ácidos para formar sales ácidas o básicas, el uso de los compuestos como sales puede ser apropiado. Ejemplos de sales aceptables son las sales de adición de ácido orgánico formadas con ácidos que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartarato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato y α -glicerofosfato. También se pueden formar sales inorgánicas adecuadas, que incluyen sales de hidrócloruro, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato.

20

Los procedimientos para preparar compuestos de una fórmula genérica descrita en esta invención, tales como las fórmulas I o II, o para preparar intermedios útiles para preparar compuestos de fórmula I u otros compuestos descritos en esta invención se describen en esta invención o son conocidos en la técnica. También se describen intermedios útiles para preparar compuestos de fórmula I u otras fórmulas.

25

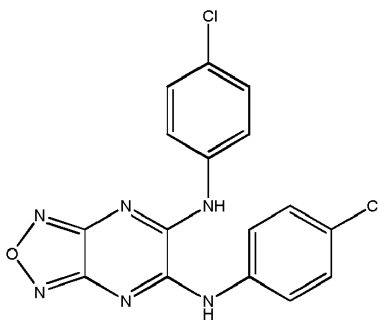
Los compuestos útiles para su uso en la invención incluyen:



(2-fluorofenil){6-[(2-fluorofenil)amino](1,2,5-oxadiazolo[3,4-e]pirazin-5-il)}amina

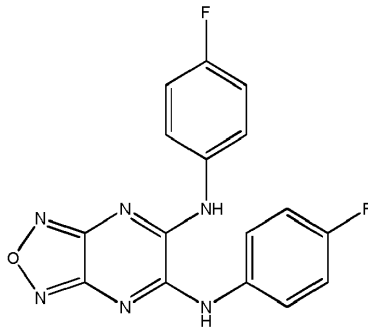
30

BAM15



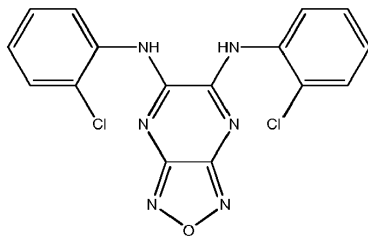
(4-clorofenil){6-[(4-clorofenil)amino](1,2,5-oxadiazolo[3,4-e]pirazin-5-il)}amina

BAM8

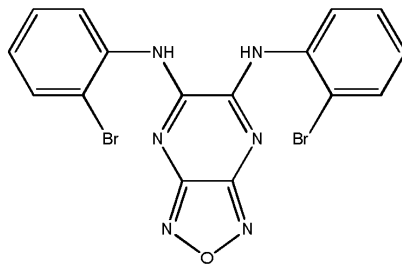


(4-fluorofenil) {6 - [(4-fluorofenil) amino] (1,2,5-oxadiazolo [3,4-e] pirazin-5-il)} amina

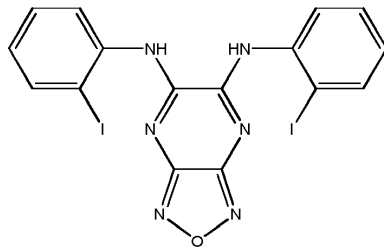
BAM9,



BAM15A,

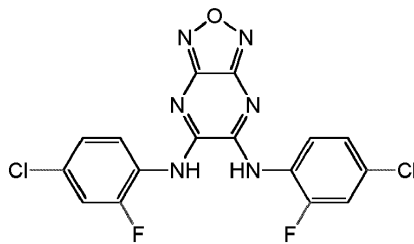


BAM15B,

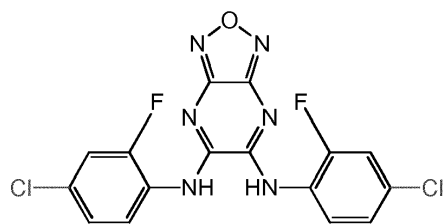


BAM15C.

También se describen los siguientes compuestos:

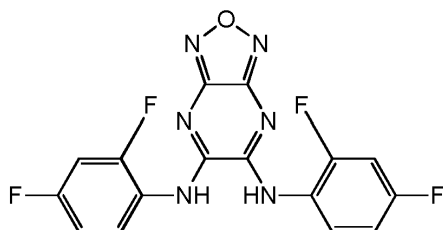


BAM15D,



BAM15E,

y



BAM15F.

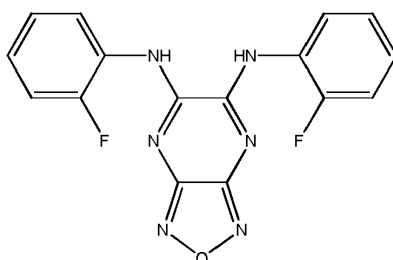
5 BAM15 se describe adicionalmente en el sitio web de la biblioteca nacional de medicina en la sección pubchem», donde se conoce como compuesto ID 565708. Las propiedades de BAM15 incluyen: peso molecular: 340,287006 [g/mol] y fórmula molecular: C₁₆H₁₀F₂N₆O. Sus nombres químicos son (2-fluorofenil) {6 - [(2-fluorofenil) amino] (1,2,5-oxadiazolo [3,4-e] pirazin-5-il)} amina y N5, N6- bis (2-fluorofenil) - [1,2,5] oxadiazolo [3,4-b] pirazina-5,6-diamina (su nombre IUPAC).

10 Un compuesto para su uso en la invención puede administrarse a una dosificación que varía de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Por ejemplo, el compuesto se administra a una dosis que varía de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal. En otro ejemplo, el compuesto se administra a una dosis que varía de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 5,0 mg/kg de peso corporal. En otro ejemplo, el compuesto se administra como una dosis unitaria que varía de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 500 mg. En un ejemplo, el compuesto se administra más de una vez. Un compuesto puede

15 administrarse por cualquier procedimiento adecuado.

En una realización, el compuesto es un desacoplador protonóforo mitocondrial que carece de actividad protonófora en la membrana plasmática.

En una realización, el compuesto es BAM15:



20 (2-fluorofenil){6-[(2-fluorofenil)amino]1,2,5-oxadiazolo[3,4-e]pirazin-5-il}amina

BAM15

En una realización, el compuesto aumenta el consumo de oxígeno.

En una realización, el compuesto reduce las especies de oxígeno reactivo celular.

En una realización, el compuesto despolariza la membrana interna mitocondrial.

25 En una realización, el compuesto aumenta la tasa de consumo de oxígeno sin donar directamente electrones a la cadena de transporte de electrones.

Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de al menos un compuesto de la invención puede administrarse a un sujeto.

En una realización, la administración de un compuesto de la invención mejora la tolerancia a la glucosa. En una

realización, BAM15 mejora la tolerancia a la glucosa. En una realización, la administración de un compuesto para su uso en la invención proporciona protección contra la intolerancia a la glucosa inducida por una dieta alta en grasas. En una realización, un compuesto para su uso en la invención es un agonista del gasto energético y aumenta el consumo de oxígeno sin producción de ROS y activa AMPK sin agotamiento de ATP.

5 En una realización, un compuesto para su uso en la invención aumenta el consumo de oxígeno celular.

En una realización, un compuesto para su uso en la invención invierte la resistencia a la insulina. En una realización, el compuesto revierte o trata la hiperinsulinemia. En una realización, el compuesto invierte o trata la hiperlipidemia. En una realización, un compuesto para su uso en la invención mejora la tolerancia a la glucosa. En una realización, un compuesto para su uso en la invención mejora la tolerancia a la glucosa en un sujeto con una dieta alta en grasas. En una realización, un compuesto para su uso en la invención es útil para aumentar el consumo de oxígeno celular. En una realización, un compuesto para su uso en la invención es útil como antidiabético.

10 En una realización, un compuesto para su uso en la invención es útil como antidiabético.

En una realización, la administración de un compuesto para su uso en la invención a un sujeto que lo necesite causará mejoras en los perfiles de lípidos en sangre, tolerancia a la glucosa, delgadez y sensibilidad a la insulina. En una realización, las mejoras en los perfiles de lípidos en sangre, la tolerancia a la glucosa, la delgadez y la sensibilidad a la insulina se producen sin hipofagia. En una realización, las mejoras en los perfiles de lípidos en sangre, la tolerancia a la glucosa, la delgadez y la sensibilidad a la insulina se producen sin hiperinsulinemia. En una realización, las mejoras en los perfiles de lípidos en sangre, la tolerancia a la glucosa, la delgadez y la sensibilidad a la insulina se producen sin hipofagia ni hiperinsulinemia. Por lo tanto, la invención abarca el uso de BAM15 y los otros compuestos mencionados en la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento y la prevención de la obesidad.

15 En una realización, la administración de un compuesto para su uso en la invención a un sujeto que lo necesite causará mejoras en los perfiles de lípidos en sangre, tolerancia a la glucosa, delgadez y sensibilidad a la insulina. En una realización, las mejoras en los perfiles de lípidos en sangre, la tolerancia a la glucosa, la delgadez y la sensibilidad a la insulina se producen sin hipofagia ni hiperinsulinemia. En una realización, las mejoras en los perfiles de lípidos en sangre, la tolerancia a la glucosa, la delgadez y la sensibilidad a la insulina se producen sin hipofagia ni hiperinsulinemia. Por lo tanto, la invención abarca el uso de BAM15 y los otros compuestos mencionados en la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento y la prevención de la obesidad.

20 Un compuesto de la invención puede ser útil para tratar la disfunción mitocondrial.

En una realización, un compuesto para su uso en la invención es útil para disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno y, a su vez, disminuye la lesión mediada por reperfusión isquémica en un tejido.

Un compuesto para su uso en la invención, tal como BAM15, tiene ciertas propiedades que se pueden analizar e identificar en otros compuestos mediante el uso de los procedimientos descritos en esta invención. Por ejemplo, un nuevo compuesto identificado tendrá las propiedades medibles requeridas de un desacoplador de protones de mitocondrias cuando se somete a una serie de ensayos bioquímicos como la capacidad de estimular OCR cuando se inhibe la ATP sintasa, despolarizar la membrana interna mitocondrial, estimular la respiración en mitocondrias aisladas y aumentar el OCR sin donar electrones a la cadena de transporte de electrones.

25 Un compuesto para su uso en la invención, tal como BAM15, tiene ciertas propiedades que se pueden analizar e identificar en otros compuestos mediante el uso de los procedimientos descritos en esta invención. Por ejemplo, un nuevo compuesto identificado tendrá las propiedades medibles requeridas de un desacoplador de protones de mitocondrias cuando se somete a una serie de ensayos bioquímicos como la capacidad de estimular OCR cuando se inhibe la ATP sintasa, despolarizar la membrana interna mitocondrial, estimular la respiración en mitocondrias aisladas y aumentar el OCR sin donar electrones a la cadena de transporte de electrones.

Un compuesto de la invención puede tener un peso molecular entre 205-370, HBA <5, HBD <3, 1-3 anillos y un LogS calculado de > 10-3.

30 Un compuesto de la invención puede tener un peso molecular entre 205-370, HBA <5, HBD <3, 1-3 anillos y un LogS calculado de > 10-3.

También se describen en esta invención composiciones y procedimientos para identificar compuestos que comprenden la actividad descrita en esta invención. El nuevo ensayo de detección se basa en los mecanismos de acción de la dieta y el ejercicio, incluida la composición de nutrientes celulares, la defensa antioxidante amplificada y la sensibilidad a la insulina. En un ejemplo, el ensayo se ejemplifica en el Ejemplo 1, Figura 1. En otro ejemplo, se ejemplifica en el ensayo ejemplificado en el Ejemplo 2, Figura 5. Por ejemplo, el Ejemplo 2, Figura 5 ilustra esquemáticamente un procedimiento para identificar nuevas moléculas de desacoplador mitocondrial con una amplia gama de oxígeno celular al realizar primero una respuesta a la dosis para la tasa de consumo de oxígeno en las células. A continuación, para validar la actividad de los protonóforos y la falta de actividad del donante de electrones en las mitocondrias, se realiza un ensayo de acoplamiento complejo en las mitocondrias aisladas. En ese punto, se realizan ensayos para demostrar que el compuesto de prueba no actúa en la membrana plasmática, que no causa acidificación celular, que no produce producción de especies reactivas de oxígeno y que no es citotóxico a dosis efectivas, utilizando ensayos que incluyen pinza de parche, ensayos de viabilidad, ensayo de pH y ensayos de ROS.

35 También se describen en esta invención composiciones y procedimientos para identificar compuestos que comprenden la actividad descrita en esta invención. El nuevo ensayo de detección se basa en los mecanismos de acción de la dieta y el ejercicio, incluida la composición de nutrientes celulares, la defensa antioxidante amplificada y la sensibilidad a la insulina. En un ejemplo, el ensayo se ejemplifica en el Ejemplo 1, Figura 1. En otro ejemplo, se ejemplifica en el ensayo ejemplificado en el Ejemplo 2, Figura 5. Por ejemplo, el Ejemplo 2, Figura 5 ilustra esquemáticamente un procedimiento para identificar nuevas moléculas de desacoplador mitocondrial con una amplia gama de oxígeno celular al realizar primero una respuesta a la dosis para la tasa de consumo de oxígeno en las células. A continuación, para validar la actividad de los protonóforos y la falta de actividad del donante de electrones en las mitocondrias, se realiza un ensayo de acoplamiento complejo en las mitocondrias aisladas. En ese punto, se realizan ensayos para demostrar que el compuesto de prueba no actúa en la membrana plasmática, que no causa acidificación celular, que no produce producción de especies reactivas de oxígeno y que no es citotóxico a dosis efectivas, utilizando ensayos que incluyen pinza de parche, ensayos de viabilidad, ensayo de pH y ensayos de ROS.

También se describen en esta invención composiciones y procedimientos para identificar compuestos con las propiedades requeridas en esta invención, así como para determinar si un compuesto es un desacoplador mitocondrial con baja toxicidad. Las etapas incluyen poner en contacto una célula con un desacoplador mitocondrial de prueba y medir el gasto de energía y cuando se detecta un aumento en el gasto de energía, el desacoplador mitocondrial de prueba se somete a un ensayo para medir especies reactivas de oxígeno. A continuación, cuando el desacoplador mitocondrial de prueba no aumenta el gasto de energía a través de la producción de especies reactivas de oxígeno, se prueba el desacoplador mitocondrial de prueba para determinar el índice de dosificación efectivo y, a continuación, se prueba el desacoplador mitocondrial de prueba para detectar efectos sensibilizadores de insulina midiendo la capacidad de revertir un modelo de resistencia a la insulina. Un resultado positivo para revertir un modelo de resistencia a la insulina es una indicación de que el compuesto es un desacoplador mitocondrial con baja toxicidad. En un ejemplo, el aumento del gasto de energía se mide usando un ensayo de consumo de oxígeno. En un ejemplo, el ensayo de consumo de oxígeno utilizado se realiza en presencia de un fluoróforo sensible al O₂. En un ejemplo, el consumo de oxígeno se mide usando un analizador de flujo extracelular. En un ejemplo, el compuesto aumenta el consumo de oxígeno en presencia de un inhibidor de la ATP sintasa. En un ejemplo, el compuesto carece de actividad protonóforo en la membrana plasmática.

45 También se describen en esta invención composiciones y procedimientos para identificar compuestos con las propiedades requeridas en esta invención, así como para determinar si un compuesto es un desacoplador mitocondrial con baja toxicidad. Las etapas incluyen poner en contacto una célula con un desacoplador mitocondrial de prueba y medir el gasto de energía y cuando se detecta un aumento en el gasto de energía, el desacoplador mitocondrial de prueba se somete a un ensayo para medir especies reactivas de oxígeno. A continuación, cuando el desacoplador mitocondrial de prueba no aumenta el gasto de energía a través de la producción de especies reactivas de oxígeno, se prueba el desacoplador mitocondrial de prueba para determinar el índice de dosificación efectivo y, a continuación, se prueba el desacoplador mitocondrial de prueba para detectar efectos sensibilizadores de insulina midiendo la capacidad de revertir un modelo de resistencia a la insulina. Un resultado positivo para revertir un modelo de resistencia a la insulina es una indicación de que el compuesto es un desacoplador mitocondrial con baja toxicidad. En un ejemplo, el aumento del gasto de energía se mide usando un ensayo de consumo de oxígeno. En un ejemplo, el ensayo de consumo de oxígeno utilizado se realiza en presencia de un fluoróforo sensible al O₂. En un ejemplo, el consumo de oxígeno se mide usando un analizador de flujo extracelular. En un ejemplo, el compuesto aumenta el consumo de oxígeno en presencia de un inhibidor de la ATP sintasa. En un ejemplo, el compuesto carece de actividad protonóforo en la membrana plasmática.

También se describe un procedimiento para aumentar el consumo de oxígeno, reducir las especies de oxígeno reactivo

celular, despolarizar una membrana interna mitocondrial y aumentar la tasa de consumo de oxígeno sin donar electrones a la cadena de transporte de electrones usando un desacoplador mitocondrial, que comprende poner en contacto una célula o mitocondrias con una composición que comprende al menos un compuesto que tiene una estructura de fórmula I o fórmula II como se describe en esta invención. En un ejemplo, el procedimiento aumenta la acidificación extracelular. En un ejemplo, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en BAM15, BAM8, BAM9, BAM15A, BAM15B, BAM15C, BAM15D, BAM15E, BAM15F, FCCP y 2,4-dinitrofenol, así como análogos biológicamente activos y derivados de los mismos. En un ejemplo, el compuesto carece de actividad protonóforo en la membrana celular. En un ejemplo, el compuesto es BAM15.

También se describen en esta invención kits para usar los compuestos y ensayos descritos en esta invención. En un ejemplo, se describe un kit para medir la respiración mitocondrial y la glucólisis. El kit puede incluir BAM15, opcionalmente FCCP u otros compuestos útiles en el ensayo como compuestos de control, otros reactivos útiles para medir mitocondrias y glucólisis, opcionalmente un analizador de flujo extracelular y un material de instrucción que describe el uso del kit. El kit se puede usar con un analizador de flujo extracelular y programas apropiados, etc. En un ejemplo, el kit proporciona la medición de la respiración mitocondrial. En un ejemplo, medir la respiración mitocondrial comprende medir la respiración basal, el recambio de ATP, la fuga de protones, la respiración máxima y la capacidad respiratoria de reserva. En un ejemplo, esto incluye medir uno o más de los siguientes: glucólisis, capacidad glucolítica y reserva glucolítica. En un ejemplo, se usa un analizador de flujo extracelular o se puede proporcionar con el kit.

Varios aspectos y realizaciones de la invención se describen con más detalle a continuación.

Breve descripción de los dibujos

Ejemplo 1

Figura 1. Diagrama de flujo. El aumento del consumo de oxígeno es un indicador importante del gasto energético. La biblioteca se analizó utilizando placas de biosensores de oxígeno BD biosciences y confirmó los resultados utilizando un analizador de flujo extracelular Seahorse XF24 para evaluar el consumo de oxígeno celular. A continuación, se seleccionaron los activos para la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esta pantalla secundaria tiene 2 propósitos; para descartar compuestos que aumentan el consumo de oxígeno a través de la producción de ROS e identificar compuestos que son antioxidantes. Finalmente, los efectos sensibilizadores a la insulina de los compuestos de impacto se determinan mediante la prueba de su capacidad para revertir múltiples modelos de resistencia a la insulina, incluida la hiperinsulinemia y la hiperlipidemia.

Figura 2. Los compuestos activos aumentan el consumo de oxígeno celular. Los compuestos activos mostraron una amplia gama de fenotipos. Los mioblastos L6 se trataron con una respuesta a la dosis de cada activo y se usó FCCP, un desacoplador mitocondrial, como control positivo. Dos de nuestros compuestos (bam 8 y bam 15) fueron más potentes que fccp (línea roja). Una característica de los desacopladores mitocondriales es que exhiben una curva de efectividad invertida en forma de campana: aumentan el consumo de oxígeno hasta una dosis que inhibe la función mitocondrial. Esto se observa con los compuestos fccp y bam 8. Los otros compuestos no exhibieron la toxicidad mitocondrial característica de los desacopladores farmacológicos y varias moléculas tienen una ventana terapéutica en varios órdenes de magnitud. Los datos mostrados son promedios de 3 pocillos.

Figura 3. Pantalla secundaria de compuesto activo para la producción de ROS. Las células L6 se cargaron con CM-DCFDA 10 μ M, un colorante sensible a ROS, durante 1 hora antes de lavarlas y tratarlas con 10 μ M de cada compuesto durante 1 hora. Se utilizaron DMSO y peróxido de hidrógeno 100 nM como controles negativos y positivos. Los datos mostrados son un promedio de tres experimentos.

Figura 4. Activación de AMPK y niveles de ATP celular después del tratamiento con compuestos activos. Las células L6 se trataron con cada compuesto activo (10 μ M) y se midió la fosforilación de AMPK mediante transferencia Western (panel superior). La oligomicina, un inhibidor de la ATP sintasa, se utilizó como control positivo. BAM7 no estaba disponible para la compra por parte del proveedor. BAM16 a BAM-25 no fueron probados. 14-3-3 fue borrado como un control de carga de limpieza. Los niveles de ATP celular se midieron después del experimento de consumo de oxígeno Seahorse XF24 que se muestra en la Fig. 2 (> una hora con un compuesto activo de 10 μ M).

Ejemplo 2

Ejemplo 2, Figura 1. BAM15 actúa sobre las mitocondrias aisladas y no es un donante de electrones para el ETC. Este experimento de «acoplamiento complejo» comienza con mitocondrias aisladas que respiran sobre piruvato y malato en presencia de FCCP o BAM15 (5 μ M) en el tiempo 0. Después de 10 minutos, se agrega rotenona 2 μ M para inhibir el complejo ETC I. La rotenona disminuye el consumo de oxígeno en mitocondrias tratadas con FCCP o BAM15, lo que indica que ni FCCP ni BAM15 donan electrones al ETC más abajo del complejo I. A continuación, se añadió succinato a los 20 minutos para estimular la respiración del complejo II. Ni FCCP ni BAM15 afectan al aumento de la respiración, lo que indica que no afectan al complejo II. A los 25 minutos, las mitocondrias se trataron con antimicina A (AntA) 4 μ M para inhibir el complejo III y bloquear la respiración mediada por succinato. Estos datos demuestran que ninguno de los compuestos dona electrones del succinato al citocromo c o al complejo IV. Finalmente, a los 31 minutos, se añadió el sistema donador de electrones de ascorbato/TMPD para alimentar electrones al complejo IV. En resumen, estos datos indican que BAM15 aumenta la respiración en las mitocondrias aisladas a través

de un mecanismo que no implica la donación de electrones al ETC.

Ejemplo 2, Figura 2. BAM15 causa menos acidificación intracelular que FCCP. Cambio de pH intracelular después de 5 minutos de tratamiento con FCCP o BAM15 a las dosis indicadas (n = 3 para todas las figuras).

5 **Ejemplo 2, Figura 3. BAM15 es menos citotóxico que FCCP.** BAM15 y FCCP se administraron a cardiomiocitos cultivados, células L6 y células NMuLi durante 48 h en las concentraciones indicadas. En todas las líneas celulares, la viabilidad se mejoró notablemente en células BAM15 (cardiomiocitos mostrados en células A y L6 y células NMuLi mostradas en B, n = 3). (C) BAM15 o FCCP se administraron a las células L6 en las concentraciones indicadas (en μM) durante 40 minutos antes del análisis de la fosforilación de la proteína quinasa activada por AMP (n = 2). (D) Los niveles de ATP celular se midieron 20 minutos después del tratamiento con FCCP o BAM15 (20 μM , n = 2).

10 **Ejemplo 2, Figura 4. El tratamiento con BAM15 mejora la tolerancia a la glucosa y la delgadez en ratones alimentados con una dieta alta en grasas.** (Izquierda) A las 8 semanas de edad, los ratones C57BL/6 fueron alimentados con una dieta alta en grasas durante 6 semanas antes del tratamiento diario con BAM15 (3 mg/kg ip) durante 5 días antes de un desafío de glucosa en bolo de 2 g/kg. Los ratones de control se inyectaron diariamente con un volumen igual de control de soporte (PEG400/5 % DMSO, azul) n = 4. (Derecha) Después de 8 días de tratamiento, se sacrificaron los ratones y se pesaron los tejidos. Los ratones que recibieron BAM15 tenían menos masa de tejido adiposo gonadal que los controles del vehículo. n = 4.

Ejemplo 2, Figura 5. Diagrama de flujo de las pantallas utilizadas para identificar nuevos desacopladores mitocondriales.

Ejemplo 3

20 **Ejemplo 3, Figura 1: BAM15 es un desacoplador protonóforo mitocondrial con un amplio intervalo efectivo.** (A) Ilustración de la fuerza motriz de protones que genera ATP y el desacoplamiento de la oxidación de nutrientes de la producción de ATP. (B) BAM15 es un novedoso desacoplador químico sin similitud estructural con otros desacopladores conocidos, incluido el FCCP. (C) Tasa de consumo de oxígeno (OCR) en células L6 tratadas con BAM15 o FCCP en las concentraciones indicadas. (D) Las células L6 se trataron secuencialmente con oligomicina (Oligo, 1 μM), BAM15 o FCCP (Desacoplador, 1 μM) y antimicina A (10 μM) más rotenona (1 μM) (A/R) según lo indicado por las flechas. (E) Las células L6 cargadas con TMRM se trataron con BAM15 10 μM durante 30 minutos antes del análisis de FACS en el canal de ficoeritrina (PE). Las células tratadas con BAM15 se desplazan a la izquierda, lo que indica la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. (F) Se trataron secuencialmente mitocondrias de hígado de ratón aisladas que respiraban piruvato y malato en presencia de FCCP (5 μM) o BAM15 (5 μM) con rotenona (4 μM), succinato (10 mM), antimicina A (4 μM), y los donantes de electrones TMPD (100 μM) y ascorbato (10 mM). * indica p < 0,05 por ANOVA de dos vías con la prueba posterior de Bonferroni. Para (C) N = 6-8 pocillos por condición de tres experimentos separados, (D) N = 5 pocillos por condición durante un experimento, (E) N = un representante de tres experimentos separados, (F) N = 3 pocillos por condición de un representante de tres experimentos separados.

35 **Ejemplo 3, Figura 2. BAM15 no altera la electrofisiología de la membrana plasmática.** (A) Registro representativo de pinza de tensión de célula completa de una célula L6 que muestra la corriente de retención (a -70 mV) durante el tratamiento de 1 μM de FCCP y BAM15. (B) Pinza de tensión con 10 μM de FCCP y BAM15. (C-D) Se generaron 10 corrientes con una rampa de tensión de -150 mV a +80 mV usando desacopladores 1 μM en (C) y desacopladores 10 μM en (D). (E) Datos promedio que comparan el cambio en la corriente de mantenimiento causado por FCCP y BAM15 a 1 μM y 10 μM . (F) Datos promedio que comparan el cambio en la conductancia generada por cualquiera de los medicamentos en el intervalo de -130 mV a -60 mV. (G) Registro de pinza de corriente de célula completa representativa a concentraciones de 10 μM para FCCP y BAM15. (H) Datos promedio que comparan el cambio en el potencial de membrana de ambos medicamentos. Para (E), (F) y (H), * indica p < 0,05 por ANOVA de dos vías con la prueba posterior de Bonferroni, n = 7-9 células por condición.

45 **Ejemplo 3, Figura 3. BAM15 es menos citotóxico que FCCP.** (A) Las células L6 y NMuLi se trataron con concentraciones crecientes de BAM15 o FCCP durante 48 horas y se tiñeron con cristal violeta. (B) Las células L6 y NMuLi se trataron con FCCP o BAM15 durante 48 horas y se observaron con microscopía de fase. (C) Los valores IC_{50} de las células C2C12, NRVC, L6 y NMuLi se calcularon mediante el ensayo MTT o la tinción con cristal violeta.

50 **Ejemplo 3, Figura 4: BAM15 protege contra la lesión de reperfusión isquémica renal.** Se trataron ratones machos (8 semanas de edad, C57BL/6) con control de vehículo (VC) o BAM15 a 1 o 5 mg/kg durante 1 hora antes de la isquemia bilateral durante 26 minutos seguido de 48 horas de reperfusión. Los ratones operados de forma simulada se sometieron a un procedimiento quirúrgico similar, pero los pedículos renales no se sujetaron. (A) BAM15 protegido de forma dependiente de la dosis de niveles elevados de creatinina en plasma a las 24 y 48 horas después de la reperfusión. (B-C) El tratamiento previo con BAM15 disminuyó la necrosis tubular proximal aguda según lo determinado por análisis histológico de la médula renal 48 horas después de la reperfusión. Las flechas indican necrosis tubular. * indica p < 0,05 en comparación con el control del vehículo por ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Dunnett.

55 **Ejemplo 3, Figura S1. Optimización de la densidad celular y control positivo de FCCP.** Se sembraron L6 en una microplaca BD-OBS de 96 pocillos. La intensidad de la señal fluorescente BD-OBS se registró durante 50-60 min (1

lectura/min). (A) Se sembraron L6 a densidades que varían de 0 a 1 millón de células por pocillo y se analizaron inmediatamente los aumentos de fluorescencia con el tiempo. (B) Células L6 (5×10^5 células/pocillo en 100 μ L) se trataron con FCCP como control positivo para identificar la concentración óptima para la detección. (C) Ejemplo del resultado activo para 5 μ g/mL BAM15 mediante el uso de 5×10^5 L6 células/pocillo y 10 μ M de FCCP como control positivo.

Ejemplo 3, Figura S2. Los 25 primeros activos se seleccionaron para detectar concentraciones intracelulares de ROS en mioblastos L6. Las células fueron incubadas con CM-H₂DCFDA, un indicador fluorescente de ROS antes de ser tratado con 5 μ g/mL del compuesto de la biblioteca utilizado para la detección. ROS se expresa en términos de porcentaje de fluorescencia del control del vehículo (DMSO, blanco). Los compuestos que aumentaron ROS sobre el fondo fueron eliminados (línea roja discontinua). N = 3.

Ejemplo 3, Figura S3. BAM15 tiene un amplio intervalo efectivo en múltiples tipos de células. La tasa de consumo de oxígeno se midió en mioblastos L6 (A), cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal (B), Mioblastos C2C12 (C), y hepatocitos NMuLi (D) tratados con una respuesta a la dosis de BAM15 o FCCP a las concentraciones indicadas. Los gráficos de la derecha se amplían a partir de las dosis de 0-1 μ M descritas en el cuadro punteado del gráfico a la izquierda. * indica $p < 0,05$ por ANOVA de dos vías con la prueba posterior de Bonferroni. N = 6-8 pocillos por condición de tres experimentos separados.

Ejemplo 3, Figura S4. BAM15 aumenta la acidificación extracelular. Las tasas de acidificación extracelular se midieron en mioblastos L6 (A), cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal (B), Mioblastos C2C12 (C), y hepatocitos NMuLi (D) tratados con una respuesta a la dosis de BAM15 versus FCCP como se indica. Las barras de error indican SEM. * indica $p < 0,05$ por ANOVA de dos vías con la prueba posterior de Bonferroni. N = 6-8 pocillos por condición de tres experimentos separados.

Ejemplo 3, Figura S5. BAM15 aumenta el consumo de oxígeno en presencia del inhibidor de la ATP sintasa oligomicina. La tasa de consumo de oxígeno (OCR) se midió en células L6 y NMuLi después del tratamiento secuencial de oligomicina 1 μ M, FCCP o BAM15 (desacoplador) a 2 μ M (A) o 10 μ M (B) y antimicina A (10 μ M) con rotenona (1 μ M) (A/R). * indica $p < 0,05$ por ANOVA de dos vías con la prueba posterior de Bonferroni. N = 3 pocillos/grupo. Las barras de error indican SEM.

Ejemplo 3, Figura S6. Contenido de monocitos renales que incluye A) leucocitos y B) macrófagos C) neutrófilos D) células dendríticas. * indica $p < 0,05$ por ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Dunnett. N = 3-6.

Ejemplo 4

Ejemplo 4, Figura 1. Análisis farmacocinético de una dosis oral de 5 mg/kg de BAM15 en ratones.

Descripción detallada

Abreviaciones y acrónimos

7-AAD- 7-Aminoactinomicina D

AMPK- proteína quinasa activada por AMP

AntA- antimicina A

Ar- arilo

BAM15- también conocido como ST056388, (2-fluorofenil) {6 - [(2-fluorofenil) amino] (1,2,5-oxadiazolo [3,4-e] pirazin-5-il)} amina, y N5, N6-bis (2-fluorofenil) - [1,2,5] oxadiazolo [3,4-b] pirazina-5,6-diamina

DNP- 2,4-dinitrofenol

ECAR- tasa de acidificación extracelular

ETC- cadena de transporte de electrones

FCCP- cianuro de carbonilo p-trifluorometoxifenilhidrazona

GTT- prueba de tolerancia a la glucosa

HBA- aceptor de enlace de hidrógeno

HBD- donante de enlace de hidrógeno

HFD- dieta alta en grasas

HPβCD-hidroxiopropil β-ciclodextrina

OCR- tasa de consumo de oxígeno

PK- farmacocinética

MP- membrana plasmática

5 ROS- especies reactivas de oxígeno

SAR- relación de actividad de estructura

SILAC- etiquetado de isótopos estables de aminoácidos en cultivo celular

T2D- diabetes tipo 2 (también conocida como diabetes tipo II)

TCA- ciclo del ácido tricarbóxico

10 TMPD- N, N, N', N'-Tetrametil-p-fenilendiamina

UCP: proteína de desacoplamiento

Definiciones

15 Al describir y reivindicar la invención, se utilizará la siguiente terminología según las definiciones establecidas a continuación. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan en esta invención tienen el entendimiento común por parte de un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en esta invención puede ser útil en la práctica o prueba de la presente invención, los procedimientos y materiales preferidos se describen a continuación. La terminología específica de particular importancia para la descripción de la presente invención se define a continuación.

20 Los artículos «una» y «uno/a» se usan en esta invención para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, «un elemento» significa un elemento o más de un elemento.

25 El término «aproximadamente sobre», como se usa en esta invención, significa aproximadamente, en la región de, prácticamente, o alrededor. Cuando el término «aproximadamente sobre» se usa junto con un intervalo numérico, modifica ese intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos establecidos. Por ejemplo, en un aspecto, el término «aproximadamente sobre» se usa en esta invención para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor establecido en una variación del 20 %.

30 Los términos «compuesto activo terapéuticamente adicional» o «agente terapéutico adicional», como se usan en el contexto de la presente invención, se refieren al uso o administración de un compuesto para un uso terapéutico adicional para una lesión, enfermedad o trastorno particular que se está tratando. Tal compuesto, por ejemplo, podría incluir uno que se usa para tratar una enfermedad o trastorno no relacionado, o una enfermedad o trastorno que puede no responder al tratamiento primario para la lesión, enfermedad o trastorno que se está tratando.

Tal como se usa en esta invención, los términos «administración de» y «administrar» un compuesto deben entenderse como que significan proporcionar un compuesto de la invención o un profármaco de un compuesto de la invención a un sujeto que necesita tratamiento.

35 Como se usa en esta invención, un «agonista» es una composición de materia que, cuando se administra a un mamífero tal como un ser humano, mejora o extiende una actividad biológica atribuible al nivel o presencia de un compuesto o molécula diana de interés en el sujeto.

Como se usa en esta invención, «aliviar un síntoma de enfermedad o trastorno» significa reducir la gravedad del síntoma o la frecuencia con la que un sujeto experimenta dicho síntoma, o ambos.

40 Como se usa en esta invención, un «análogo» o «analógico» de un compuesto químico es un compuesto que, a modo de ejemplo, se asemeja a otro en estructura pero no es necesariamente un isómero (por ejemplo, el 5-fluorouracilo es un análogo de timina).

Un «antagonista» es una composición de materia que cuando se administra a un mamífero tal como un ser humano, inhibe una actividad biológica atribuible al nivel o presencia de un compuesto o molécula de interés en el sujeto.

45 El término «agentes antimicrobianos», como se usa en esta invención, se refiere a cualquier compuesto o composición o mezcla de los mismos de origen natural, sintético o semisintético, que es seguro para el uso humano o animal como se practica en los procedimientos descritos en esta invención, y es eficaz para matar o inhibir sustancialmente el crecimiento de microbios. Antimicrobiano» como se usa en esta invención, incluye agentes antibacterianos, antifúngicos y antivirales.

- Un «compuesto», como se usa en esta invención, se refiere a cualquier tipo de sustancia o agente que comúnmente se considera un medicamento, o un candidato para su uso como medicamento, así como combinaciones y mezclas de los anteriores. Cuando se hace referencia a un compuesto de la invención, y a menos que se especifique lo contrario, el término «compuesto» pretende abarcar no solo la entidad molecular especificada sino también sus análogos farmacológicamente aceptables, farmacológicamente activos, que incluyen, pero no se limitan a, sales, polimorfos, ésteres, amidas, profármacos, aductos, conjugados, metabolitos activos y similares, donde tales modificaciones a la entidad molecular son apropiadas.
- El término «vehículo de entrega» se refiere a cualquier tipo de dispositivo o material que puede usarse para administrar compuestos *in vivo* o puede agregarse a una composición que comprende compuestos administrados a una planta o animal. Esto incluye, entre otros, dispositivos implantables, agregados de células, materiales de matriz, geles, etc.
- Como se usa en esta invención, un «derivado» de un compuesto se refiere a un compuesto químico que puede producirse a partir de otro compuesto de estructura similar en una o más etapas, como en sustitución de h por un grupo alquilo, acilo o amino.
- Como se usa en esta invención, una «cantidad efectiva» o «cantidad terapéuticamente efectiva» significa una cantidad suficiente para producir un efecto seleccionado, tal como aliviar los síntomas de una enfermedad o trastorno. En el contexto de la administración de compuestos en forma de una combinación, como múltiples compuestos, la cantidad de cada compuesto, cuando se administra en combinación con otro(s) compuesto(s), puede ser diferente de cuando ese compuesto se administra solo. Por lo tanto, una cantidad efectiva de una combinación de compuestos se refiere colectivamente a la combinación como un todo, aunque las cantidades reales de cada compuesto pueden variar. El término «más eficaz» significa que el efecto seleccionado se alivia en mayor medida por un tratamiento en relación con el segundo tratamiento con el que se está comparando.
- Como se usa en la descripción y en las reivindicaciones adjuntas, los términos «por ejemplo», «tal como», «incluidos» y similares, están destinados a introducir ejemplos que aclaran aún más el tema general. A menos que se especifique lo contrario, estos ejemplos se proporcionan solo como una ayuda para comprender la invención, y no pretenden ser limitantes de ninguna manera.
- Los términos «fórmula» y «estructura» se usan indistintamente en esta invención.
- Como se usa en esta invención, una molécula «funcional» es una molécula en una forma en la que exhibe una propiedad o actividad por la cual se caracteriza. Una enzima funcional, por ejemplo, es aquella que exhibe la actividad catalítica característica por la cual se caracteriza la enzima.
- Como se usa en esta invención, «homología» se usa como sinónimo de «identidad».
- El término «inhibir», como se usa en esta invención, se refiere a la capacidad de un compuesto de la invención para reducir o impedir una función descrita, tal como tener actividad inhibitoria del canal de sodio. Preferentemente, la inhibición es al menos del 10 %, más preferentemente al menos del 25 %, incluso más preferentemente al menos del 50 %, y lo más preferentemente, la función se inhibe al menos un 75 %. Los términos «inhibir», «reducir» y «bloquear» se usan indistintamente en esta invención.
- Como se usa en esta invención, «inyectar o aplicar» incluye la administración de un compuesto de la invención por cualquier número de rutas y medios que incluyen, pero no se limitan a, tópico, oral, bucal, intravenoso, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmico, medios subcutáneos, intraperitoneales, intranasales, enterales, tópicos, sublinguales, vaginales, oftálmicos, pulmonares o rectales.
- Como se usa en esta invención, un «material de instrucción» incluye una publicación, un registro, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que pueda usarse para comunicar la utilidad del péptido de la invención en el kit para efectuar el alivio de las diversas enfermedades o trastornos mencionados en esta invención. Opcionalmente, o alternativamente, el material de instrucción puede describir uno o más procedimientos para aliviar las enfermedades o trastornos en una célula o un tejido de un mamífero. El material de instrucción del kit de la invención puede, por ejemplo, fijarse a un contenedor que contiene la invención del compuesto identificado o enviarse junto con un contenedor que contiene el compuesto identificado. Alternativamente, el material de instrucción se puede enviar por separado del contenedor con la intención de que el material de instrucción y el compuesto sean utilizados de manera cooperativa por el receptor.
- El término «medir el nivel de expresión» o «determinar el nivel de expresión» como se usa en esta invención se refiere a cualquier medida o ensayo que pueda usarse para correlacionar los resultados del ensayo con el nivel de expresión de un gen o proteína de interés. Tales ensayos incluyen la medición del nivel de ARNm, niveles de proteínas, etc. y pueden realizarse mediante ensayos tales como análisis de transferencia Northern y Western, ensayos de unión, inmunotransferencias, etc. El nivel de expresión puede incluir tasas de expresión y puede medirse en términos de la cantidad real de un ARNm o proteína presente. Tales ensayos se combinan con procesos o sistemas para almacenar y procesar información y para ayudar a cuantificar niveles, señales, etc. y para digitalizar la información para su uso en la comparación de niveles.

El término «desacoplamiento mitocondrial», también conocido como «desacoplamiento», se refiere al proceso mediante el cual los protones entran en la matriz mitocondrial a través de una vía independiente de la ATP sintasa y, por lo tanto, desacoplan la oxidación de nutrientes de la producción de ATP. Este proceso puede ser inducido farmacológicamente por protonóforos mitocondriales de molécula pequeña, que transportan directamente protones a través de la membrana interna mitocondrial hacia la matriz. La vía principal para la producción de energía en las células aeróbicas implica la oxidación de nutrientes (incluidas grasas, carbohidratos y aminoácidos) en las mitocondrias, lo que promueve el flujo de salida de protones de la matriz mitocondrial. Este proceso crea un gradiente electroquímico y de pH a través de la membrana interna mitocondrial. Los protones normalmente vuelven a entrar en la matriz mitocondrial a través de la ATP sintasa, lo que resulta en la producción de ATP. Los protones también pueden volver a entrar en la matriz mitocondrial a través de vías independientes de la ATP sintasa, que «desacopla» la oxidación de nutrientes y el flujo de protones de la producción de ATP.

El término «modular», como se usa en esta invención, se refiere a cambiar el nivel de una actividad, función o proceso. El término «modular» abarca tanto la inhibición como la estimulación de una actividad, función o proceso.

El término «por aplicación», como se usa en esta invención, se refiere a la administración de una composición, medicamento o compuesto a un sujeto.

Como se usa en esta invención, el término «soporte farmacéuticamente aceptable» incluye cualquiera de los soportes farmacéuticos estándar, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite, y varios tipos de agentes humectantes. El término también abarca cualquiera de los agentes aprobados por una agencia reguladora del gobierno federal de EE.UU. o enumerados en la Farmacopea de EE.UU. para su uso en animales, incluidos los humanos.

El término «prevenir», como se usa en esta invención, significa evitar que algo suceda o tomar medidas anticipadas contra algo posible o probable. En el contexto de la medicina, «prevención» se refiere generalmente a las medidas tomadas para disminuir la posibilidad de contraer una enfermedad o afección.

Un tratamiento «preventivo» o «profiláctico» es un tratamiento administrado a un sujeto que no muestra signos, o exhibe solo signos tempranos, de una enfermedad o trastorno. Se administra un tratamiento profiláctico o preventivo con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar patología asociada con el desarrollo de la enfermedad o trastorno.

Un «profármaco» se refiere a un agente que se convierte en el medicamento base *in vivo*. Los profármacos a menudo son útiles porque, en algunas situaciones, pueden ser más fáciles de administrar que el medicamento base. Pueden, por ejemplo, estar biodisponibles por administración oral mientras que el medicamento base no lo está. El profármaco también puede tener una solubilidad mejorada en composiciones farmacéuticas sobre el medicamento base, o puede demostrar una mayor palatabilidad o ser más fácil de formular.

Como se usa en esta invención, el término «purificado» y términos similares se refieren a un enriquecimiento de una molécula o compuesto en relación con otros componentes normalmente asociados con la molécula o compuesto en un entorno nativo. El término «purificado» no indica necesariamente que se haya logrado la pureza completa de la molécula particular durante el proceso. Un compuesto «altamente purificado» como se usa en esta invención se refiere a un compuesto que tiene una pureza mayor del 90 %.

El término «regular» se refiere a estimular o inhibir una función o actividad de interés.

Una «muestra», como se usa en esta invención, se refiere preferentemente a una muestra biológica de un sujeto o materiales de ensayo, que incluyen, pero no se limitan a, muestras de tejido normal, muestras de tejido enfermo, biopsias, sangre, saliva, heces, semen, lágrimas, extractos de células y orina. Una muestra también puede ser cualquier otra fuente de material obtenida de un sujeto que contenga células, tejidos o fluidos de interés. También se puede obtener una muestra del cultivo de células o tejidos.

El término «estándar», como se usa en esta invención, se refiere a algo usado para comparación. Por ejemplo, puede ser un agente o compuesto estándar conocido que se administra y se usa para comparar resultados al administrar un compuesto de prueba, o puede ser un parámetro o función estándar que se mide para obtener un valor de control al medir el efecto de un agente o compuesto en un parámetro o función. El estándar también puede referirse a un «estándar interno», como un agente o compuesto que se agrega en cantidades conocidas a una muestra y es útil para determinar cosas tales como tasas de purificación o recuperación cuando una muestra se procesa o se somete a procedimientos de purificación o extracción antes de medir un marcador de interés. Los patrones internos son a menudo un marcador de interés purificado que se ha etiquetado, tal como con un isótopo radiactivo, lo que permite distinguirlo de un marcador endógeno.

Un «sujeto» de análisis, diagnóstico o tratamiento es un animal. Tales animales incluyen mamíferos, preferentemente un ser humano.

Como se usa en esta invención, un «sujeto que lo necesita» es un paciente, animal, mamífero o humano, que se beneficiará del procedimiento descrito en esta invención.

El término «síntoma», como se usa en esta invención, se refiere a cualquier fenómeno mórbido o desviación de lo normal en estructura, función o sensación, experimentado por el paciente e indicativo de enfermedad. En contraste, un signo» es evidencia objetiva de enfermedad. Por ejemplo, una nariz ensangrentada es un signo. Es evidente para el paciente, el médico, la enfermera y otros observadores.

5 Como se usa en esta invención, el término «tratar» incluye la profilaxis del trastorno o afección específica, o el alivio de los síntomas asociados con un trastorno o afección específica y/o la prevención o eliminación de dichos síntomas. Un tratamiento «profiláctico» es un tratamiento administrado a un sujeto que no muestra signos de una enfermedad o exhibe solo signos tempranos de la enfermedad con el propósito de disminuir el riesgo de desarrollar una patología asociada con la enfermedad.

10 Un tratamiento «terapéutico» es un tratamiento administrado a un sujeto que exhibe signos de patología con el propósito de disminuir o eliminar esos signos.

Una «cantidad terapéuticamente efectiva» de un compuesto es la cantidad de compuesto que es suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al sujeto al que se administra el compuesto.

15 Como se usa en esta invención, el término «tratar» incluye la profilaxis de la enfermedad, trastorno o afección específica, o el alivio de los síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o afección específica y/o la prevención o eliminación de dichos síntomas.

Como se usa en esta invención, el término «herida» se refiere a un desgarro físico, rotura o ruptura de un tejido o capa celular. Una herida puede ocurrir por cualquier agresión física, incluido un procedimiento quirúrgico o como resultado de una enfermedad o trastorno.

20 **Definiciones químicas**

Como se usa en esta invención, el término «halógeno» o «halo» incluye bromo, cloro, flúor y yodo.

El término «haloalquilo», como se usa en esta invención, se refiere a un radical alquilo que lleva al menos un sustituyente halógeno, por ejemplo, clorometilo, fluoroetilo o trifluorometilo y similares.

25 El término «alquilo o C₁-C₁₀ alquilo», como se usa en esta invención, representa un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de uno a seis átomos de carbono. Típicamente los grupos alquilo C₁-C₁₀ incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo y similares.

30 El término «alqueno o C₂-C₁₀ alqueno», como se usa en esta invención, representa un grupo ramificado o lineal olefínicamente insaturado que tiene de 2 a 10 átomos de carbono y al menos un doble enlace. Los ejemplos de tales grupos incluyen, pero sin limitación, 1-propeno, 2-propeno, 1,3-butadieno, 1-butenilo, hexeno, penteno y similares.

El término «alquino o C₂-C₁₀ alquino» se refiere a un grupo ramificado o lineal insaturado que tiene de 2 a 10 átomos de carbono y al menos un triple enlace. Ejemplos de tales grupos incluyen, pero no se limitan a, 1-propino, 2-propino, 1-butino, 2-butino, 1-pentino y similares.

35 El término «C₃-C₈ cicloalquilo» representa ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo y similares.

Como se usa en esta invención, el término «opcionalmente sustituido» se refiere de cero a cuatro sustituyentes, en los que los sustituyentes se seleccionan cada uno independientemente. Cada uno de los sustituyentes seleccionados independientemente puede ser igual o diferente a otros sustituyentes.

40 Como se usa en esta invención, el término «arilo» se refiere a un sistema de anillo carbocíclico mono o bicíclico C₅-C₁₀ que tiene uno o dos anillos aromáticos que incluyen, pero no se limitan a, fenilo, bencilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, indenilo y similares.

Como se usa en esta invención, «arilo opcionalmente sustituido» incluye compuestos de arilo que tienen de cero a cuatro sustituyentes, y un arilo sustituido incluye compuestos de arilo que tienen de uno a tres sustituyentes, en los que los sustituyentes incluyen grupos tales como, por ejemplo, sustituyentes alquilo, halo o amino.

45 El término «arilalquilo» se refiere a cualquier grupo arilo que está unido al resto parental a través del grupo alquilo, p. ej., arilo(alquilo C₁-C₉). Por lo tanto, el término (arilo C₅-C₈)(alquilo C₅-C₈) se refiere a un anillo aromático de cinco o seis miembros que está unido al resto original a través del grupo alquilo C₅-C₈.

50 El término «grupo heterocíclico» se refiere a un sistema de anillo carbocíclico mono o bicíclico opcionalmente sustituido que contiene de uno a tres heteroátomos en el que los heteroátomos se seleccionan del grupo que consiste en oxígeno, azufre y nitrógeno.

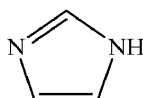
Como se usa en esta invención, el término «heteroarilo» se refiere a un sistema de anillo carbocíclico mono- o bicíclico

opcionalmente sustituido que tiene uno o dos anillos aromáticos que contienen de uno a tres heteroátomos e incluye, pero no se limita a, furilo, tienilo, piridilo y similares.

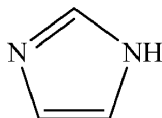
5 El término «bicíclico» representa un anillo de carbono bicíclico puenteado o fusionado estable de 7 a 12 miembros, ya sea insaturado o saturado. El anillo bicíclico puede estar unido a cualquier átomo de carbono que proporcione una estructura estable. El término incluye, pero no se limita a, naftilo, dicitlohexilo, dicitlohexenilo y similares.

Los compuestos para su uso en la presente invención pueden contener uno o más centros asimétricos en la molécula. Según la presente invención, cualquier estructura que no designe la estereoquímica debe entenderse como que abarca todos los diversos isómeros ópticos, así como sus mezclas racémicas.

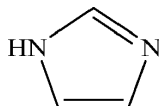
10 Los compuestos para uso en la presente invención pueden existir en formas tautoméricas y la invención incluye tanto mezclas como tautómeros individuales separados. Por ejemplo, la siguiente estructura:



Se entiende que representa una mezcla de las estructuras:



así como



15 Los términos hidrocarburo 16:0, 18:0, 18:1, 20:4 ó 22:6 se refieren a un grupo alquilo o alquenilo lineal o ramificado, en el que el primer número entero representa el número total de carbonos en el grupo y el segundo número entero representa el número de dobles enlaces en el grupo.

Realizaciones

20 Las mitocondrias regulan el metabolismo celular y desempeñan un papel importante en la patogénesis de algunas de las enfermedades humanas más prevalentes que incluyen la obesidad, el cáncer, la diabetes, la neurodegeneración y las enfermedades cardíacas. Los compuestos para su uso en la invención, incluido BAM15, son útiles para tratar y prevenir estas enfermedades y trastornos y otros descritos en esta invención, así como otros en los que es útil un desacoplador mitocondrial.

25 BAM15 es de dominio público. Se denomina arbitrariamente BAM15 en esta invención. Su nombre IUPAC es 5-N,6-N-bis (2-fluorofenil)-[1,2,5]oxadiazolo[3,4-b]pirazina-5,6-diamina, es el número de compuesto ST056388 de Timtec. La biblioteca de la que proviene es Timtec ApexScreen 5040.

30 Muchos medicamentos contra la diabetes tales como los sensibilizadores a la insulina, promueven la eliminación de glucosa de la sangre al «empujar» efectivamente la glucosa en los tejidos sobrecargados de nutrientes; sin embargo, en contraste con este enfoque, nuestra estrategia está dirigida a reducir las reservas de nutrientes celulares para que los tejidos «extraigan» la glucosa de la circulación. El procedimiento descrito se basa en el ejercicio y las intervenciones de restricción calórica que también reducen las reservas de nutrientes celulares para mejorar la glucemia y la sensibilidad a la insulina. La prueba de principio está validada en humanos tratados con el desacoplador mitocondrial 2,4-dinitrofenol (DNP). DNP disminuye la adiposidad y mejora el metabolismo en humanos; sin embargo, también tiene una ventana terapéutica muy estrecha y se eliminó de la aprobación de la FDA en 1938. Otros medicamentos contra la diabetes, incluidos los agonistas de la hormona tiroidea y los inhibidores de la 11-β hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 1, tienen efectos fuera del objetivo de un mayor gasto de energía que puede mediar en algunos de los efectos protectores de estos compuestos. Sin embargo, no hay medicamentos que se hayan dirigido específicamente para aumentar el gasto energético.

40 El compuesto BAM15 muestra efectos prometedores de sensibilización a la insulina en células y ratones cultivados.

45 Uno de los primeros defectos observados en la diabetes tipo 2 es la reducción de la sensibilidad a la insulina o la resistencia a la insulina, por lo que restaurar este proceso es un objetivo principal de muchas estrategias terapéuticas. Las intervenciones no farmacológicas del ejercicio y la restricción calórica son reversos muy efectivos de la T2D; sin embargo, requieren un cumplimiento estricto y vigoroso del protocolo y reciben un cumplimiento deficiente del paciente. Como tal, la intervención farmacológica en la diabetes es necesaria. La mayoría, si no todos, los

medicamentos actuales contra la diabetes se identificaron en función de sus propiedades reductoras de la glucosa en sangre; sin embargo, un problema con esta estrategia es que no considera las consecuencias de la sobrecarga de glucosa en los tejidos periféricos. En un esfuerzo por desarrollar nuevas estrategias para la intervención en la diabetes, hemos desarrollado una nueva pantalla de medicamentos que se basa en los mecanismos de acción de la dieta y el ejercicio; incluyendo consumo de nutrientes celulares, defensa antioxidante amplificada y sensibilidad a la insulina.

Los compuestos útiles para su uso en la invención incluyen, pero no se limitan a, BAM15, BAM8 y BAM9.

En los casos en que los compuestos para su uso en la invención son suficientemente básicos o ácidos para formar sales ácidas o básicas, el uso de los compuestos como sales puede ser apropiado. Ejemplos de sales aceptables son las sales de adición de ácido orgánico formadas con ácidos que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartarato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato y α -glicerofosfato. También se pueden formar sales inorgánicas adecuadas, que incluyen sales de hidrocloreuro, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato.

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables pueden prepararse a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos. Las sales derivadas de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Las sales derivadas de ácidos orgánicos incluyen ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-tolueno-sulfónico, ácido salicílico y similares.

Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables pueden prepararse a partir de bases inorgánicas y orgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen, solo a modo de ejemplo, sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, entre otras, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, tales como alquilaminas, dialquilaminas, trialquilaminas, alquilaminas sustituidas, di(alquil sustituidas) aminas, tri(alquil sustituidas) aminas, alquenilaminas, dialquenilaminas, trialquenilaminas, alquenilaminas sustituidas, di(alquenil sustituidas) aminas, tri(alquenil sustituidas) aminas, cicloalquil aminas, di(cicloalquil) aminas, tri(cicloalquil) aminas, cicloalquil aminas sustituidas, cicloalquil amina disustituidas, cicloalquil aminas trisustituidas, cicloalquenil aminas, di(cicloalquenil) aminas, tri(cicloalquenil) aminas, cicloalquenilaminas sustituidas, cicloalquenilaminas disustituidas, cicloalquenilaminas, aril aminas, diaril aminas, heteroaril aminas, diheteroaril aminas, triheteroaril aminas, aminas heterocíclicas, aminas diheterocíclicas, aminas triheterocíclicas, di- y tri-aminas mixtas donde al menos dos de los sustituyentes en la amina son diferentes ahora y se seleccionan del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, heteroarilo, heterocíclico y similares. También se incluyen las aminas donde los dos o tres sustituyentes, junto con el amino nitrógeno, forman un grupo heterocíclico o heteroarilo. Los ejemplos de aminas adecuadas incluyen, a modo de ejemplo solamente, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, tri(iso-propil) amina, tri(n-propil) amina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, trometamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, N-alquilglucaminas, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, morfolina, N-etilpiperidina y similares. También debe entenderse que otros derivados de ácido carboxílico serían útiles en la práctica de esta invención, por ejemplo, amidas de ácido carboxílico, que incluyen carboxamidas, alquil carboxamidas inferiores, dialquil carboxamidas y similares.

Las sales aceptables se pueden obtener usando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico tal como una amina con un ácido adecuado que proporciona un anión fisiológicamente aceptable. También se puede realizar sales de metales alcalinos (*por ejemplo*, sodio, potasio o litio) o metales alcalinotérreos (*por ejemplo*, calcio) de ácidos orgánicos (*por ejemplo*, carboxílicos).

Uno o más compuestos para su uso en la invención pueden administrarse a un sujeto que lo necesite, que incluye, pero no se limita a, un diabético de Tipo II. Por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de al menos un compuesto de la invención se administra al sujeto.

Las composiciones para su uso en la presente invención comprenden, como agente activo, compuestos que tienen la estructura de cualquiera de las fórmulas descritas en la reivindicación 1 en una forma farmacéuticamente aceptable. Si se desea, las composiciones pueden comprender además uno o más agentes activos adicionales. Cuando sea apropiado, cualquiera de los agentes activos puede administrarse en forma del compuesto per se, y/o en forma de una sal, polimorfo, éster, amida, derivado o similar, siempre que la sal, el polimorfo, éster, amida o derivado sea farmacológicamente adecuado. Cuando sea apropiado, se pueden preparar sales, ésteres, amidas y otros derivados de los agentes activos mediante el uso de procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica de la química orgánica sintética y descritos, por ejemplo, por J. March, Química orgánica avanzada: reacciones, mecanismos y estructura, 4^a ed. (Nueva York: Wiley-Interscience, 1992). Para cualquier agente activo que pueda existir en formas enantioméricas, el agente activo puede incorporarse a las presentes composiciones como racemato o en forma enriquecida enantioméricamente.

Los valores proporcionados en esta invención para radicales, sustituyentes e intervalos, son solo ilustrativos; no excluyen otros valores definidos u otros valores dentro de intervalos definidos para los radicales y sustituyentes. Los compuestos descritos incluyen compuestos de las Fórmulas específicas citadas en esta invención que tienen cualquier

combinación de los valores ejemplares, valores preferidos y valores más preferidos descritos en esta invención.

En un ejemplo, al menos uno de los compuestos para su uso en la invención es para administración al menos una vez al día. En una opción, un compuesto es para administración más de una vez. En una opción, es para administración al menos dos veces al día. En otra opción, es para administración al menos una vez a la semana. En otra opción, es para la administración al menos una vez al mes.

5

También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos para su uso en la invención. La composición farmacéutica puede comprender uno o más compuestos de la invención, y análogos biológicamente activos, homólogos, derivados, modificaciones y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y un soporte farmacéuticamente aceptable. Los compuestos pueden administrarse como una composición farmacéutica.

10 La ruta de administración puede variar dependiendo del tipo de compuesto que se administra. En un ejemplo, los compuestos son para administración por vía oral, tópica, rectal, intramuscular, intramucosa, intranasal, inhalación, oftálmica e intravenosa.

Se puede proporcionar un compuesto para su uso en la invención como una formulación de liberación controlada.

15 También se describe un procedimiento que involucra al menos tres compuestos, en el que al menos tres de los compuestos son topiramato, ondansetrón y naltrexona.

Se describen composiciones y procedimientos para tratar enfermedades y trastornos relacionados con el alcohol mediante el uso de composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades eficaces de topiramato, ondansetrón y naltrexona.

20 La dosificación del (de los) compuesto(s) activo(s) que se administra(n) dependerá de la afección que se va a tratar, el compuesto particular y otros factores clínicos como la edad, el sexo, el peso y la salud del sujeto que se va a tratar, la vía de administración del (de los) compuesto(s), y el tipo de composición que se administra (comprimido, cápsula de gel, cápsula, solución, suspensión, inhalador, aerosol, elixir, pastilla, inyección, parche, pomada, crema, etc.). Debe entenderse que la presente invención tiene aplicación tanto para uso humano como veterinario.

25 Los procesos para preparar compuestos para su uso en la invención se ilustran mediante los siguientes procedimientos en los que los significados de los radicales genéricos son como se dieron anteriormente, a menos que se califique lo contrario.

30 En los casos en que los compuestos son suficientemente básicos o ácidos para formar sales o bases no tóxicas estables, la administración de los compuestos como sales puede ser apropiada. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son las sales de adición de ácido orgánico formadas con ácidos que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartarato, succinato, benzoato, ascorbato, -ketoglutarato y -glicerofosfato. También se pueden formar sales inorgánicas adecuadas, que incluyen sales de hidrocioruro, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato.

35 Las sales farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse usando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico tal como una amina con un ácido adecuado que proporciona un anión fisiológicamente aceptable. También se pueden preparar sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio) de ácidos carboxílicos.

40 Los compuestos para su uso en la invención pueden formularse como composiciones farmacéuticas y administrarse a un huésped mamífero, tal como un paciente humano en una variedad de formas adaptadas a la ruta de administración elegida, es decir, oral o parenteralmente, por vía intravenosa, intramuscular, tópica o rutas subcutáneas.

Se apreciará que los compuestos para su uso en la invención pueden administrarse usando diversos tipos de sistemas y medios de suministro. Además, los compuestos para su uso en la invención pueden administrarse en combinación con otros agentes y compuestos terapéuticos y pueden usarse con otros tipos de tratamientos.

45 En un ejemplo, los compuestos pueden administrarse sistémicamente, por ejemplo, por vía oral, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. Pueden estar encerrados en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, pueden comprimirse en comprimidos o pueden incorporarse directamente con los alimentos de la dieta del paciente. Para la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede combinarse con uno o más excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, grageas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Dichas composiciones y preparaciones deben contener al menos un 0,1 % de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede, por supuesto, variar y puede estar convenientemente entre aproximadamente el 2 y 50 aproximadamente el 60 % del peso de una forma de dosificación unitaria dada. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosificación eficaz.

Los comprimidos, las pastillas, las píldoras, las cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: aglutinantes

como goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y se puede agregar un agente edulcorante tal como sacarosa, fructosa, lactosa o aspartamo o un agente aromatizante tal como menta, aceite de gaulteria o sabor a cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un soporte líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Varios otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas pueden recubrirse con gelatina, cera, goma laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa o fructosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y saborizante como el sabor a cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo puede incorporarse en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

El compuesto activo también puede administrarse por vía intravenosa o intraperitoneal mediante infusión o inyección. Las soluciones del compuesto activo o sus sales se pueden preparar en agua, opcionalmente mezcladas con un tensioactivo no tóxico. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas de dosificación farmacéutica adecuadas para inyección o infusión pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el ingrediente activo que están adaptados para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables o infusibles estériles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. En todos los casos, la forma de dosificación final debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El vehículo o soporte líquido puede ser un disolvente o medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones o mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede ser provocada por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtro. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son el secado al vacío y las técnicas de liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado presente en las soluciones previamente filtradas estériles.

Para la administración tópica, los presentes compuestos pueden aplicarse en forma pura, es decir, cuando son líquidos. Sin embargo, generalmente será conveniente administrarlos a la piel como composiciones o formulaciones, en combinación con un vehículo dermatológicamente aceptable, que puede ser un sólido o un líquido.

Los vehículos sólidos útiles incluyen sólidos finamente divididos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Los vehículos líquidos útiles incluyen agua, alcoholes o glicoles o mezclas de agua-alcohol/glicol, en los que los presentes compuestos pueden disolverse o dispersarse a niveles efectivos, opcionalmente con la ayuda de tensioactivos no tóxicos. Se pueden agregar adyuvantes tales como fragancias y agentes antimicrobianos adicionales para optimizar las propiedades para un uso dado. Las composiciones líquidas resultantes pueden aplicarse a partir de almohadillas absorbentes, usarse para impregnar vendajes y otros apósitos, o rociarse sobre el área afectada usando pulverizadores de tipo bomba o aerosol.

Los espesantes tales como polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales y ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales minerales modificados también pueden emplearse con vehículos líquidos para formar pastas para untar, geles, pomadas, jabones y similares, para su aplicación directa a la piel del usuario.

Ejemplos de composiciones dermatológicas útiles que pueden usarse para administrar los compuestos de la fórmula I o la fórmula II a la piel son conocidos en la técnica; por ejemplo, véase Jacquet et al. (patente de EE. UU. n.º 4.608.392), Geria (patente de EE. UU. n.º 4.992.478), Smith et al. (patente de EE. UU. n.º 4.559.157) y Wortzman (patente de EE. UU. n.º 4.820.508).

Las dosis útiles de los compuestos para su uso en la invención pueden determinarse comparando su actividad *in vitro* y actividad *in vivo* en modelos animales. Los procedimientos para la extrapolación de dosis efectivas en ratones y otros animales a humanos son conocidos en la técnica; por ejemplo, véase la patente de EE. UU. n.º 4.938.949.

Generalmente, la concentración de los compuestos de fórmula I en una composición líquida, tal como una loción, será

de aproximadamente el 0,1-25 % en peso, preferentemente de aproximadamente el 0,5-10 % en peso. La concentración en una composición semisólida o sólida tal como un gel o un polvo será de aproximadamente el 0,1-5 % en peso, preferentemente de aproximadamente el 0,5-2,5 % en peso.

5 La cantidad del compuesto, o una sal activa o derivado del mismo, requerida para su uso en el tratamiento variará no solo con la sal particular seleccionada sino también con la ruta de administración, la naturaleza de la afección que se va a tratar y la edad y afección del paciente y será en última instancia a discreción del médico o clínico auxiliar.

10 Por ejemplo, en una realización relacionada con la administración oral a humanos, una dosis de entre aproximadamente 0,1 y 300 mg/kg/día, o entre aproximadamente 0,5 y 50 mg/kg/día, o entre aproximadamente 1 y 10 mg/kg/día, generalmente es suficiente, pero variará dependiendo de cosas como el trastorno que se está tratando, la duración del tratamiento, la edad, el sexo, el peso y/o la salud del sujeto, etc. En un aspecto, se usa una dosis unitaria. En un aspecto, la dosis unitaria se suministra en una jeringa. Las combinaciones de medicamentos se pueden administrar en formulaciones que contienen todos los medicamentos que se usan, o los medicamentos se pueden administrar por separado. En algunos casos, se anticipa que serán necesarias o útiles múltiples dosis/tiempos de administración. Además, para algunos regímenes de tratamiento, se utilizarán al menos dos compuestos. En un aspecto, se administrarán al menos tres compuestos. La presente descripción proporciona además la variación del tiempo de tratamiento.

15 Sin embargo, en general, una dosis adecuada estará en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 75 mg/kg de peso corporal por día, tal como 3 a aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día, preferentemente en el intervalo de 6 a 90 mg/kg/día, lo más preferentemente en el intervalo de 15 a 60 mg/kg/día.

20 El compuesto se administra convenientemente en forma de dosificación unitaria; por ejemplo, que contiene de 5 a 1.000 mg, convenientemente de 10 a 750 mg, lo más convenientemente, de 50 a 500 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria.

25 Idealmente, cuando el ingrediente activo necesita entrar en circulación y administrarse a través de la sangre, el ingrediente activo, en una realización, debe administrarse para alcanzar concentraciones plasmáticas máximas del compuesto activo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 75 μ M, preferentemente de aproximadamente 1 a 50 μ M, lo más preferentemente, de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 μ M. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante la inyección intravenosa de una solución del 0,05 al 5 % del ingrediente activo, opcionalmente en solución salina, o administrada por vía oral como un bolo que contiene aproximadamente 1-100 mg del ingrediente activo. Los niveles en sangre convenientes se pueden mantener mediante infusión continua para proporcionar aproximadamente 0,01-5,0 mg/kg/h o mediante infusiones intermitentes que contienen aproximadamente 0,4-15 mg/kg del ingrediente o ingredientes activos.

30 La dosis deseada puede presentarse convenientemente en una dosis única o como dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis por día. La subdosis en sí misma puede dividirse adicionalmente, por ejemplo, en una cantidad de administraciones discretas y poco espaciadas; tal como inhalaciones múltiples de un insuflador o mediante la aplicación de una pluralidad de gotas en el ojo.

35 Opcionalmente, una formulación de la invención se puede impregnar en un material de apósito (o de otro modo contener o abarcar el material de apósito). El material de apósito es un tejido farmacéuticamente aceptable. Puede ser, por ejemplo, una gasa o cualquier otro tipo de tela o material médico que pueda usarse para cubrir una herida y/o para mantener un agente terapéutico o composición en contacto con un paciente.

40 La composición para su uso en la invención puede comprender además aditivos terapéuticos adicionales, solos o en combinación (*por ejemplo*, 2, 3 ó 4 aditivos adicionales). Los ejemplos de aditivos adicionales incluyen, entre otros: (a) antimicrobianos, (b) esteroides (*por ejemplo*, hidrocortisona, triamcinolona); (c) medicamentos para el dolor (*por ejemplo*, aspirina, un AINE y un anestésico local); (d) agentes antiinflamatorios; y (e) combinaciones de los mismos.

45 Las proteínas de matriz no sintéticas como el colágeno, los glicosaminoglicanos y el ácido hialurónico, que se digieren enzimáticamente en el cuerpo, son útiles para el suministro (véanse las patentes de EE. UU. n.º 4.394.320; 4.472.840; 5.366.509; 5.606.019; 5.645.591; y 5.683.459) y son adecuados para su uso con la presente invención. Se pueden usar otros medios y dispositivos implantables para la administración de los compuestos de la invención *in vivo*. Estos incluyen, entre otros, esponjas, tales como las de Integra, geles de fibrina, andamios formados a partir de microesferas sinterizadas de copolímeros de ácido glicólico de ácido poliláctico (PLAGA) y nanofibras formadas a partir de colágeno nativo, así como otras proteínas. Los compuestos de la presente invención pueden combinarse adicionalmente con factores de crecimiento, factores de nutrientes, productos farmacéuticos, compuestos que contienen calcio, agentes antiinflamatorios, agentes antimicrobianos o cualquier otra sustancia capaz de acelerar o facilitar el crecimiento, la estabilidad y la remodelación de huesos o tejidos.

55 Las composiciones para su uso en la presente invención también se pueden combinar con cargas o partículas inorgánicas. Por ejemplo, para su uso en injertos implantables, las cargas o partículas inorgánicas pueden seleccionarse entre hidroxiapatita, fosfato tricálcico, vidrio cerámico, fosfato cálcico amorfo, partículas o polvos cerámicos porosos, malla de titanio o aleación de titanio, o titanio en partículas o aleación de titanio.

Los ejemplos de otros agentes antimicrobianos que se pueden usar en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, isoniazida, etambutol, pirazinamida, estreptomina, clofazimina, rifabutina, fluoroquinolonas, ofloxacina, sparfloxacina, rifampicina, azitromicina, claritromicina, dapsona, tetraciclina, eritromicina, cikprofloxacina, doxiciclina, anfencilina, anfotericina B, ketoconazol, fluconazol, pirimetamina, sulfadiazina, clindamicina, lincomicina, pentamidina, atovaquona, paromomicina, diclaraziril, aciclovir, trifluorouridina, foscarnet, penicilina, gentamicina, ganciclovir, iatroconazol, miconazol, Zn-piritiona y sales de plata, tales como cloruro, bromuro, yoduro y peryodato.

En una realización, los compuestos para su uso en la invención se pueden encapsular primero en microcápsulas, microesferas, micropartículas, microfibras, fibras de refuerzo y similares para facilitar la mezcla y lograr la liberación controlada, extendida, retardada y/o sostenida y combinar otros agentes o medicamentos. La encapsulación del agente biológicamente activo también puede proteger al agente contra la degradación durante la formación del material compuesto de la invención.

En otra opción de la invención, el compuesto puede liberarse de forma controlable en un sujeto cuando la composición de la invención se implanta en un sujeto, debido a que la biorreabsorción depende de la escala de tiempo resultante de la remodelación celular. En una opción, la composición puede usarse para reemplazar un área de discontinuidad en el tejido. El área de discontinuidad puede ser el resultado de un trauma, una enfermedad, trastorno o afección, cirugía, lesión, etc.

Como se usa en esta invención, un «material de instrucción» incluye una publicación, una grabación, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que pueda usarse para comunicar la utilidad de la composición de la invención para su uso designado. El material de instrucción del kit descrito en esta invención puede, por ejemplo, fijarse a un contenedor que contiene la composición o enviarse junto con un contenedor que contiene la composición. Alternativamente, el material de instrucción puede enviarse por separado del contenedor con la intención de que el material de instrucción y la composición sean utilizados cooperativamente por el destinatario.

Un kit puede comprender un compuesto para su uso en la invención y un material de instrucción que describe la administración del compuesto o una composición que comprende el compuesto a una célula o un sujeto a cualquier objetivo de interés, tal como una superficie. Esto debe interpretarse para incluir otras versiones de kits que son conocidos por los expertos en la técnica, tales como un kit que comprende un disolvente (preferentemente estéril) adecuado para disolver o suspender una composición para su uso en la invención antes de administrar el compuesto a una célula o un sujeto, por ejemplo, un humano.

Según la presente invención, como se describe anteriormente o como se discute en los Ejemplos a continuación, se pueden emplear técnicas químicas, celulares, histoquímicas, bioquímicas, de biología molecular, microbiología y técnicas *in vivo* convencionales que son conocidas por los expertos en la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía.

Sin una descripción adicional, se cree que un experto en la técnica puede, utilizando la descripción anterior y los siguientes ejemplos ilustrativos, fabricar y utilizar los compuestos para su uso en la presente invención.

La invención se describe ahora con referencia a los siguientes ejemplos y realizaciones. Sin una descripción adicional, se cree que un experto en la técnica puede, utilizando la descripción anterior y los siguientes ejemplos ilustrativos, crear y utilizar la presente invención y practicar los procedimientos descritos. Por lo tanto, los siguientes ejemplos de trabajo se proporcionan solo con fines ilustrativos y señalan específicamente las realizaciones preferidas de la presente invención, y no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera del resto de la descripción. Por lo tanto, los ejemplos deben interpretarse para abarcar todas y cada una de las variaciones que se hacen evidentes como resultado de la enseñanza proporcionada en esta invención. En cualquier caso, el alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier otra descripción en la presente descripción, independientemente de si se indica como preferida o ejemplificada, no forma parte de la presente invención.

Ejemplos

45 Procedimientos generales

Materiales

La biblioteca *ApexScreen 5040* se adquirió de TimTec (Newark, DE) con cada compuesto químico suministrado a una concentración de 1 µg/µL en dimetilsulfóxido (DMSO). Las microplacas de 96 pocillos Becton Dickinson (BD) Biosensor de oxígeno (OBS) se obtuvieron de BD Biosciences (Bedford, MA). Cianuro de carbonilo *p*-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) y CM-H₂DCFDA se adquirieron de Sigma-Aldrich y Molecular Probes, Invitrogen (Carlsbad, CA), respectivamente.

Ensayo de consumo de oxígeno

Los mioblastos L6 se cultivaron hasta confluencia, se lavaron con PBS, se tripsinizaron y, a continuación, se sembraron en una microplaca BD-OBS de 96 pocillos a una densidad de 500.000 células/pocillo en 100 µL de medio de crecimiento L6. Las células se incubaron con compuesto de biblioteca al 0,5 % (v/v) o control de vehículo (DMSO) y

la intensidad de fluorescencia se registró durante 45-90 min (1 lectura/min) a 37 °C mediante un lector de microplacas de doble monocromador SpectraMax M5 (Molecular Devices, CA) utilizando una configuración de lectura inferior y con los filtros de excitación y emisión establecidos a 485 nM y 630 nM, respectivamente. El agente de desacoplamiento mitocondrial FCCP se usó como control positivo para el desacoplamiento. Los datos de fluorescencia se registraron en el software SoftMax Pro (versión 4.8) y se exportaron a Microsoft Excel para su posterior análisis. Los compuestos que aumentaron el consumo de oxígeno en > 20 % en relación con las células de control se seleccionaron para el cribado secundario.

Ensayo de producción de ROS

Los mioblastos L6 se sembraron en microplacas de 96 pocillos con fondo transparente y paredes negras en medios de crecimiento L6 y se cultivaron hasta confluencia. Las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron conjuntamente con 7,5 µM CM-H₂DCFDA y 0,5 ng/µL de cada compuesto base o control de vehículo (DMSO) en tampón KRP (NaCl 136 mM, KCl 4,7 mM, NaPO₄ 10 mM, MgSO₄ 0,9 mM, CaCl₂ 0,9 mM, pH 7,4) suplementado con D-glucosa 25 mM a 37 °C en 5 % de CO₂/95 % de aire durante 1 hora. Se usó como control positivo 100 nM de H₂O₂ para la producción de ROS. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con PBS para eliminar el exceso de sonda. A continuación, las células se cubrieron con 100 µl/pocillo de PBS y se midió la intensidad de fluorescencia mediante un lector de microplacas Tecan Infinite® M200 (Tecan Group Ltd., Suiza) usando una configuración de lectura superior y con los filtros de excitación y emisión establecidos a 495 ± 9 nM y 530 ± 20 nM, respectivamente. Los datos de fluorescencia se registraron en el software Magellan (versión 6.4) y se exportaron a Microsoft Excel para su posterior análisis. Habiendo restado la fluorescencia de fondo (que emitió de un pocillo que no recibió la sonda CM-H₂DCFDA) de cada pocillo, la producción de ROS se expresó en términos de porcentaje de fluorescencia del control del vehículo para cada condición. Se eliminaron los compuestos que aumentaron los niveles de ROS en más del 20 %.

Mediciones de consumo de oxígeno y acidificación extracelular en células enteras

La tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la tasa de acidificación extracelular (ECAR) se midieron usando un analizador de flujo Seahorse XF-24 (Seahorse Biosciences, North Billerica, MA). Se sembraron células NMuLi, C2C12 y L6 en una placa de cultivo de tejidos Seahorse de 24 pocillos a una densidad de 3,5 x 10⁴ células/pocillo y cardiomiocitos aislados a una densidad de 4 x 10⁴ células/pocillo. A continuación, se permitió que las células se adhirieran durante la noche. Antes del ensayo, los medios se cambiaron a DMEM sin tampón que contenía piruvato y glutamina (Gibco # 12800-017, pH = 7.4 a 37 °C) y las células se equilibraron durante 30 minutos a 37 °C sin CO₂. Los compuestos se inyectaron durante el ensayo y se midieron OCR y ECAR usando períodos de medición de 2 minutos. Se usaron 2-3 pocillos por condición y se promediaron en tres placas (n = 6-9). La significación estadística se determinó mediante ANOVA de dos vías con la prueba posterior de Bonferroni.

Aislamiento de mitocondrias

Las mitocondrias se aislaron de los hígados de ratones macho C57BL/6. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Se separaron los hígados, se picaron con tijeras y se colocaron inmediatamente en 1 ml de medio de aislamiento helado (sacarosa 250 mM, Tris-HCl 10 mM, EGTA 1 mM, BSA libre de ácidos grasos al 1 %, pH 7.4). El tejido se homogeneizó usando cuatro resultados de un homogeneizador de tejido Potter-Elvehjem automatizado. Después de añadir 4 ml de medio de aislamiento, el homogeneizado se centrifugó a 800 xg durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se dividió en cuatro tubos Eppendorf de 2 ml y se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se aspiró cualquier residuo blanco del sedimento de mitocondrias marrón. Los gránulos se combinaron, a continuación, en 1 ml de medio de aislamiento y se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante y cualquier resto blanco se eliminaron y las mitocondrias se resuspendieron en 1 ml de solución de ensayo mitocondrial (MAS, sacarosa 70 mM, manitol 220 mM, KH₂PO₄ 10 mM, MgCl₂ 5 mM, HEPES 2 mM, EGTA 1 mM, BSA libre de ácidos grasos al 0,2 %, pH 7,2).

Ensayo de flujo de electrones

Los ensayos de flujo de electrones se realizaron utilizando los procedimientos descritos en Rogers y col. (19) Brevemente, 5 µg de proteína mitocondrial en MAS se cargaron en una placa de cultivo de tejidos Seahorse de 24 pocillos y se centrifugaron a 2.000 xg durante 15 minutos a 4 °C. Antes del ensayo, las mitocondrias se incubaron a 37 °C durante 10 minutos en MAS que contenía piruvato 10 mM, malato 2 mM y BAM15 o FCCP 5 µM. Rotenona (2 µM), succinato (10 mM), antimicina A (4 µM) y N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD, 100 µM) más ascorbato (10 mM) tiempo extraordinario. N = 3 pocillos/placa de un representante de 3 placas.

Ensayos de valoración mitocondrial

Se aislaron mitocondrias hepáticas de ratón y se midió la respiración según Rogers y col. (19) El consumo de oxígeno se midió usando un analizador de flujo Seahorse XF96 en mitocondrias que respiraban en piruvato (10 mM) y malato (2 mM) o succinato (10 mM) y rotenona (2 µM).

Potencial de membrana mitocondrial

Las células L6 se incubaron con el indicador fluorescente de potencial de membrana mitocondrial TMRM (250 nM) o control DMSO (1 %) durante 30 minutos. Las células se centrifugaron durante 10 minutos a 700 x g y se resuspendieron en medio de cultivo (alfa-MEM suplementado con suero de ternera fetal al 10 %) a una concentración de 1×10^5 células/ml y tratadas con 10 μ M de BAM15/FCCP o DMSO (0,1 %) durante 30 minutos antes del análisis de citometría de flujo, n = 3.

Electrofisiología de membrana plasmática

En preparación para el registro, las células L6 se colocaron en placas sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina y se devolvieron a la incubadora para adherirse durante al menos 1 hora antes de su uso. Las células se usaron dentro de 1 día de plaqueado. Se realizaron grabaciones de células enteras a temperatura ambiente con pipetas de parche de vidrio de borosilicato recubiertas con Sylgard de 3-5 M Ω y un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices). La solución interna contenía KCH₃SO₃ 120 mM, NaCl 4 mM, mgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 0,5 mM, HEPES 10 mM, EGTA 10 mM, ATP-Mg 3 mM y GTP-Tris 0,3 mM (pH 7.2). La solución de baño estaba compuesta de NaCl 140 mM, KCl 3 mM, mgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM, HEPES 10 mM y glucosa 10 mM (pH 7.3) y se hizo fluir sobre las células a aproximadamente 2 ml/min. Para los experimentos de fijación de voltaje, las células se mantuvieron a -70 mV y se aplicó una rampa de 750 mseg de -150 mV a +80 mV a intervalos de 10 segundos utilizando el software pCLAMP y un digitalizador Digidata 1322A (Molecular Devices). Las medidas de conductancia se tomaron entre -130 mV y -60 mV. Para los experimentos con pinzas actuales, las células se registraron en el potencial de membrana en reposo o con inyección actual para alcanzar un potencial de aproximadamente -70 mV.

Citotoxicidad

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5.000 células/pocillo para células NMuLi, L6 y C2C12 y 10.000 células/pocillo para cardiomiocitos ventriculares izquierdos de rata primarios. Las células se incubaron durante la noche a 37 °C antes del tratamiento farmacológico. Los medicamentos se diluyeron en medio de cultivo celular (suero de ternera fetal al 10 % en medio Eagle modificado por Dulbecco) (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, EE.UU.) y se agregaron a cada pocillo en las concentraciones indicadas. La viabilidad celular se midió 48 h después usando solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Amresco, Solon, Ohio, EE.UU.) o tinción con violeta cristal (0,5 % p/v en 50 % de metanol). La absorbancia se midió utilizando un lector de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.). La viabilidad celular de las células tratadas con medicamentos se muestra como un porcentaje de las células de control, es decir, células con concentraciones equivalentes del vehículo, dimetilsulfóxido (DMSO). La concentración final de DMSO expuesta a las células no fue más del 0,1 % (v/v) durante la duración del experimento.

Lesión por reperfusión isquémica renal

Todos los animales fueron manejados y los procedimientos se realizaron en cumplimiento de la Guía de los Institutos Nacionales de Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, y todos los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Virginia. Ratones machos (8 semanas de edad, C57BL/6, del Instituto Nacional del Cáncer, Frederick, MD) fueron anestesiados con una mezcla (i.p.) de ketamina (120 mg/kg), xilazina (12 mg/kg) y atropina (0,324 mg/kg) y fueron sometidos a una lesión de reperfusión isquémica bilateral (isquemia de 26 min, a continuación, reperfusión de 24 h o 48 h) como se describió previamente (24). Durante la cirugía, la temperatura central del ratón se mantuvo a 34-36 °C con una almohadilla térmica; durante el período de recuperación y reperfusión, los ratones fueron alojados en una incubadora de calentamiento con temperatura ambiente a 30-32 °C. Los ratones control, operados de forma simulada, se sometieron a un procedimiento similar, pero los pedículos renales no se sujetaron. Los ratones fueron i.p. inyectados con BAM15 a 1 ó 5 mg/kg, 1 h antes de IR renal. A los ratones del vehículo también se les inyectó la misma solución con la que se preparó BAM15 (DMSO al 3 % en PEG400 al 50 %).

Evaluación de la función renal y la histología

La creatinina plasmática, como medida de la función renal, se determinó utilizando un ensayo colorimétrico según el protocolo del fabricante (Sigma-Aldrich). Para la histología, los riñones se fijaron durante la noche en 0,2 % de peryodato de sodio/1,4 % de DL-lisina/4 % de paraformaldehído en tampón de fosfato 0,1 M (pH 7.4) y se incluyeron en parafina. Los riñones se prepararon para la tinción con H&E como se describió previamente (3) y se observaron mediante microscopía óptica (Zeiss Axioskop). Se tomaron fotografías y se realizó un ajuste de brillo/contraste con una cámara SPOT RT (versión de software 3.3; Instrumentos de diagnóstico). La necrosis tubular aguda se evaluó como se describió anteriormente (25). Las secciones de riñón teñidas se puntuaron de manera ciega. La puntuación se basó en el porcentaje de túbulos de la médula externa con yesos rosados en el interior, que es un marcador de necrosis tubular. El sistema de puntuación fue el siguiente: 1 (<10 %), 2 (10 a 25 %), 3 (25 a 75 %) y 4 (> 75 %).

Análisis de FACS de riñón

Se utilizó citometría de flujo para analizar el contenido de leucocitos renales. En resumen, los riñones fueron extraídos, picados, digeridos y pasados a través de un filtro y una columna de algodón como se describe (26) Después de

bloquear la unión no específica de Fc con CD16/32 anti-ratón (2.4G2), se incubaron suspensiones renales recientes con CD45 anti-ratón marcado con fluoróforo (30-F11) para determinar el número total de células leucocitarias. Las muestras etiquetadas con CD45 se usaron adicionalmente para etiquetar con diferentes combinaciones de anti-ratón F4/80 (BM8), GR-1 (Ly6G), CD11b, CD11c, IA (MHCII). Se añadió 7-aminoactinomicina D (7-AAD; BD Biosciences) 15 minutos antes de analizar la muestra para separar las células vivas de las células muertas. La adquisición de datos de citometría de flujo se realizó en un FACSCalibur (Becton Dickinson). Los datos fueron analizados por el software FlowJo 9.0 (Tree Star).

Ejemplo 1-

Recientemente, seleccionamos una biblioteca química de diversidad en células de músculo esquelético de rata L6 para agonistas de gasto de energía con propiedades antioxidantes que mejoraron la sensibilidad a la insulina. Se pasaron más de 5.000 moléculas a través de la primera pantalla para agonistas de gasto de energía. Esto produjo 25 resultados positivos, una tasa de éxito de ~0.5 %. Nuestro examen secundario para la producción de ROS descartó falsos positivos que aumentaron el consumo de oxígeno a través de la producción de ROS (y también identificó compuestos antioxidantes). De nuestros 25 resultados, identificamos 10 prooxidantes, 7 antioxidantes y 8 euoxidantes. Excluyendo los prooxidantes, los 15 compuestos restantes tienen excelentes propiedades similares a los medicamentos, incluyendo un peso molecular entre 205-370, HBA <5, HBD <3, 1-3 anillos y un LogS calculado de > 10-3. La pantalla final está actualmente en progreso e identificará compuestos que revierten la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina inducida por hiperlipidemia en miotubos y adipocitos cultivados.

Un diagrama de flujo de nuestra pantalla se muestra en el Ejemplo 1, Figura 1. La primera pantalla identificó compuestos que aumentaron el gasto de energía y una selección de nuestros compuestos afectados se muestra en el Ejemplo 1, Figura 2. La segunda pantalla investigó el estado oxidante de las células tratadas con 10 μ M de cada compuesto usando lectura de fluorescencia de la sonda sensible a redox CM-DCFDA (Ejemplo 1, Figura 3). Los niveles de ATP celular se midieron después de 70 minutos a una dosis de 10 μ M para descartar compuestos tóxicos que disminuyen los niveles de ATP celular (Ejemplo 1, Figura 4). Finalmente, dado que la activación de AMPK tiene efectos sensibilizadores a la insulina (la activación de AMPK está vinculada a los efectos antidiabéticos de metformina, rosiglitazona y berberina (3)), analizamos la fosforilación de AMPK en el Ejemplo 1, Fig. 4. Estas pantallas revelaron que el compuesto BAM -15 fue el agonista más potente del gasto energético, aumentó el consumo de oxígeno sin producción de ROS y activó AMPK sin agotamiento de ATP (Ejemplo 1, Figs. 2-4). Este compuesto se usó en un estudio piloto de cinco ratones en el que tenía propiedades sensibilizantes a la insulina en ratones alimentados con un HFD.

1. Para caracterizar nuevos agonistas del gasto energético para la protección de la resistencia a la insulina *in vitro*. Para evaluar la capacidad de los compuestos base para revertir la resistencia a la insulina, haremos que los miotubos L6 y los adipocitos 3T3-L1 sean resistentes a la insulina con hiperinsulinemia crónica (4 tratamientos de insulina 10 nM durante 24 h) o tratamiento de hiperlipidemia (palmitato 0,3 mM durante 24 h). Estos modelos de diabetes/resistencia a la insulina están bien validados en nuestro laboratorio y los hemos descrito previamente (4-5). Cada compuesto base se tratará conjuntamente con el desacato a la resistencia a la insulina durante un curso de tiempo (1-24 horas) y una respuesta a la dosis (10 nM-10 μ M). La transducción de señal estimulada por insulina a través de la vía de acción canónica de la insulina se controlará mediante transferencia Western para fosfo-IR, fosfo-IRS1, fosfo-S473/T308-Akt y fosfo-T162-AS160 como se describe en (5). Además, se medirá la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática y el transporte de glucosa para evaluar la acción de la insulina. El tráfico de GLUT4 se medirá como se describe en (5), y la absorción de glucosa se medirá utilizando el procedimiento 3H-2-desoxiglucosa descrito anteriormente (6).

2: Para probar los efectos sensibilizadores a la insulina de los nuevos agonistas del gasto de energía en ratones alimentados con alto contenido de grasa.

Farmacocinética y bibliotecas de gasto energético de próxima generación: después de desarrollar el procedimiento LCMS para cuantificar los compuestos de interés, el análisis PK inicial utilizará un modelo de bolo IV de un compartimento para determinar la tasa de eliminación constante, el volumen aparente de distribución, la vida media en plasma, el aclaramiento y el área bajo la concentración vs. la curva de tiempo. Las mediciones de la concentración plasmática después de la dosificación por sonda oral se utilizarán para calcular la biodisponibilidad. Los parámetros más útiles de inmediato son la vida media y la disponibilidad oral, que determinarán la frecuencia de dosificación (dentro de las 3 vidas medias) y la vía de administración, respectivamente. En el caso de compuestos de vida muy corta, tenemos la opción de entrega por minibomba si el compuesto es suficientemente potente. Realizaremos un estudio de relación estructura-actividad para mejorar la estabilidad *in vivo* y/o la disponibilidad oral de compuestos convenientes.

Caracterización *in vivo* de compuestos base/principales: la solubilidad del compuesto base se determinará experimentalmente mediante dilución en hidroxipropil β -ciclodextrina (HP β CD) y otros disolventes basados en polietilenglicol o metilcelulosa. Se realizarán estudios de aumento de dosis para determinar la LD₅₀. La mitad, la décima y la centésima parte de la LD₅₀ se administrarán a ratones para evaluar la eficacia del medicamento mediante el consumo de oxígeno utilizando el sistema CLAMS. Tras la validación del gasto de energía *in vivo*, seleccionaremos dos dosis para cada medicamento y comenzaremos las pruebas *in vivo* para la reversión de la resistencia a la insulina

como se describe a continuación. Los compuestos base y principales se administrarán de forma crónica a ratones resistentes a la insulina alimentados con alto contenido de grasa por i.p. inyección, incorporación en alimentos, o mini bombas osmóticas Azlet (según la biodisponibilidad oral y las propiedades farmacocinéticas (PK)). La respirometría CLAMS se utilizará para medir el gasto energético. El peso corporal, la ingesta de alimentos y la tolerancia a la glucosa/insulina se medirán cada cuatro semanas desde el inicio de la dieta alta en grasas.

Esperamos que aproximadamente cinco compuestos sean probados *in vivo*. En este escenario, la primera cohorte para el estudio *in vivo* incluirá 12 grupos de cinco ratones (60 ratones). Se ordenarán ratones C57BL/6 de 7 semanas de edad de los laboratorios Jackson. Un grupo permanecerá en la dieta Chow como control de referencia y 11 grupos pasarán de una dieta Chow estándar a una dieta obesigénica y resistente a la insulina (60 % de grasa, dieta basada en manteca de cerdo, dietas de investigación) durante hasta 12 semanas. Después de cinco semanas de alimentación con alto contenido de grasa, los ratones serán evaluados para el gasto energético inicial y la sensibilidad a la insulina (mediante la prueba de tolerancia a la glucosa, la prueba de tolerancia a la insulina y las mediciones de insulina/lípidos en sangre en ayunas). A continuación, iniciaremos la intervención farmacológica (por ejemplo, mediante sonda oral o inyección intraperitoneal) de los cinco compuestos principales en dos dosis predeterminadas para aumentar el gasto energético. El control del vehículo (disolvente solo) se administrará al grupo HFD restante. Los compuestos se administrarán en dos dosis; una dosis moderada-alta de menos de la mitad de la DL50 que produce un aumento > 10 % en el gasto de energía sin signos de sufrimiento físico, y una dosis cercana al límite de detección del gasto de energía. La ingesta de alimentos y el peso corporal se registrarán semanalmente. La sensibilidad a la insulina se reevaluará cada semana mediante pruebas de tolerancia a la glucosa. Los ratones se mantendrán en los compuestos hasta que un fenotipo sea aparente o hasta 7 semanas (un total de 12 semanas con HFD). Se registrarán los pesos de los órganos, incluidos los depósitos de hígado y adiposo, y la acumulación de lípidos en el hígado se determinará mediante un ensayo de triglicéridos y una histología con tinción con aceite rojo o. Se recogerá suero para la determinación de triglicéridos, ácidos grasos libres, colesterol, insulina y adiponectina. Los compuestos correctos mostrarán mejoras en los perfiles de lípidos en la sangre, tolerancia a la glucosa, delgadez y sensibilidad a la insulina sin hipofagia ni hiperinsulinemia.

Alternativas, planes de contingencia y estudios futuros: si se observa hipofagia con el tratamiento de cualquier compuesto, repetiremos ese estudio compuesto con ratones de control alimentados por parejas para que coincida con la ingesta de alimentos de los ratones de prueba. Los compuestos que evitan la resistencia a la insulina *in vivo* se investigarán más a fondo para determinar el tipo de tejido que media en los efectos beneficiosos. En resumen, los indicadores ¹⁴C-glucosa y ³H-2-desoxiglucosa radioetiquetados se administrarán durante el GTT. El transporte de glucosa específico del tejido se controlará mediante extracción de fosfo-³H-2-desoxiglucosa, y la síntesis de glucógeno se determinará mediante la incorporación de ¹⁴C-glucosa en el glucógeno como se describe en (4, 7). Los estudios futuros identificarán los objetivos moleculares de los compuestos principales. Utilizaremos la proteómica cuantitativa basada en SILAC para la identificación de los objetivos principales como se describe en (1). Tenemos experiencia en el etiquetado SILAC como se publicó anteriormente (8).

Se utiliza un analizador de flujo extracelular Seahorse (XF24) para evaluar el consumo de oxígeno en las células intactas. Se utiliza un lector de microplacas de doble monocromador SpectraMax M5 para los ensayos de estrés oxidativo basados en células. Un calorímetro indirecto CLAMS está disponible. Se utiliza un espectrómetro de masas triple cuadrupolo ABI 4000 para las evaluaciones farmacocinéticas.

BAM15 es un químico conocido, pero los usos descritos en esta invención son nuevos y los resultados inesperados. Este y los otros compuestos útiles descritos en esta invención o que están abarcados por la invención son una clase completamente nueva de moléculas que actúan como agonistas del gasto de energía. Fue nombrado arbitrariamente BAM15 en este laboratorio. Su nombre IUPAC es (2-fluorofenil) {6 - [(2-fluorofenil) amino] (1,2,5-oxadiazolo [3,4-e] pirazin-5-il)} amina, es el número de compuesto ST056388 de Timtec. La biblioteca de la que proviene es el Timtec ApexScreen 5040. Se están realizando experimentos y procedimientos para modificar y sintetizar aminas secundarias.

También se describen en esta invención datos que indican que BAM15 y los otros compuestos de la invención con actividad similar son una clase completamente nueva de protonóforo mitocondrial, otros en esta clase son FCCP y 2,4-dinitrofenol. BAM15 es superior a estas moléculas en algunos de nuestros ensayos, tanto en términos de potencia como de toxicidad.

Los títulos se incluyen en esta invención para referencia y para ayudar a localizar ciertas secciones. Estos encabezados no tienen la intención de limitar el alcance de los conceptos descritos a continuación, y estos conceptos pueden tener aplicabilidad en otras secciones a lo largo de toda la especificación.

Aunque esta invención se ha descrito con referencia a realizaciones específicas, es evidente que otras realizaciones y variaciones de esta invención pueden ser desarrolladas por otros expertos en la técnica sin salirse del alcance de la invención.

Ejemplo 1- Bibliografía

1. Ong SE, Schenone M, Margolin AA, Li X, Do K, Doud MK, et al. Identificar las proteínas a las que se unen las sondas de moléculas pequeñas y los fármacos en las células. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106 (12): 4617-22. PMID:

2649954.

2. Tseng YH, Cypess AM, Kahn CR. La bioenergética celular como objetivo para la terapia de la obesidad. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9 (6): 465-82. PMID: 2880836.

5 3. Brunmair B, Staniek K, Gras F, Scharf N, Althaym A, Clara R, et al. Las tiazolidinedionas, como la metformina, inhiben el complejo respiratorio I: ¿un mecanismo común que contribuye a sus acciones antidiabéticas? *Diabetes.* 2004; 53 (4): 1052-9.

4. Hoehn KL, Salmon AB, Hohnen-Behrens C, Turner N, Hoy AJ, Maghzal GJ, et al. La resistencia a la insulina es un mecanismo de defensa antioxidante celular. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106 (42): 17787-92. PMID: 2764908.

10 5. Hoehn KL, Hohnen-Behrens C, Cederberg A, Wu LE, Turner N, Yuasa T, et al. Los defectos independientes del IRS1 definen los principales nodos de resistencia a la insulina. *Cell Metab.* 2008; 7 (5): 421-33.

6. Yip MF, Ramm G, Larance M, Hoehn KL, Wagner MC, Guilhaus M, et al. La fosforilación mediada por CaMKII del motor de miosina Myo1c es necesaria para la translocación de GLUT4 estimulada por insulina en adipocitos. *Cell Metab.* 2008; 8 (5): 384-98.

15 7. Hoehn KL, Turner N, Swarbrick MM, Wilks D, Preston E, Phua Y, et al. La regulación positiva aguda o crónica de la oxidación de ácidos grasos mitocondriales no tiene un efecto neto sobre el gasto energético o la adiposidad de todo el cuerpo. *Cell Metab.* 2010; 11 (1): 70-6.

8. Larance M, Rowland AF, Hoehn KL, Humphreys DT, Preiss T, Guilhaus M, et al. La fosfoproteómica global identifica un papel importante para AKT y 14-3-3 en la regulación de EDC3. *Proteómica de células mol.* 2010; 9 (4): 682-94. PMID: 2860230.

20 **Ejemplo 2-**

Acoplamiento mitocondrial

25 La vía principal para la producción de energía en las células aeróbicas implica la oxidación de nutrientes en las mitocondrias a través del ciclo del ácido tricarbólico (TCA) para producir CO₂ y portadores de electrones de alta energía en forma de NADH y FADH₂. NADH y FADH₂ donan electrones a la cadena de transporte de electrones mitocondriales (ETC) y activan una serie de bombas de protones que extruyen protones de la matriz mitocondrial. Los electrones reducen el O₂ en el complejo IV para formar H₂O. Este proceso crea un gradiente electroquímico y de pH, también conocido como fuerza motriz protónica (pmf), a través de la membrana interna mitocondrial (MIM). La vía principal para la reentrada de protones en la matriz mitocondrial es a través de la ATP sintasa, lo que resulta en la producción de ATP.

30 **Desacoplamiento mitocondrial**

35 Los protones que vuelven a entrar en la matriz mitocondrial a través de vías independientes de la oxidación de nutrientes ATP sintasa «desacopla» de la producción de ATP. El desacoplamiento reduce el pmf y, por lo tanto, aumenta el flujo de electrones a través del ETC a medida que las mitocondrias aceleran la respiración para mantener el potencial de membrana mitocondrial. La duración reducida de la ocupación de electrones en los complejos I, II y III disminuye la extracción inapropiada de electrones por oxígeno molecular en estos complejos y, por lo tanto, disminuye la producción de superóxido. Por el contrario, la alta ocupación de electrones en los portadores de electrones, causada por las mitocondrias hiperpolarizadas (por ejemplo, una alta relación ADP ATP/baja debido al estilo de vida sedentario o la sobrenutrición), produce una mayor producción de superóxido⁷.

40 El desacoplamiento es un fenómeno natural mediado por una familia de proteínas de desacoplamiento (UCP) que se encuentran en el MIM. El desacoplamiento sirve para varios propósitos en las células. Por ejemplo, UCP1 se expresa altamente en grasa marrón donde se activa por el estrés por frío para aumentar la termogénesis, mientras que UCP2 es ubicuo y tiene funciones en el mantenimiento de la función mitocondrial y reduce el estrés oxidativo⁸⁻⁹. Por ejemplo, nuestro trabajo reciente ha demostrado el requisito de UCP2 en la fagocitosis y la oxidación del material muerto¹⁰.

45 Los protonóforos químicos también transportan protones a través del MIM en ausencia de generación de ATP y son desacopladores muy efectivos. Los dos desacopladores mitocondriales químicos más utilizados son los ácidos débiles hidrófobos DNP y el cianuro de carbonilo *p*-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP). Aunque el DNP se prescribió a los humanos y se usó en exceso, las muertes fueron raras. FCCP, que es más potente que DNP, rara vez se usa *in vivo*.

50 Una posible explicación de la toxicidad observada con rosiglitazona, o la toxicidad inducida por el mantenimiento agresivo de la normoglucemia con tratamiento con insulina en los ensayos ACCORD y NICE-SUGAR puede deberse al aumento de la carga de nutrientes colocada en los tejidos periféricos. Por ejemplo, los sensibilizadores a la insulina, como la rosiglitazona, y otros miméticos de la insulina estimulan la eliminación de glucosa en los tejidos tales como el músculo esquelético y cardíaco. _Esta estrategia elimina la glucosa de la sangre al «empujarla» hacia los tejidos. Aunque esta estrategia de «empuje» tiene efectos beneficiosos para reducir los niveles de azúcar en la sangre, su mecanismo contrasta con el ejercicio, que agota las reservas de nutrientes y «extrae» la glucosa de la circulación. La

presente solicitud describe composiciones y procedimientos para mejorar el aclaramiento de glucosa al imitar la estrategia de «extracción» del ejercicio mientras se disminuye la toxicidad de los protonóforos no selectivos. Las ventajas de usar el desacoplamiento selectivo de mitocondrias para mediar en la estrategia de extracción incluyen disminución de la lipotoxicidad, función mitocondrial mejorada, producción disminuida de ROS y disminución de la adiposidad.

Resultados del ejemplo 2

Para identificar nuevos desacopladores mitocondriales con una ventana terapéutica más amplia, desarrollamos una nueva estrategia de detección de moléculas pequeñas basado en células. La pantalla primaria midió la tasa de consumo de oxígeno celular (OCR) en mioblastos L6 sembrados en placas que contenían el cloruro de fluoróforo 4,7-difenil-1,10-fenatrolina rutenio (II) sensible al oxígeno incrustado en silicona en la base del pocillo. Este fluoróforo se enfría con oxígeno, por lo que la fluorescencia de cada pocillo aumenta a medida que las células consumen oxígeno. Cada compuesto (el tamaño de la biblioteca fue de 5.040 compuestos) se seleccionó por duplicado a una concentración de ~ 6 μM y se identificaron 25 resultados que aumentaron el consumo de oxígeno celular en al menos un 10 % sobre la línea de base. Cinco de estos resultados fueron eliminados porque pertenecían a una familia de desacopladores mitocondriales conocidos. Doce fueron eliminados porque aumentaron la producción de ROS. Los 8 resultados restantes se probaron para el consumo de oxígeno celular en un intervalo de dosis (10 nM a 10 μM). Como se muestra en el Ejemplo 1, Fig. 2, identificamos BAM15 como un compuesto excepcional con igual potencia y un intervalo terapéutico mucho mayor que FCCP.

Un requisito de un desacoplador protonóforo mitocondrial de buena fe es su capacidad para estimular el consumo de oxígeno cuando se inhibe la ATP sintasa. El tratamiento de los mioblastos L6 con el oligomicina inhibidor de la ATP sintasa detiene el ETC al promover un fuerte aumento de pmf. Esto da como resultado una gran disminución en el consumo de oxígeno en el complejo IV (véase el Ejemplo 3). Los desacopladores de protonóforos mitocondriales FCCP o BAM15 pueden aumentar el consumo de oxígeno en presencia de oligomicina porque aumentan la entrada de protones en la matriz mitocondrial para permitir el consumo de oxígeno a través del complejo IV. Se eligió la dosis de 1 μM de BAM15 y FCCP porque representaba una concentración en la que ambos compuestos exhibían una respiración similar en las células tratadas sin oligomicina (véase el Ejemplo 3). BAM15 es muy superior a FCCP en todas las dosis más altas (no se muestra). La capacidad de usar BAM15 en un amplio intervalo de concentración sin toxicidad es un avance clave para el estudio de la función mitocondrial porque evita el «hallazgo de dosis» que debe lograrse con FCCP para determinar la tasa máxima de respiración mitocondrial y la capacidad respiratoria de reserva.

Otro requisito de un desacoplador mitocondrial es su capacidad para estimular la respiración en mitocondrias aisladas. Para probar esto, aislamos mitocondrias de hígado de ratón (respirando en piruvato/malato) y las tratamos con BAM15 o FCCP. Para determinar que el mecanismo de acción de BAM15 no se debía a la donación de electrones al ETC, realizamos un experimento de «acoplamiento complejo» en mitocondrias aisladas. Como se muestra en el Ejemplo 2, Fig. 1, el experimento de acoplamiento complejo comienza con mitocondrias aisladas que respiran sobre piruvato y malato en presencia de FCCP o BAM15 (5 μM) en el tiempo 0. Después de 10 minutos, se agrega rotenona 2 μM para inhibir ETC complejo I. El ejemplo 2, Fig. 1 muestra que las tasas de consumo de oxígeno disminuyeron en las mitocondrias tratadas con FCCP o BAM15, lo que indica que no donan electrones al ETC más abajo del complejo I. A continuación, se añadió succinato a los 20 minutos para estimular la respiración del complejo II. Ni FCCP ni BAM15 afectan al aumento de la respiración, lo que indica que no afectan al complejo II. A los 25 minutos, las mitocondrias se trataron con antimicina A (AntA) 4 μM para inhibir el complejo III y bloquear la respiración mediada por succinato. Estos datos demuestran que ninguno de los compuestos dona electrones del succinato al citocromo c o al complejo IV. Finalmente, a los 31 minutos, se añadió el sistema donador de electrones de ascorbato/TMPD para alimentar electrones al complejo IV. En resumen, estos datos indican que BAM15 aumenta la respiración en las mitocondrias aisladas a través de un mecanismo que no implica la donación de electrones al ETC.

El problema más significativo con la mayoría de los desacopladores no selectivos disponibles actualmente, incluidos FCCP y DNP, es su actividad protonóforo en membranas no mitocondriales. Más específicamente, la conductancia interna del protón en la MP resulta en un aumento sustancial en el gasto de energía para restaurar el potencial de membrana en reposo. Las concentraciones de DNP o FCCP que se usan con frecuencia para inducir tasas máximas de respiración mitocondrial (un índice de función mitocondrial y capacidad respiratoria de reserva) también promueven la despolarización de MP, lo que produce un agotamiento de los niveles de ATP celular y la producción de ROS que conduce a la muerte celular dependiente de caspasa. La acidificación intracelular se determinó cargando miotubos L6 con el fluoróforo SNARF-1 sensible al pH y determinando los cambios ratiométricos en la intensidad de fluorescencia contra una curva estándar. Se espera que los desacopladores mitocondriales aumenten ligeramente la acidificación intracelular debido al aumento de la hidrólisis de ATP y la producción de fosfato inorgánico. El Ejemplo 2, Fig. 2 ilustra la acidificación leve esperada con BAM15 y muestra que FCCP promueve la acidificación intracelular 2 veces más, presumiblemente debido a sus efectos en la MP.

Para investigar si la falta de actividad de protonóforo en la MP y el amplio intervalo de eficacia máxima de BAM15 mejoraron la viabilidad celular, cultivamos células L6, células NMuLi y cardiomiocitos ventriculares de rata neonatales aislados en presencia de un intervalo de dosis de FCCP o BAM15 durante 48 h. El número de células, la morfología y la muerte se observaron mediante microscopía de contraste de fase, ensayo de MTT y tinción con cristal violeta. Ejemplo 2, las Figs. 3A-B demuestran la citotoxicidad reducida de BAM15, en comparación con FCCP, en los tres

grupos de células. Además, la FCCP resultó en una pérdida de ATP celular y la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), mientras que el tratamiento con BAM15 no alteró los niveles de ATP y causó la activación leve de AMPK (Ejemplo 2, Fig. 3C-D).

5 Para determinar si BAM15 tiene actividad biológica *in vivo*, iniciamos un estudio piloto en el que ratones C57BL/6 de ocho semanas de edad adquiridos en Jackson Laboratories fueron alimentados con un 45 % de HFD durante seis semanas. Los ratones fueron evaluados para determinar la tolerancia a la glucosa y asignados a grupos para normalizar la masa corporal y la tolerancia a la glucosa. Los ratones se trataron diariamente mediante inyección IP de BAM15 (3 mg/kg ip) o un volumen igual de control de portador (50 % PEG400/5 % DMSO) durante siete días. En el día 5, los ratones fueron sometidos a una prueba de tolerancia a la glucosa de 2 g/kg, y en el día 8, los ratones fueron sacrificados y se analizaron los pesos de los tejidos. Como se muestra en el Ejemplo 2, Fig. 4, los ratones tratados con 3 mg/kg de BAM15 demostraron una mejor tolerancia a la glucosa. En la necropsia, los ratones que recibieron 3 mg/kg de BAM15 tenían masa de la almohadilla de grasa reducida pero peso del hígado normal. Estos datos piloto establecen que BAM15 es un novedoso desacoplador mitocondrial y destacan la necesidad de un mayor desarrollo y pruebas *in vivo*.

15 Nuestro objetivo fenotípico *in vivo* es mejorar la tolerancia a la glucosa y la delgadez. El desacoplamiento mitocondrial promueve la delgadez y la sensibilidad a la insulina. Por lo tanto, la identificación de desacopladores más seguros es relevante para los posibles tratamientos para la obesidad y la T2D.

BAM15 representa nuestro prototipo de molécula para la química medicinal. Hemos sintetizado BAM15 y confirmamos que su actividad es idéntica a la muestra analíticamente pura (datos no mostrados).

20 **Ensayos.** Las tasas de consumo de oxígeno en células intactas y mitocondrias aisladas se determinan usando un analizador de flujo extracelular Seahorse XF24. Este instrumento proporciona una respuesta reproducible y los datos obtenidos se pueden usar de manera fiable para validar y optimizar los derivados de BAM15. El primer examen que se realizará con todos los nuevos derivados es una respuesta a la dosis del consumo de oxígeno en mioblastos L6 intactos del músculo esquelético. Todas las muestras se analizarán de 10 nM a 100 µM en comparación con BAM15 y FCCP. Los nuevos derivados que tienen una ventana terapéutica similar o mayor que BAM15 se someterán a una pantalla de «acoplamiento complejo» para validar que los compuestos funcionan en mitocondrias aisladas y no donan electrones directamente a la cadena de transporte de electrones. Los nuevos compuestos que pasan ambos filtros se someterán a la serie de ensayos realizados para BAM15 (véase el Ejemplo 2, Fig. 5) para probar si las nuevas moléculas se comportan como desacopladores de protones de mitocondrias y tienen la viabilidad celular adecuada. Moléculas que serán consideradas para las pruebas *in vivo*:

i. No tiene actividad de protonóforo en la MP ni causa acidificación intracelular. Esto se probará mediante análisis de pinza de parche y ensayos de pH_i utilizando SNARF-1 en presencia de NCE. BAM15 (1 µM) y FCCP (1 µM) se utilizarán como controles para la acidificación intracelular.

35 ii. No aumenta la producción celular de ROS. Esto se probará cargando células con el colorante CM-DCFDA sensible a ROS y tratando con los compuestos desconocidos. BAM15 (1 µM) se usará como control para la falta de ROS y el inhibidor del complejo III AntA (100 nM) se usará como control positivo para la producción de ROS mitocondrial.

40 iii) Tienen mayor viabilidad celular que FCCP. La viabilidad se probará mediante un tratamiento de 48 horas con dosis que oscilan entre 0,1 y 100 µM, como se describe en el Ejemplo 2, Fig. 3. La viabilidad celular y la toxicidad se evaluarán mediante microscopía de contraste de fase, liberación de LDH, escisión pro-caspasa, ensayo MTT y/o tinción con anexina V.

Los estudios preliminares descritos anteriormente demuestran la colaboración íntima de la química médica y la farmacología para ilustrar la actividad sin precedentes de una molécula pequeña desacopladora de mitocondrias BAM15. Nuestro objetivo es construir sobre estos estudios y desarrollar compuestos con farmacología mejorada para que puedan ser probados en modelos de enfermedad en ratones. Por lo tanto, nuestra estrategia es sencilla: un proceso iterativo de síntesis química y estudios *in vitro* e *in vivo*, incluida la farmacocinética (véase, por ejemplo, el ejemplo 4).

A través de un proceso iterativo de síntesis y pruebas biológicas, crearemos moléculas similares a BAM15 que tienen una vida media, potencia y biodisponibilidad adecuadas para las pruebas en modelos de obesidad y resistencia a la insulina en ratones.

50 **Mejora las propiedades de solubilidad de BAM15.**

Para mejorar la solubilidad de BAM15 en sistemas de tampón acuoso, introduciremos restos solubilizantes mientras minimizamos las perturbaciones estructurales y electrónicas.

Definir el farmacóforo de BAM15

55 Debido a que solo ahora se describe en esta invención que BAM15 es un protonóforo de molécula pequeña con un amplio intervalo de eficacia máxima sin precedentes, el SAR alrededor de esta molécula es limitado. Por lo tanto,

synetizaremos derivados para desarrollar un farmacóforo que retenga la actividad deseada. Los experimentos han demostrado que BAM15 es más lipofílico que FCCP o 2,4-DNP.

Ejemplo 2 - Bibliografía

1. Del Prato S. Megatrials en diabetes tipo 2. ¿De la emoción a la frustración? *Diabetologia*. 2009; 52 (7): 1219-26.
- 5 2. Stockton MTaA. Dinitrofenol en el tratamiento de la obesidad: informe final. *JAMA*. 1935; 5 (105): 332-7.
3. Colman E. Dinitrofenol y la obesidad: un dilema regulador de principios del siglo XX. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2007; 48 (2): 115-7.
- 10 4. Caldeira da Silva CC, Cerqueira FM, Barbosa LF, Medeiros MH, Kowaltowski AJ. El desacoplamiento mitocondrial leve en ratones afecta el metabolismo energético, el equilibrio redox y la longevidad. *Envejecimiento celular*. 2008; 7 (4): 552-60.
5. Lou PH, Hansen BS, Olsen PH, Tullin S, Murphy MP, Brand MD. Desacopladores mitocondriales con un rango dinámico extraordinario. *Biochem J*. 2007; 407 (1): 129-40. PMID: 2267406.
6. Heytler PG, Prichard WW. Una nueva clase de agentes de desacoplamiento: carbonil cianuro de fenilhidrazonas. *Biochem Biophys Res Commun*. 1962; 7: 272-5.
- 15 7. Turrens JF. Producción de superóxido por la cadena respiratoria mitocondrial. *Informes de biociencia*. 1997; 17 (1): 3-8.
8. Marca MD, Esteves TC. Funciones fisiológicas de las proteínas de desacoplamiento mitocondrial UCP2 y UCP3. *Cell Metab*. 2005; 2 (2): 85-93.
- 20 9. Mailloux RJ, Harper ME. Proticidad mitocondrial y señalización ROS: lecciones de las proteínas de desacoplamiento. *Tendencias Endocrinol Metab*. 2012; 23 (9): 451-8.
10. Park D, Han CZ, Elliott MR, Kinchen JM, Trampont PC, Das S, Collins S, Lysiak JJ, Hoehn KL, Ravichandran KS. El aclaramiento continuo de las células apoptóticas depende de manera crítica de la proteína fagocita Ucp2. *Naturaleza*. 2011; 477 (7363): 220-4.
- 25 11. Wu YN, Munhall AC, Johnson SW. Los agentes desacopladores mitocondriales antagonizan las acciones de rotenona en las neuronas de dopamina de sustancia negra de rata. *Brain Res*. 2011; 1395: 86-93.
12. Pandya JD, Pauly JR, Sullivan PG. La dosis óptima y la oportunidad para mantener la homeostasis mitocondrial después de una lesión cerebral traumática utilizando el FCCP desacoplador. *Exp Neurol*. 2009; 218 (2): 381-9.
13. Korde AS, Pettigrew LC, Craddock SD, Maragos WF. El desacoplador mitocondrial 2,4-dinitrofenol atenúa el daño tisular y mejora la homeostasis mitocondrial después de la isquemia cerebral focal transitoria. *J Neurochem*. 2005; 94 (6): 1676-84.
- 30 14. Modriansky M, Gabrielova E. Desacopla mi corazón: los beneficios de la ineficiencia. *J Bioenerg Biomembr*. 2009; 41 (2): 133-6.
15. Brennan JP, Southworth R, Medina RA, Davidson SM, Duchon MR, Shattock MJ. El desacoplamiento mitocondrial, con FCCP de baja concentración, induce una cardioprotección dependiente de ROS independiente de la activación del canal KATP. *Cardiovasc Res*. 2006; 72 (2): 313-21.
- 35 16. Murphy MP, Smith RAJ. Dirigiendo antioxidantes a las mitocondrias mediante conjugación a cationes lipofílicos. *Revisión anual de farmacología y toxicología*. 2007; 47 (1): 629-56.
17. Marrache S, Dhar S. Ingeniería de plataforma de nanopartículas combinadas para la administración de terapias que actúan en mitocondrias. *Procedimientos de la Academia Nacional de Ciencias*. 2012; 109 (40): 16288-93.
- 40 18. Smith RA, Hartley RC, Murphy MP. Terapias y sondas de moléculas pequeñas dirigidas a mitocondrias. *Antioxidantes y señalización redox*. 2011; 15: 3021-38.
19. Blaikie FH, Brown SE, Samuelsson LM, Brand MD, Smith RA, Murphy MP. Dirigir el dinitrofenol a las mitocondrias: limitaciones para el desarrollo de un protonóforo mitocondrial autolimitado. *Bioscience Reports*. 2006; 26 (3): 231-43.
- 45 20. Smith RA, Murphy MP. Estudios en animales y humanos con el antioxidante dirigido a mitocondrias MitoQ. *Anales de la Academia de Ciencias de Nueva York*. 2010; 1201: 96-103.
21. Rodriguez-Cuenca S, Cochemé HM, Logan A, Abakumova I, Prime TA, Rose C, Vidal-Puig A, Smith AC, Rubinsztein DC, Fearnley IM, Jones BA, Pope S, Heales SJR, Lam BYH, Neogi SG, McFarlane Yo, James AM, Smith RAJ, Murphy MP. Consecuencias de la administración oral a largo plazo del antioxidante MitoQ dirigido a mitocondrias

- a ratones de tipo salvaje. *Radiología Libre y Medicina*. 2010; 48 (1): 161-72.
22. Horton KL, Stewart KM, Fonseca SB, Guo Q, Kelley SO. Péptidos penetrantes de mitocondrias. *Química y biología*. 2008; 15 (4): 375-82.
- 5 23. Zhao K, Zhao G-M, Wu D, Soong Y, Birk AV, Schiller PW, Szeto HH. Los antioxidantes peptídicos permeables a las células dirigidos a la membrana mitocondrial interna inhiben la inflamación mitocondrial, la muerte celular oxidativa y la lesión por reperfusión. *Revista de Química Biológica*. 2004; 279 (33): 34682-90.
24. Bryson DI, Zhang W, Ray WK, Santos WL. Detección de una biblioteca de péptidos ramificados con ARN TAR VIH-1. *Mol BioSyst*. 2009; 5: 1070-3.
- 10 25. Bryson DI, Zhang W, McLendon PM, Reineke TM, Santos WL. Hacia la estructura de ARN dirigida: péptidos ramificados como ligandos permeables a las células al ARN TAR. *ACS Chemical Biology*. 2012; 7 (1): 210-7. PMID: 3262918.
26. Hoehn KL, Hohnen-Behrens C, Cederberg A, Wu LE, Turner N, Yuasa T, Ebina Y, James DE. Los defectos independientes del IRS1 definen los principales nodos de resistencia a la insulina. *Cell Metab*. 2008; 7 (5): 421-33.
- 15 27. Hoehn KL, Salmon AB, Hohnen-Behrens C, Turner N, Hoy AJ, Maghzal GJ, Stocker R, Van Remmen H, Kraegen EW, Cooney GJ, Richardson AR, James DE. La resistencia a la insulina es un mecanismo de defensa antioxidante celular. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106 (42): 17787-92. PMID: 2764908.
28. Hoehn KL, Turner N, Swarbrick MM, Wilks D, Preston E, Phua Y, Joshi H, Furler SM, Larance M, Hegarty BD, Leslie SJ, Pickford R, Hoy AJ, Kraegen EW, James DE, Cooney GJ. La regulación positiva aguda o crónica de la oxidación de ácidos grasos mitocondriales no tiene un efecto neto sobre el gasto energético o la adiposidad de todo el cuerpo. *Cell Metab*. 2010; 11 (1): 70-6.
- 20 29. MacArthur DG, Seto JT, Chan S, Quinlan KG, Raftery JM, Turner N, Nicholson MD, Kee AJ, Hardeman EC, Gunning PW, Cooney GJ, Head SI, Yang N, North KN. Un ratón knockout Actn3 proporciona información mecanicista sobre la asociación entre la deficiencia de alfa-actinina-3 y el rendimiento atlético humano. *Hum Mol Genet*. 2008; 17 (8): 1076-86.
- 25 30. Patel SA, Hoehn KL, Lawrence RT, Sawbridge L, Talbot NA, Tomsig JL, Turner N, Cooney GJ, Whitehead JP, Kraegen EW, Cleasby ME. La sobreexpresión del receptor de adiponectina AdipoR1 en el músculo esquelético de rata amplifica la sensibilidad local a la insulina. *Endocrinología*. 2012.
31. Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseaux E, Chauvin MA, Morio B, Vidal H, Rieusset J. La disfunción mitocondrial resulta del estrés oxidativo en el músculo esquelético de ratones resistentes a la insulina inducidos por la dieta. *J Clin Invest*. 2008; 118 (2): 789-800.
- 30 32. Sauerbeck A, Pandya J, Singh I, Bittman K, Readnower R, Bing G, Sullivan P. Análisis de la bioenergética mitocondrial cerebral regional y la susceptibilidad a la inhibición mitocondrial utilizando un sistema basado en microplacas. *J Neurosci Métodos*. 2011; 198 (1): 36-43. PMID: 3535268.
33. Djouadi F, Riveau B, Merlet-Benichou C, Bastin J. Regulación específica del tejido del gen de la acil-CoA deshidrogenasa de cadena media por las hormonas tiroideas en la rata en desarrollo. *Biochem J*. 1997; 324 (Pt 1): 289-94. PMID: 1218429.
- 35 34. Bruce CR, Thrush AB, Mertz VA, Bezaire V, Chabowski A, Heigenhauser GJ, Dyck DJ. El entrenamiento de resistencia en humanos obesos mejora la tolerancia a la glucosa y la oxidación de los ácidos grasos mitocondriales y altera el contenido de lípidos musculares. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 291 (1): E99-E107.
- 40 35. Turner N, Bruce CR, Beale SM, Hoehn KL, So T, Rolph MS, Cooney GJ. La disponibilidad excesiva de lípidos aumenta la capacidad oxidativa de los ácidos grasos mitocondriales en el músculo: evidencia contra el papel de la reducción de la oxidación de los ácidos grasos en la resistencia a la insulina inducida por lípidos en roedores. *Diabetes*. 2007; 56 (8): 2085-92.
36. Kim JY, Hickner RC, Cortright RL, Dohm GL, Houmard JA. La oxidación lipídica se reduce en el músculo esquelético humano obeso. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000; 279 (5): E1 039-44.
- 45 37. Lin L, Saha PK, Ma X, Henshaw IO, Shao L, Chang BH, Buras ED, Tong Q, Chan L, McGuinness OP, Sun Y. La ablación del receptor de grelina reduce la adiposidad y mejora la sensibilidad a la insulina durante el envejecimiento al regular el metabolismo de las grasas en tejidos adiposos blancos y marrones. *Envejecimiento celular*. 2011; 10 (6): 996-1010. PMID: 3215833.

50 Ejemplo 3

La fosforilación oxidativa en las mitocondrias es intrínseca a la producción de energía en las células eucariotas

aeróbicas. Este proceso, que se diagrama en el Ejemplo 3, Figura 1A, implica el acoplamiento de la oxidación de nutrientes a la producción de ATP a través de un ciclo de protones a través de la membrana interna mitocondrial. Cualquier vía que permita la reentrada de protones en la matriz independientemente de la ATP sintasa «desacopla» la oxidación de nutrientes de la producción de ATP. El desacoplamiento suave tiene efectos antioxidantes al disminuir la fuerza motriz del protón y acortar el tiempo de ocupación de electrones individuales en los portadores de electrones dentro de la cadena de transporte de electrones. En contraste, una alta fuerza motriz de protones conduce a un estado más reducido de la cadena de transporte de electrones y aumenta la tasa de producción de superóxido mitocondrial (1-3). El desacoplamiento genético y farmacológico tiene efectos beneficiosos sobre los trastornos relacionados con el estrés oxidativo mitocondrial (es decir, lesión por reperfusión isquémica (4-7), enfermedad de Parkinson (8), resistencia a la insulina (9-10), envejecimiento (11) e insuficiencia cardíaca (12)) y trastornos que pueden beneficiarse del aumento del gasto energético tal como la obesidad (13).

Los dos desacopladores químicos más utilizados, 2,4-dinitrofenol (DNP) y *p*-trifluorometoxifenilhidrazona de cianuro de carbonilo (FCCP), se descubrieron hace más de 50 años, pero siguen siendo los reactivos de elección para los estudios bioenergéticos mitocondriales. FCCP es más potente que DNP y se prefiere para el estudio de la función mitocondrial, mientras que DNP es menos potente y tiene más utilidad *in vivo*. Se cree que una de las limitaciones más significativas de DNP y FCCP es su actividad transportadora de protones (protonóforo) en la membrana plasmática (14-16). La actividad de protonóforo en la membrana plasmática induce la despolarización y conduce a una gama de efectos fuera del objetivo, incluida la apertura de canales iónicos sensibles al voltaje (17). En algunas células, más del 50 % del gasto de energía celular se utiliza para mantener los gradientes de iones celulares (18), por lo tanto, la combinación de la despolarización crónica de la membrana plasmática con la eficiencia reducida de la producción de ATP mitocondrial conduce a una mayor citotoxicidad a altas concentraciones.

Resultados del ejemplo 3

Para identificar nuevos desacopladores mitocondriales con baja toxicidad, desarrollamos una pantalla de molécula pequeña basada en células. Nuestra pantalla primaria identificó moléculas que aumentaron el consumo de oxígeno celular (O_2), un indicador del aumento de la fosforilación oxidativa. En este ensayo, se sembraron células de mioblastos L6 en una placa de 96 pocillos que contenía un fluoróforo sensible al O_2 incorporado en silicona en la base del pocillo (Ejemplo 3, Fig. S1). Cada compuesto se cribó a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se usó FCCP como control positivo (Ejemplo 3, Fig. S1B). Los resultados positivos se sometieron a una pantalla secundaria para identificar y eliminar aquellos que aumentaron el consumo de oxígeno celular a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ejemplo 3, Fig. S2). Los compuestos base que no aumentaron la producción de ROS y que no estaban relacionados estructuralmente con los desacopladores conocidos se probaron adicionalmente en un intervalo de concentración de 10 nM a 10 μM para determinar su índice de dosificación efectivo. Este algoritmo identificó a BAM15 como un agonista del consumo de oxígeno (Ejemplo 3, Fig. S1C) que redujo las ROS celulares (Ejemplo 3, Fig. S2) y tenía un amplio intervalo dinámico en mioblastos, cardiomiocitos ventriculares de rata neonatales primarios y células hepáticas murinas normales (Ejemplo 3, figuras 1C y S3). Las altas tasas de respiración inducidas por BAM15 fueron acompañadas por un aumento proporcional en la tasa de acidificación extracelular; que es una medida correlativa tanto de la glucólisis como de la condensación de CO_2 con H_2O para formar HCO_3^- y H^+ de oxidación de nutrientes (Ejemplo 3, Fig. S4).

A continuación, BAM15 se sometió a una serie de ensayos bioquímicos para determinar si poseía las propiedades requeridas de un desacoplador de protones mitocondriales. Estos ensayos probaron la capacidad de BAM15 para: 1) estimular OCR cuando se inhibe la ATP sintasa; 2) despolarizar la membrana interna mitocondrial; 3) estimular la respiración en mitocondrias aisladas; y 4) aumentar el OCR sin donar electrones a la cadena de transporte de electrones. Como se muestra en las Figuras 1D-F, BAM15 cumplió todos estos criterios.

Primero, BAM15 estimuló la respiración mitocondrial en presencia de la oligomicina inhibidora de la ATP sintasa en mioblastos L6 (Ejemplo 3, Fig. 1D). En este experimento, se usaron BAM15 y FCCP en una concentración equipotente de 1 μM para que se pudiera hacer una comparación directa entre estos dos desacopladores. Sin embargo, BAM15 logró tasas de respiración más altas que la FCCP en las células L6 y NMuLi cuando los desacopladores se administraron a 2 μM o 10 μM (Ejemplo 3, Fig. S5). En segundo lugar, el tratamiento con BAM15 de mioblastos L6 despolarizó mitocondrias, como lo demuestra un cambio hacia la izquierda en la fluorescencia del tinte potencial de membrana mitocondrial catiónica TMRM (Ejemplo 3, Fig. 1E).

A la luz del amplio intervalo dinámico que observamos para BAM15, probamos los efectos de BAM15 y FCCP en la electrofisiología de la membrana plasmática de las células L6 utilizando grabaciones de pinzas de parche de células completas. Bajo pinza de tensión, FCCP indujo una corriente hacia dentro con un potencial de retención de -70 mV que era completamente recuperable en el lavado y repetible en múltiples aplicaciones. Además, la corriente inducida por FCCP era dependiente de la dosis y estaba asociada con un aumento en la conductancia (Ejemplo 3, Figs. 2A-F). En contraste, BAM15 no provocó un cambio apreciable en la corriente en las mismas células en ninguna de las concentraciones y en un amplio intervalo de tensión. Solo la FCCP causó la despolarización de la membrana plasmática reversible y repetible bajo la pinza de corriente en el potencial de membrana en reposo (Ejemplo 3, Figs. 2G-H), y con inyección de corriente para producir un potencial de membrana a -70 mV (datos no mostrados). Los efectos diferenciales de BAM15 y FCCP en las propiedades de la membrana plasmática fueron independientes del orden de aplicación del desacoplador (datos no mostrados). Estos datos indican que BAM15 no comparte los efectos

adversos de la membrana plasmática que se cree que restringen el uso de FCCP.

Dado que BAM15 carece de actividad protonóforo de la membrana plasmática, examinamos la viabilidad celular relativa después del tratamiento con BAM15. La viabilidad celular se determinó después de 48 horas de exposición a dosis crecientes de BAM15 o FCCP (hasta 50 μ M). BAM15 fue de 2 a 4 veces menos citotóxico que FCCP en mioblastos, hepatocitos y cardiomiocitos cultivados (Ejemplo 3, Fig. 3). Los ejemplos representativos de la tinción con cristal violeta y las imágenes de microscopía de contraste de fase demuestran las diferencias en el número de células y la morfología en los pocillos tratados con BAM15, en comparación con las concentraciones equimolares de FCCP (Ejemplo 3, Figs. 3A-B).

Uno de los usos biológicos establecidos de los desacopladores mitocondriales es la protección contra la lesión por reperfusión isquémica (7, 21). El desacoplamiento reduce el estrés oxidativo mitocondrial inducido por reperfusión y la fragmentación mitocondrial (4, 22). Por ejemplo, el precondicionamiento isquémico requiere una regulación positiva de la proteína de desacoplamiento 2 (UCP2) para prevenir la lesión por reperfusión isquémica (5, 7). Dada la potente y selectiva actividad de desacoplamiento de BAM15, probamos su potencial terapéutico *in vivo* utilizando un modelo de ratón de lesión por reperfusión isquémica renal. En este modelo, BAM15 se administró como un bolo intraperitoneal único a 1 mg/kg o 5 mg/kg una hora antes de 26 minutos de isquemia renal bilateral y 48 horas de reperfusión. En comparación con el vehículo, los ratones tratados con BAM15 estaban protegidos del daño renal según lo determinado por una disminución dependiente de la dosis en los niveles de creatinina en plasma a las 24 y 48 h después de la isquemia (Ejemplo 3, Fig. 4A). El análisis histológico de la médula externa del riñón teñida con H&E demostró que el tratamiento con BAM15 redujo notablemente la necrosis tubular, el agotamiento de las vellosidades del borde en cepillo y la obstrucción de los túbulos proximales (Ejemplo 3, Fig. 4B-C). Además, los ratones pretratados con BAM15 tuvieron una disminución dependiente de la dosis en la infiltración de leucocitos en comparación con los controles del vehículo (Ejemplo 3, Fig. S6).

En resumen, informamos de la identificación de BAM15 como un nuevo quimiotipo de desacoplador de protones de mitocondrias. BAM15 es altamente potente y demuestra un mayor intervalo dinámico máximamente efectivo que el desacoplador estándar de oro FCCP. A diferencia de FCCP, BAM15 despolariza las mitocondrias sin afectar al potencial de la membrana plasmática. Estas cualidades permiten a BAM15 mantener tasas máximas de respiración mitocondrial con baja citotoxicidad, y permiten el estudio de la función mitocondrial en células intactas sin interferencia de los efectos fuera del objetivo en la membrana plasmática. Además, en comparación con FCCP, BAM15 estimula una mayor respiración celular máxima en la mayoría de las líneas celulares analizadas (Ejemplo 3, Fig. S3), lo que sugiere que FCCP puede subestimar la respiración mitocondrial máxima debido a la toxicidad. Finalmente, la capacidad de BAM15 para proteger contra la lesión por reperfusión isquémica renal demuestra la eficacia preclínica y proporciona un optimismo renovado de que los protonóforos pueden ser útiles de nuevo para la intervención médica en la miríada de trastornos relacionados con la disfunción mitocondrial.

Ejemplo 3 - Bibliografía

1. S. S. Korshunov, V. P. Skulachev, A. A. Starkov, FEBS Lett 416, 15 (13 de octubre, 1997).
2. J. F. Turrens, representante de Biosci 17, 3 (febrero, 1997).
3. C. L. Quinlan et al., J Biol Chem 287, 27255 (3 de agosto, 2012).
4. M. N. Sack, Cardiovasc Res 72, 210 (1 de noviembre, 2006).
5. C. J. McLeod, A. Aziz, R. F. Hoyt, Jr., J. P. McCoy, Jr., M. N. Sack, J Biol Chem 280, 33470 (30 de septiembre, 2005).
6. A. S. Korde, L. C. Pettigrew, S. D. Craddock, W. F. Maragos, J Neurochem 94, 1676 (septiembre, 2005).
7. M. Modriansky, E. Gabrielova, J Bioenerg Biomembr 41, 133 (abril, 2009).
8. Y. N. Wu, A. C. Munhall, S. W. Johnson, Brain Res 1395, 86 (13 de junio, 2011).
9. E. J. Anderson et al., J Clin Invest, (2 de febrero, 2009).
10. K. L. Hoehn et al., Proc Natl Acad Sci U S A 106, 17787 (20 de octubre, 2009).
11. C. C. Caldeira da Silva, F. M. Cerqueira, L. F. Barbosa, M. H. Medeiros, A. J. Kowaltowski, Aging Cell 7, 552 (agosto, 2008).
12. J. P. Brennan et al., Cardiovasc Res 72, 313 (1 de noviembre, 2006).
13. Y. H. Tseng, A. M. Cypess, C. R. Kahn, Nat Rev Drug Discov 9, 465 (junio, 2010).
14. K. S. Park et al., Pflugers Arch 443, 344 (Jan, 2002).

15. S. K. Juthberg, T. Brismar, *Cell Mol Neurobiol* 17, 367 (agosto, 1997).
16. T. Brismar, V. P. Collins, *J Physiol* 460, 365 (enero, 1993).
17. K. J. Buckler, R. D. Vaughan-Jones, *J Physiol* 513 (Pt 3), 819 (15 de diciembre, 1998).
18. C. Howarth, P. Gleeson, D. Attwell, *J Cereb Blood Flow Metab* 32, 1222 (julio, 2012).
- 5 19. G. W. Rogers et al., *PLoS One* 6, e21746 (2011).
20. P. H. Lou et al., *Biochem J* 407, 129 (1 de octubre, 2007).
21. E. Y. Plotnikov et al., *Biochemistry (Mosc)* 77, 1029 (septiembre, 2012).
22. M. Zhan, C. Brooks, F. Liu, L. Sun, Z. Dong, *Kidney Int* 83, 568 (abril, 2013).
23. A. S. Divakaruni et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, (19 de marzo, 2013).
- 10 24. L. Li et al., *J Clin Invest* 122, 3931 (1 de noviembre, 2012).
25. A. Bajwa et al., *J Am Soc Nephrol* 21, 955 (junio, 2010).
26. L. Li et al., *J Immunol* 178, 5899 (1 de mayo, 2007).

Ejemplo 4

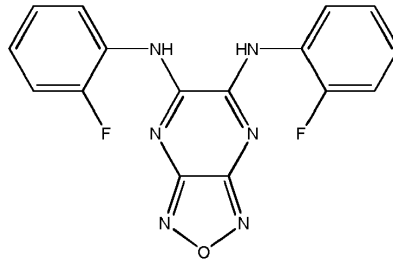
- 15 Se realizaron experimentos para medir la cantidad de BAM15 en la sangre después de la administración oral. Los ratones recibieron BAM15 por vía oral a 5 mg/kg y, a continuación, los niveles plasmáticos del medicamento se midieron con el tiempo. El análisis farmacocinético se demuestra en el Ejemplo 4, Figura 1.

Los títulos se incluyen en esta invención para referencia y para ayudar a localizar ciertas secciones. Estos títulos no tienen la intención de limitar el alcance de los conceptos descritos a continuación, y estos conceptos pueden tener aplicabilidad en otras secciones a lo largo de toda la especificación.

- 20 Aunque esta invención se ha descrito con referencia a realizaciones específicas, es evidente que otras realizaciones y variaciones de esta invención pueden ser desarrolladas por otros expertos en la técnica sin salirse del alcance de la invención.

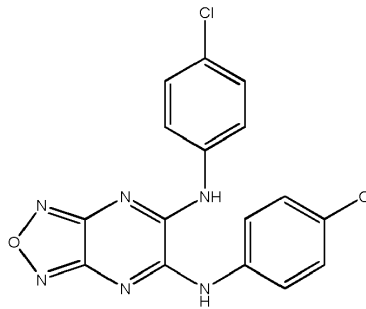
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección seleccionada del grupo que consiste en lesión por reperfusión isquémica, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, glucemia, tolerancia a la glucosa, sensibilidad a la insulina, adiposidad, resistencia a la insulina, obesidad, diabetes, neurodegeneración, lesión cerebral traumática, insuficiencia cardíaca, enfermedad de Parkinson; en el que dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



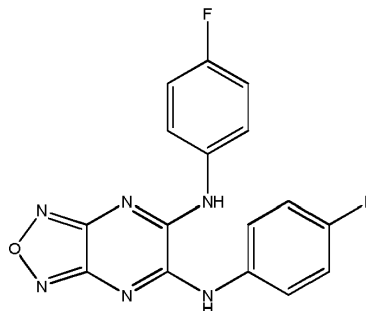
(2-fluorofenil){6-[(2-fluorofenil)amino](1,2,5-oxadiazolo[3,4-e]pirazin-5-il)}amina

BAM15



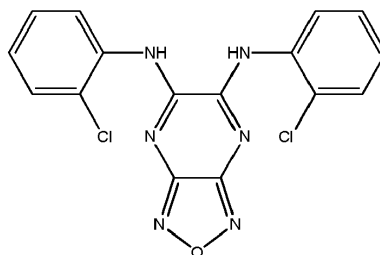
(4-clorofenil){6-[(4-clorofenil)amino](1,2,5-oxadiazolo[3,4-e]pirazin-5-il)}amina

BAM8

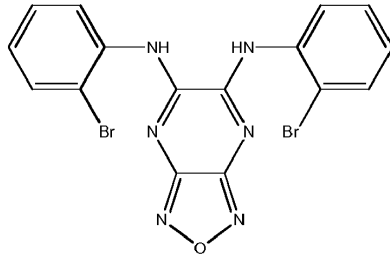


(4-fluorofenil){6-[(4-fluorofenil)amino](1,2,5-oxadiazolo[3,4-e]pirazin-5-il)}amina

BAM9

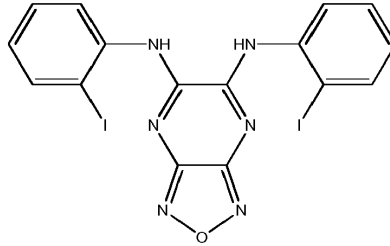


BAM15A,



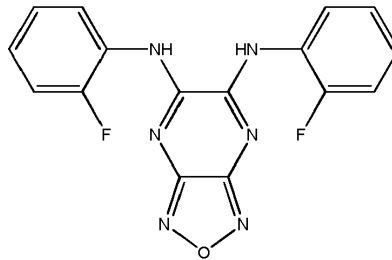
BAM15B,

y



BAM15C.

- 5 **2.** El compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto es BAM15:



(2-fluorofenil){6-[(2-fluorofenil)amino](1,2,5-oxadiazolo[3,4-e]pirazin-5-il)}amina

BAM15

- 10 **3.** El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha enfermedad es diabetes tipo II.
- 4.** El compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha afección es lesión por reperfusión isquémica y dicha lesión por reperfusión isquémica es lesión por reperfusión isquémica renal, lesión por reperfusión isquémica cerebral o lesión por reperfusión isquémica cardíaca.
- 15 **5.** El compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho tratamiento reduce el estrés oxidativo mitocondrial inducido por reperfusión y la fragmentación mitocondrial.
- 6.** El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho compuesto es para administración a una dosis que varía de 0,1 mg/kg a 50 mg/kg de peso corporal.
- 20 **7.** El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según la reivindicación 6, en el que dicho compuesto es para administración como una dosis unitaria que varía de 10 mg a 500 mg.
- 8.** El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que
- 25 (i) dicho compuesto aumenta el consumo de oxígeno, o
- (ii) dicho compuesto reduce las especies de oxígeno reactivo celular, o
- (iii) dicho compuesto despolariza la membrana interna mitocondrial, o

(iv) dicho compuesto aumenta la tasa de consumo de oxígeno sin donar electrones a la cadena de transporte de electrones.

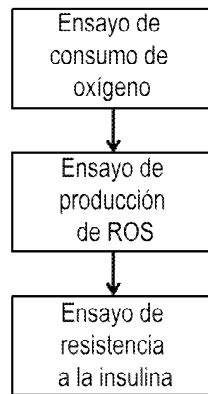


Figura 1. Diagrama de flujo. El consumo de oxígeno incrementado es un indicador principal de gasto de energía. Monitoreamos nuestra biblioteca mediante el uso de placas de biosensor de oxígeno de BD biosciences y confirmamos nuestras bases mediante el uso de un analizador de flujo extracelular Seahorse XF24 para evaluar el consumo de oxígeno celular. Las bases se monitorearon a continuación para la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS). Esta pantalla secundaria tiene 2 propósitos; eliminar compuestos que incrementan el consumo de oxígeno a través de la producción de ROS e identificar compuestos que son antioxidantes. Finalmente, determinaremos los efectos de sensibilización a la insulina de compuestos base mediante la prueba de su capacidad para revertir modelos múltiples de resistencia a la insulina que incluyen la hiperinsulinemia y la hiperlipidemia.

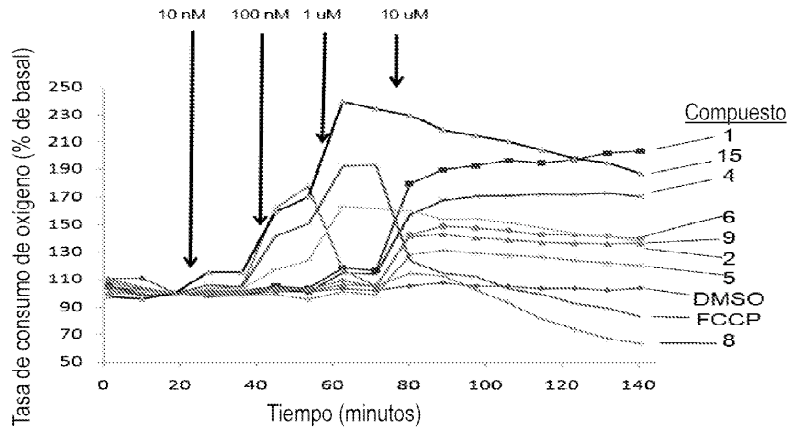


Figura 2. Los compuestos base incrementan el consumo de oxígeno celular. Los compuestos base mostraron un amplio intervalo de fenotipos. Los mioblastos L6 se trataron con una respuesta de dosis de cada base y FCCP, un desacoplador mitocondrial, se utilizó como un control positivo. Dos de nuestros compuestos (BAM 8 y BAM 15) fueron más potentes que FCCP (línea roja). Una característica de los desacopladores mitocondriales es que mostraron una curva en forma de campana invertida de efectividad – incrementan el consumo de oxígeno hasta una dosificación que inhibe la función mitocondrial. Esto se observa con los compuestos FCCP y BAM 8. Los otros compuestos no mostraron la característica de toxicidad mitocondrial de los desacopladores farmacológicos y varias moléculas tienen una ventana terapéutica sobre varios órdenes de magnitud. Los datos mostrados son promedios de 3 pocillos.

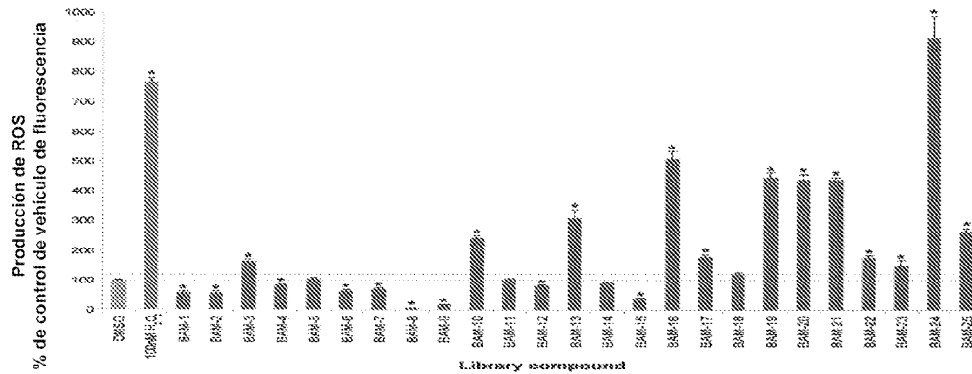


Figura 3. Pantalla secundaria de compuesto base para producción de ROS. Las células L6 se cargaron con CM-DCFDA 10uM, una coloración sensible a ROS, durante 1 hora antes de lavarse y tratarse con 10uM de cada compuesto durante 1 hora. DMSO y 100 nM de peróxido de hidrógeno se utilizaron como controles positivos y negativos. Los datos mostrados son un promedio de tres experimentos.

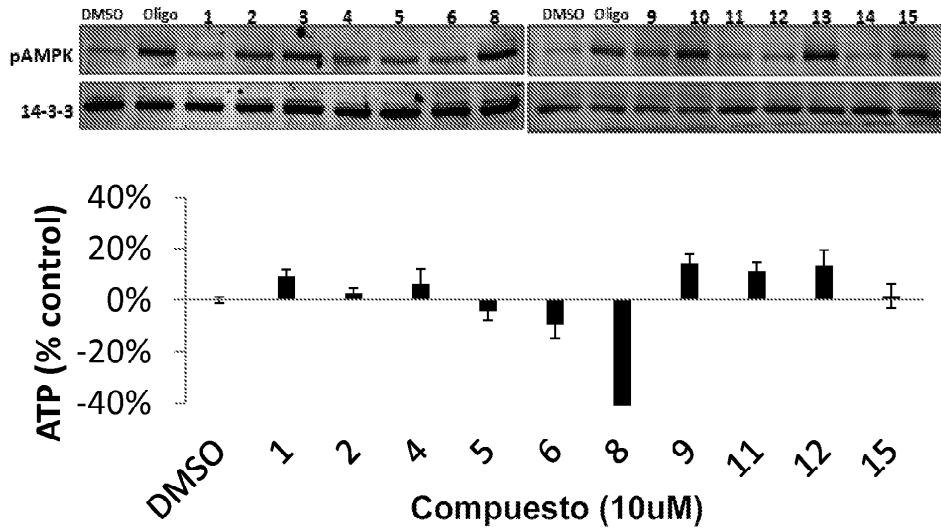
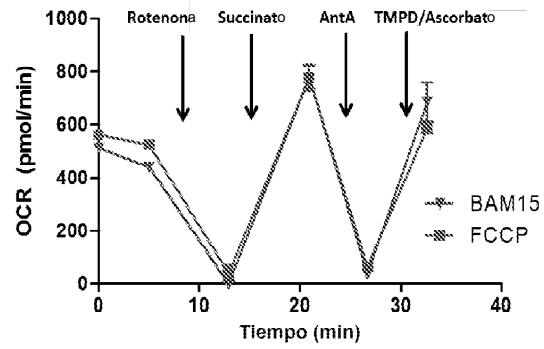
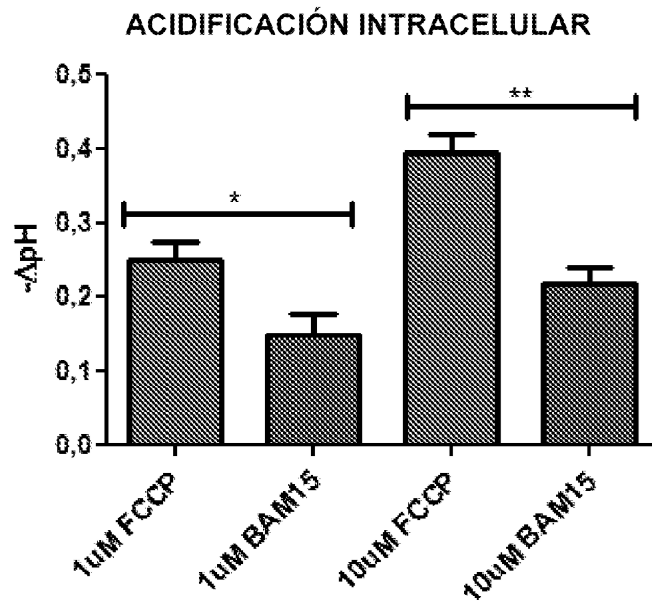


Figura 4. La activación AMPK y los niveles de ATP celular después del tratamiento con compuestos base. Las células L6 fueron tratadas con cada compuesto base (10 uM) y fosforilación de AMPK fue medida por transferencia Western (panel superior). La oligomicina, un inhibidor de la ATP sintasa, se utilizó como un control positivo. BAM-7 no estaba disponible para la adquisición por el proveedor. BAM-16 a través de BAN-25 no se probaron. 14-3-3 se transfirió como un control de carga de limpieza. Los niveles de ATP celular se midieron después del experimento de consumo de oxígeno de Seahorse XF24 mostrado en la figura 2 (> una hora con 10 uM de compuesto base).

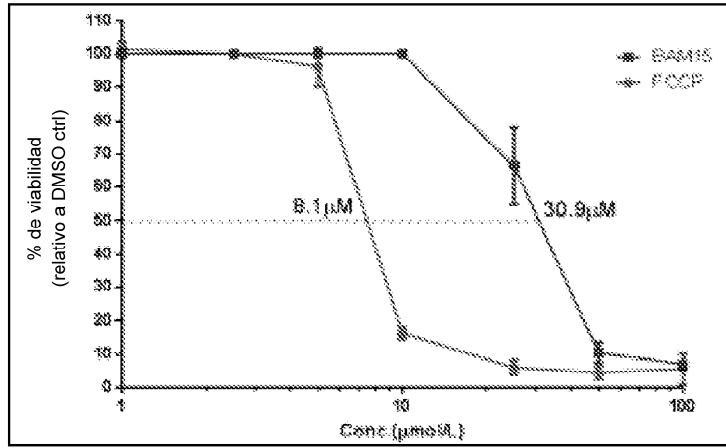


Ejemplo 2, Figura 1. BAM15 actúa en mitocondrias aisladas y no es un donante de electrones al ETC.

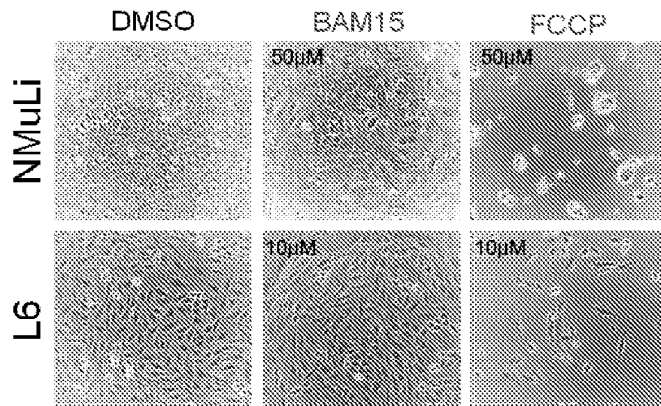


Ejemplo 2, Figura 2

A

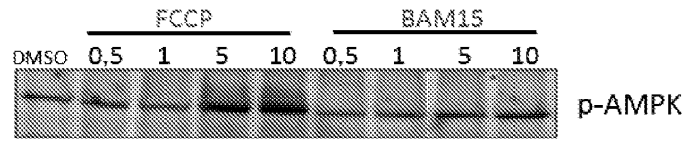


B

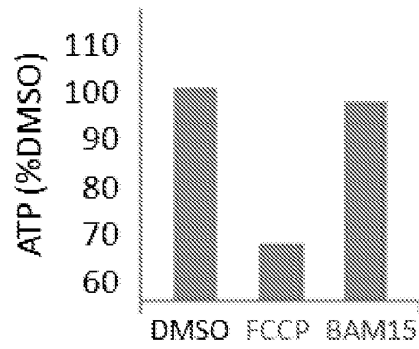


Ejemplo 2. Figura 3 A-B. BAM15 es menos citotóxico que FCCP.

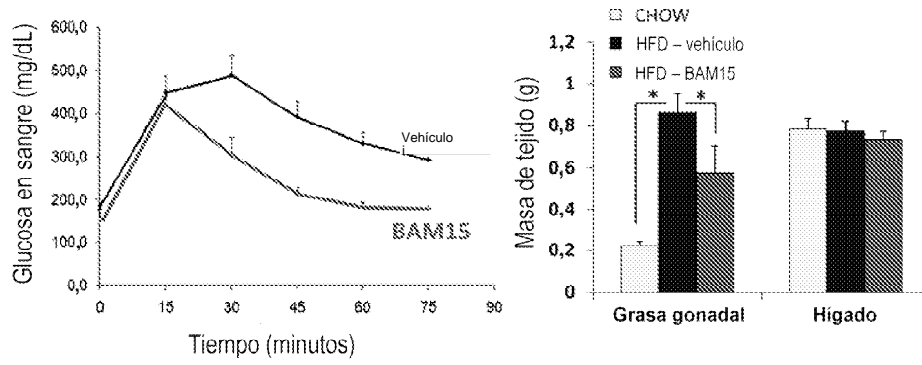
C



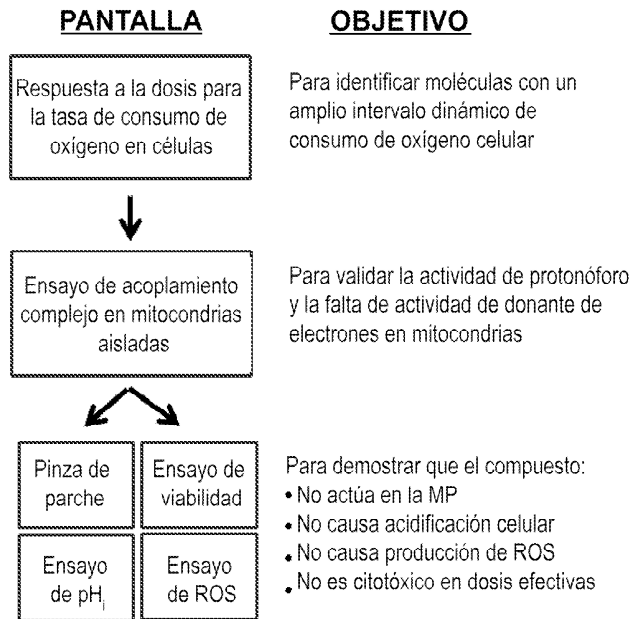
D



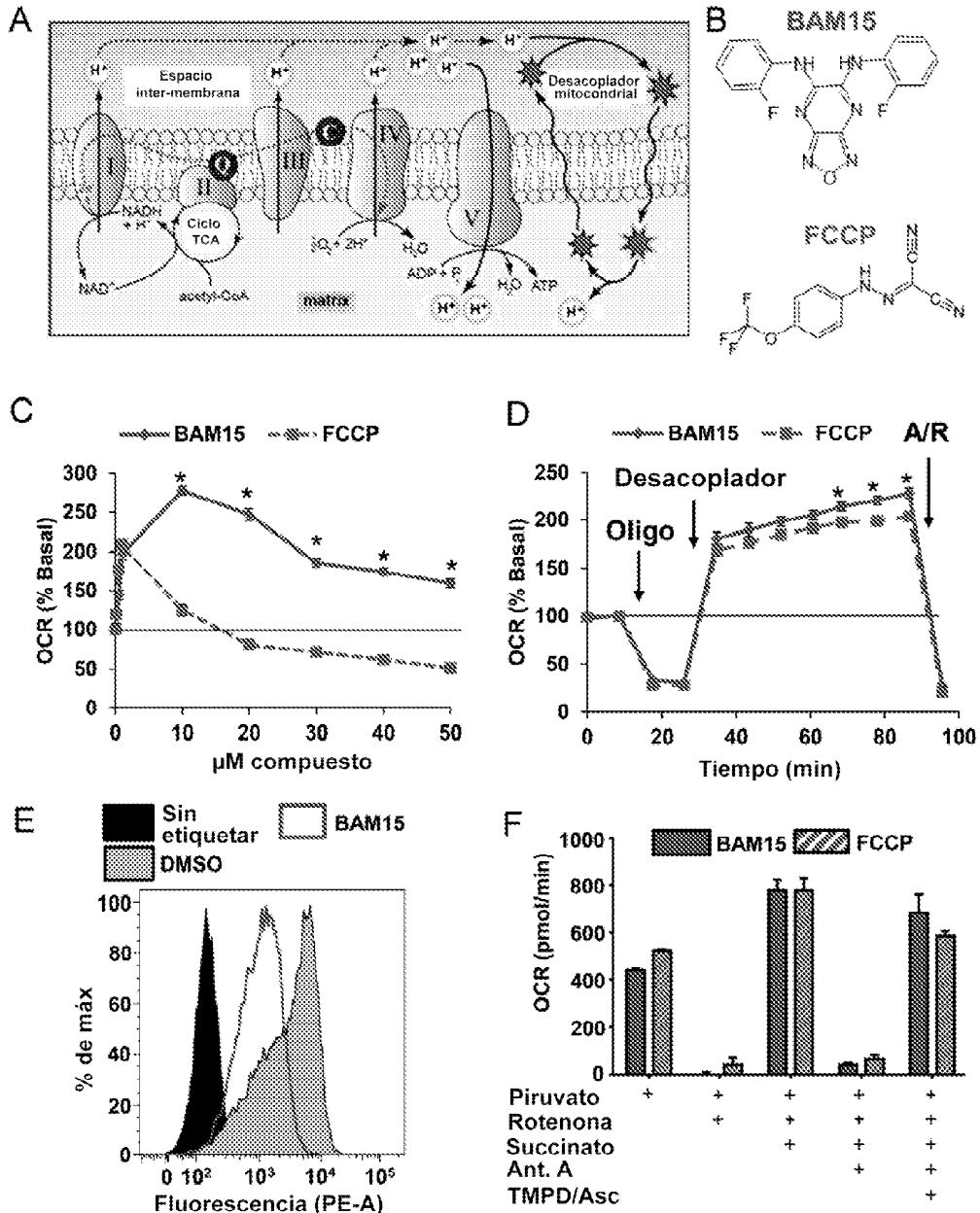
Ejemplo 2, Figura 3 C-D. BAM15 es menos citotóxico que FCCP.



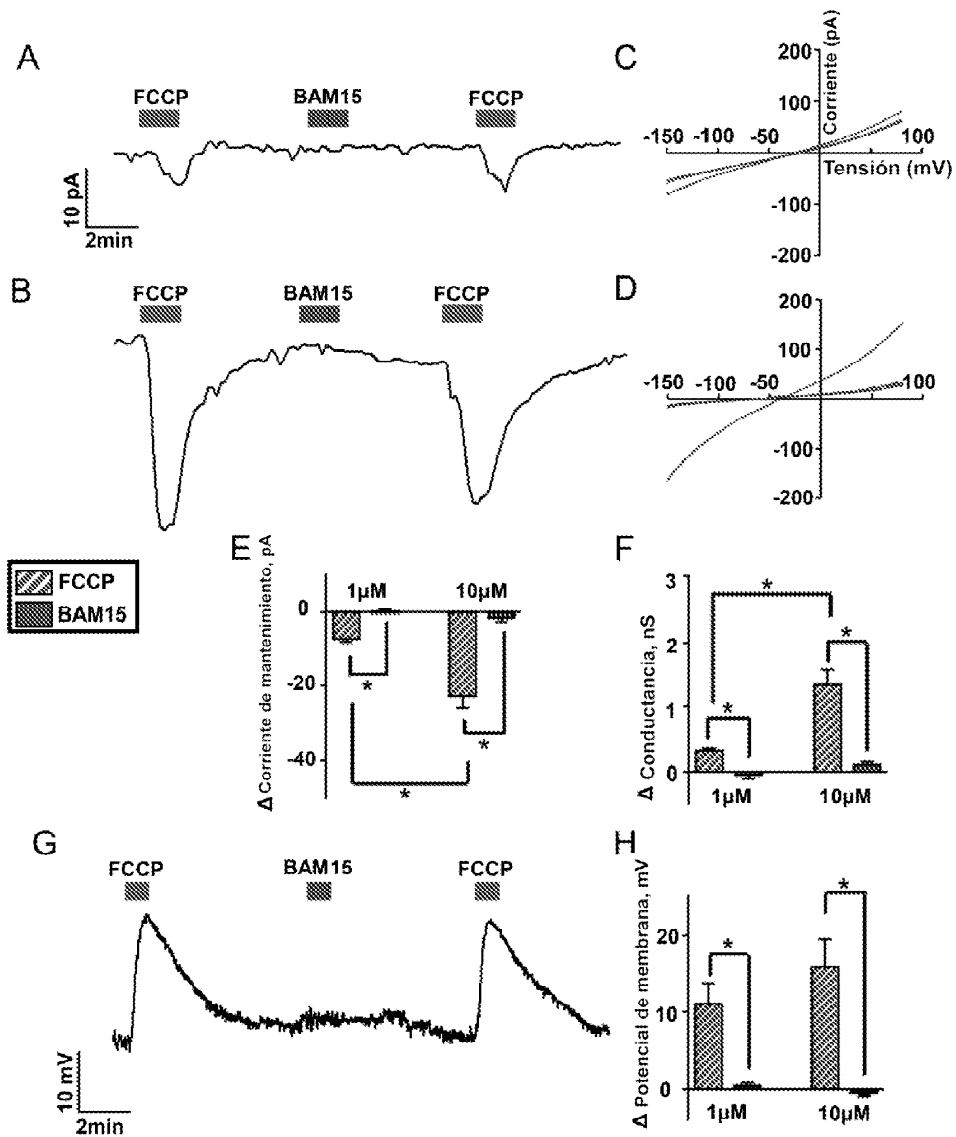
Ejemplo 2, Figura 4. El tratamiento de BAM15 promueve la tolerancia a la glucosa y la delgadez.



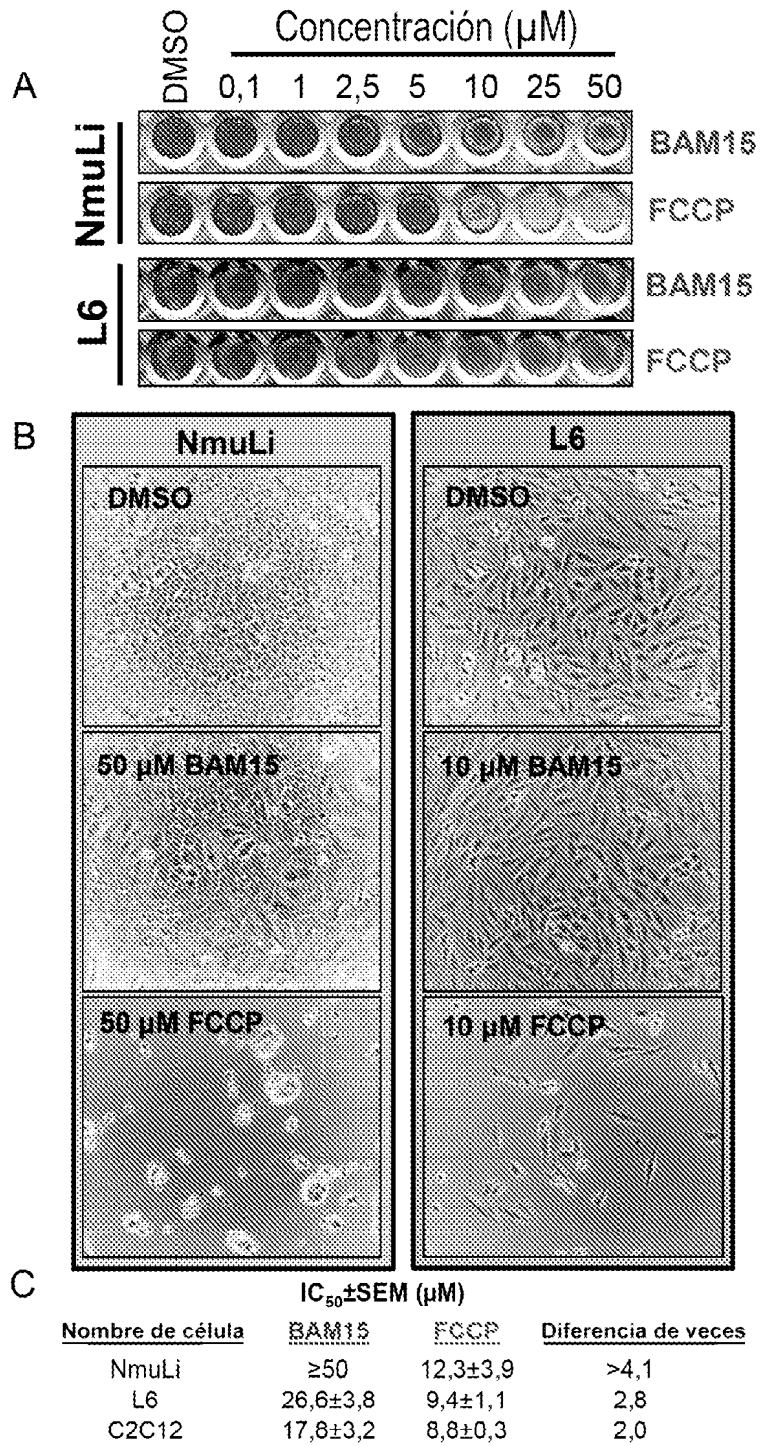
Ejemplo 2, Figura 5. Gráfico de flujo de las pantallas utilizado para identificar nuevos desacopladores mitocondriales.



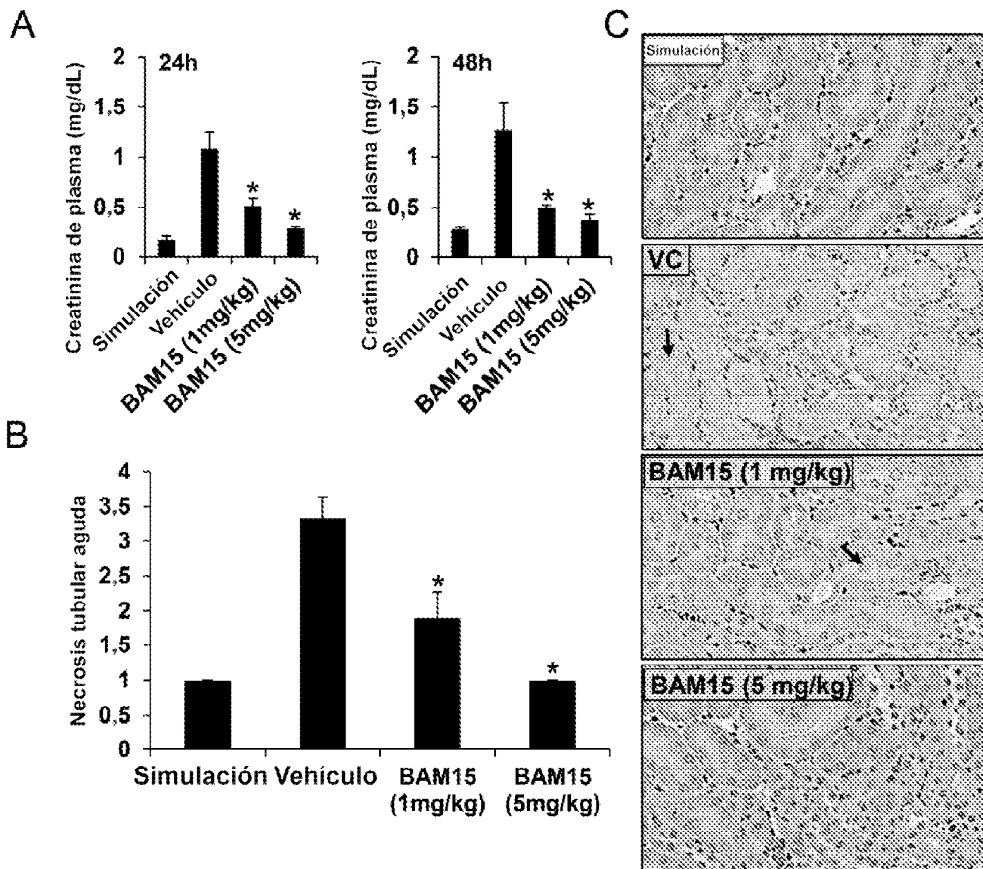
Ejemplo 3, Figura 1.



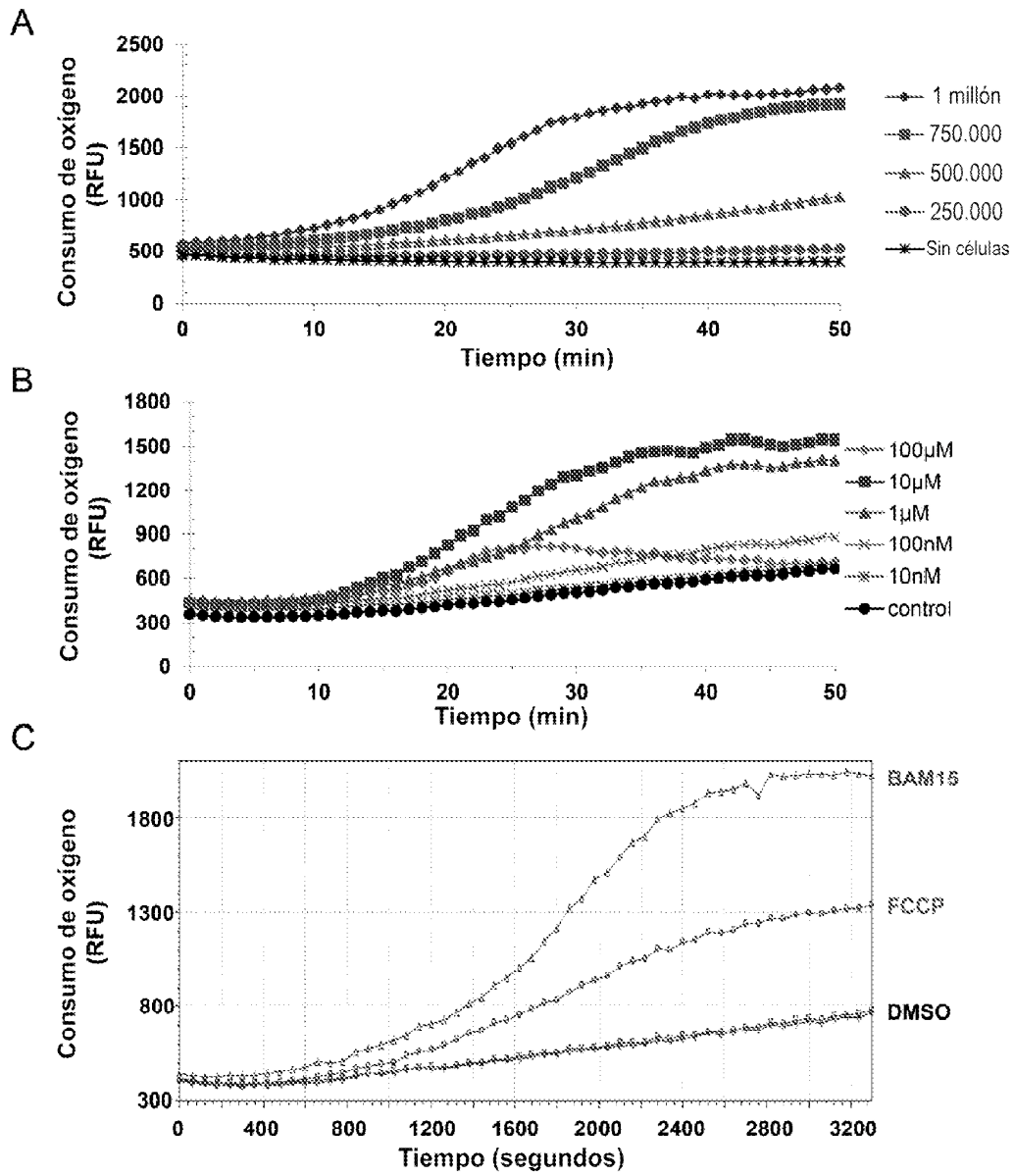
Ejemplo 3, Figura 2.



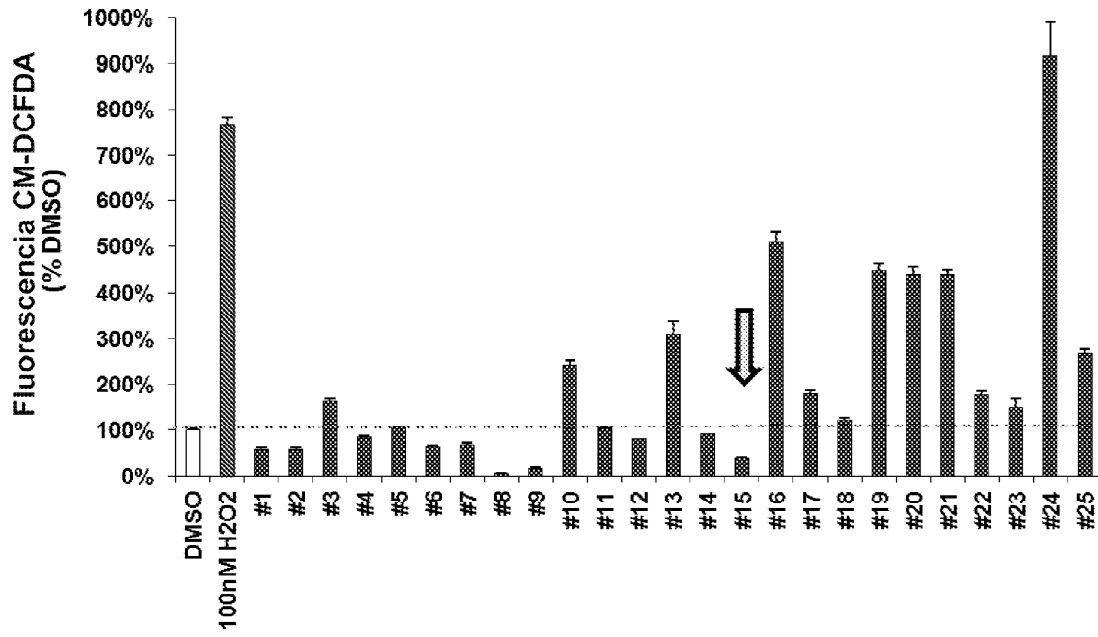
Ejemplo 3, Figura 3.



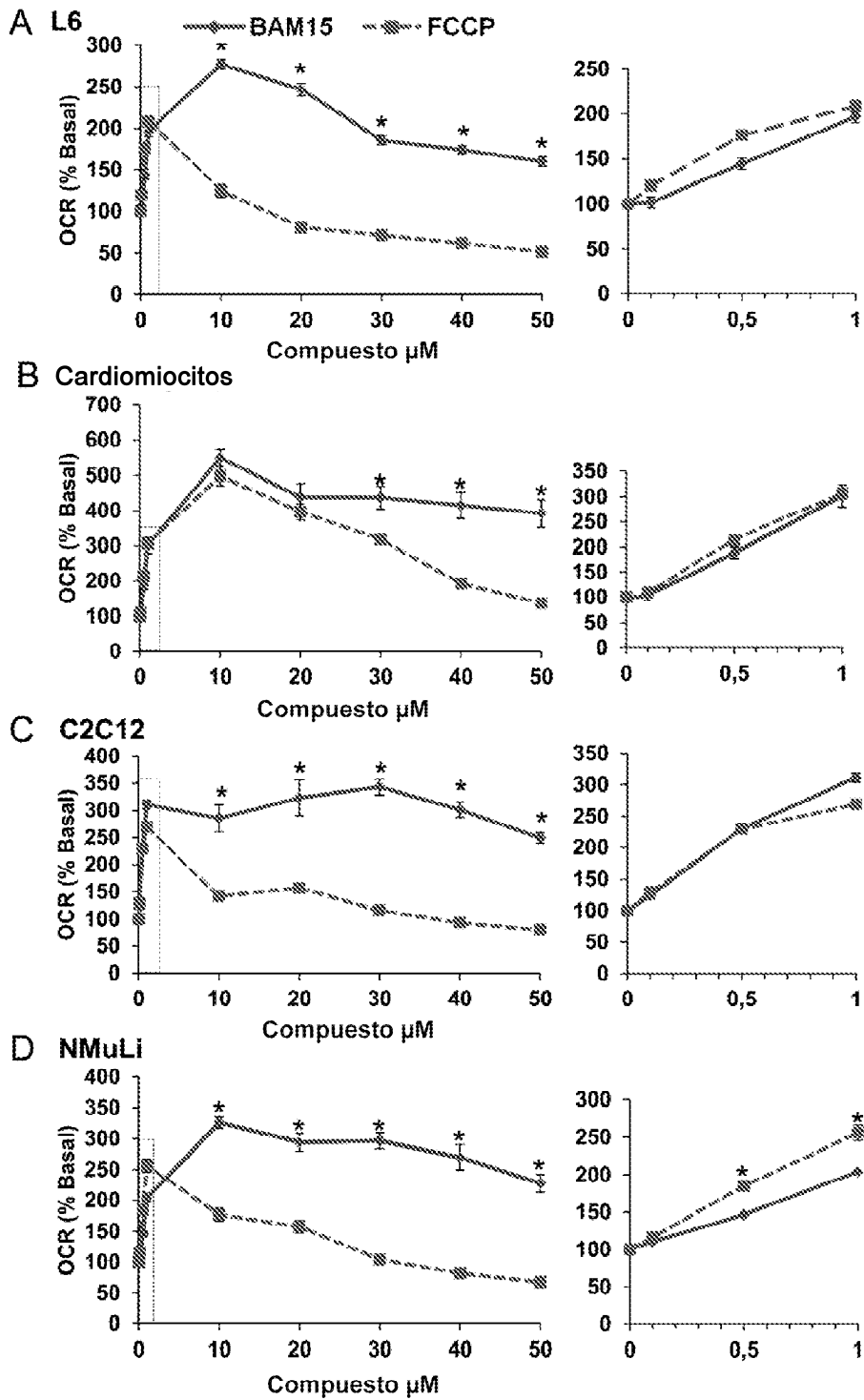
Ejemplo 3, Figura 4



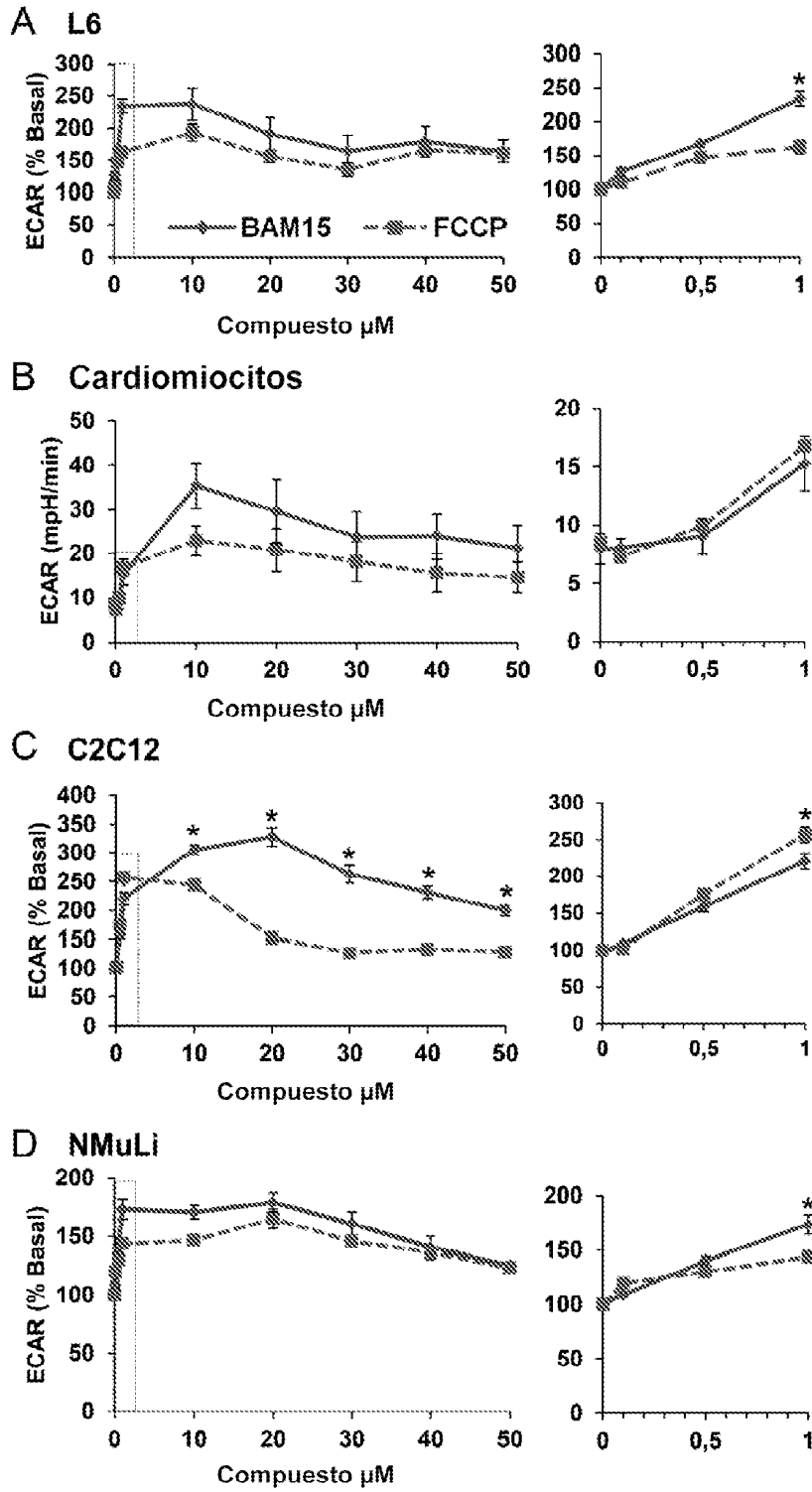
Ejemplo 3, Figura S1



Ejemplo 3, Figura S2

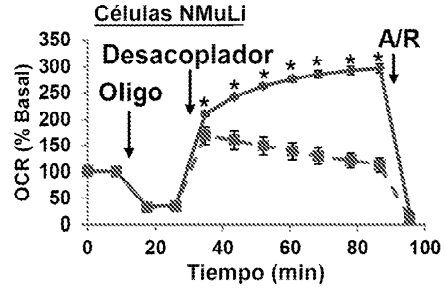
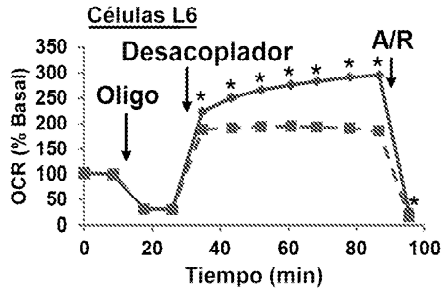


Ejemplo 3, Figura S3

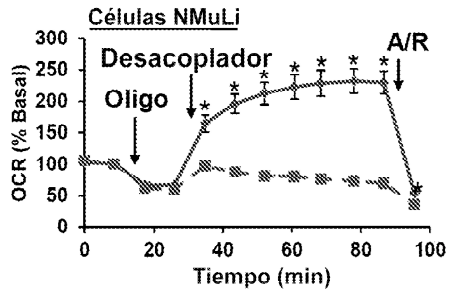
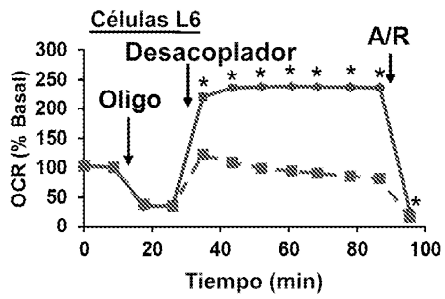


Ejemplo 3, Figura S4

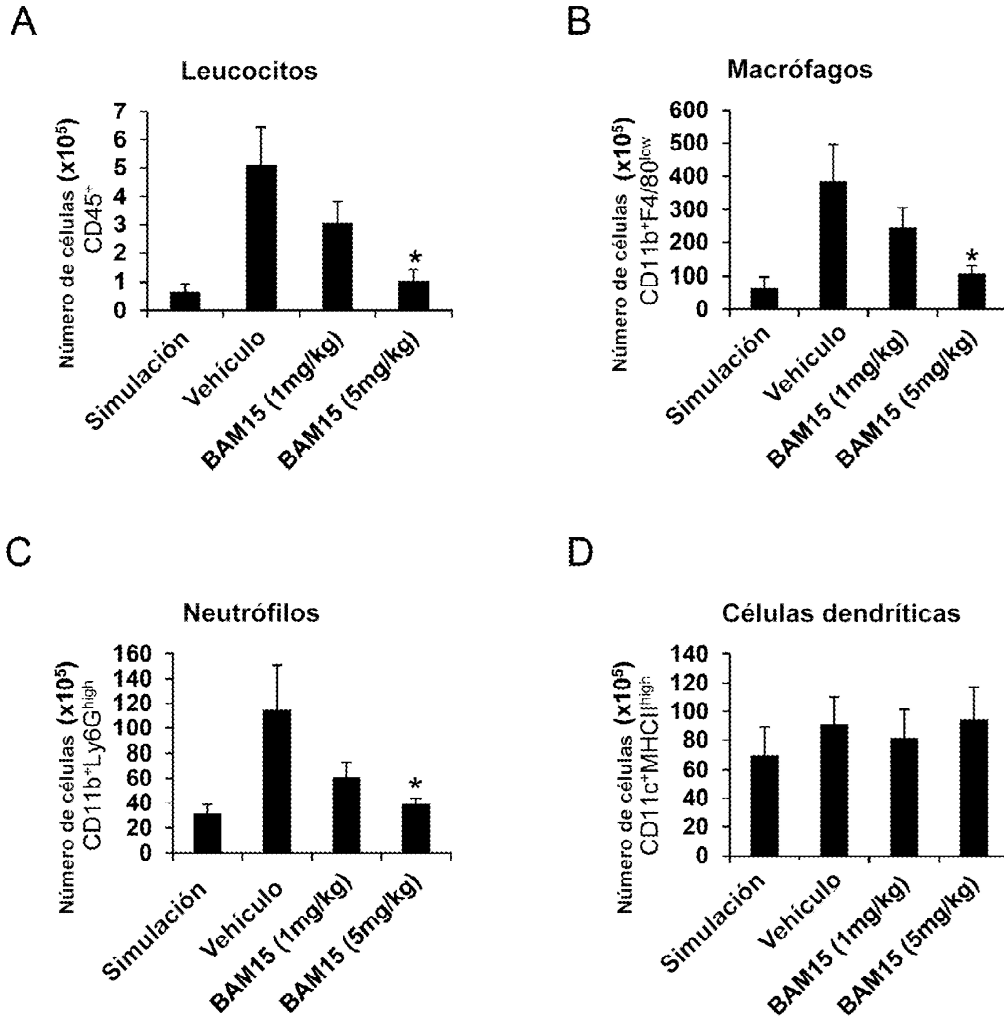
A desacoplador 2 μ M \leftarrow BAM15 \leftarrow FCCP



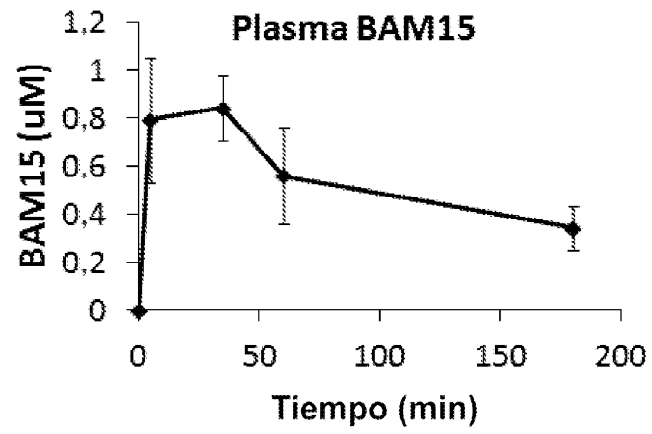
B desacoplador 10 μ M



Ejemplo 3. Figura S5



Ejemplo 3, Figura S6



Ejemplo 4, Figura 1