

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 815 539**

51 Int. Cl.:

C07D 471/10	(2006.01)	A61P 25/28	(2006.01)
A61K 31/445	(2006.01)	A61P 25/16	(2006.01)
A61K 31/4965	(2006.01)	A61P 9/06	(2006.01)
C07D 241/54	(2006.01)	C07D 401/04	(2006.01)
A61P 43/00	(2006.01)	C07D 207/36	(2006.01)
C07D 211/66	(2006.01)	C07D 207/416	(2006.01)
C07D 295/15	(2006.01)	C07D 207/273	(2006.01)
C07D 241/04	(2006.01)	A61K 31/454	(2006.01)
C07D 403/04	(2006.01)	A61K 31/435	(2006.01)
A61P 9/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.09.2016 PCT/IL2016/051020**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.03.2017 WO17046794**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2016 E 16845836 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 3350182**

54 Título: **Nuevos derivados de piperazina y piperidina, síntesis y uso de los mismos en la inhibición de la oligomerización de VDAC, la apoptosis y la disfunción mitocondrial**

30 Prioridad:

14.09.2015 US 201562217986 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.03.2021

73 Titular/es:

THE NATIONAL INSTITUTE FOR BIOTECHNOLOGY IN THE NEGEV LTD. (100.0%) Ben-Gurion University of the Negev P.O. Box 653 8410501 Beer-Sheva, IL

72 Inventor/es:

SHOSHAN-BARMATZ, VARDA y LEV GRUZMAN, ARIE

74 Agente/Representante:

GARCÍA-CABRERIZO Y DEL SANTO, Pedro María

ES 2 815 539 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

Nuevos derivados de piperazina y piperidina, síntesis y uso de los mismos en la inhibición de la oligomerización de VDAC, la apoptosis y la disfunción mitocondrial

5 La invención se refiere al uso de pequeños compuestos orgánicos que interactúan con el canal aniónico dependiente del voltaje (VDAC, por sus siglas en inglés), reduciendo su conductancia de canal y actuando como inhibidores de la oligomerización de VDAC, asociada con la inducción de apoptosis, para el tratamiento de enfermedades asociadas con apoptosis aumentada. En particular, la presente invención se refiere a los compuestos de Fórmulas generales (Id) para el tratamiento de enfermedades asociadas a la apoptosis aumentada, tales como enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares. La presente invención también abarca composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y procedimientos de uso de los compuestos y sus composiciones farmacéuticas.

15 El VDAC forma la principal interfaz entre los metabolismos mitocondrial y celular al mediar los flujos de iones, nucleótidos y otros metabolitos a través de la membrana mitocondrial externa (OMM, por sus siglas en inglés) (Shoshan-Barmatz, V., y col. (2010) *VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating both cell life and death*. *Molecular Aspects of Medicine* 31(3), 227-286; Shoshan-Barmatz, V. y Ben-Hail, D. (2012) *VDAC, a multi-functional mitochondrial protein as a pharmacological target*, *Mitochondrion*, 12(1):24-34). El VDAC también ha sido reconocido como una proteína clave en la apoptosis mediada por mitocondrias. El VDAC media la liberación de proteínas inductoras de apoptosis desde las mitocondrias al citosol y regula la apoptosis a través de la interacción con proteínas pro y antiapoptóticas (Shoshan-Barmatz, V., y col. (2010) *VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating both cell life and death*. *Molecular Aspects of Medicine* 31(3), 227-286; Shoshan-Barmatz V. y Golan M. (2012) *Mitochondrial VDAC: Function in cell life and death and a target for cancer therapy*, *Current Medicinal Chemistry* 19 (5), 714-735).

25 La piperazina y la piperidina se utilizan como motivos de subestructura esencial en varios fármacos. También se ha demostrado que los derivados de piperazina piperidina-2,5-diona son inhibidores de la enzima málica (Zhang, Y. John y col. 2006. *Biorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16, 525-528).

30 Journigan V B y col. : "*Nonpeptide small molecule agonist and antagonist original leads for neuropeptide FF1 and FF2 receptors*", *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 57, n.º 21, 13 de noviembre de 2014, páginas 8903-8927; Registro de la base de datos, número de registro 1385037-69-3; documento WO 2014/192865 A1 y Bauer A j y col.: "*Functional Model of Metabolite Gating by Human Voltage-dependent Anion Channel 2*", *Biochemistry*, vol. 50, n.º 17, 31 de diciembre de 2011, páginas 3408-3410, todos describen pequeños compuestos activos, en los que algunos de ellos pueden usarse, por ejemplo, como inhibidores de la oligomerización de VDAC. Guo X y col.: "*Discovery of Aroyl Piperazine Derivatives as IKr & IKs Dual Inhibitors for Cardiac Arrhythmia Treatment*", *Medicinal Chemistry*, vol. 10, n.º 5, 31 de mayo de 2014, páginas 497-505; los documentos CN 1944 424 A (China Pharmaceutical Univeristy) y WO 2008/063984 A2 (King Pharmaceuticals Research & Development Inc), 29 de mayo de 2008, se refieren a compuestos para el tratamiento de arritmias tales como arritmias cardíacas. El documento CN 1948 298 A (Dongnan University) y Gu L.: "*Synthesis of N-[4-[4-[2-(trifluoromethoxy)phenyl]-1-piperazinyl]butyl]carboxamide derivatives and determination of their activity as dopamine D3 receptor ligands*". *Journal of Hainan Normal University (Natural Science)*, vol. 20, n.º 4, diciembre de 2007, páginas. 324-345 se refieren a compuestos para el tratamiento de afecciones del sistema nervioso central tales como la enfermedad de Parkinson. Kempter G y col.: "*Synthesis of heteroanalogs of piperidinoacetanilides*" *Wissenschaftliche Zeitschrift-Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg-Mathematisch-Natur-wissenschaftliche Reihe*, vol. 32, n.º 5, 1983, páginas 3-25 describe esquemas de reacción de los compuestos del título.

50 Los presentes inventores han descubierto ahora que los miembros de un nuevo grupo de compuestos basados en piperazina y piperidina interactúan directamente con la oligomerización del VDAC y presentan una alta actividad inhibidora de la misma, por lo que resultan útiles como inhibidores de su conductancia de canal, de su oligomerización y, por consiguiente, como inhibidores de la liberación de proteínas apoptogénicas de las mitocondrias, así como inhibidores de la muerte celular apoptótica u otros tipos de muerte celular como la necrosis.

55 La presente invención proporciona los compuestos de la Fórmula general (Id) como en la reivindicación 1.

60 Los compuestos de las Fórmulas generales (I) y (II), tal como se definen a continuación, son adecuados para inhibir la oligomerización de la proteína mitocondrial del canal aniónico dependiente del voltaje (VDAC), un paso inicial y crítico en la progresión de la apoptosis. Los compuestos de las Fórmulas generales (I) y (II) también son adecuados para la protección de las células contra la apoptosis. Los compuestos de las Fórmulas generales (I) y (II) también son adecuados para la protección de las células contra la disfunción mitocondrial asociada a la inducción de apoptosis y/o la producción de energía celular comprometida, la producción de radicales reactivos de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y/o las alteraciones en la concentración de calcio intracelular.

65 La invención también se refiere a procedimientos para la preparación de un compuesto de Fórmula general (Id) de acuerdo con la invención.

La invención se dirige, además, a composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto de Fórmula (Id) de acuerdo con la invención, así como al uso de los compuestos de Fórmula (Id) para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades y trastornos, especialmente enfermedades y trastornos asociados con apoptosis aumentada u otros tipos de muerte celular como la necrosis.

Otros aspectos y realizaciones de la presente invención resultarán evidentes para los expertos a partir de la siguiente descripción detallada.

10 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un cromatograma representativo y los respectivos espectros de masas de dos picos de interés relacionados con el Intermedio 1.

La Figura 2a muestra un cromatograma representativo y el respectivo espectro de masas del pico de interés relacionado con el compuesto de Fórmula 2.

La Figura 2b muestra un espectro de RMN representativo relacionado con el compuesto de Fórmula 2.

La Figura 3 muestra un cromatograma representativo y el respectivo espectro de masas del pico de interés relacionado con el Intermedio 2.

La Figura 4a muestra un cromatograma representativo y el respectivo espectro de masas del pico de interés relacionado con el compuesto de Fórmula 1.

La Figura 4b muestra un espectro de RMN representativo relacionado con el compuesto de Fórmula 1.

La Figura 5 muestra un cromatograma representativo y el respectivo espectro de masas del pico de interés relacionado con el Intermedio 3.

La Figura 6 muestra un cromatograma representativo y el respectivo espectro de masas del pico de interés relacionado con el Intermedio 4.

La Figura 7 muestra un cromatograma representativo y el respectivo espectro de masas del pico de interés relacionado con el Intermedio 5.

La Figura 8 muestra un cromatograma representativo y el respectivo espectro de masas del pico de interés relacionado con el Intermedio 6.

La Figura 9 muestra un cromatograma representativo y el respectivo espectro de masas del pico de interés relacionado con el Intermedio 7.

La Figura 10 muestra un cromatograma representativo y el respectivo espectro de masas del pico de interés relacionado con el Intermedio 8.

La Figura 11a muestra un cromatograma representativo y el respectivo espectro de masas del pico de interés relacionado con el compuesto de Fórmula 3.

La Figura 11b muestra un espectro de RMN representativo en DMSO deuterado relacionado con el compuesto de Fórmula 3.

La Figura 11c muestra un espectro de RMN representativo en DMSO deuterado y agua deuterada (D₂O) relacionado con el compuesto de Fórmula 3.

Las Figuras 12a y 12b muestran espectros de RMN representativos en DMSO deuterado relacionados con enantiómeros individuales separados del compuesto de Fórmula 1 (identificados como BGD-4-1 y VBIT-4-2, respectivamente).

La Figura 13a muestra las señales de BRET2 en el experimento de dimerización de VDAC1 con o sin el inhibidor de dimerización de VDAC1 DNDS ((Ben-Hail D, Shoshan-Barmatz V. *VDAC1-interacting anion transport inhibitors inhibit VDAC1 oligomerization and apoptosis*. *Biochim Biophys Acta*. Julio de 2016; 1863 (7 Pt A): 1612-2), en ausencia o presencia de selenito.

La Figura 13b muestra la inmunotransferencia VDAC1 representativa de gel de electrotransferencia en el experimento de oligomerización de VDAC1 con o sin el inhibidor de dimerización de VDAC1 DNDS ((Ben-Hail D, Shoshan-Barmatz V. *VDAC1-interacting anion transport inhibitors inhibit VDAC1 oligomerization and apoptosis*. *Biochim Biophys Acta*). Julio de 2016; 1863 (7 Pt A): 1612-2), en ausencia o presencia de selenito. Los oligómeros VDAC se estabilizaron mediante reticulación EGS.

La Figura 14a muestra el gel de electrotransferencia de inmunotransferencia VDAC1 representativo en el experimento de oligomerización de VDAC1 con o sin los enantiómeros individuales o el compuesto racémico de Fórmula 1, en presencia de selenito. Los oligómeros de VDAC1 se estabilizaron mediante reticulación EGS.

La Figura 14b muestra esquemáticamente la inhibición de la muerte celular apoptótica en función de la concentración de los enantiómeros individuales o del compuesto racémico de Fórmula 1 en presencia de selenito.

La Figura 15a muestra el gel de electrotransferencia con inmunotinción de VDAC1 representativo en el experimento de oligomerización de VDAC1 con o sin el compuesto racémico de Fórmula 1, y los compuestos de Fórmula 2 y 10, en presencia de selenito.

La Figura 15b muestra la inhibición de la oligomerización de VDAC1 en función de la concentración de los compuestos de Fórmulas 1, 2 y 10 en presencia de selenito. El círculo relleno (•) representa el compuesto de Fórmula 1, el círculo vacío (○) representa el compuesto de Fórmula 10 y el cuadrado vacío (□) representa el compuesto de Fórmula 2.

La Figura 15c muestra esquemáticamente la inhibición de la muerte celular apoptótica inducida por selenito en función de la concentración de los compuestos de Fórmulas 1, 2 y 10. El círculo relleno (•) representa el

compuesto de Fórmula 1, el círculo vacío (o) representa el compuesto de Fórmula 10 y el cuadrado vacío (\square) representa el compuesto de Fórmula 2.

La Figura 15d muestra bandas de gel de electrotransferencia con inmunotinción de VDAC1 representativas de Cyto c y VDAC1 en mitocondrias y en las fracciones mitocondrial y citoplásmica después de la exposición a selenito y los compuestos de Fórmulas 1, 2 y 10.

La Figura 15e muestra la inhibición de la liberación de Cyto C inducida por selenito en función de la concentración de los compuestos de Fórmula 1, 2 y 10. El círculo relleno (\bullet) representa el compuesto de Fórmula 1, el círculo vacío (o) representa el compuesto de Fórmula 10 y el cuadrado vacío (\square) representa el compuesto de Fórmula 2.

La Figura 16a muestra un gel de electrotransferencia de VDAC1 inmunoteñido representativo después de la exposición a los compuestos de Fórmulas 1 y 10 en células SH-SY5Y en ausencia o presencia de cisplatino.

La Figura 16b muestra un gel de electrotransferencia de VDAC1 inmunoteñido representativo después de la exposición a los compuestos de Fórmulas 1 y 10 en células $Bax^{-/-}/Bak^{-/-}$ MEF en presencia de cisplatino.

La Figura 16c muestra la inhibición de la muerte celular apoptótica y la formación de dímeros de VDAC1 en presencia de los compuestos de Fórmulas 1 y 10 en células SH-SY5Y, en presencia de cisplatino.

La Figura 16d muestra la inhibición de la liberación de Cyto C por apoptosis y la formación de dímeros de VDAC1 en presencia de los compuestos de Fórmulas 1 y 10 en células $Bax^{-/-}/Bak^{-/-}$ MEF, en presencia de cisplatino.

La Figura 17a muestra un gel de electrotransferencia de VDAC1 inmunoteñido con VDAC1 representativo después de la exposición a concentraciones crecientes del compuesto de Fórmula 10 en presencia de selenito.

La Figura 17b muestra la inhibición de la apoptosis y la formación de dímeros de VDAC1 en función de la exposición a concentraciones crecientes del compuesto de Fórmula 10 en presencia de selenito.

La Figura 17c muestra un gel de electrotransferencia de VDAC1 inmunoteñido con VDAC1 representativo después de la exposición a concentraciones crecientes del compuesto de Fórmula 10 en presencia de cisplatino.

La Figura 17d muestra la inhibición de la apoptosis y la formación de dímeros de VDAC1 en función de la exposición a concentraciones crecientes del compuesto de Fórmula 10 en presencia de cisplatino.

La Figura 17e muestra el grado de inhibición de la apoptosis en función de la inhibición de la dimerización de VDAC1 obtenida a la misma concentración de la Fórmula 10 y según inducida por cisplatino (cuadrado vacío - \square) o selenito (cuadrado relleno - \blacksquare).

La Figura 18a muestra la corriente a través del canal VDAC1 purificado en presencia de los compuestos de Fórmulas 1, 2 y 10.

La Figura 18b muestra la fracción de conductancia máxima de VDAC1 purificado en presencia de los compuestos de las Fórmulas 1 (círculo relleno), 2 (cuadrado vacío) o 10 (círculo vacío), bajo diferentes voltajes aplicados.

La Figura 18c muestra el valor de la fracción ligada de los compuestos de Fórmulas 1, 2 y 10 a VDAC1 purificado, en función de su concentración.

La Figura 19a muestra el efecto de los compuestos de Fórmulas 1 y 10 sobre las concentraciones de iones calcio intracelulares en células tratadas con selenito.

La Figura 19b muestra el efecto de los compuestos de Fórmula 1 y 10 sobre el potencial de membrana mitocondrial en células tratadas con selenito.

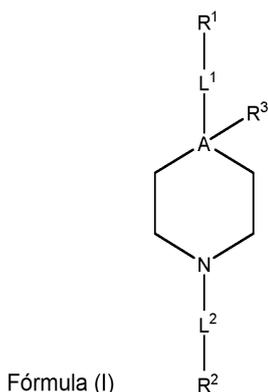
La Figura 19c muestra el efecto de los compuestos de Fórmula 1 y 10 sobre los niveles de ROS en células tratadas con selenito.

La Figura 19d muestra esquemáticamente el efecto de los compuestos de Fórmula 1 y 10 sobre los niveles de superóxido mitocondrial en células tratadas con selenito.

La Figura 20A muestra el efecto del compuesto de Fórmula 1 sobre el aprendizaje y la memoria de ratones transgénicos con síntomas similares a la enfermedad de Alzheimer usando la prueba Radial Arm Water Maze; el número de errores se muestra en función de los bloques de aprendizaje.

La Figura 20B muestra el efecto del compuesto de Fórmula 1 sobre el aprendizaje y la memoria de ratones transgénicos con síntomas similares a la enfermedad de Alzheimer usando la prueba Radial Arm Water Maze; el tiempo total por prueba se muestra en función de los bloques de aprendizaje.

En el presente documento se describe un compuesto de Fórmula general (I):



en la que:

A es carbono (C) o nitrógeno (N);

R^3 es hidrógeno o un grupo heteroalquilo; en el que cuando A es nitrógeno (N), R^3 está ausente;

L^1 es un grupo de enlace que puede estar ausente o presente, pero si está presente es un grupo de enlace amino $-NR^4-$, en el que R^4 es hidrógeno, un alquilo C_{1-n} , donde n es un número entero de 2 a 5, inclusive, o un alquilo sustituido CH_2-R , en el que R es un grupo funcional seleccionado de entre hidrógeno, halo, haloalquilo, ciano, nitro, hidroxilo, alquilo, alqueno, arilo, alcoxilo, ariloxilo, aralcoxilo, alquilcarbamido, arilcarbamido, amino, alquilamino, arilamino, dialquilamino, diarilamino, arilalquilamino, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarboniloxilo, arilcarboniloxilo, carboxilo, alcoxicarbonilo, ariloxicarbonilo, sulfo, alquilsulfonilamido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo o heteroarilo; preferiblemente R^4 es hidrógeno;

R^1 es un resto aromático, preferiblemente fenilo, que puede estar sustituido con uno o más de Z;

Z es independientemente uno o más de los grupos funcionales seleccionados de entre, hidrógeno, halo, haloalquilo, haloalcoxi, perhaloalcoxi o perfluoroalcoxi C_{1-2} , ciano, nitro, hidroxilo, alquilo, alqueno, arilo, alcoxilo, ariloxilo, aralcoxilo, alquilcarbamido, arilcarbamido, amino, alquilamino, arilamino, dialquilamino, diarilamino, arilalquilamino, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarboniloxi, arilcarboniloxi, carboxilo, alcoxicarbonilo, ariloxicarbonilo, sulfo, alquilsulfonilamido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo o heteroarilo; preferiblemente Z es perfluoroalcoxi C_{1-2} ; preferiblemente, R^1 es un fenilo y Z es trifluorometoxi; preferiblemente, R^1 es un fenilo sustituido con un trifluorometoxi, más preferiblemente en la posición *para*;

L^2 es un grupo de enlace, de modo que cuando A es nitrógeno (N), L^2 es un grupo que consta de 4-10 átomos (aparte de los átomos de hidrógeno), formando opcionalmente un anillo cerrado, del cual al menos uno de los átomos es nitrógeno, formando parte dicho nitrógeno de un grupo amida; preferiblemente, dicho grupo de enlace se selecciona del grupo que consiste en un alquilamidileno C_{4-6} y un pirrolidinileno, estando dicho grupo de enlace opcionalmente sustituido con uno o dos de los grupos alquilo, hidroxilo, oxo o tioxo; más preferiblemente L^2 se selecciona de entre butanamidileno, N-metilbutanamidileno, N,N-dimetilbutanamidileno, 4-hidroxibutanamidileno ($HO-CH_2-C^*H-CH_2-C(O)NH-$, donde el asterisco indica el punto de unión), 4-oxobutanamidileno, 4-hidroxi-N-metilbutanamidileno, 4-oxo-N-metilbutanamidileno, 2-pirrolidonilo, pirrolidina-2,5-dionileno, 5-tioxo-2-pirrolidinonileno y 5-metoxi-2-pirrolidinonileno; y cuando A es carbono (C), L^2 es alquileo C_{1-n} , donde n es un número entero de 2 a 4, inclusive; preferiblemente, L^2 es metileno ($-CH_2-$);

R^2 es un fenilo o naftilo, opcionalmente sustituido con halógeno, preferiblemente cuando R^2 es un fenilo, está sustituido con halógeno, preferiblemente cloro, en la posición *para*, preferiblemente cuando R^2 es naftilo, L^2 es un grupo alquileo, preferiblemente $-CH_2-$;

con la condición de que cuando A es carbono (C), L^1 es $-NR^4-$, R^4 es hidrógeno y R^2 es fenilo sustituido con cloro, L^2 no es pirrolidina-2,5-diona.

Cuando A es nitrógeno (N), el grupo de enlace L^2 se selecciona del grupo que consiste en un alquilamidileno C_{4-6} y un pirrolidinileno, estando dicho grupo de enlace opcionalmente sustituido con uno o dos de los grupos alquilo, hidroxilo, oxo o tioxo. Por ejemplo, L^2 puede ser butanamidileno, N-metilbutanamidileno, N,N-dimetilbutanamidileno, 4-hidroxibutanamidileno, 4-oxobutanamidileno, 4-hidroxi-N-metilbutanamidileno, 4-oxo-N-metilbutanamidileno, 2-pirrolidonilo, pirrolidina-2,5-dionileno, 5-tioxo-2-pirrolidinonileno o 5-metoxi-2-pirrolidinonileno. Preferiblemente, cuando L^2 es butanamidileno, N-metilbutanamidileno, N, N-dimetilbutanamidileno, 4-hidroxibutanamidileno, 4-oxobutanamidileno, 4-hidroxi-N-metilbutanamidileno o 4-oxo-N-metilbutanamidileno, preferiblemente el carbono en la tercera posición (C) del resto butanamida está unido al nitrógeno (N) del anillo de piperazina o el anillo de piperidina y el nitrógeno (N) del resto butanamida está unido a R^2 . Por ejemplo, cuando L^2 es 2-pirrolidona, pirrolidina-2,5-diona, 5-tioxo-2-pirrolidona o 5-metoxi-2-pirrolidona, preferiblemente un carbono (C) del resto pirrolidina está unido al nitrógeno (N) del anillo de piperazina o el anillo de piperidina y el nitrógeno (N) del resto pirrolidina está unido a R^2 .

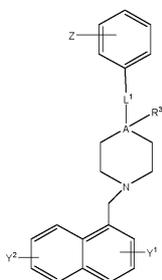
A puede ser carbono (C), R^3 puede ser heteroalquilo y L^2 puede ser metileno.

En el presente documento también se describen los estereoisómeros, enantiómeros, sales y mezclas de los mismos, en particular, las sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de Fórmula general (I).

En el presente documento se describe un compuesto de Fórmula general (Ia):

con la condición de que cuando A es carbono (C), L¹ está presente y R⁴ es hidrógeno, L² no es pirrolidina-2,5-diona.

5 En el presente documento se describe un compuesto de Fórmula general (Ic):

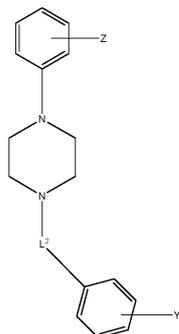


Fórmula (Ic)

en la que:

- 10 A, R³ y Z son tal como se han definido anteriormente con referencia a los compuestos de Fórmula general (I);
 L¹ es -NH-;
 Y¹ e Y² pueden estar ausentes o presentes, pero, si están presentes, son independientemente un halógeno, un enantiómero, un diastereómero, o una mezcla o una sal de los mismos.
- 15 Compuestos preferidos de Fórmula (Ic) son aquellos en los que R³ es un grupo -C(O)NHCH₂C(O)OH y/o en los que Z es alcoxi C₁₋₂ o alcoxi C₁₋₂ halogenado, por ejemplo, perfluoroalcoxi C₁₋₂.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula general (Id):



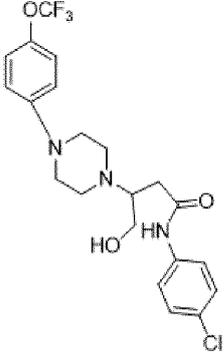
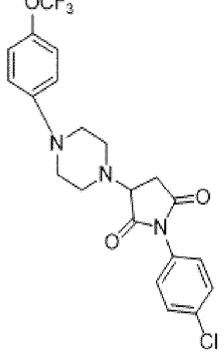
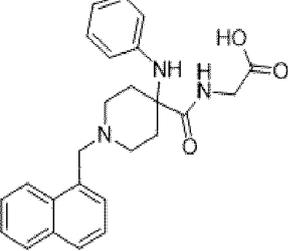
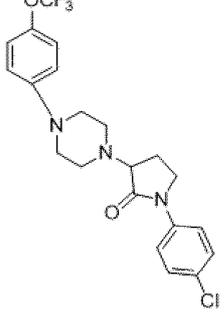
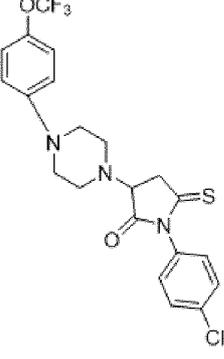
Fórmula (Id)

- 20 en la que
- 25 L² se selecciona del grupo que consiste en un alquilamidileno C₄₋₆ (por ejemplo, HO-CH₂-C*H-CH₂-C(O)NH-, donde el asterisco indica el punto de unión) y un pirrolidinileno (por ejemplo, pirrolidina-2,5-dionileno), opcionalmente sustituido con uno o dos de los grupos alquilo, hidroxilo, oxo o tioxo;
- Z es perfluoroalcoxi C₁₋₂ e Y es halógeno.

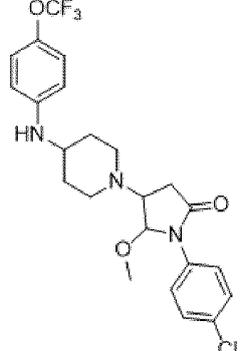
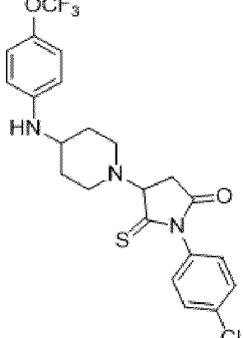
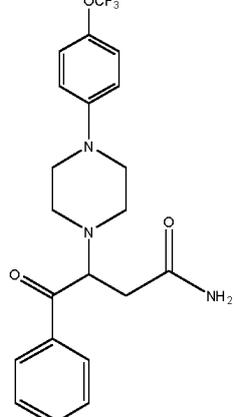
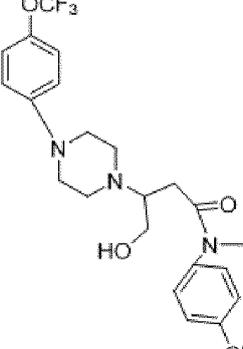
30 La invención también se refiere a los estereoisómeros, enantiómeros, mezclas y sales de los mismos, de los compuestos de Fórmulas generales (Id) de acuerdo con la invención.

La Tabla 1 proporciona ejemplos no limitantes de compuestos de Fórmula general (I). Incluye los siguientes compuestos: N-(4-clorofenil)-4-hidroxi-3-(4-(4-(trifluorometoxi)fenil)-piperazin-1-il)butanamida (Fórmula 1), 1-(4-clorofenil)-3-(4-(4-(trifluorometoxi)fenil)piperazin-1-il)pirrolidina-2,5-diona (Fórmula 2), 1-(naftalen-1-il)metil-4-(fenilamino)-piperidina-4-carbonilglicina (Fórmula 3), 1-(4-clorofenil)-3-(4-(4-(trifluorometoxi)fenil)piperazin-1-il)pirrolidin-2-ona (Fórmula 4), 1-(4-clorofenil)-5-tioxo-3-(4-(4-(trifluorometoxi)fenil)piperazin-1-il)pirrolidin-2-ona (Fórmula 5), 1-(4-clorofenil)-5-metoxi-4-(4-(4-(trifluorometoxi)fenil)-piperazin-1-il)pirrolidin-2-ona (Fórmula 6), 1-(4-clorofenil)-5-tioxo-4-(4-(4-(trifluorometoxi)fenil)amino)piperidin-1-il)pirrolidin-2-ona (Fórmula 7), 4-(4-clorofenil)-4-oxo-3-(4-(4-(trifluorometoxi)fenil)piperazin-1-il)butanamida (Fórmula 8), N-(4-clorofenil)-4-hidroxi-N-metil-3-(4-(4-(trifluorometoxi)fenil)piperazin-1-il)butanamida (Fórmula 9).

Tabla 1

Fórmula n.º	Estructura	Descripción (de acuerdo con la Fórmula general (I))
1		A es nitrógeno (N), R ³ está ausente, L ¹ está ausente, R ¹ es fenilo sustituido con un trifluorometoxi, L ² es 4-hidroxibutanamidileno, el tercer carbono (C) del resto butanamida está unido al nitrógeno (N) del anillo de piperazina, el nitrógeno (N) del resto butanamida está unido a R ² y R ² es un fenilo sustituido con cloro en la posición <i>para</i> [también representado en el presente documento como VBIT-4 o BGD-4]
2		A es nitrógeno (N), R ³ está ausente, L ¹ está ausente, R ¹ es fenilo sustituido con un trifluorometoxi, L ² es pirrolidina-2,5-diona, el carbono (C) en la posición 3 del resto pirrolidina está unido al nitrógeno (N) del anillo de piperazina, el nitrógeno (N) del resto pirrolidina está unido a R ² y R ² es un fenilo sustituido con cloro en el posición <i>para</i> [también representado en el presente documento como VBIT-3 o BGD-3]
3		A es carbono (C), R ³ es un grupo -C(O)NHCH ₂ C(O)OH; L ¹ es -NH-, R ¹ es un fenilo, L ² es metileno y R ² es un naftilo [también representado en el presente documento como VBIT-12]
4		A es nitrógeno (N), R ³ está ausente, L ¹ está ausente, R ¹ es un fenilo sustituido con un trifluorometoxi; L ² es 2-pirrolidona, el carbono (C) en la posición 3 del resto pirrolidona está unido al nitrógeno (N) del anillo de piperazina, el nitrógeno (N) del resto pirrolidona está unido a R ² y R ² es un fenilo sustituido con cloro en la posición <i>para</i> [también representado en el presente documento como VBIT-5]
5		A es nitrógeno (N), R ³ está ausente, L ¹ está ausente, R ¹ es un fenilo sustituido con un trifluorometoxi, L ² es 5-tioxo-2-pirrolidona, el carbono (C) en la posición 3 del resto pirrolidina está unido al nitrógeno (N) del anillo de piperazina, el nitrógeno (N) del resto pirrolidina está unido a R ² y R ² es un fenilo sustituido con cloro en la posición <i>para</i> [también representado en el presente documento como VBIT-6]

(continuación)

Fórmula n.º	Estructura	Descripción (de acuerdo con la Fórmula general (I))
6		<p>A es carbono (C), R³ es hidrógeno, L¹ es -NH-, R¹ es un fenilo sustituido con un trifluorometoxi, L² es 5-metoxi-2-pirrolidinona, el carbono (C) en la posición 4 del resto pirrolidina está unido al nitrógeno (N) del anillo de piperidina, el nitrógeno (N) del resto pirrolidina está unido a R² y R² es un fenilo sustituido con cloro en la posición <i>para</i> [también representado en el presente documento como VBIT-9]</p>
7		<p>A es carbono (C), R³ es hidrógeno, L¹ es -NH-, R¹ es un fenilo sustituido con un trifluorometoxi, L² es 5-tioxo-2-pirrolidinona, el carbono (C) en la posición 3 del resto pirrolidina está unido al nitrógeno (N) del anillo de piperidina, el nitrógeno (N) del resto pirrolidina está unido a R² y R² es un fenilo sustituido con cloro en la posición <i>para</i> [también representado en el presente documento como VBIT-10]</p>
8		<p>A es nitrógeno (N), R³ está ausente, L¹ está ausente, R¹ es fenilo sustituido con un trifluorometoxi, L² es 4-oxobutanamida, el tercer carbono (C) del resto butanamida está unido al nitrógeno (N) del anillo de piperazina, el cuarto carbono (C) del resto butanamida está unido a R² y R² es un fenilo sustituido con cloro en la posición <i>para</i> [también representado en el presente documento como VBIT-7]</p>
9		<p>A es nitrógeno (N), R³ está ausente, L¹ está ausente, R¹ es fenilo sustituido con un trifluorometoxi, L² es 4-hidroxi-N-metilbutanamida, el tercer carbono (C) del resto butanamida está unido al nitrógeno (N) del anillo de piperazina, el nitrógeno (N) del resto butanamida está unido a R² y R² es un fenilo sustituido con cloro en la posición <i>para</i> [también representado en el presente documento como VBIT-8]</p>

A continuación, se describen de manera más específica algunos términos usados en el presente documento para describir los compuestos de acuerdo con la invención.

El término halógeno denota un átomo seleccionado entre F, Cl, Br e I, preferiblemente Cl y Br.

5 El término heteroalquilo, tal como se usa en el presente documento en referencia al resto R^3 de las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa), se refiere a un grupo saturado o insaturado de 3-12 átomos (aparte de los átomos de hidrógeno), en el que uno o más (preferiblemente 1, 2 o 3) átomos son un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, por ejemplo, un grupo alquiloxi, tal como, por ejemplo, metoxi o etoxi, o un grupo metoximetil-, nitril-,
10 metilcarboxialquiléster- o 2,3-dioxietyl; preferiblemente, el grupo heteroalquilo es una cadena que comprende un alquileo y al menos uno de un resto ácido carboxílico, un resto carbonilo, un resto amina, un resto hidroxilo, un resto éster, un resto amida. El término heteroalquilo se refiere, además, a un ácido carboxílico o un grupo derivado de un ácido carboxílico, tal como, por ejemplo, acilo, aciloxi, carboxialquilo, carboxialquiléster, tal como, por ejemplo, metilcarboxialquiléster, carboxialquilamida, alcocicarbonilo o alcocicarboniloxi; preferiblemente, el término se refiere
15 a un grupo $-C(O)NHCH_2C(O)OH$.

El término alquilo C_{1-n} , donde n puede tener un valor tal como se define en el presente documento, denota un grupo hidrocarburo saturado, ramificado o no ramificado con 1 a n átomos de carbono (C). Ejemplos de tales grupos incluyen metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, iso-pentilo, neo-pentilo,
20 terc-pentilo, n-hexilo, iso-hexilo, etc.

El término alcoxi C_{1-n} , donde n puede tener un valor tal como se define en el presente documento, indica un grupo alquilo tal como se define en el presente documento, unido mediante un enlazador -O- (oxígeno).

25 El término perfluoroalcoxi C_{1-n} , donde que n puede tener un valor tal como se define en el presente documento, indica un grupo alcoxi con átomos de hidrógeno sustituidos por átomos de flúor.

El término alquilamidilo C_{1-m} , donde m puede tener un valor tal como se define en el presente documento, denota un grupo que comprende de 1 a m átomos de carbono (C) y un grupo amida formado por C_{m-a} alquil-COOH y H_2N-C_a alquilo, o C_{m-a} alquil-NH₂ y HOOC- C_a alquilo, donde a es menor o igual que m. De manera similar, los términos alquilamidileno C_4 , alquilamidileno C_5 y alquilamidileno C_6 se refieren a grupos alquilamidilo C_m divalentes, en los que m es 4, 5 o 6, respectivamente.

35 El término "VDAC", tal como se usa en el presente documento, a menos que el contexto indique explícitamente lo contrario, se refiere a la proteína del canal aniónico dependiente del voltaje, a todas sus isoformas, por ejemplo, a la isoforma VDAC1, a la isoforma VDAC2 o a la isoforma VDAC3.

En el presente documento se describe un procedimiento para la preparación de un compuesto de Fórmula (I). Los compuestos de Fórmula (I) de acuerdo con la invención pueden obtenerse utilizando procedimientos de síntesis conocidos. Preferiblemente, los compuestos se obtienen mediante procedimientos de preparación que se describen con más detalle a continuación.

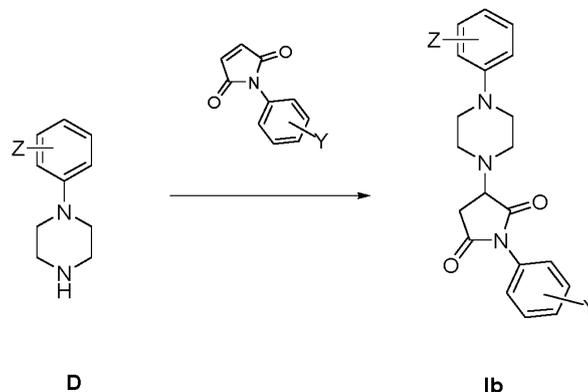
45 De acuerdo con otro aspecto de la invención, en el presente documento se proporciona un procedimiento para la preparación de un compuesto de Fórmula (Id). Los compuestos de Fórmula (Id) de acuerdo con la invención pueden obtenerse utilizando procedimientos de síntesis conocidos. Preferiblemente, los compuestos se obtienen mediante procedimientos de preparación que se describen con más detalle a continuación.

Ciertos compuestos de Fórmula general (I), en los que L^1 está ausente y A es nitrógeno, se pueden preparar acoplado un haluro de arilo de Fórmula R^1-X , en la que X es un halógeno, preferiblemente bromuro, con una piperazina monoprotectada, por ejemplo, una piperazina protegida con BOC, y después de la desprotección, reaccionando con un precursor del enlazador L^2 reactivo con aminas secundarias, y posterior amidación o transamidación del resto precursor del enlazador L^2 con una amina adecuada de Fórmula $(Y)R^2-NH_2$. El precursor del enlazador L^2 puede ser un compuesto derivado carboxílico C_{4-6} insaturado, por ejemplo, una lactona C_{4-6} insaturada, o un éster lineal β -, γ -, δ - o ϵ - insaturado del ácido carboxílico C_{4-6} y un alcohol adecuado, por ejemplo,
55 un alcohol C_{1-6} . De manera alternativa, la R^1 -piperazina desprotegida puede hacerse reaccionar con una NR^2 -pirrolideno o NR^2 -pirrolidino-diona adecuada, preparada mediante una metodología generalmente conocida (por ejemplo, en *Synthesis, anticonvulsant activity and 5-HT1A, 5-HT2A receptor affinity of new N-[(4-aryl)piperazin-1-yl]-alkyl] derivatives of 2-azaspiro[4.4]nonane and [4.5]decane-1,3-dione*, de Obniska, J. ; Kolaczkowski, M.; Bojarski, AJ; Duszyńska, B., *European Journal of Medicinal Chemistry* (2006), 41(7), 874-881).

60 Los compuestos de Fórmula general (Ia) y (Ib) pueden prepararse de acuerdo con un procedimiento (a) mostrado en los Esquemas 1 a 3, partiendo de un compuesto de Fórmula general A, en donde Z es tal como se ha definido anteriormente.

Por ejemplo, ciertos compuestos preferidos de Fórmula general (Ib) pueden obtenerse de acuerdo con el Esquema 3, haciendo reaccionar un compuesto de Fórmula general D con una pirrol-diona adecuada, por ejemplo, 1-fenil-1H-pirrol-2,5-diona, que está disponible comercialmente o se puede preparar fácilmente mediante procedimientos familiares para los expertos en la técnica, para producir un compuesto de Fórmula general (Ib).

5



Esquema 3

Ciertos compuestos de Fórmula general (I) en los que R^3 está presente y no es hidrógeno y en los que L^1 está presente, se pueden preparar a partir de compuestos halogenados de Fórmula general $(Y^1)(Y^2)R^2-L^2-X$ que se acoplan con una piperidona protegida en presencia de una base, y la cetona recuperada es R^3 -sililada, por ejemplo, nitrilosililada, en presencia de una amina de Fórmula general R^1-L^1-H (siendo L^1-H el grupo $-NR^4-$, con R^4 tal como se ha definido anteriormente) en ambiente ácido para proporcionar el compuesto de Fórmula general $(Y^1)(Y^2)R^2-L^2-N[-CH_2-CH_2-]_2C(R^3)L^1-R^1$, en la que R^3 es el nitrilo. Posteriormente, el nitrilo se puede hidrolizar en un ácido fuerte a una amida respectiva y además en una base fuerte a un ácido carboxílico respectivo, que se hace reaccionar mediante metodología peptídica a un éster de glicinato protegido, finalmente desprotegido para proporcionar el compuesto de Fórmula (I).

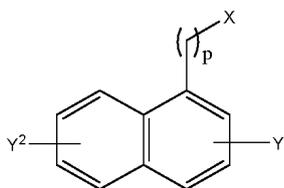
10

15

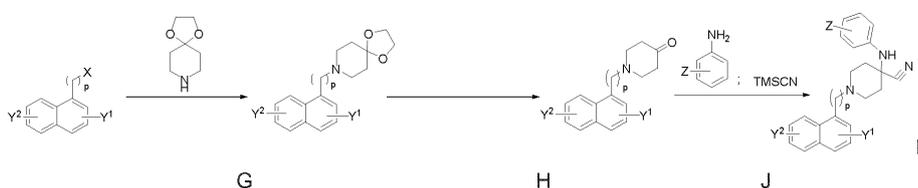
Ciertos compuestos preferidos de Fórmula general (Ic) se pueden preparar de acuerdo con el procedimiento (b) mostrado en los Esquemas 4 y 4a, partiendo de un compuesto de naftilo de Fórmula general F, en la que X es halógeno, preferiblemente cloro, p es un número entero que tiene un valor de 1, 2 o 3 e Y^1 e Y^2 son tal como se han definido anteriormente.

20

Fórmula F



25



Esquema 4

Generalmente, los compuestos de Fórmula general H se obtienen haciendo reaccionar un compuesto de Fórmula general F con una piperidona, preferiblemente 4-piperidona, protegida con un glicol adecuado, por ejemplo, etilenglicol, seguido de desprotección de la cetona. La reacción se lleva a cabo en un disolvente polar, tal como dimetilformamida (DMF) o tetrahidrofurano (THF), en presencia de una base. La base adecuada puede ser un carbonato, por ejemplo, carbonato de potasio, carbonato de sodio. La reacción se puede llevar a cabo a una temperatura de entre 0 °C y 60 °C, preferiblemente de entre 15 °C y 40 °C, más preferiblemente a temperatura de entorno, por ejemplo, a temperatura ambiente. La reacción puede mantenerse durante aproximadamente 6-18 horas, preferiblemente durante aproximadamente 10-14 horas. El producto puede purificarse, por ejemplo, mediante cromatografía y desprotegerse calentando el producto en condiciones ácidas. La desprotección puede llevarse a

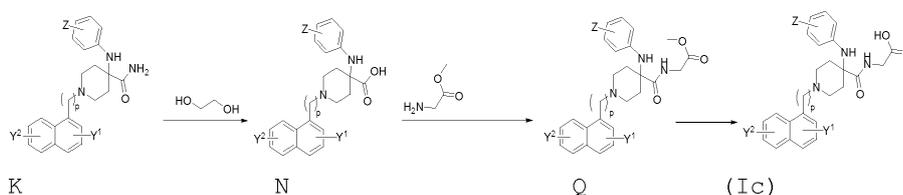
30

35

cabo en un disolvente adecuado, por ejemplo, en un alcohol, tal como el etanol, que disuelve el ácido utilizado, por ejemplo, el ácido clorhídrico.

5 El compuesto obtenido de Fórmula H puede hacerse reaccionar adicionalmente con un silano sustituido adecuado, por ejemplo, trimetilsililo nitrilo (TMSCN), en presencia de una amina primaria o secundaria adecuada, por ejemplo, anilina, piperidina, etilamina, propilamina, etilpropilamina, dipropilamina, en un disolvente adecuado en condiciones ácidas, por ejemplo, en ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido benzoico. Los reactivos pueden combinarse a una temperatura inferior a 60 °C, preferiblemente inferior a 40 °C, más preferiblemente de entre 0 °C y 40 °C y más preferiblemente de entre 10 °C y 20 °C. La reacción puede mantenerse durante aproximadamente 6-18 horas, preferiblemente durante aproximadamente 10-14 horas. Después de neutralizar el ácido, la mezcla de reacción se puede extraer en un disolvente apolar, tal como diclorometano, para producir el compuesto de nitrilo de Fórmula J, que puede usarse sin purificación adicional.

15 Los compuestos de nitrilo de Fórmula J pueden convertirse, de manera adicional, en los compuestos de Fórmula general (Ic) de acuerdo con el siguiente Esquema 4a:



Esquema 4a

20 El compuesto de Fórmula K se prepara hidrolizando el compuesto de nitrilo de Fórmula J en un ácido fuerte, por ejemplo, en ácido sulfúrico concentrado, ácido nítrico, ácido bromhídrico (HBr) y ácido clorhídrico (HCl). La reacción puede mantenerse durante aproximadamente 6-18 horas, preferiblemente durante aproximadamente 10-14 horas. Después de la neutralización de la mezcla de reacción, el compuesto de Fórmula K puede purificarse, por ejemplo, mediante HPLC preparativa de fase inversa.

25 El compuesto de Fórmula K puede hidrolizarse adicionalmente en el compuesto de Fórmula N, por ejemplo, con hidróxido de potasio en un disolvente polar, por ejemplo, en etilenglicol. Los reactivos pueden combinarse a una temperatura de entre 110 °C y 170 °C y más preferiblemente de entre 140 °C y 160 °C. La reacción puede mantenerse durante aproximadamente 6-18 horas, preferiblemente durante aproximadamente 10-14 horas. Después de enfriar la mezcla de reacción, el compuesto de Fórmula N puede purificarse, por ejemplo, mediante HPLC preparativa de fase inversa. El compuesto de Fórmula N puede hacerse reaccionar luego con glicinato de metilo en DMF en presencia de un agente de acoplamiento, por ejemplo, hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo [4,5-b]-piridinio-3-óxido (conocido como HATU) y diisopropiletilamina, durante aproximadamente 6-18 horas, preferiblemente durante aproximadamente 10-14 horas, y purificado, por ejemplo, mediante HPLC preparativa de fase inversa, para proporcionar el compuesto de Fórmula Q. Agentes de acoplamiento adicionales que pueden usarse son N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 3-(etiliminometilnamino)-N,N-dimetilpropan-1-amina (EDC), hexafluorofosfato de 3-[bis(dimetilamino)-metiliumil]-3H-benzotriazol-1-óxido (HBTU), hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]-piridinio-3-óxido (HATU), hexafluorofosfato de 1-[(1-(ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenamino)oxi)-dimetilamino-morfolinometileno]]-metanaminio (COMU).

40 Finalmente, el compuesto de Fórmula Q puede hidrolizarse con una base, por ejemplo, hidróxido de litio, para liberar el éster metílico y proporcionar el compuesto bruto de Fórmula general (Ic), por ejemplo, en un disolvente aprótico, tal como tetrahidrofurano, durante aproximadamente de 6 a 18 horas, preferiblemente durante aproximadamente de 10 a 14 horas. A continuación, la mezcla de reacción puede neutralizarse a un pH de aproximadamente 7 y luego purificarse, por ejemplo, mediante una HPLC preparativa, para proporcionar el compuesto de Fórmula general (Ic).

45 Los compuestos de Fórmula general (Id) se preparan de acuerdo con el procedimiento descrito para los compuestos de Fórmulas generales (Ia) y (Ib).

50 En las reacciones descritas anteriormente, cualquier grupo reactivo, tal como por ejemplo un grupo amino, alquilamino, hidroxilo o carboxilo, puede protegerse durante la reacción mediante grupos protectores convencionales que se escinden después de la reacción, mediante procedimientos conocidos en la técnica.

55 En el presente documento se describen estereoisómeros, tales como diastereómeros y enantiómeros, mezclas y sales, particularmente las sales fisiológicamente aceptables, de los compuestos de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic) y (Id), y de los compuestos de Fórmulas estructurales 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9.

La invención también se refiere a los estereoisómeros, tales como diastereómeros y enantiómeros, mezclas y sales,

particularmente las sales fisiológicamente aceptables, de los compuestos de Fórmula general (Id), y de los compuestos de Fórmulas estructurales 1, 2, 4, 5 y 9.

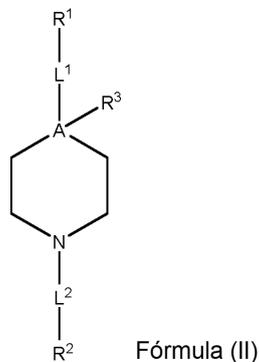
5 Los compuestos de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic) y (Id), o productos intermedios en la síntesis de compuestos de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic) y (Id), pueden resolverse en sus enantiómeros y/o diastereómeros sobre la base de sus diferencias fisicoquímicas usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las mezclas *cis/trans* pueden resolverse en sus isómeros *cis* y *trans* mediante cromatografía. Por ejemplo, los enantiómeros pueden separarse mediante cromatografía en fases quirales o mediante recristalización en un disolvente ópticamente activo o mediante siembra enriquecida con enantiómeros.

10 Los compuestos de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic) y (Id), y los compuestos de Fórmulas estructurales 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, pueden convertirse en sales de los mismos, particularmente en sales fisiológicamente aceptables para uso farmacéutico. Sales adecuadas de los compuestos de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic) y (Id), y de los compuestos de Fórmulas estructurales 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, pueden formarse con ácidos orgánicos o inorgánicos, tales como, pero sin limitarse a, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido palmítico o ácido maleico. Los compuestos de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic) y (Id), que contienen un grupo carboxilo, pueden convertirse en las sales de los mismos, particularmente en sales fisiológicamente aceptables para uso farmacéutico, con bases orgánicas o inorgánicas. Las bases adecuadas para este propósito incluyen, por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, arginina o etanolamina.

25 En el presente documento se describen usos de los compuestos de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa), tales como, pero sin limitarse a, los compuestos de Fórmulas estructurales 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, por ejemplo, como inhibidores de oligomerización del canal aniónico dependiente del voltaje (VDAC).

De acuerdo con otro aspecto proporcionado en el presente documento, se utilizan los compuestos de Fórmula general (Id), tales como, pero sin limitarse a, los compuestos de Fórmulas estructurales 1, 2, 4, 5 y 9, por ejemplo, como inhibidores de oligomerización del canal aniónico dependiente del voltaje (VDAC).

30 En el presente documento, se describe el uso del compuesto de acuerdo con la Fórmula general (II), tal como se define a continuación, en la preparación de fármacos para el tratamiento de enfermedades tal como se describe en el presente documento.



35 en la que:

A es carbono (C) o nitrógeno (N);

40 R^3 es hidrógeno o grupo heteroalquilo que comprende de 3 a 12 átomos distintos de hidrógeno, en el que al menos uno es un heteroátomo, preferiblemente seleccionado de entre nitrógeno, azufre y oxígeno; en el que cuando A es nitrógeno (N), R^3 está ausente;

45 L^1 es un grupo de enlace que puede estar ausente o presente, pero, si está presente, se selecciona de un grupo de enlace amino $-NR^4$, en el que R^4 es hidrógeno; un alquileo C_{1-n} , donde n es un número entero de 2 a 5, inclusive; o un alquilo sustituido, CH_2-R donde R es un grupo funcional seleccionado entre hidrógeno, halo, haloalquilo, ciano, nitro, hidroxilo, alquilo, alquenoilo, arilo, alcoxilo, ariloxilo, aralcoxilo, alquilcarbamido, arilcarbamido, amino, alquilamino, arilamino, dialquilamino, diarilamino, arilalquilamino, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarboniloxi, arilcarboniloxi, carboxilo, alcocarbonilo, ariloxycarbonilo, sulfo, alquilsulfonilamido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo o heteroarilo, preferiblemente R^4 es hidrógeno, con L^1 opcionalmente formando un anillo con R^3 ;

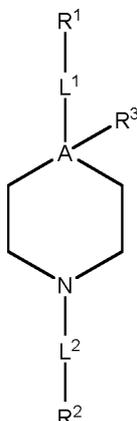
R^1 es un resto aromático, preferiblemente fenilo, que puede estar sustituido con uno o más de alcoxi C_{1-2} ,

perfluoroalcoxi C₁₋₂; preferiblemente, R¹ es un trifluorometoxi sustituido con fenilo; preferiblemente, R¹ es un fenilo sustituido con un trifluorometoxi, preferiblemente en la posición *para*;

5 L² es un grupo de enlace que consta de 4-10 átomos, preferiblemente de 5-6 átomos, formando opcionalmente un anillo cerrado, del cual al menos uno de los átomos es nitrógeno, formando parte dicho nitrógeno de un grupo amida, seleccionándose dicho grupo de enlace preferiblemente del grupo que consiste en un alquilamidileno C₄₋₆ o un pirrolidinileno, estando dicho grupo de enlace opcionalmente sustituido con uno o dos de los grupos alquilo, hidroxilo, oxo o tioxo; más preferiblemente, L² se selecciona de entre butanamidileno, N-metilbutanamidileno, N,N-dimetilbutanamidileno, 4-hidroxibutanamidileno, 4-oxobutanamidileno, 4-hidrox-N-metilbutanamidileno, 4-oxo-N-metilbutanamidileno, 2-pirrolidonileno, pirrolidina-2,5-dionileno, 5-tioxo-2-pirrolidinonileno y 5-metoxi-2-pirrolidinonileno; o L² es alquilenilo C_{1-n}, donde n es un número entero entre 2 y 5, inclusive, preferiblemente metileno (-CH₂-); dicho grupo de enlace L² enlaza piperidina o resto de piperazina en el átomo de nitrógeno (N); y

15 R² es un arilo, preferiblemente un fenilo o un naftilo, opcionalmente sustituido con halógeno, opcionalmente cuando R² es un fenilo está sustituido con halógeno, preferiblemente cloro, preferiblemente en la posición *para*, y también opcionalmente cuando R² es naftilo, L² es un grupo alquilenilo, preferiblemente metileno (-CH₂-).

En el presente documento se describe el uso del compuesto de acuerdo con la Fórmula general (IIa) como se define a continuación, en la preparación de fármacos para el tratamiento de enfermedades tal como se describe en el presente documento.



Fórmula (IIa)

25 en la que:

A es carbono (C);

30 R³ es hidrógeno o cadena heteroalquilo que comprende de 3 a 12 átomos, en donde al menos uno es un heteroátomo, seleccionado entre nitrógeno, azufre y oxígeno;

35 L¹ es un grupo de enlace que es un grupo de enlace de amino -NR⁴-, donde R⁴ es hidrógeno, alquilo C_{1-n}, donde n es un número entero de 2 a 5, inclusive, y CH₂-R, en el que R es un grupo funcional seleccionado de hidrógeno, halo, haloalquilo, ciano, nitro, hidroxilo, alquilo, alquenilo, arilo, alcoxilo, ariloxilo, aralcoxilo, alquilcarbamido, arilcarbamido, amino, alquilamino, arilamino, dialquilamino, diarilamino, arilalquilamino, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, carboxilo, alcocarbonilo, ariloxicarbonilo, sulfo, alquilsulfonilamido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo o heteroarilo;

40 cuando R³ es hidrógeno, L¹ es -NR⁴ -; cuando R³ es un grupo heteroalquilo que comprende 3-12 átomos, L¹ está formando un anillo con R³;

R¹ es un resto aromático, que está opcionalmente sustituido con uno o más de alcoxi C₁₋₂, por ejemplo, haloalcoxi, tal como perfluoroalcoxi C₁₋₂;

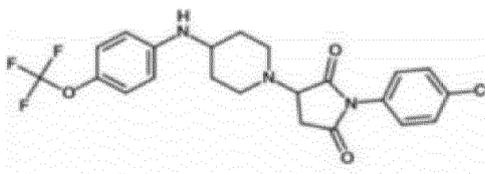
45 L² es un grupo de enlace que consta de 4-10 átomos, formando opcionalmente un anillo cerrado, del cual al menos uno de los átomos es nitrógeno, formando parte dicho nitrógeno de un grupo amida o L² es alquilo C_{1-n} o alquilenilo C_{1-n}, en el que n es un número entero entre 2 y 5, inclusive; dicho grupo de enlace L² enlaza piperidina o resto piperazina en el átomo de nitrógeno (N); preferiblemente, L² se selecciona de entre butanamidileno, N-metilbutanamidileno, N,N-dimetilbutanamidileno, 4-hidroxibutanamidileno, 4-oxobutanamidileno, 4-hidrox-N-metilbutanamidileno, 4-oxo-N-metilbutanamidileno, 2-pirrolidonileno, pirrolidina-2,5-dionileno, 5-tioxo-2-pirrolidinonileno y 5-metoxi-2-pirrolidinonileno; y

R^2 es un arilo, opcionalmente sustituido con halógeno, opcionalmente cuando R^2 es un fenilo está sustituido con halógeno, además opcionalmente cuando R^2 es naftilo, L^2 es un grupo alquilenilo. En una realización específica, R^3 es hidrógeno, L^1 es -NH- y R^1 es un fenilo sustituido con trifluorometoxi.

- 5 En el presente documento se describe el uso de los estereoisómeros, enantiómeros, mezclas de los mismos y sales, particularmente las sales fisiológicamente aceptables, de los compuestos de Fórmulas generales (II) y (IIa).

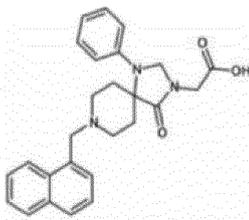
En el presente documento se describe el uso de compuestos de acuerdo con las Fórmulas generales (II) y (IIa), que tienen las Fórmulas estructurales 10 y 11:

10



Fórmula 10

El compuesto de Fórmula 10 también se representa en el presente documento como AKOS022 o AKOS022075291.



Fórmula 11

15

El compuesto de Fórmula 11 también se representa en el presente documento como DIV 00781.

- 20 Los compuestos de Fórmulas generales (II) y (IIa), tales como, pero sin limitarse a, los compuestos de Fórmulas estructurales 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, pueden convertirse en sales de los mismos, particularmente en las sales fisiológicamente aceptables para uso farmacéutico. Sales adecuadas de los compuestos de Fórmulas generales (II) y (IIa), tales como, pero sin limitarse a, los compuestos de Fórmulas estructurales 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, pueden formarse con ácidos orgánicos o inorgánicos, tales como, pero sin limitarse a, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido palmítico o ácido maleico. Los compuestos de Fórmulas generales (II) y (IIa) que contienen un grupo carboxilo, se pueden convertir en las sales de los mismos, particularmente en sales fisiológicamente aceptables para uso farmacéutico, con bases orgánicas o inorgánicas. Las bases adecuadas para este propósito incluyen, por ejemplo, sales de sodio, sales de potasio, sales de arginina, sales de amonio o sales de etanolamina.

- 30 Los compuestos de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa), especialmente los compuestos específicos de las Fórmulas 1, 2, 3, 10 y 11, son inhibidores de la oligomerización y la apoptosis del canal aniónico dependiente del voltaje (VDAC). El efecto de los compuestos de la invención y de los compuestos específicos de Fórmulas 1, 2, 3, 10 y 11 sobre la oligomerización de VDAC, es decir, su capacidad para inhibir la oligomerización de VDAC, está determinado por la tecnología de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET2, por sus siglas en inglés) que permite monitorizar directamente el estado oligomérico de las moléculas de VDAC en la membrana nativa en células vivas. La detección de BRET2 puede realizarse tal como se describe en la técnica (Keinan y col., (2010) *Oligomerization of the mitochondrial protein voltage-dependent anion channel is coupled to the induction of apoptosis*. Mol Cell Biol 30, 5698-5709).

- 40 Los compuestos de Fórmula general (II) y (IIa) presentan valores de IC_{50} para varias actividades en el intervalo de 0,1 μ M a 10 μ M.

- 45 La interacción directa entre VDAC y los compuestos de Fórmula general (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa), especialmente los compuestos específicos de Fórmula 1, 2, 3, 10 y 11, puede medirse evaluando la conductancia del canal VDAC, después de su reconstitución en una bicapa lipídica plana (PLB, por sus siglas en inglés). Los compuestos de las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa) interactúan con VDAC y reducen su conductancia de canal. Para obtener parámetros cuantitativos de esta interacción y derivar una constante de disociación, por ejemplo, puede realizarse un ensayo de interacción de termoforesis a microescala (MST, por sus siglas en inglés). De esta manera, los valores de disociación se derivan de las curvas que muestran la afinidad de los compuestos de la invención por VDAC.

50

Se descubrió que los compuestos de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa), especialmente los compuestos específicos de Fórmulas 1, 2, 3, 10 y 11, protegen a las células contra la muerte celular apoptótica. La capacidad de los compuestos de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa) para inhibir la apoptosis puede analizarse mediante tinción con anexina-V/yoduro de propidio (PI) y citometría de flujo.

Una de las formas en que se activa la apoptosis celular es mediante la liberación del Citocromo c (Cyto c) de la mitocondria al citosol. Se descubrió que los compuestos de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa), especialmente los compuestos específicos de Fórmulas 1, 2, 3, 10 y 11, inhiben la liberación de Cyto c de las mitocondrias, inducida por estímulos de apoptosis, protegiendo así a las células contra la muerte celular por apoptosis. El Cyto c liberado al citosol puede analizarse mediante inmunotransferencia usando anticuerpos específicos del Cyto c.

Se demostró que la inducción de la apoptosis altera la homeostasis del Ca^{2+} celular y la producción de energía. De hecho, muchos fármacos contra el cáncer y otros agentes citotóxicos, tales como taspigargina, estaurosporina, As_2O_3 y selenito, inducen la muerte celular apoptótica y alteran la homeostasis del Ca^{2+} celular (Keinan y col., (2013) *The role of calcium in VDAC1 oligomerization and mitochondria-mediated apoptosis*. Biochim Biophys Acta 1833, 1745-1754)). Se descubrió que los compuestos de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa), especialmente los compuestos específicos de Fórmulas 1, 2, 3, 10 y 11, inhiben la elevación de la concentración de iones de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) provocada por estímulos de apoptosis. El aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se asocia con un aumento en el Ca^{2+} mitocondrial, un proceso que cabe esperar que conduzca a la disipación del potencial mitocondrial ($m\Delta\Psi$) (Baumgartner y col., (2009) *Calcium elevation in mitochondria is the main Ca^{2+} requirement for mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening*. J Biol Chem 284, 20796-20803). Se descubrió que los compuestos de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa), especialmente los compuestos específicos de Fórmulas 1, 2, 3, 10 y 11, resultan eficaces en la prevención de la disminución de $m\Delta\Psi$ provocada por un agente citotóxico. La capacidad de los compuestos de la invención para prevenir la disminución de $m\Delta\Psi$ inducida por un agente citotóxico puede medirse usando éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM).

Los compuestos de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa), especialmente los compuestos específicos de Fórmulas 1, 2, 3, 10 y 11, son inhibidores de la producción de especies oxidativas reactivas celulares (ROS) y de la producción de ROS mitocondriales. El efecto de los compuestos de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa) especialmente los compuestos específicos de Fórmulas 1, 2, 3, 10 y 11, la inhibición de la producción de ROS celulares puede determinarse mediante fluorescencia de diclorodihidrofluoresceína (DCF) 2', 7'. El efecto de los compuestos de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id) y (II), especialmente los compuestos específicos de Fórmulas 1, 2, 3, 10 y 11, como inhibidores de la producción de ROS mitocondriales se puede medir con MitoSOX Red, un indicador de superóxido mitocondrial.

En vista de la capacidad de los compuestos de Fórmula general (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa), especialmente los compuestos específicos de Fórmula 1, 2, 3, 10 y 11, para inhibir una o más de la oligomerización de VDAC y/o de la conductancia iónica del canal de VDAC o apoptosis y/o la liberación de Cyto c de las mitocondrias y/o la elevación de la concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) provocada por un agente citotóxico y/o la producción de especies oxidativas reactivas (ROS), los compuestos de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa), especialmente los compuestos específicos de Fórmulas 1, 2, 3, 10 y 11, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden resultar adecuados para el tratamiento y/o la prevención de todas aquellas afecciones o enfermedades que pueden verse influenciadas por la inhibición de uno o más de la oligomerización de VDAC, la apoptosis, la liberación de Cyto c de las mitocondrias, la elevación de la concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y la producción de especies oxidativas reactivas (ROS). Por tanto, los compuestos de acuerdo con las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa), especialmente los compuestos específicos de las Fórmulas 1, 2, 3, 10 y 11, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son particularmente adecuados para la prevención o el tratamiento de enfermedades o afecciones asociadas con la apoptosis aumentada, tales como, sin limitarse a, enfermedades y trastornos neurodegenerativos y cardiovasculares. Los compuestos de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa), especialmente los compuestos específicos de Fórmulas 1, 2, 3, 10 y 11, y las sales farmacéuticamente aceptables de los, también son particularmente adecuados para la prevención o el tratamiento de enfermedades o afecciones tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, lesión por isquemia/reperfusión, apoptosis y autofagia de miocitos cardíacos, fibrilación auricular (FA), arritmia cardíaca y enfermedades relacionadas. Se ha descubierto que el tratamiento con un compuesto de Fórmula 1 mejoró la tarea del aprendizaje y la memoria de ratones transgénicos similares en la enfermedad de Alzheimer, para parecerse a los de los ratones de tipo salvaje, tal como se describe en los siguientes Ejemplos.

Otro aspecto de la invención se refiere al compuesto de acuerdo con la invención para su uso como fármaco.

Otro aspecto de la invención es el compuesto de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado de la lista que consta de enfermedades y trastornos neurodegenerativos y cardiovasculares, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca,

infarto de miocardio, lesión por isquemia/reperfusión, apoptosis, autofagia de miocitos cardíacos, fibrilación auricular (FA) y arritmia cardíaca.

5 Los compuestos de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa), tales como, pero sin limitarse a, los compuestos de Fórmulas estructurales 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, especialmente los compuestos específicos de Fórmulas 1, 2, 3, 10 y 11, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden formularse en un composición, que comprende opcionalmente otras sustancias activas, y uno o más de los excipientes convencionales inertes, tal como conocen los expertos en la materia. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar de acuerdo con la guía general proporcionada en la técnica, por ejemplo, por Remington, *The Science and*
10 *Practice of Pharmacy* (anteriormente conocida como *Remington's Pharmaceutical Sciences*), ISBN 978-0-85711-062-6. Las composiciones farmacéuticas, por ejemplo, en forma de formas de dosificación sólidas, formas de dosificación tópica y/ o formas de dosificación parenteral, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, cremas, ungüentos, parches, inyecciones y otros conocidos en la técnica constituyen otro aspecto de la invención.

15 Otro aspecto de la invención es la composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado de la lista que consta de enfermedades y trastornos neurodegenerativos y cardiovasculares, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, lesión por isquemia/reperfusión, apoptosis, autofagia de miocitos cardíacos, fibrilación auricular (FA) y arritmia cardíaca.

20 En particular, los compuestos de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa), particularmente de Fórmulas estructurales 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, especialmente los compuestos específicos de Fórmulas 1, 2, 3, 10 y 11, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden formularse como nanopartículas. Las nanopartículas pueden prepararse en polímeros muy conocidos como, por ejemplo, ácido poliláctico-co-glicólico, por ejemplo, tal como se describe en H.K. Makadia, S.J. Siegel, *Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable*
25 *Controlled Drug Delivery Carrier*, *Polymers* (Basel), 3 (2011) 1377-1397; y otros. Generalmente, los compuestos se pueden disolver conjuntamente con el polímero en un disolvente orgánico adecuado, y luego la fase orgánica se puede dispersar en una fase acuosa que comprende estabilizadores y/o agentes tensioactivos. Los estabilizadores pueden ser, por ejemplo, alcohol polivinílico, con pesos moleculares de aproximadamente 89.000 a 98.000 y un grado de hidrólisis de aproximadamente 99 %. Tras la evaporación del disolvente orgánico de la fase acuosa, las nanopartículas se pueden purificar, por ejemplo, mediante centrifugación y lavado.

30 Los compuestos encapsulados, por ejemplo, en forma de nanopartículas, de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa), tales como, pero sin limitarse a, los compuestos de Fórmulas estructurales 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, especialmente los compuestos específicos de Fórmulas 1, 2, 3, 10 y 11, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se pueden utilizar, de manera ventajosa, en diversas vías de administración. La vía intranasal puede ser un modo de administración adecuado a este respecto. De manera alternativa, las nanopartículas pueden administrarse sistémicamente para acumularse en tejidos cancerosos.

35 Las dosis de compuestos de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa), tales como, sin limitarse a, los compuestos de Fórmulas estructurales 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, especialmente los compuestos específicos de Fórmulas 1, 2, 3, 10 y 11, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, necesarias para lograr el tratamiento o la prevención de una enfermedad, trastorno o afección dependen habitualmente de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del compuesto que se va a administrar, del paciente, de la naturaleza de la enfermedad, el trastorno o la afección y del procedimiento y la frecuencia de administración. Intervalos de dosificación adecuados para compuestos de Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa), tales como, pero
45 sin limitarse a, los compuestos de Fórmulas estructurales 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, especialmente los compuestos específicos de Fórmulas 1, 2, 3, 10 y 11, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden ser de 1,0 a 100 mg/kg de peso corporal.

50 Compuestos de Fórmulas (I), (Ia-d), (II) y (IIa), que llevan al menos un átomo de flúor, por ejemplo, como parte del grupo trifluorometilo, tales como, pero sin limitarse a, los compuestos de Fórmulas estructurales 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, especialmente los compuestos específicos de Fórmulas 1, 2 y 10, pueden ser adecuados como agentes de diagnóstico para la tomografía por emisión de positrones. Para este propósito, estos compuestos se pueden modificar o sintetizar con el isótopo ¹⁸F, tal como se conoce en la técnica. Estos compuestos 18-fluorados pueden ser adecuados para obtener imágenes de la sobreexpresión de VDAC en organismos vivos. En particular, los compuestos 18-fluorados de las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa) pueden usarse para detectar afecciones patológicas o cambios debidos a tratamientos, particularmente para la detección temprana de enfermedades tales como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, cambios en el patrón de expresión de VDAC en células beta pancreáticas y otros tejidos.
60

En consecuencia, en el presente documento se describe un procedimiento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada de la lista que consiste en enfermedades y trastornos neurodegenerativos, enfermedades y trastornos cardiovasculares, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, lesión por isquemia/reperfusión, apoptosis, autofagia de miocitos cardíacos, fibrilación auricular (FA) y arritmia cardíaca, que comprende la administración al sujeto que lo
65

necesite de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmulas generales (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (II) y (IIa), tal como se definen en el presente documento.

Ejemplos

5

Materiales

Cianuro de carbonilo m-clorofenilhidrazona (CCCP), carboximetilcelulosa (CMC), cisplatino, citocalasina B, dimetilsulfóxido (DMSO), DL-ditiotreitol (DTT), EDTA, HEPES, leupeptina, fenilmetilsulfonil fluoruro (PMS), N-decano, selenito de sodio, asolectina de soja, estaurosporina (STS), éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM) y Tris se adquirieron de Sigma (St. Louis, MO). Se obtuvo N,N-lauril-(dimetil)-aminaóxido (LDAO) de Fluka (Buchs, Suiza). La coelenterazina (Deep Blue C [DBC]) se obtuvo de Bioline (Taunton, MA). La hidroxiapatita (Bio-Gel HTP) se adquirió de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). La digitonina proviene de Calbiochem-Novobiochem (Nottingham, Reino Unido). Celite se adquirió en British Drug Houses (Londres, Reino Unido). Los anticuerpos monoclonales de conejo contra VDAC1 (ab154856) y los anticuerpos monoclonales de ratón contra GAPDH (ab9484) procedían de Abcam (Cambridge, Reino Unido). Los anticuerpos monoclonales contra actina se obtuvieron de Millipore (Billerica, MA) y los anticuerpos anti-citocromo c (556433) se obtuvieron de BD Bioscience (San José, CA). Los anticuerpos policlonales anti-AIF (factor inductor de apoptosis) proceden de R&D Systems (Minneapolis, MN). Fluo-4-AM® (nombre/número CAS: glicina, N-[4-[6-[(acetiloxi)metoxi]-2,7-difluoro-3-oxo-3H-xanten-9-il]-2-[2-[bis[2-[(acetiloxi)metoxi]-2-oxoetil]amino]-5-metilfenoxi]etoxi]fenil]-N-[2-[(acetiloxi)metoxi]-2-oxoetil]-,(acetiloxi)metil éster 273221-67-3), carboxi-H2DCFDA® (5-(y-6)-carboxi-2",7"-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (carboxi-H2DCFDA) y MitoSOX® Red (superóxido mitocondrial rojo indicador) fueron adquiridos de Invitrogen (Grand Island, NY). Los anticuerpos anti-ratón y anti-conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) se obtuvieron de Promega (Madison, WI). El bis[succinimidilsuccinato] de etilenglicol (EGS) se obtuvo de Pierce (Rockford, IL). El isotiocianato de anexina V-fluoresceína (FITC) era de Enzo Life Sciences (Lausen, Suiza). Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) y los suplementos de suero bovino fetal (FBS), L-glutamina y penicilina-estreptomicina se adquirieron en Biological Industries (Beit-Haemek, Israel). El compuesto de Fórmula 10 (AKOS 022) se obtuvo de AKos Consulting & Solutions GmbH (Alemania), con el número de catálogo AKOS022075291. Se obtuvo ácido poliláctico-co-glicólico (poli-D, L-lactida-co-glicólido, 30.000-60.000 Da) de Sigma. Sigma proporcionó alcohol polivinílico, PM 89000-98000, grado de hidrólisis del 99 %.

Procedimientos

Análisis LC-MS

35

La cromatografía se realizó usando una columna Bridge C18 regular de 4,6 x 50 mm, 3,5 µm, mantenida a 40 °C. Los materiales se eluyeron a 2 ml/min, con una mezcla de solución acuosa 0,01 M de carbonato de amonio y acetonitrilo, con acetonitrilo aumentando de 5 % a 100 % por periodos tal como se describe a continuación y eluyendo con acetonitrilo al 100 %, con detección en la masa objetivo.

40

Cultivo de tejidos

Se cultivaron líneas celulares de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) HEK-293, HeLa, SH-SY5Y y K-Ras transformadas Bax^{-/-}/Bak^{-/-} a 37 °C en una atmósfera de 95 % de aire y 5 % de CO₂ en DMEM suplementado con FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM, 1000 U/ml de penicilina y 1 mg/ml de estreptomicina. Células T-REx-293 (células HEK que contienen de manera estable el vector regulador pcDNA6/TR y, por lo tanto, expresan el represor de tetraciclina; Invitrogen) que expresan de manera estable hVDAC1-shRNA y muestran una baja (10-20 %) expresión endógena de VDAC1 (a las que se hace referencia en el presente documento como T-REx-pS10) se cultivaron en las mismas condiciones que las células HEK-293, con una adición de 5 µg/ml de blasticidina.

50

Reticulación de VDAC-1

Se recolectaron células de prueba apropiadas (2,5-3 mg/ml) en PBS después del tratamiento y se incubaron con el reactivo de reticulación EGS en una proporción de 100-300 µM para una muestra de concentración de 2-3 mg de proteína/ml (pH 8,3) durante 15 minutos. La concentración de proteína se determinó según el ensayo de Lowry. Las muestras (60-80 µg de proteína) se sometieron a SDS-PAGE mediante una técnica estándar y se realizó una inmunotransferencia usando anticuerpos anti-VDAC1. Los geles se transfirieron eléctricamente a membranas de nitrocelulosa para la inmunotinción. Las membranas se incubaron con una solución de bloqueo que contenía leche desnatada en polvo al 5 % y Tween-20 al 0,1 % en solución salina tamponada con Tris, seguido de incubación con anticuerpos monoclonales anti-VDAC1, anti-citocromo c, anti-AIF o anti-actina. A continuación, las membranas se incubaron con IgG anti-ratón o anti-conejo conjugada con HRP (1:10.000), sirviendo como anticuerpos secundarios. El marcaje de anticuerpos se detectó por quimioluminiscencia. Para detectar oligómeros VDAC1, las membranas se trataron con glicina 0,1 M, pH 2,0, antes de la inmunotransferencia y se lavaron varias veces con Tween-20 al 0,1 % en solución salina tamponada con Tris. El análisis cuantitativo de las bandas de dímeros, trímeros y multímeros de VDAC1 inmunorreactivas se realizó utilizando FUSION-FX (Vilber Lourmat, Francia).

65

Purificación de VDAC1

5 Brevemente, se incubaron mitocondrias de hígado de rata (5 mg/ml) en Tris-HCl 10 mM, pH 7,2, con LDAO al 2 % a 0 °C durante 20 minutos, seguido de centrifugación (30 min, 14.000 g) y el sobrenadante obtenido se cargó en una columna seca de celite: hidroxapatita (2:1). Se eluyó VDAC1 con una solución que contenía LDAO al 2 %, Tris-HCl 10 mM, pH 7,2, NaCl 50 mM y NaH₂PO₄ de 20 a 22 mM, con detección de VDAC1 mediante tinción con azul de Coomassie. Las fracciones que contenían VDAC1 se dializaron frente a Tris-HCl 10 mM, pH 7,2, y se sometieron a una segunda etapa de cromatografía en una columna de carboximetilcelulosa (CMC) de la que se eluyó VDAC1 con una solución que contenía Tris-HCl 10 mM, pH 7,2, LDAO al 0,1 % y NaCl 500 mM, detectado como anteriormente. Las fracciones que contenían VDAC1 se recogieron y utilizaron para ensayos de conductancia del canal VDAC1 y MST.

Conductancia del canal VDAC1

15 La reconstitución de VDAC1 de rata purificado en una bicapa lipídica plana (PLB) y los registros de corriente y análisis de datos de canal único y múltiple posteriores se llevaron a cabo como consta a continuación. Brevemente, el PLB se preparó a partir de asolectina de soja disuelta en n-decano (30 mg/ml). Se añadió VDAC1 purificado (1 ng) a la cámara definida como el lado *cis* que contenía NaCl 1 M, Hepes 10 mM, pH 7,4. Las corrientes se registraron bajo fijación de voltaje usando un amplificador Bilayer Clamp BC-535B (Warner Instrument, Hamden, CT). Las corrientes, medidas con respecto al lado *trans* de la membrana (tierra), se filtraron en paso bajo a 1 kHz y se digitalizaron en línea utilizando una placa de interfaz Digidata1440 y el software pClampex 10.2 (Axon Instruments, Union City, CA).

Análisis de termoforesis a microescala (MST)

25 El análisis de MST se realizó usando un aparato NanoTemper Monolith NT.115. Brevemente, VDAC1 10 μM purificado se marcó con fluorescencia usando el kit de etiquetado de proteínas NanoTempers BLUE de acuerdo con las instrucciones del fabricante (L001, NanoTemper Technologies). Se incubó una concentración constante de la proteína con diferentes concentraciones del inhibidor de prueba en PBS. Posteriormente, se cargaron 3-5 μl de las muestras en un capilar de vidrio (Capilares Monolith NT) y se realizó el análisis de termoforesis (LED 20 %, láser IR 20 %).

Medida de la producción de superóxido

35 La producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) se controló usando la sonda fluorescente sensible a oxidantes DCFDA (diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína), un indicador de ROS permeable a las células, que se convierte por H₂O₂ y peroxidasas, en el derivado fluorescente DCF (2', 7'-diclorofluoresceína). Brevemente, las células tratadas y no tratadas se incubaron con DCFDA (4 μM) durante 30 minutos. Para el ROS acumulado mitocondrial, se utilizó MitoSOX Red (4 μM), indicador de superóxido mitocondrial para imágenes de células vivas de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, Grand Island, NY). La fluorescencia se midió usando un software de citómetro de flujo FACSCalibur® (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ).

Determinación del potencial de membrana mitocondrial

45 El potencial de membrana mitocondrial (mΔΨ) se determinó usando TMRM (tetrametilrodamina, éster metílico, perclorato), un colorante sensible al potencial y un lector de placas. Las células HEK-293 se trataron con los compuestos de prueba y un inductor apoptótico y posteriormente se incubaron con TMRM (0,5 μM, 20 min). A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS y se examinaron con el software de citómetro de flujo FACSCalibur® (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). La disipación de ΔΨ mediada por CCCP (cianuro de carbonilo m-clorofenilhidrazina) sirvió como control.

Análisis de concentración de Ca²⁺ celular

55 Se usó Fluo-4 AM® para controlar los cambios en los niveles de Ca²⁺ citosólico. Las células, por ejemplo, células HeLa (1x10⁶ células/ml), se recolectaron después del tratamiento, se recogieron (fuerza centrifuga relativa (RCF) 1.500 xg) (durante 10 min) y se lavaron con tampón HBSS (solución salina equilibrada de Hanks), pH 7,3-7,4 (5,33 mM de KCl, 0,44 mM de KH₂PO₄, 138 mM de NaCl, 4 mM de NaHCO₃, 0,3 mM de Na₂HPO₄, 5,6 mM de glucosa, 0,03 mM de rojo de fenol) suplementado con 1,8 mM de CaCl₂ (HBSS+) y se incubó con 2,5 μM de Fluo-4 AM® en 200 μl de tampón (HBSS+) en la oscuridad durante 30 minutos a 37 °C. Después de lavar el tinte restante, las células se incubaron con 200 μl de tampón (HBSS+) y se midieron los cambios en la concentración de Ca²⁺ libre celular inmediatamente con análisis FACS. Se registraron al menos 10.000 eventos en el detector FL1, se representaron como un histograma y se analizaron con el software de citometría de flujo FACS Calibur. Las células positivas mostraron un cambio a un nivel mejorado de fluorescencia verde (FL1).

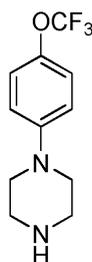
Liberación de citocromo c de las mitocondrias

Las células tratadas con inductores de apoptosis en ausencia o presencia de los compuestos de prueba se recolectaron, se lavaron dos veces con PBS, pH 7,4 y se resuspendieron suavemente a 6 mg/ml en tampón helado (KCl 100 mM, MgCl₂ 2,5 mM, 250 sacarosa mM, HEPES/KOH 20 mM pH 7,5, EDTA 0,2 mM, ditiotreitól 1 mM, leupeptina 1 µg/ml, citocalasina B 5 mg/ml y PMSF 0,1 mM) que contenía digitonina al 0,025 % y se incubaron durante 10 minutos en hielo. Las muestras se centrifugaron a 10.000 xg (fuerza centrífuga relativa - RCF) a 4 °C durante 5 minutos para obtener sobrenadantes (extractos citosólicos libres de mitocondrias) y sedimento (fracción que contiene mitocondrias). El citocromo c liberado al citosol se analizó mediante inmunotransferencia usando anticuerpos específicos del citocromo c. Se utilizaron anticuerpos anti-VDAC1 y anti-GAPDH para verificar que los extractos citosólicos estaban libres de mitocondrias.

Citometría de flujo con yoduro de propidio (PI) y tinción con anexina V-FITC

Las células, por ejemplo, las células HeLa (2 x 10⁵), no tratadas o tratadas con reactivos inductores de apoptosis, se analizaron para determinar la muerte celular apoptótica usando análisis de PI, anexina V-FITC y citómetro de flujo. Las células se recogieron (1500 xg durante 10 minutos), se lavaron y se resuspendieron en 200 µl de tampón de unión (HEPES/NaOH 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM y CaCl₂ 2,5 mM). Se añadió anexina V-FITC de acuerdo con el protocolo recomendado (Enzo Life Sciences, Suiza) y las células se incubaron en la oscuridad durante 15 minutos. A continuación, las células se lavaron con tampón de unión y se resuspendieron en 200 µl de tampón de unión, al que se añadió PI inmediatamente antes del análisis por citometría de flujo. Se recogieron al menos 10.000 eventos, se registraron en un diagrama de puntos y se analizaron mediante el software de citómetro de flujo FACSCalibur® (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ).

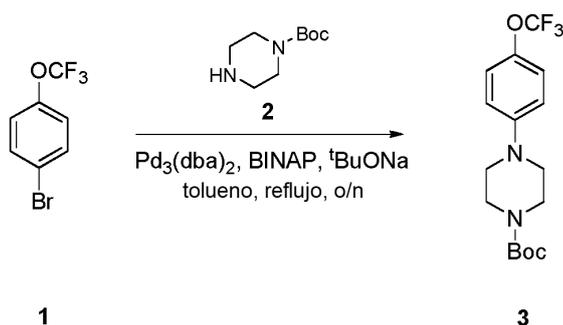
Preparación del intermedio 1



Intermedio 1

Paso A

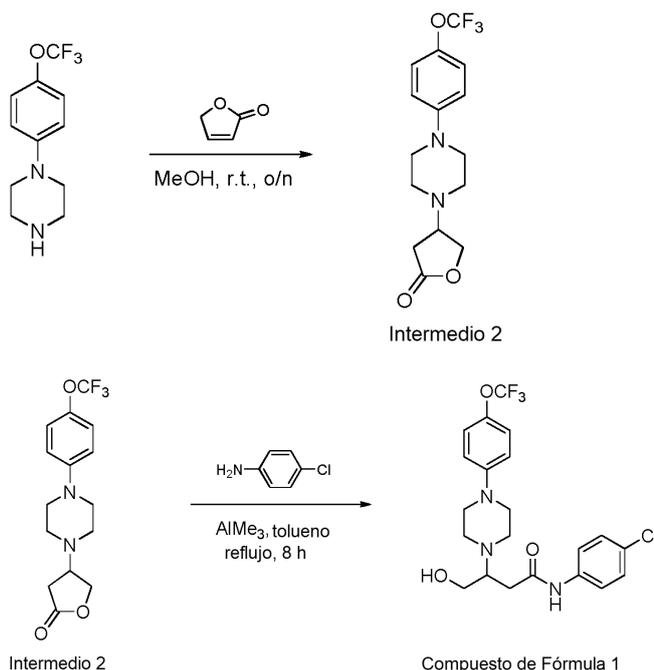
El intermedio 1 se sintetizó de acuerdo con el siguiente esquema.



Se utilizó el reactivo de material de partida 1 (p-trifluorometoxi-bromobenceno; 1-bromo-4-(trifluorometoxi)benceno). A una solución del reactivo 1 (2,41 g, 10 mmol) en tolueno (50 ml) se añadieron consecutivamente los siguientes compuestos: reactivo 2 (1-Boc-piperazina; terc-butil piperazina-1-carboxilato) (1,68 g, 9 mmol), Pd₂(dba)₃ (tris-(dibencilidena)acetona)dipaladio) (290 mg, 0,5 mmol), 2,2'-bis(difenilfosfina)-1,1'-binaftilo (BINAP) (311 mg, 0,5 mmol) y t-butóxido de sodio (1,92 g, 20 mmol). La mezcla se calentó a reflujo bajo atmósfera de N₂ durante la noche. El disolvente se evaporó para obtener como residuo el reactivo bruto 3(terc-butil 4-(4-(trifluorometil)-fenil)-piperazina-1-carboxilato).

Paso B

El reactivo 3 se utilizó directamente para el siguiente paso sin purificación adicional. El grupo Boc se eliminó mediante hidrólisis ácida de acuerdo con el siguiente esquema.



5

Paso A

Se agitó una mezcla de Intermedio 1 (2,0 g, 8 mmol) y furan-2 (5H)-ona (2 (5H)-Furanona) (1,3 g, 16 mmol) en metanol (MeOH) (5 ml) a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se evaporó al vacío y el residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa para proporcionar el Intermedio 2 [3-(4-(4-(trifluorometoxi)fenil)-piperazin-1-il)-dihidrofuran-2(3H)-ona] como un sólido blanco (1,3 g, 0,4 mmol, rendimiento del 50 %).

El producto (Intermedio 2) se analizó usando el procedimiento LC-MS tal como se ha descrito anteriormente con rampas durante 1,6 minutos y elución durante 1,4 minutos, con detección a +330. El cromatograma se representa en la Figura 3.

Paso B

A una solución de 4-cloroanilina (254 mg, 2 mmol) en tolueno (5 ml) se le añadió trimetil aluminio (AlMe_3) (2,0 M en tolueno, 2 ml). Después de agitar durante 10 minutos, se añadió el Intermedio 2 (330 mg, 1,0 mmol) a la solución y la mezcla resultante se calentó a 80 °C durante 8 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó al vacío y el residuo se purificó mediante HPLC preparativa inversa para producir el compuesto de Fórmula 1 (VBIT-4) como un sólido blanco (200 mg, rendimiento del 44 %).

El producto (compuesto de Fórmula 1) se analizó usando el procedimiento LC-MS tal como se ha descrito anteriormente con rampas durante 3 minutos y elución durante 1 minuto, con detección a +457. El cromatograma se representa en la Figura 4a.

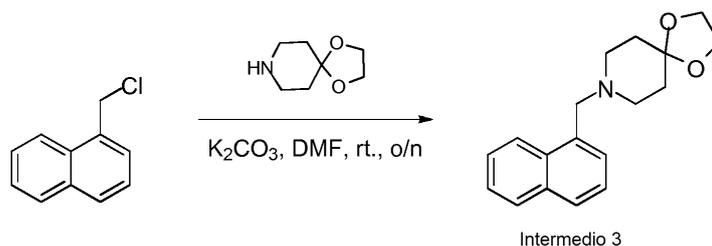
Los espectros de RMN se obtuvieron en un aparato de 400 MHz (de Varian).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6): δ 10,081 (s, H), 7,601 (d, $J=0,5$ Hz, 2 H), 7,341 (d, $J=1,2$ Hz, 2 H), 7,177 (d, $J=2,2$ Hz, 2 H), 6,980 (d, $J=2,3$ Hz, 2 H), 4,538 (dd, $J=1,2$ Hz, 1 H), 3,561 (m, $J=1,3$ Hz, H), 3,440 (m, $J=1,4$ Hz, H), 3,112 (m, $J=1,2$ Hz, 5H), 2,807 (m, $J=1,6$ Hz, 2H), 2,709 (m, $J=1,5$ Hz, 2H), 2,400 (m, $J=1,4$ Hz, H), 2,150 (m, $J=1,4$ Hz, H). El espectro se muestra en la Figura 4b.

Ejemplo de referencia 3

Preparación del compuesto de Fórmula 3 (VBIT-12, ácido 2-(1-(naftalen-1-ilmetil)-4-(fenilamino)piperidin-4-carboxamido)acético)

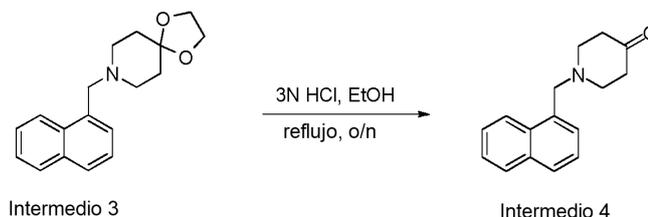
Paso 1



5 Se disolvió 1-(clorometil) naftaleno (8,8 g, 50 mmol) en dimetilformamida (DMF) (100 ml) y se añadió carbonato de potasio (13,8 g, 100 mmol), seguido de 4-piperidona etilen cetal (1,4-dioxa-8-azaespiro[4,5]decano) (7,2 g, 50 mmol). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se evaporó al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (eluyendo con diclorometano) para proporcionar cetal naftilado puro (Intermedio 3) como un sólido blanco (8,5 g, rendimiento del 60 %).

10 El intermedio 3 se analizó usando el procedimiento LC-MS tal como se ha descrito anteriormente con rampas durante 1,6 minutos y elución durante 1,4 minutos, con detección a +283. El cromatograma se representa en la Figura 5.

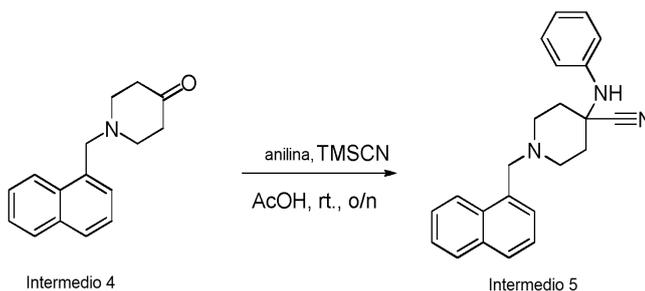
15 Paso 2



20 Una solución del Intermedio 3 (producto del Paso 1) (1,42 g, 5 mmol) en 20 ml de ácido clorhídrico 3N (HCl) en etanol (EtOH) se calentó a reflujo durante la noche. La mezcla resultante se concentró al vacío para proporcionar el Intermedio 4 (1-(naftalen-1-ilmetil)piperidin-4-ona), que se usó sin purificación adicional.

25 El producto (Intermedio 4) se analizó utilizando el procedimiento LC-MS tal como se ha descrito anteriormente con rampas durante 1,6 minutos y elución durante 1,4 minutos, con detección a +239. El cromatograma se representa en la Figura 6.

30 Paso 3



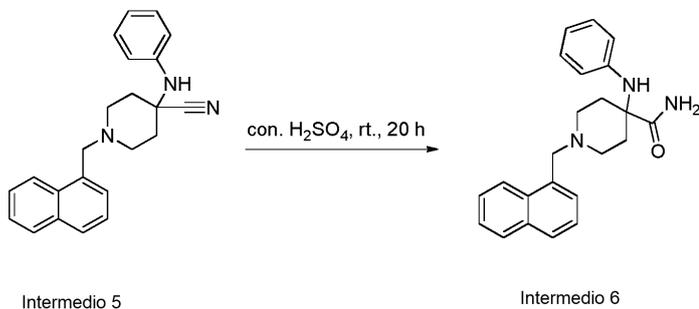
30 El intermedio 4 (N-metilnaftil-4-piperidinona) (2,4 g, 10 mmol) y anilina (930 mg, 10 mmol) se disolvieron en ácido acético glacial (AcOH) (25 ml). A continuación, se añadió gota a gota cianuro de trimetilsililo (TMSCN) (1,3 ml, 10 mmol) durante un periodo de 10 minutos, manteniendo la temperatura por debajo de 40 °C usando un baño de agua fría. La solución se agitó durante la noche y luego se vertió en una mezcla de hielo de hidróxido de amonio, formada por 50 ml de solución de hidróxido de amonio concentrado y 100 g de hielo triturado. Se añadió lentamente hidróxido de amonio concentrado adicional hasta que el pH subió a 10. La mezcla resultante se extrajo tres veces con 100 ml de cloroformo y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron hasta un residuo de nitrilo amarillo (Intermedio 5, 1-(naftalen-1-ilmetil)-4-(fenilamino)piperidina-4-carbonitrilo) que se usó en el siguiente paso directamente sin purificación adicional.

40 El producto (Intermedio 5) se analizó usando el procedimiento LC-MS tal como se ha descrito anteriormente con rampas durante 1,6 minutos y elución durante 1,4 minutos, con detección a +341. El cromatograma se representa en la Figura 7.

Paso 4

El nitrilo (intermedio 5) se hidrolizó de acuerdo con el siguiente esquema:

5



Se mezcló el intermedio 5 (el producto del paso 3) con 10 ml de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió lentamente una solución concentrada de hidróxido de amonio hasta que el pH subió a 10. La mezcla final se concentró y se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa para proporcionar la amida (Intermedio 6, 1-(naftalen-1-ilmetil)-4-(fenilamino)piperidina-4-carboxamida) como un sólido blanco (400 mg, rendimiento del 11 % para los pasos 2-4).

10

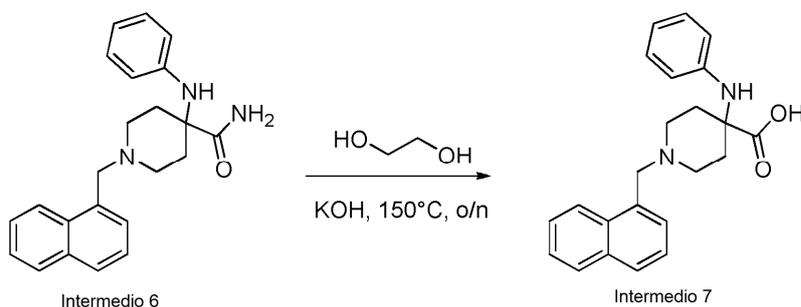
El producto (Intermedio 6) se analizó usando el procedimiento LC-MS tal como se ha descrito anteriormente con rampas durante 1,6 minutos y elución durante 1,4 minutos, con detección a +359. El cromatograma se representa en la Figura 8.

15

Paso 5

El intermedio 6 se hidrolizó adicionalmente a ácido carboxílico de acuerdo con el siguiente esquema:

20



Se disolvió el intermedio 6 (360 mg, 1,0 mmol) en etilenglicol (10 ml) y se añadió hidróxido de potasio (KOH) (280 mg, 5 mmol). La mezcla resultante se calentó a 150 °C y se agitó durante la noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla final se concentró al vacío y se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa para proporcionar el ácido carboxílico libre (Intermedio 7, ácido 1-(naftalen-1-ilmetil)-4-(fenilamino)-piperidina-4-carboxílico) como un sólido blanco (200 mg, rendimiento del 50 %).

25

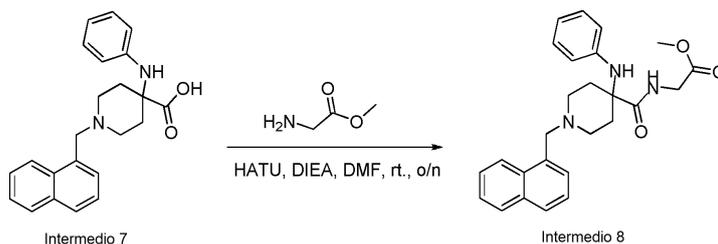
El producto (Intermedio 7) se analizó usando el procedimiento LC-MS tal como se ha descrito anteriormente con rampas durante 1,6 minutos y elución durante 1,4 minutos, con detección a +360. El cromatograma se representa en la Figura 9.

30

Paso 6

El intermedio 7 se glicinó con 2-aminoacetato de metilo (glicinato de metilo) de acuerdo con el siguiente esquema:

35

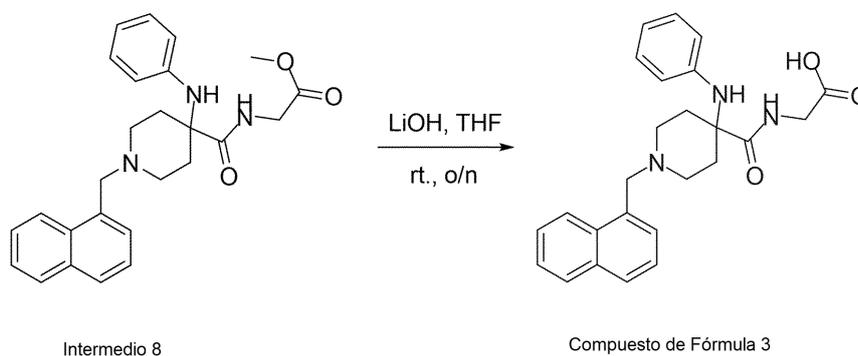


El intermedio 7 (180 mg, 0,5 mmol), HATU (hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo-[4,5-b]-piridinio 3-óxido) (380 mg, 1,0 mmol), N,N-diisopropiletilamina (DIEA) (260 mg, 2,0 mmol) y glicinato de metilo (90 mg, 1,0 mmol) se disolvieron en dimetilformamida (DMF) (10 ml) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla resultante se concentró al vacío y se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa para proporcionar el éster metílico de glicinato (Intermedio 8, (1-(naftalen-1-ilmetil)-4-(fenilamino)piperidina-4-carbonil)glicinato de metilo) como un sólido blanco (100 mg, rendimiento del 46 %).

El producto (Intermedio 8) se analizó usando el procedimiento LC-MS tal como se ha descrito anteriormente con rampas durante 1,6 minutos y elución durante 1,4 minutos, con detección en +431. El cromatograma se representa en la Figura 10.

Paso 7

El Intermedio 8 (el producto de éster metílico de glicinato del paso 6) se hidrolizó con hidróxido de litio en tetrahidrofurano, de acuerdo con el siguiente esquema:



A una solución del Intermedio 8 (100 mg, 0,23 mmol) en 5 ml de THF, se le añadió una solución de hidróxido de litio (LiOH) (40 mg, 1,0 mmol) en 5 ml de agua y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Posteriormente, el pH se ajustó a aproximadamente 7 con HCl 1,0 N. La mezcla se concentró al vacío y se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar el compuesto de Fórmula 3 (VBIT-12) (20 mg, rendimiento del 20 %) como un sólido blanco.

El producto (compuesto de Fórmula 3; nombre IUPAC: ácido 2-(1-(naftalen-1-ilmetil)-4-(fenilamino)piperidin-4-carboxamido)acético se analizó usando el procedimiento LC-MS tal como se ha descrito anteriormente con rampas durante 3 minutos y elución durante 1 minuto, con detección en +417. El cromatograma se representa en la Figura 11a.

Los espectros de RMN se obtuvieron en un aparato de 400 MHz (de Varian).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO/D₂O-d₆): δ8,63 (d, H), 8,1 (s, H), 7,9 (d, J=1,2 Hz, 2 H), 7,89 (d, J=2,2 Hz, 2 H), 7,87 (d, J=2,3 Hz, 2 H), 7,71 (dd, J=1,2 Hz, 2 H), 7,67 (d, J=1,3 Hz, 2 H), 7,16 (2, J=1,4 Hz, 2 H), 6,78 (m, 4 H), 3,80 (s, 2 H), 3,71 (s, 2 H), 2,31 (d, J=2,4, Hz, 2 H), 2,25 (s, 2 H), 2,17 (t, J=2,4, 2H), 1,98 (t, J=1,9, 2H), 1,88 (t, J=1,8, 2H).

Los espectros en d₆-DMSO y en d₆-DMSO con D₂O se muestran en las Figuras 11b y 11c, respectivamente.

Ejemplo 4

Separación quiral de enantiómeros del compuesto de Fórmula 1 (VBIT-4)

El compuesto racémico de Fórmula 1 (VBIT-4) se analizó mediante HPLC analítica quiral. Brevemente, el material se eluyó en una columna Chiralpak-IC3 (4,6x100 mm, 3 μm), se mantuvo a 35 °C, a 2 ml/min, con acetonitrilo y una solución al 20 % de DEA al 0,1 % en metanol. Se obtuvieron dos picos, con una diferencia de 0,38 minutos en el tiempo de retención (2,32 y 2,7 minutos), en la proporción esperada de aproximadamente 50,0 %. Luego se llevó a cabo HPLC quiral preparativa. Cada pico se recogió por separado. Los enantiómeros se analizaron mediante RMN de 400 MHz pero no fueron discernibles en DMSO deuterado.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ10,081 (s, H), 7,601 (d, J=0,5 Hz, 2 H), 7,341 (d, J=1,2 Hz, 2 H), 7,177 (d, J=2,2 Hz, 2 H), 6,980 (d, J=2,3 Hz, 2 H), 4,538 (dd, J=1,2 Hz, 1 H), 3,561 (m, J=1,3 Hz, H), 3,440 (m, J=1,4 Hz, H), 3,112 (m, J=1,2 Hz, 5H), 2,807 (m, J=1,6 Hz, 2H), 2,709 (m, J=1,5, Hz, 2H), 2,400 (m, J=1,4, Hz, H), 2,150 (m, J=1,4, Hz, H).

La Figura 12a muestra un espectro de RMN representativo en DMSO deuterado relacionado con el enantiómero individual separado del compuesto de Fórmula 1, VBIT-4-1 (también denominado BGD-4-1). La Figura 12b muestra

un espectro de RMN representativo en DMSO deuterado relacionado con el enantiómero individual separado del compuesto de Fórmula 1, VBIT-4-2 (también denominado BGD-4-2).

Ejemplo 5

5 Ensayo de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET-2) para controlar la oligomerización de VDAC1 en células vivas

10 Los plásmidos que codifican las proteínas de fusión rat(r)VDAC1-GFP2 y rVDAC1-luc se construyeron usando los plásmidos BRET2 (Perkin Elmer, Waltham, MA). El gen rVDAC1 se clonó en sitios BamHI y HindIII de los plásmidos BRET2 (variantes N2) y se amplificó usando el cebador directo CGAAGCTTATGGCTGTGCCACCCACGTATGCC y el cebador inverso GGATCCGCCGCCGCCGAGCCGCCGCCGCTGCTTCAAAT-TC. El cebador inverso se diseñó para contener una secuencia de enlace doble ((GGGS)₂) que conecta VDAC1 y los genes *RLuc* o *GFP2* que introducen flexibilidad en la región.

15 Se introdujo un plásmido que codifica shRNA contra VDAC1 humano (hVDAC1) para el silenciamiento específico de VDAC1 humano endógeno en un vector que expresa shRNA. La secuencia que codifica hVDAC1-shRNA se creó utilizando las dos secuencias de oligonucleótidos complementarias, cada una de las cuales contiene la secuencia diana de 19 nucleótidos de hVDAC1 (337-355), seguida de un espaciador corto y una secuencia antisentido de la diana:

20 oligonucleótido 1, AGCTTAAAAACACTAGGCACCGAGATTATCTCTTGAATAATCTCGGTGCCTAGTGTG y oligonucleótido 2, GATCCACACTAGGCACCGAGATTATCAAGAGATAATCTCGGTGCCTAGTGTGTTTTTA, estando la secuencia derivada de VDAC1 subrayada. La secuencia de codificación de hVDAC1-shRNA fue clonada en los sitios *Bgl*II y *Hind*III del plásmido pSUPERretro (OligoEngine, Seattle, WA), que contenía un gen de resistencia a puromicina. La transcripción de esta secuencia bajo el control del promotor de ARN H1 de la ARN polimerasa III produce una horquilla (hVDAC1-shRNA).

30 Se sembraron células T-REx-293 que expresan de manera estable hVDAC1-shRNA, mostrando una expresión de VDAC1 endógena baja (10 a 20 %) (denominadas células T-REx-pS10) en placas de 96 pocillos a una densidad de 9.000 células por pocillo y se incubaron durante al menos 24 horas hasta su adhesión.

35 Las células se transfectaron usando el procedimiento del fosfato cálcico. Las transfecciones se llevaron a cabo con 0,2 µg de un plásmido que codifica rVDAC1-RLuc y con 0,8 µg de un plásmido que codifica rVDAC1-GFP2. Como control negativo, las células se transfectaron con plásmidos que codifican rVDAC1-RLuc (0,2 µg de ADN) y GFP2 (0,8 µg). En otro control (células de control), las células también se transfectaron con un plásmido que codifica rVDAC1-luc (0,2 µg) y el plásmido pcDNA4/TO (0,8 µg).

40 La señal BRET2 representa la relación de la fluorescencia de GFP2, medida en su longitud de onda de emisión (510 nm), sobre la intensidad de la luz (luminiscencia) emitida a 395 nm. Todas las mediciones se realizaron utilizando el lector ELISA Infinite 200 (Tecan). Las señales BRET2 se definieron como relación de intensidad GFP2/RLuc y se calcularon de la siguiente manera:

- 45 (a) Las señales BRET2 obtenidas en células VDAC1-RLuc/pcDNA4/TO (células de control) se restaron de las señales obtenidas en células que expresan VDAC1-RLuc y VDAC1-GFP2.
 (b) Se calcularon las proporciones netas de actividades de luciferasa de *Renilla* y GFP2 (proporción de GFP2/luciferasa después de la sustracción de las señales BRET2 de las células de control).
 (c) Se compararon las proporciones de señales BRET2 entre diferentes células expuestas y no expuestas a inductores de apoptosis.
 50 (d) Para la validación de la solidez del ensayo BRET2, la oligomerización de VDAC1 fue inducida por el inductor de apoptosis STS (Starosporine). El factor Z y el factor Z', que es una medida de la solidez del ensayo, se calcularon de la siguiente manera:

$$55 \quad Z = [\text{BRET2 Ratio (AVG +STS)} - (\text{AVG -STS})] / \text{SD}(+STS) .$$

Un factor Z > 3 se considera bueno y se obtuvo el valor Z calculado de aproximadamente 28.

$$Z' = 1 - [3 \times \text{SD}(+STS) + 3 \times \text{SD}(-STS)] / [\text{AVG}(+STS) - \text{AVG}(-STS)]$$

60 Se obtuvo un valor de 0,58 para el factor Z', que está en el intervalo requerido de 0,5-1; donde SD indica desviación estándar y AVG = promedio de la señal BRET2 de varias muestras (repeticiones 10-36).

De manera alternativa, el factor Z se calculó usando la ecuación: $Z = [\text{Relación BRET2 (AVG + STS)} - (\text{AVG - STS})] / \text{SD}(+STS)$, donde un factor Z > 3 se considera bueno.

Como medida de la solidez del ensayo, el factor Z' se obtuvo mediante la ecuación: $Z' = 1 - [3 \times SD(+STS) + 3 \times SD(-STS)] / [AVG(+STS) - AVG(-STS)]$.

a) El valor de 0,58 para el factor Z' está en el rango requerido de 0,5-1 para el ensayo basado en células.

El ADN que codifica las proteínas de fusión rVDAC1-Rluc (en el que RLuc se conectó a rVDAC1 en la posición terminal C a través de un enlazador (GGGS)) y rVDAC1-GFP2 (en el que el GFP2 se fusionó con el terminal C de rVDAC1) fue clonado en Vectores BRET2. rVDAC1-GFP2 y rVDAC1-Rluc se expresaron en células T-REx-293 que expresan de manera estable shRNA-hVDAC1 y un nivel bajo de hVDAC1 endógeno (denominadas células T-REx-pS10) siendo el hVDAC1-shRNA específico de VDAC1 humano, lo que permitió la expresión de rVDAC1 y disminuyó la participación de hVDAC1 endógeno en la oligomerización, mejorando así la señal BRET2. Los niveles de expresión de rVDAC1-GFP2 y rVDAC1-Rluc se correlacionaron con la cantidad de plásmidos utilizados. Específicamente, se descubrió que 0,8 µg de rVDAC1-GFP2 y 0,1 µg de rVDAC1-Rluc proporcionaban la mejor señal.

Los presentes inventores han demostrado recientemente que el selenito induce la apoptosis y la oligomerización de VDAC1. Por lo tanto, se utilizó selenito para mejorar la oligomerización de VDAC1 detectable por BRET-2. Por el contrario, el ácido 4,4-diisotiocianoestilbeno-trans-2,2-disulfónico (DNDS), un inhibidor de la conductancia del canal VDAC1 y la apoptosis (Ben-Hail D, Shoshan-Barmatz V. *VDAC1-interacting anion transport inhibitors inhibit VDAC1 oligomerization and apoptosis*. *Biochim Biophys Acta*. Julio 2016; 1863 (7 Pt A): 1612-2) se utilizó para inhibir cualquier señal BRET2 inducida por selenito. La reticulación química y el análisis de transferencia Western también sirvieron para demostrar cualquier mejora o inhibición de la oligomerización de VDAC1.

Las células T-REx-293 se trataron de la siguiente manera: primero se incubaron las células durante 1 hora sin o con DNDS a una concentración final de 200 µM en 100 µL, y luego se incubaron con selenito, a una concentración de 30 µM, durante 3 horas adicionales.

Después de la incubación, las células se recolectaron usando tripsina, se lavaron dos veces con PBS por centrifugación a 1000 xg durante 5 minutos, fueron resuspendidas en 200 µl de PBS y se dividieron entre dos pocillos de una placa de fondo transparente de 96 pocillos (Grenier). Se ensayó la actividad luciferasa usando el sustrato permeable a la membrana DBC en PBS suplementado con cloruro de magnesio (1 g/l) y glucosa (1 g/l), añadiendo DBC a una concentración final de 5 µM justo antes de medir la luminiscencia.

Los resultados se muestran en la Figura 13a.

Ejemplo 6

Identificación de inhibidores de oligomerización de VDAC1

La capacidad de los compuestos de la invención para inhibir la oligomerización de VDAC1 se ensayó mediante los siguientes procedimientos A y B:

Procedimiento A: oligomerización de VDAC1 inducida por reactivos inductores de apoptosis: ensayo BRET2

La detección se llevó a cabo usando el ensayo BRET2 tal como se ha descrito anteriormente. Brevemente, las células T-Rex-293 que contienen niveles bajos de VDAC1, cultivadas como se ha descrito anteriormente, se transfectaron para expresar rVDAC1-GFP2 (0,8 µg) y rVDAC1-Rluc (0,1 µg) y se sembraron a una densidad de 9.000 células/pocillo en un plato de 96 pocillos. Los compuestos de prueba se diluyeron con DMSO a una concentración de 2 mM del compuesto de prueba y se almacenaron congelados. Se añadieron compuestos de prueba (1 µl de soluciones madre 2 mM) (usando un sistema robótico) a las células hasta una concentración final de 10 µM en 100 µl (concentración final de DMSO al 1 %). Las células fueron preincubadas durante 1 hora con los compuestos de prueba y luego se incubaron con uno de los siguientes inductores de apoptosis: STS, 1 µM (3 h) o selenito, 30 µM (3 h) o As₂O₃, 60 µM (3 h), todos en medio de crecimiento. Después del tratamiento, el medio se eliminó y se midió la señal BRET2 tal como se ha descrito anteriormente. La manipulación de líquidos se realizó con el sistema robótico de manipulación de líquidos y MCA Freedom 150 de Tecan (Männedorf, Suiza), mientras que las lecturas de luminiscencia y fluorescencia de luciferasa se obtuvieron con un lector Tecan Infinite M1000 integrado en un robot.

Se utilizó el procedimiento A para la detección de los inhibidores de oligomerización de VDAC1. Por ejemplo, este procedimiento se utilizó para realizar pruebas a una biblioteca de compuestos de tipo fármaco proporcionada por el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) y los resultados, expresados como porcentaje de inhibición de la señal BRET2, se muestran en la siguiente Tabla 2.

ES 2 815 539 T3

Tabla 2. Resumen de los resultados de detección basados en BRET2 de la actividad de oligomerización anti-VDAC1 de compuestos de la biblioteca NCI

BRET2, % de inhibición									
Número	NSC	As ₂ O ₃	Selenito	STS	Número	NSC	As ₂ O ₃	Selenito	STS
1	16631	0	41,5	30,5	37	335048	76,5	35	17
2	48422	0	38,6	36,8	38	19637	76,2	61,8	0
3	308849	99,5	0	0	39	404057	74,6	37,1	0
4	42537	84,9	0	0	40	15571	72,3	77,5	1,3
5	324623	78	16,3	0	41	672441	69,6	41,8	0
6	667251	77,5	0	1,4	42	40275	64,8	35,2	16,8
7	109292	75,4	0	0	43	41377	60,4	27,3	0
8	31069	74,9	0	0	44	31703	56,7	33,3	16,6
9	13151	67	0	0	45	132868	55,5	41,4	0
10	163802	65,8	1,2	0	46	341956	51,5	24	0
11	605333	63,7	16	0	47	8816	49,6	20,1	0
12	30205	62,7	0	0	48	31672	46,4	32,3	17,3
13	205968	58,5	0	0	49	317605	46	52	0,3
14	32892	55,4	16,4	0	50	338042	44,7	80,2	0
15	10768	52	9,6	0	51	343966	39,4	20,1	0
16	31698	51,3	2,1	0	52	15362	98	41	39,7
17	36586	49	0	0	53	601359	97,7	74,4	46
18	41066	48,8	0	0	54	42199	97	78,7	31
19	39938	48,7	18,8	0	55	10428	96,4	75,7	38,2
20	151252	100	29,8	0	56	154389	90,6	90,6	45,9
21	146554	100	71,8	0	57	19487	88,8	68,6	32,6
22	23247	97,3	52,1	0	58	680515	87,8	66,3	33,4
23	11150	95,2	67	11,6	59	15364	85,4	75,9	40,9
24	204232	90,3	32,5	0	60	146771	70,7	68,1	41,2
25	135618	88,9	64,9	0	61	39047	70,2	54	39,1
26	657149	88,3	25,3	0	62	36815	67,7	50	34,5
27	20045	88	77,4	0	63	19115	64,2	62	36,4
28	268487	86,7	69,4	0	64	319990	96,2	43,2	22
29	522131	86,8	47,6	0	65	43678	95,1	78,3	34,6
30	191029	86,5	36,4	0	66	252172	83,1	50	44,1
31	331208	86,4	28,3	0	67	103520	82,5	74	22,7
32	28837	85,2	48,3	0,3	68	43344	80,7	50,1	23,8
33	329249	82,8	22,4	12,1	69	372275	72,5	46,5	28,5
34	12262	81,5	67,4	0	70	41376	71,6	41,8	29,7
35	67436	78,1	65,7	14,8	71	321502	67,3	46,5	22,4
36	372767	77,3	26,6	0					

La Tabla 2 proporciona un resumen de los resultados de detección basados en BRET2 de la actividad de oligomerización anti-VDAC1 de los compuestos de la biblioteca del NCI. Los resultados se presentan como el porcentaje de inhibición de la señal BRET2 inducida por el agente proapoptótico indicado. Según lo identificado por esta prueba, usando tres inductores, los doce compuestos más activos de la biblioteca del NCI fueron los compuestos números: 15362, 601359, 42199, 10428, 154389, 19487, 680515, 15364, 146771, 39047 y 19115.

Procedimiento B: oligomerización de VDAC1 ensayada por reticulación química

Se trataron células T-Rex-293 tal como se describe en el Ejemplo 5 anterior, y se reticularon con EGS como se ha descrito en el procedimiento anterior (reticulación de VDAC1), se sometieron a electroforesis en SDS y se inmunotransfirieron para VDAC1. Los resultados se muestran en la Figura 13b.

Los presentes inventores han indicado anteriormente la equivalencia del procedimiento A y B para el inhibidor de la apoptosis ácido 4,4'-dinitrostilben-2,2'-disulfónico (DNDS) (Ben-Hail D, Shoshan-Barmatz V. *VDAC1-interacting anion transport inhibitors inhibit VDAC1 oligomerization and apoptosis*. Biochim Biophys Acta. 2016 1863 (2016) 1612-1623).

La capacidad de los compuestos de la invención para inhibir la oligomerización de VDAC1 se ensayó mediante el procedimiento B y los resultados se proporcionan en los siguientes Ejemplos 8-12.

Ejemplo 8

Inhibición de la oligomerización de VDAC1 por VBIT-4 racémico y enantiómeros

Las células HEK-293 se incubaron con el compuesto racémico de Fórmula 1 (VBIT-4), el enantiómero 1 del compuesto de Fórmula 1 (VBIT-4-1 (también identificado como BGD-4-1)) o el enantiómero 2 del compuesto de Fórmula 1 (VBIT-4-2 (también identificado como BGD-4-2)) (10 μ M) durante 2 horas y luego con o sin selenito (15 μ M, 4 h). Las células se recolectaron, se reticularon con EGS (300 μ M, 15 min) tal como se ha descrito anteriormente y se analizaron mediante inmunotransferencia usando anticuerpos anti-VDAC1.

Los resultados se presentan en la Figura 14a. Se indican las posiciones de los monómeros y multímeros de VDAC1. El asterisco indica VDAC1 monomérico con movilidad electroforética modificada, que representa VDAC1 monomérico reticulado intramolecular.

Ejemplo 9

El compuesto racémico de Fórmula 1 (VBIT-4) y los enantiómeros del compuesto de Fórmula 1 (VBIT-4-1 y VBIT-4-2) inhiben la muerte celular apoptótica

Se incubaron células HeLa con concentraciones variables (2-20 μ M) de compuesto racémico de Fórmula 1 (VBIT-4) y de los enantiómeros del compuesto de Fórmula 1 (VBIT-4-1 y VBIT-4-2) durante 1 hora y luego con o sin selenito (25 μ M, 3 horas). Las células se recolectaron y analizaron para determinar la muerte celular apoptótica, usando tinción con PI y análisis FACS. Los resultados que se muestran en la Figura 14b corresponden a la media \pm SD (n=3).

Ejemplo 10

Inhibición de la oligomerización de VDAC1, apoptosis y liberación de citocromo C por el compuesto de Fórmula 10 (AKOS-022), el compuesto de Fórmula 2 (VBIT-3) y el compuesto racémico de Fórmula 1 (VBIT-4), en células HEK-293

a. Las células HEK-293 se incubaron con y sin los siguientes compuestos de prueba durante 2 horas: compuesto de Fórmula 10 (AKOS-022), compuesto de Fórmula 2 (VBIT-3) o compuesto racémico de Fórmula 1 (VBIT-4) (2,5-15 μ M) y luego con o sin selenito (15 μ M, 4 h), se sometieron a tripsinización y lavado con PBS, se determinó la concentración de proteína y se recolectaron, se reticularon con EGS (3 mg de proteína/ml, 300 μ M, 15 min) y se analizaron por inmunotransferencia utilizando anticuerpos anti-VDAC1. Las posiciones de los monómeros y multímeros de VDAC1 se indican en la Figura 15a. El asterisco indica VDAC1 monomérico con movilidad electroforética modificada, que representa VDAC1 monomérico reticulado intramolecular.

Los datos cuantitativos de la formación del dímero de VDAC1 inducida por selenito por los compuestos de prueba se presentan como percentil de inhibición, en la Figura 15b. Los resultados muestran la media \pm SD (n = 3). El círculo relleno (•) representa VBIT-4 (compuesto de Fórmula 1), el círculo vacío (o) representa el compuesto de Fórmula 10 y el cuadrado vacío (\square) representa VBIT-3 (compuesto de Fórmula 2).

b. Además, la inhibición de la apoptosis inducida por selenito por los compuestos analizados utilizando tinción con anexina V-FITC/PI y FACS se presenta en la Figura 15c.

- c. La liberación de citocromo c (Cyto c) se determinó tal como se ha descrito anteriormente en procedimientos (liberación de citocromo c de las mitocondrias). Brevemente, para evaluar la liberación de Cyto c, las células se incubaron en hielo durante 10 minutos con digitonina al 0,025 %, se centrifugaron y el sedimento (mitocondrias - Mito) y los sobrenadantes (citosol - Cytos) se sometieron a SDS-PAGE e inmunotransferencia, usando anticuerpos anti-Cyto c. Se utilizaron anticuerpos anti-VDAC1 y anti-GAPDH para verificar que los extractos citosólicos no contenían mitocondrias. Los resultados de la liberación de Cyto c de las mitocondrias inducida por selenito se presentan como inmunotransferencias, con las fracciones citosólica y mitocondrial confirmadas por inmunotransferencia de GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y VDAC1, respectivamente, en la Figura 15d. Los datos cuantitativos de la liberación de Cyto c inducida por selenito al citosol por los compuestos de prueba se presentan en la Figura 15e. Los datos se presentan como porcentaje de inhibición. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm SD (n=3). El círculo relleno (\bullet) representa VBIT-4 (compuesto de Fórmula 1), el círculo vacío (\circ) representa el compuesto de Fórmula 10 (AKOS-022) y el cuadrado vacío (\square) representa VBIT-3 (compuesto de Fórmula 2).
- d. Los valores de CI_{50} de los compuestos de prueba se derivaron de los datos obtenidos. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm SD (n = 3).

Tabla 3

Compuesto de Fórmula n.º (nombre)	Oligomerización de VDAC1 IC_{50} , mM	Liberación de Cyto c IC_{50} , mM	Apoptosis IC_{50} , mM
Fórmula 10 (AKOS 022)	3,3 \pm 0,18	3,6 \pm 0,4	3,4 \pm 0,2
Fórmula 2 (VBIT-3)	8,8 \pm 0,56	6,6 \pm 1,03	7,5 \pm 0,27
Fórmula 1 (VBIT-4)	1,9 \pm 0,08	1,8 \pm 0,24	2,9 \pm 0,12

20 Ejemplo 11

Inhibición de la oligomerización de VDAC1 y de la apoptosis en células neuronales y en células que carecen de Bax/Bak por el compuesto de Fórmula 10 (AKOS-022) y el compuesto racémico de Fórmula 1 (VBIT-4)

- 25 Se incubaron células SH-SY5Y y células Bax^{-/-}/Bak^{-/-} MEF con los siguientes compuestos de prueba: compuesto de Fórmula 10 (AKOS-022) o compuesto racémico de Fórmula 1 (VBIT-4) (30 μ M, 2 h), y luego con o sin cisplatino (20 μ M, 20 h). Las células se recolectaron, se reticularon con EGS (200 μ M, 15 min) y se analizaron mediante inmunotransferencia usando anticuerpos anti-VDAC1.
- 30 Los resultados de las células SH-SY5Y se presentan en la Figura 16a. Los resultados de las células Bax^{-/-}/Bak^{-/-} MEF se presentan en la Figura 16b. Se indican las posiciones de los monómeros y multímeros de VDAC1. El asterisco indica VDAC1 monomérico con movilidad electroforética modificada, que representa VDAC1 monomérico reticulado intramolecular.
- 35 El análisis cuantitativo de la formación de dímeros de VDAC1 inducida por cisplatino (columnas grises) y apoptosis según analizada utilizando tinción con anexina V-FITC/PI y FACS (columnas negras) en células SH-SY5Y, en ausencia y presencia de los compuestos de prueba, se presenta en la Figura 16c. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm SD (n=3), p <0,001 (***)
- 40 En la Figura 16d se presenta el análisis cuantitativo de la formación de dímeros de VDAC1 inducida por cisplatino y la liberación de citocromo c por los compuestos de prueba en células Bax^{-/-}/Bak^{-/-} MEF.

Ejemplo de referencia 12

45 Correlación entre el grado de inhibición de la apoptosis y la oligomerización de VDAC1 por el compuesto de Fórmula 10 (AKOS-022)

- 50 Se incubaron células HeLa con el compuesto de Fórmula 10 (AKOS-022) a 0-20 μ M durante 2 horas y más con o sin selenito (30 μ M, 3 h) o cisplatino (15 μ M, 20 h). Las células se recolectaron y se reticularon con EGS (300 μ M, 15 min) tal como se ha descrito anteriormente y se analizaron para la oligomerización de VDAC1 por inmunotransferencia usando anticuerpos anti-VDAC1, o se analizaron para la muerte celular apoptótica usando tinción con anexina V-FITC/PI y análisis FACS. El experimento del gel de selenito se representa en la Figura 17a.

- 55 En la Figura 17b se presenta el análisis cuantitativo de la inhibición de los niveles de dímeros de VDAC1 y las células que experimentan apoptosis inducida por selenito, en función de la concentración del compuesto de Fórmula 10 (AKOS-022). Los resultados reflejan la media \pm SD (n=3).

El experimento del gel de cisplatino se representa en la Figura 17c. El análisis cuantitativo de la inhibición de los niveles de dímeros de VDAC1 y las células que experimentan apoptosis inducida por cisplatino, en función de la concentración del compuesto de Fórmula 10 (AKOS-022), se presenta en la Figura 17d. Los resultados reflejan la media \pm SD (n=3).

5 El análisis cuantitativo del grado de inhibición de la apoptosis en función de la inhibición de la formación de dímeros de VDAC1 se presenta en la Figura 17e. La apoptosis fue inducida por selenito (cuadrado relleno -■) o cisplatino (cuadrado vacío -□), y se analizó a la misma concentración de AKOS-022 tal como se ha descrito anteriormente.

10 **Ejemplo 13**

Interacción de los compuestos de prueba con VDAC1 purificado y con VDAC1 purificado reconstituido en bicapa lipídica y conductancia de canal reducida

15 Se purificó VDAC1 tal como se ha descrito anteriormente en procedimientos (purificación de VDAC1). Se reconstituyó VDAC1 purificado en una membrana de bicapa lipídica plana (PLB) y se registraron las corrientes a través de VDAC1, en respuesta a un paso de voltaje de 0 a 10 mV, antes y 30 minutos después de la adición de 40 μ M de los siguientes compuestos de prueba: compuesto de Fórmula 10 (AKOS-022), compuesto de Fórmula 2 (VBIT-3) o compuesto racémico de Fórmula 1 (VBIT-4), tal como se muestra en la Figura 18a.

20 Además, se midieron la conducción del canal a través de registros multicanal en función del voltaje y la conductancia media en estado estable de VDAC1.

25 La Figura 18b muestra la conductancia del canal antes (cuadrados rellenos) y 30 minutos después de la adición del compuesto de Fórmula 10 (AKOS-022) (círculo vacío), del compuesto de Fórmula 2 (VBIT-3) (cuadrado vacío), o del compuesto racémico de Fórmula 1 (VBIT-4) (círculo relleno). Se determinó la conductancia relativa (conductancia/conductancia máxima) a un voltaje dado. Los datos se normalizaron según la conductancia a -10 mV (conductancia máxima).

30 **Ejemplo 14**

Afinidades de unión de los compuestos de prueba a VDAC1 purificado

35 El VDAC1 purificado (133 nM), marcado usando el kit de etiquetado de proteínas fluorescentes NanoTemper BLUE (Nano Temper Technologies, Munich, Alemania), de acuerdo con las instrucciones de fabricación, se incubó con concentraciones crecientes de los siguientes compuestos de prueba: compuesto de Fórmula 10 (AKOS-022), compuesto de Fórmula 2 (VBIT-3) o compuesto racémico de Fórmula 1 (VBIT-4). Después de 20 minutos de incubación, las muestras (3-5 μ l) se cargaron en capilares de vidrio de calidad MST (capilares Monolith NT) y se midió el procedimiento de termoforesis usando el aparato Monolith-NT115. Los resultados se presentan en la Figura 18c como porcentaje de la fracción ligada, del compuesto de Fórmula 10 (AKOS-022) (círculo vacío), del compuesto de Fórmula 2 (VBIT-3) (cuadrado vacío), o del compuesto racémico de Fórmula 1 (VBIT-4) (círculo relleno) (0,3 μ M a 100 μ M), cada uno con VDAC-1 purificado.

45 La fracción ligada se calculó como:

$$\text{Fracción ligada} = 100 \times \frac{F - F_{\text{mín}}}{F_{\text{máx}} - F_{\text{mín}}}$$

F_{máx} y F_{mín} representan la fluorescencia máxima y mínima, respectivamente, y F la fluorescencia medida en presencia del compuesto de prueba.

50 Se calcularon las afinidades de unión a VDAC1 de los compuestos de prueba a partir de las mediciones de MST. Los resultados de la media \pm SD (n=3) son 15,4 \pm 2,9 μ M para el compuesto de Fórmula 10 (AKOS022), 31,3 \pm 1,7 μ M para el compuesto de Fórmula 2 (VBIT-3) y 17 \pm 5,3 μ M para el compuesto racémico de Fórmula 1 (VBIT-4).

55 **Ejemplo 15**

Efecto de los compuestos de prueba sobre los aumentos inducidos por selenito en los niveles de calcio intracelular, potencial de la membrana mitocondrial y niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS)

60 a. Se incubaron células HEK-293 con los siguientes compuestos de prueba: compuesto de Fórmula 10 (AKOS-022), compuesto de Fórmula 2 (VBIT-3) o compuesto de Fórmula 1 (VBIT-4) (15 μ M, 2 horas) y luego con o sin selenito (15 μ M, 4 horas). Las células se recolectaron y los niveles de calcio intracelular ([Ca²⁺]_i) se midieron usando análisis de Fluo-4 y FACS, tal como se ha descrito anteriormente. El análisis cuantitativo de los resultados como percentil de [Ca²⁺]_i máximo se presenta en la Figura 19a.

b. El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) se analizó con análisis TMRM y FACS. Se utilizó CCCP (25 μ M, 30 min) como control positivo para la disipación mitocondrial $\Delta\Psi$ y la fluorescencia de TMRM sensible a CCCP. Los respectivos resultados se presentan en las Figuras 19b.

5 c. Los niveles de ROS celulares se analizaron con análisis de carboxi- H_2 DCFDA y FACS. Se detectó superóxido mitocondrial con MitoSOX Red y citometría de flujo. Los respectivos resultados se presentan en las Figuras 19c-d.

10 Todos los resultados mostrados en las Figuras 19a-d corresponden a la media \pm SD (n=3), p <0,05 (*), <0,01 (**), o <0,001 (***)

Ejemplo de referencia 16

15 Preparación de nanopartículas de PLGA del compuesto de Fórmula 10

Se disolvieron aproximadamente 10 mg de AKOS-022 en 1 ml de acetona, seguido de 50 mg de PLGA. Esta mezcla de fase orgánica se añadió gota a gota (aproximadamente 0,5 ml/min) a 20 ml de solución acuosa que contenía alcohol polivinílico (PVA) al 1 % (p/v) como estabilizador. Después, la mezcla se agitó a 400 rpm con un agitador magnético de laboratorio a temperatura ambiente hasta la completa evaporación del disolvente orgánico. El estabilizador redundante se eliminó de la dispersión de nanopartículas mediante centrifugación a 15.000 x g a 4 °C durante 20 minutos. El sedimento se volvió a suspender en agua bidestilada estéril y se lavó tres veces. Las nanopartículas en blanco se prepararon de la misma manera excepto por la adición de AKOS-022.

25 Ejemplo 17

Preparación de nanopartículas de PLGA del compuesto de Fórmula 1

Se prepararon nanopartículas de PLGA que contenían el compuesto de Fórmula 1 (VBIT-4) de acuerdo con el Ejemplo 16, con 10 mg de VBIT-4 en lugar de 10 mg de AKOS022.

Ejemplo 18

Penetración cerebral y exposición a los compuestos de Fórmulas 1 y 10

35 Se utilizaron ratones C57BL/6 (20 g). Los animales recibieron tratamientos con compuestos libres de Fórmulas 1 y 10, o compuestos encapsulados, preparados de acuerdo con los Ejemplos 16 y 17. Se administraron las dosis indicadas en la siguiente Tabla 4 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a través de una sonda oral. Después de 12 horas y de 24 horas, se sacrificaron ratones seleccionados al azar de cada grupo, se recogieron sus cerebros y se almacenaron a -80 °C. Las concentraciones de los compuestos en los tejidos se determinaron mediante análisis HPLC/MS. Las muestras de tejido se homogeneizaron en solución salina tamponada con fosfato, luego se diluyeron con acetonitrilo al 50 % v/v, se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos y se analizaron los sobrenadantes. Las concentraciones de compuestos en los extractos de cerebro se determinaron a partir de curvas de calibración. Los resultados fueron el promedio de 2 ratones para cada grupo de tratamiento/punto de tiempo.

45

Tabla 4

Compuesto	Tratamiento	Compuestos en extractos de cerebro, mM
Fórmula 10	50 mg/kg, 12 h	4,2 \pm 0,714
Fórmula 10	50 mg/kg, 24 h	1,24 \pm 0,23
Fórmula 10	50 mg/kg en PLGA, 12 h	4,36 \pm 0,148
Fórmula 10	50mg/kg en PLGA, 24 h	2,8 \pm 1,19
Fórmula 1	50 mg/kg en PLGA, 24 h	0,190 \pm 0,07
Fórmula 1	50 mg/kg, 24 h	0,120 \pm 0,02

Los compuestos de Fórmulas 1 y 10 (AKOS-022 y VBIT-4) administrados por vía oral llegaron al cerebro tanto cuando se administraron en solución como encapsulados en nanopartículas de PLGA. Sin embargo, mientras que 50 12 horas después de la administración, el nivel de AKOS-022 en el cerebro fue similar en ambos casos, después de 24 horas el nivel de AKOS022 o de VBIT-4 se duplicó cuando estaban encapsulados en PLGA. Los niveles de AKOS-022 y VBIT-4 en el cerebro se encuentran en su rango efectivo (IC50 = 1 μ M). Por tanto, las moléculas, cuando se administran, encapsuladas o no en PLGA, pueden llegar al cerebro.

Ejemplo 19**Efecto del compuesto de Fórmula 1 en la tarea de aprendizaje y memoria de ratones transgénicos 5XFAD con enfermedad similar a la enfermedad de Alzheimer utilizando el laberinto de agua de brazo radial para realizar la prueba de la tarea de aprendizaje y memoria**

Se realizó la prueba del efecto del compuesto de Fórmula 1 (VBIT-4) en la tarea de aprendizaje y memoria de ratones transgénicos 5XFAD con enfermedad similar a la EA tal como se describe en Webster, SJ, y col. (2014) *Frontiers in genetics* 5, 88, ([5XFAD B6. Cg-Tg APPSwFILon, PSEN1*M146Ln*L286V6799Vas/J]). Estos ratones presentan fenotipos detectables de placas amiloides intracelulares y extracelulares a los 2 meses de edad, desarrollan deterioro cognitivo a los 4-5 meses y exhiben muerte neuronal a los 9 meses.

El compuesto de Fórmula 1 (VBIT-4) se disolvió en agua potable como consta a continuación. Aproximadamente 24 mg de VBIT-4 se transfirieron a un tubo Eppendorf y se disolvieron en 120 µl de DMSO al 100 % con un mezclador Vortex. Se obtuvo una solución clara. Se preparó una solución de 1 M de HCl, aproximadamente 10 ml, a partir de una solución de HCl 6 M, proporcionada por Pierce, Rockford, Ill, EE. UU. Se utilizaron aproximadamente 370 µl de la solución de HCl 1 M para acidificar 120 ml de agua potable. La solución de VBIT-4 DMSO (120 µl) se añadió lentamente (por goteo) al agua ácida y se mezcló mediante agitación magnética. El pH final estaba comprendido entre 4,8 y 5,0. Si la solución se volvía lechosa, se añadían más de 10 a 30 µl de solución de HCl adicionales para obtener una solución clara. La cantidad fue suficiente para 24 ratones a una dosis de 20 mg/kg y un volumen de bebida de 5 ml por ratón y por día. Los animales de dos meses de edad fueron asignados a tres grupos: tratados transgénicos (TG-T, 8 machos y 3 hembras), vehículos transgénicos (TG-V, 8 machos y 3 hembras) y tipo salvaje (WT, 10 machos y 8 hembras). De estos, 2 machos del grupo TG-T murieron durante el estudio.

A los ratones 5XFAD de dos meses de edad se les administró una solución de DMSO al 0,9 % o una solución de VBIT-4 (20 mg/kg en DMSO al 0,9 %) en agua potable, que se reemplazó con una solución nueva tres veces por semana en el primer mes y posteriormente dos veces por semana durante 3 meses adicionales.

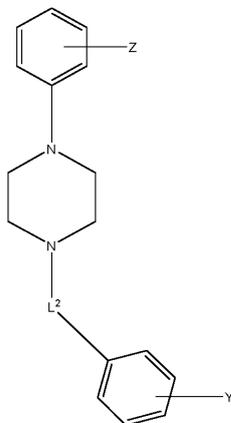
Cuando los ratones alcanzaron la edad de seis meses, se realizó un ensayo de laberinto de agua de brazo radial (RAWM) de dos días tal como se ha descrito anteriormente (Jennifer Alamed, y col., *Nature Protocols* 1, (2006) 1671-1679) para realizar la prueba del efecto de VBIT-4 en la tarea de aprendizaje y memoria. Se utilizó el RAWM que contiene seis trayectorias de natación (brazos). Los brazos se extendían desde un área central abierta con una plataforma de escape situada en el extremo de un brazo (el brazo objetivo). La ubicación del brazo objetivo se mantuvo constante para un ratón determinado. El día 1, los ratones fueron entrenados para 15 pruebas (espaciadas en 3 h), con pruebas alternadas entre plataformas visibles y ocultas. El día 2, los ratones fueron entrenados para 15 pruebas con la plataforma oculta.

La entrada en un brazo incorrecto se anotó como un error y se registraron los tiempos que el animal empleó para encontrar la plataforma. Los resultados se muestran en las Figuras 20A y 20B. La Figura 20A muestra el número de errores, mientras que la Figura 20B muestra el tiempo total empleado en el laberinto de agua, en función del número de bloques de aprendizaje. Los datos del número de errores (Figura 20A, datos presentados como media \pm error estándar de la media) del RAWM se evaluaron utilizando la prueba ANOVA; una diferencia significativa en el entrenamiento de la memoria de los animales entre los tres grupos: los ratones WT (n=18), 5XFAD/APOE (n=13) y 5XFAD/APOE tratados con VBIT-4 (n=9) en diferentes tiempos de medición (ensayos) se obtuvieron con $F(9,159) = 2,03$ ($p=0,03$). Para examinar el origen de las diferencias se utilizó la prueba *post hoc* de tipo Bonferroni. Los ratones no transgénicos entrenaron mejor en comparación con los ratones TG no tratados ($p=0,007$). El rendimiento de los ratones TG tratados con VBIT-4 fue mejor que el de los TG no tratados y no hubo diferencia entre el grupo tratado con TG VBIT-4 y el grupo WT. Se observó una tendencia a la mejora del rendimiento (entrenamiento) del grupo tratado con VBIT-4-TG en comparación con el grupo de TG no tratado ($p=0,06$).

Los datos del tiempo total empleado (Figura 20B, datos presentados como media \pm error estándar de la media) del RAWM se analizaron utilizando la prueba ANOVA de medidas repetidas; se obtuvo una diferencia significativa en el entrenamiento de la memoria de los animales entre los tres grupos de ratones: WT (n=18), 5XFAD/APOE (n=13) y 5XFAD/APOE tratados con VBIT-4 (n=9) en diferentes tiempos de medición (ensayos), con $F(2,35) = 6,91$, $p=0,003$. Para examinar el origen de las diferencias se utilizó la prueba *post hoc* de tipo Bonferroni. Los ratones no transgénicos entrenados aprendieron mejor en comparación con los ratones TG no tratados ($p=0,003$). El rendimiento de los ratones TG tratados con VBIT-4 fue mejor que el de los TG no tratados y no hubo diferencias entre el grupo tratado con TG VBIT-4 y el grupo WT.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de Fórmula general (Id):



5

Fórmula (Id)

en la que

10 L² es un grupo de enlace seleccionado del grupo que consiste en un alquilamidileno C₄₋₆ y un pirrolidinileno, estando dicho grupo de enlace opcionalmente sustituido con uno o dos de los grupos alquilo, hidroxilo, oxo o tioxo. Z es un perfluoroalcoxi C₁₋₂ e Y es un halógeno, un enantiómero, un diastereómero, una mezcla o una sal de los mismos.

15 2. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que L² es alquilamidileno C₄₋₆ que está opcionalmente sustituido con uno o dos de los grupos alquilo, hidroxilo, oxo o tioxo.

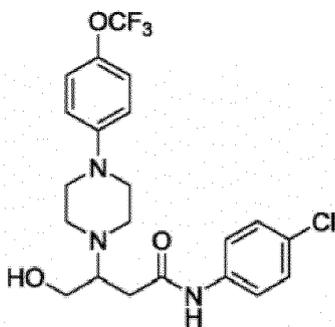
20 3. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en el que L² es HO-CH₂-C*H-CH₂-C(O)NH-, en el que el asterisco indica el punto de unión.

25 4. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que L² es un pirrolidinileno opcionalmente sustituido con uno o dos de los grupos alquilo, hidroxilo, oxo o tioxo.

5. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en el que L² es pirrolidin-2,5-dionileno.

6. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que Z es un grupo trifluorometoxi en la posición *para*.

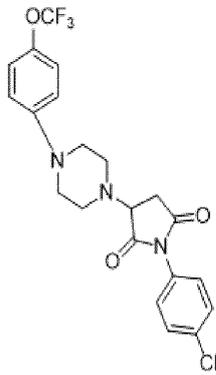
30 7. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 3 que presenta la Fórmula 1:



(Fórmula 1)

un enantiómero, un diastereómero, una mezcla o una sal de los mismos.

35 8. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 5 que presenta la Fórmula 2:



(Fórmula 2)

un enantiómero, un diastereómero, una mezcla o una sal de los mismos.

- 5
9. Composición farmacéutica que contiene un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 10
10. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso como fármaco.
- 10
11. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado de la lista que consiste en enfermedades y trastornos neurodegenerativos, enfermedades y trastornos cardiovasculares, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, lesión por isquemia/reperfusión, apoptosis, autofagia de miocitos cardíacos, fibrilación auricular (FA) y arritmia cardíaca.
- 15
12. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado de la lista que consiste en enfermedades y trastornos neurodegenerativos, enfermedades y trastornos cardiovasculares, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, lesión por isquemia/reperfusión, apoptosis, autofagia de miocitos cardíacos, fibrilación auricular (FA) y arritmia cardíaca.
- 20

Fig. 1

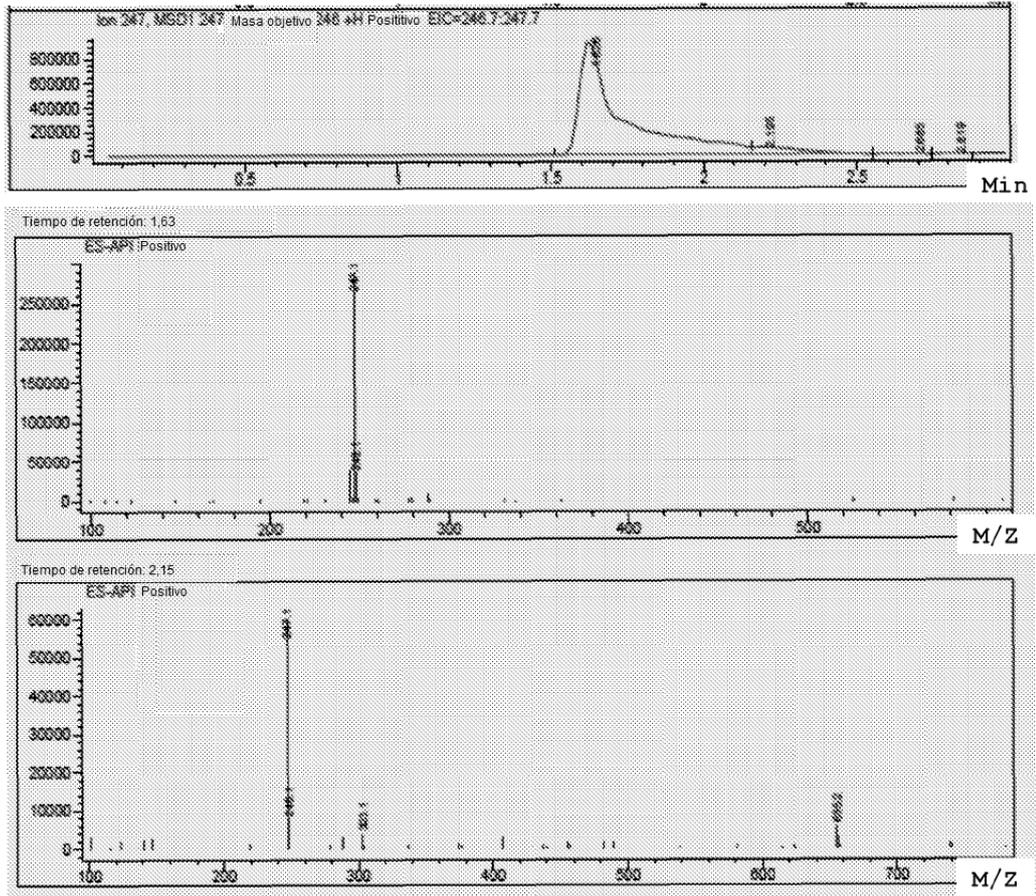


Fig. 2a

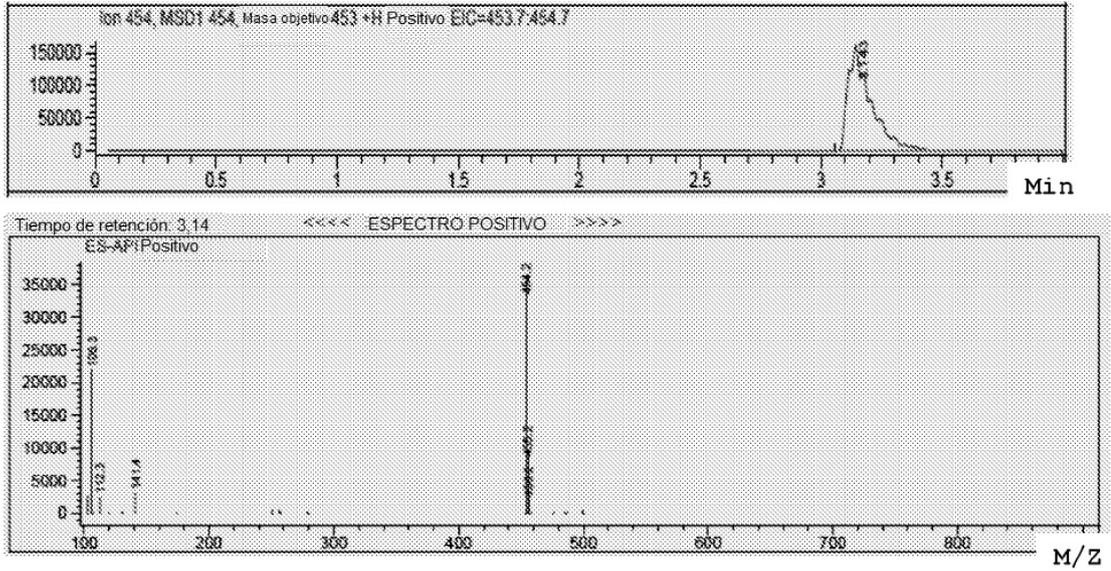


Fig. 2b

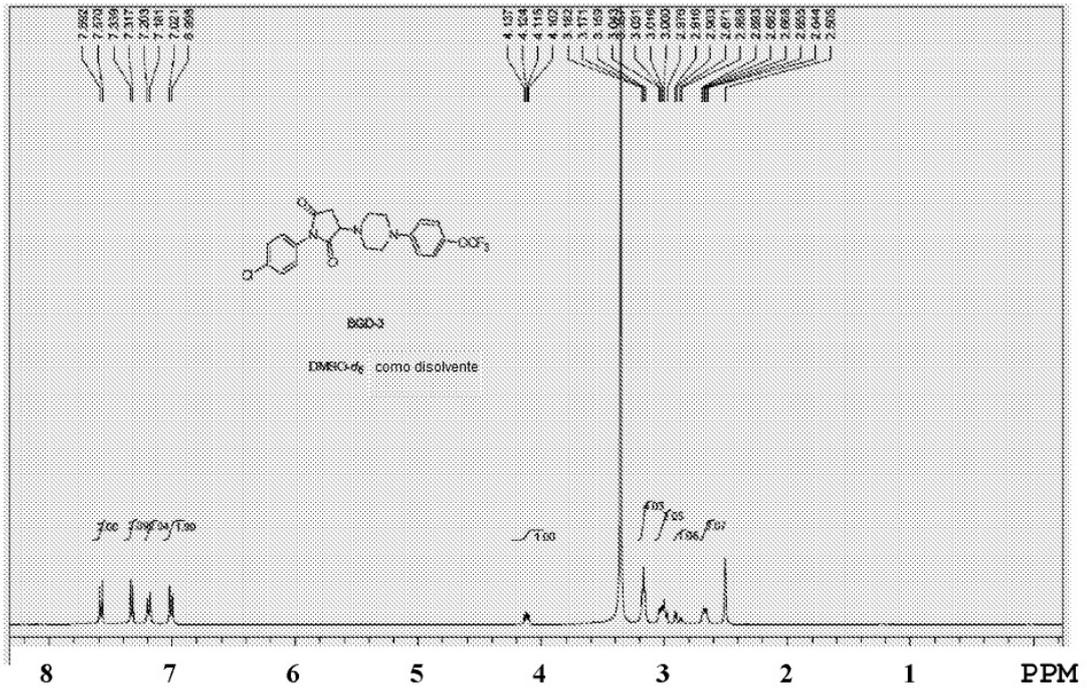


Fig. 3

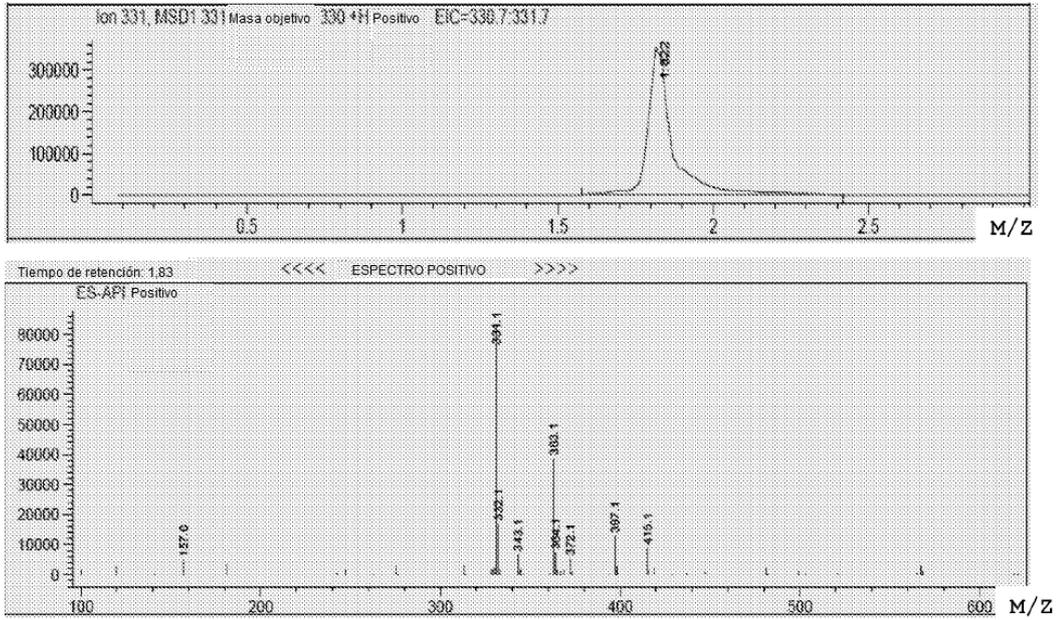


Fig. 4a

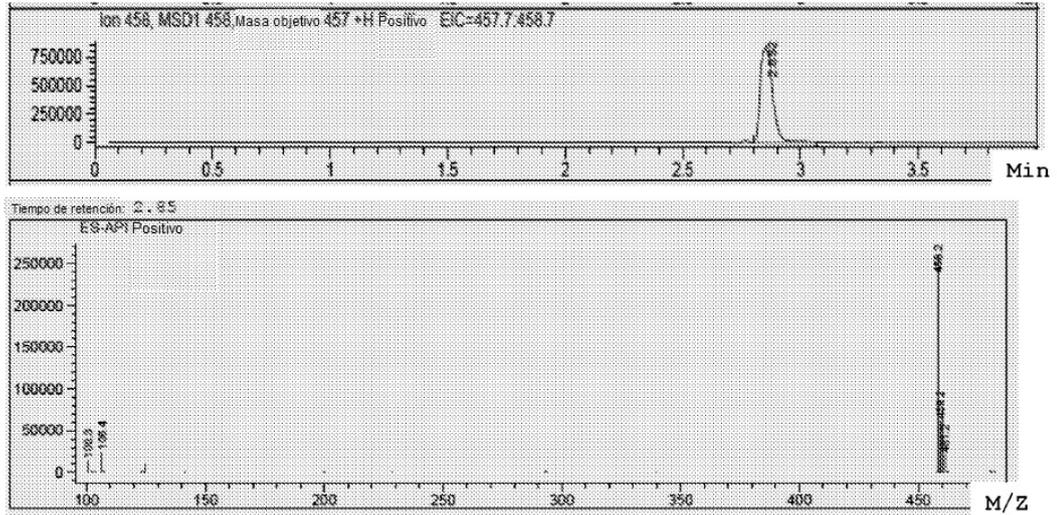


Fig. 4b

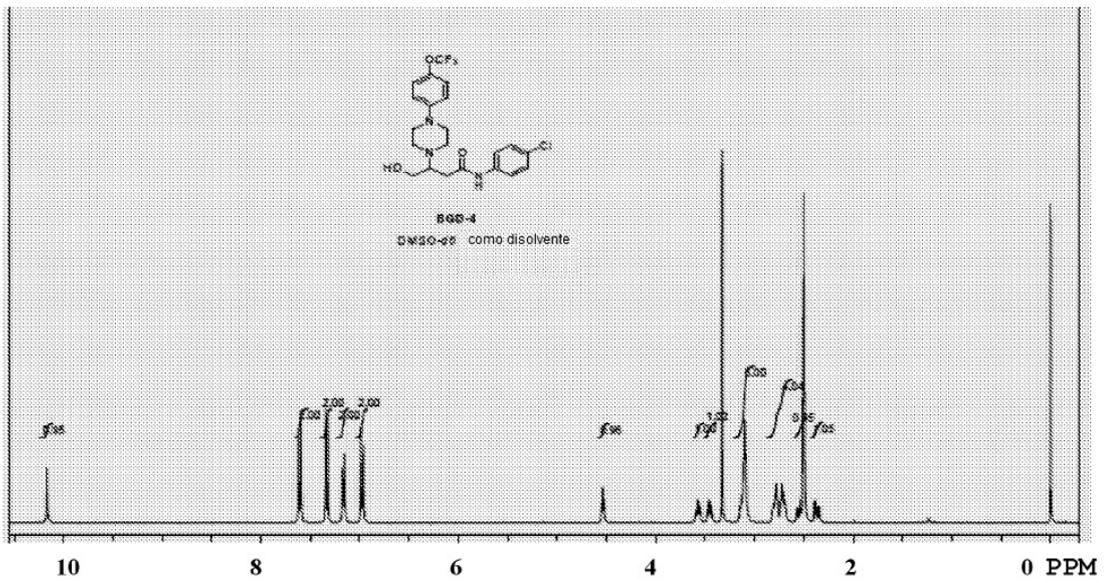


Fig. 5

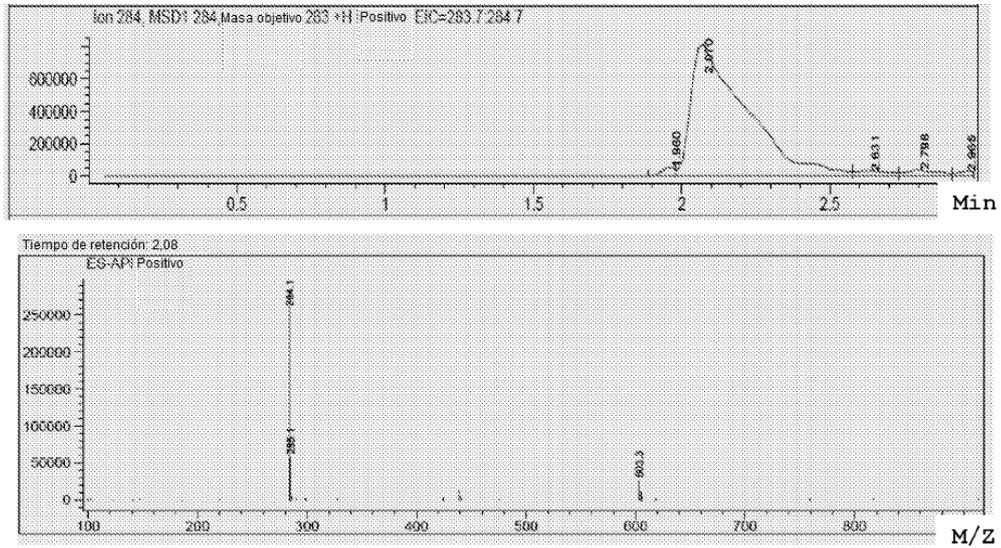


Fig. 6

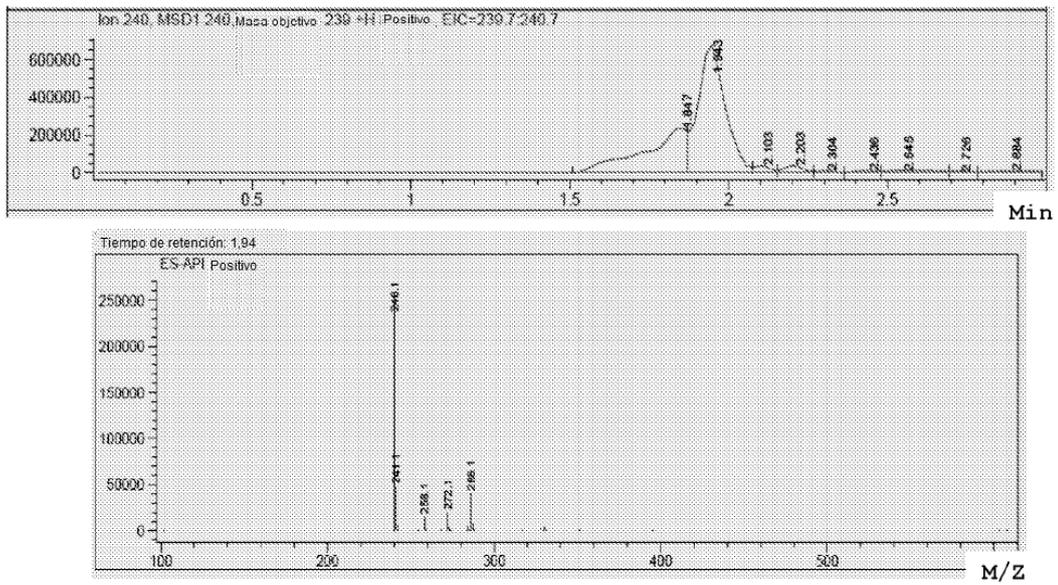


Fig. 7

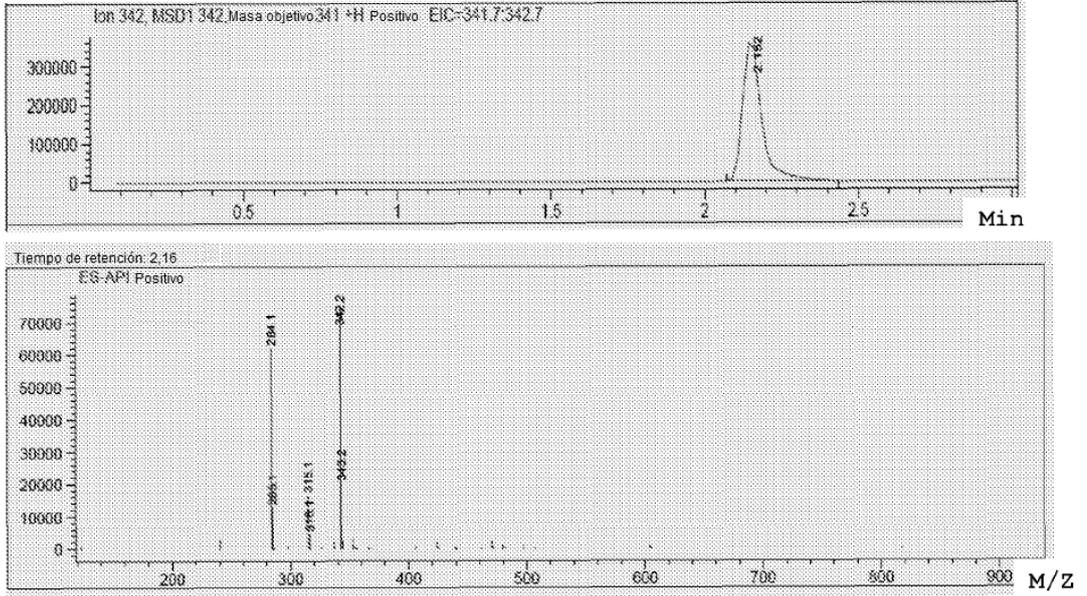


Fig. 8

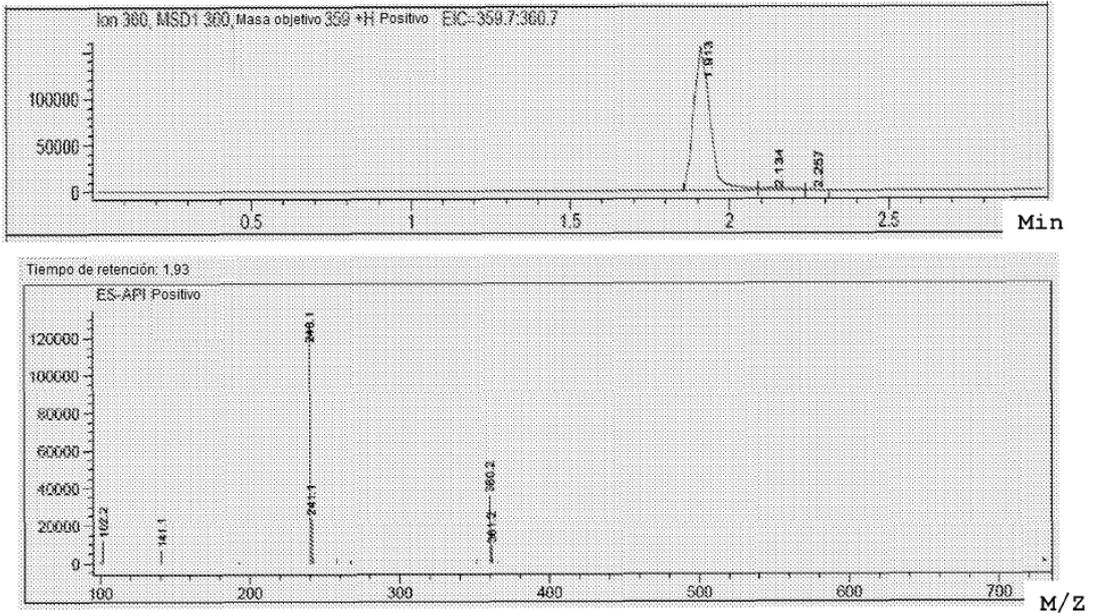


Fig. 9

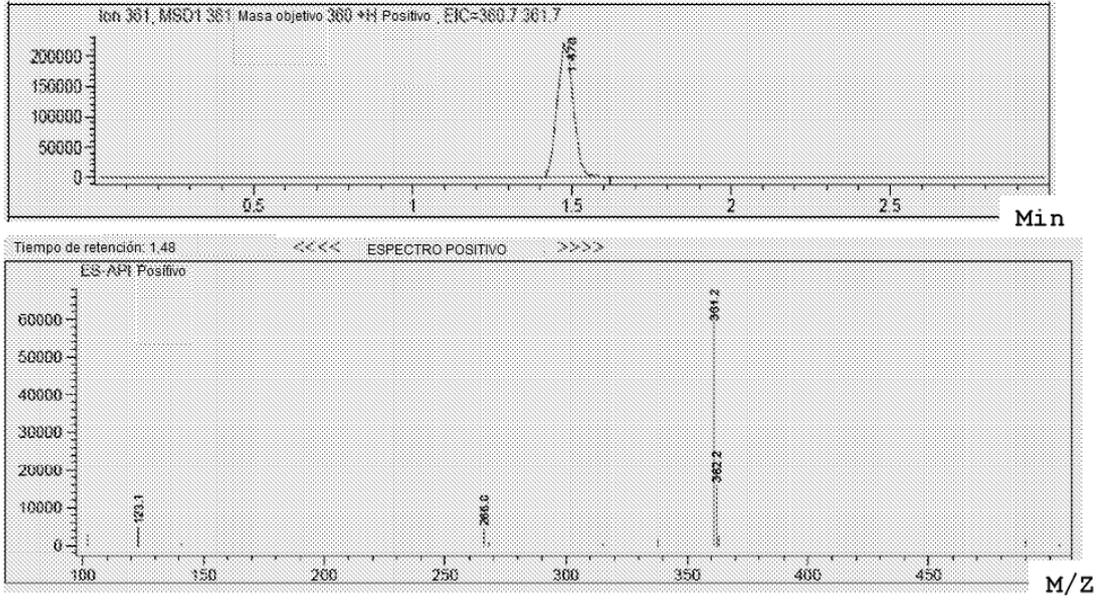


Fig. 10

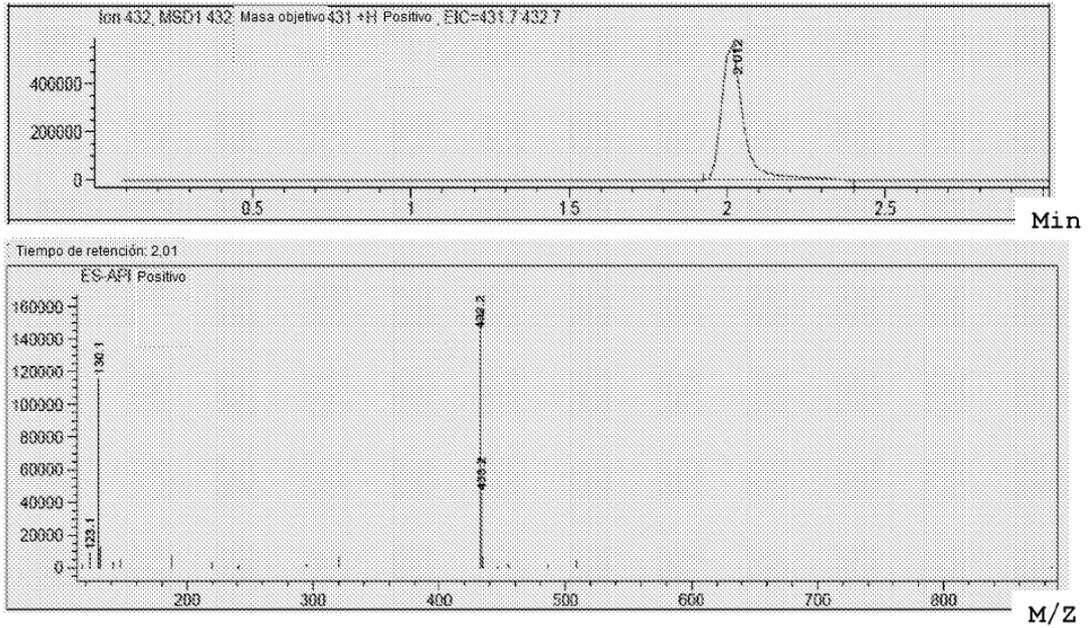


Fig. 12a

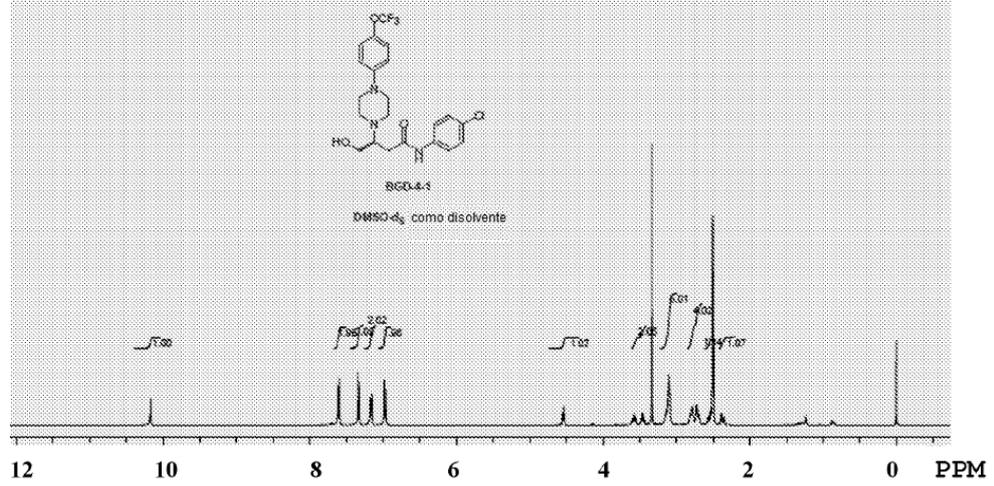


Fig. 12b

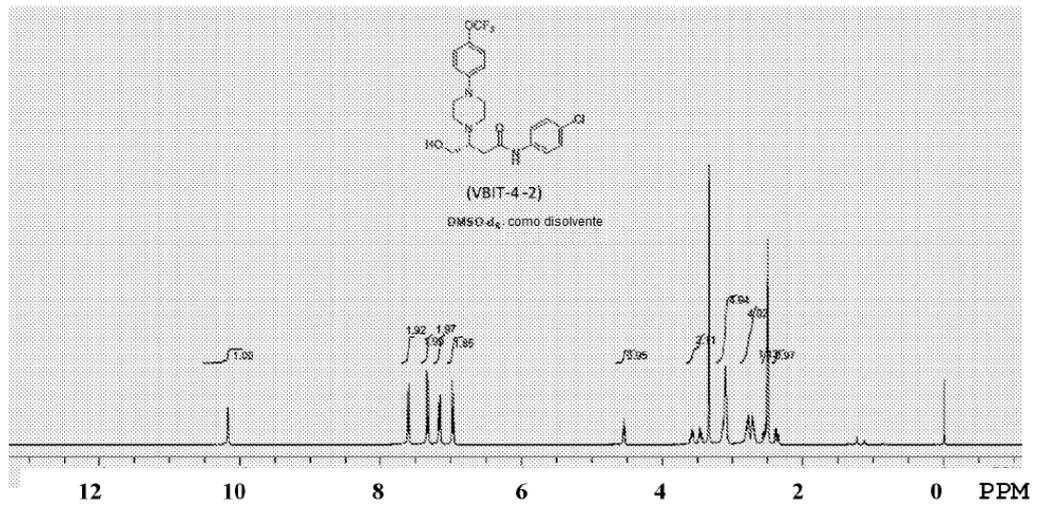


Fig. 13a

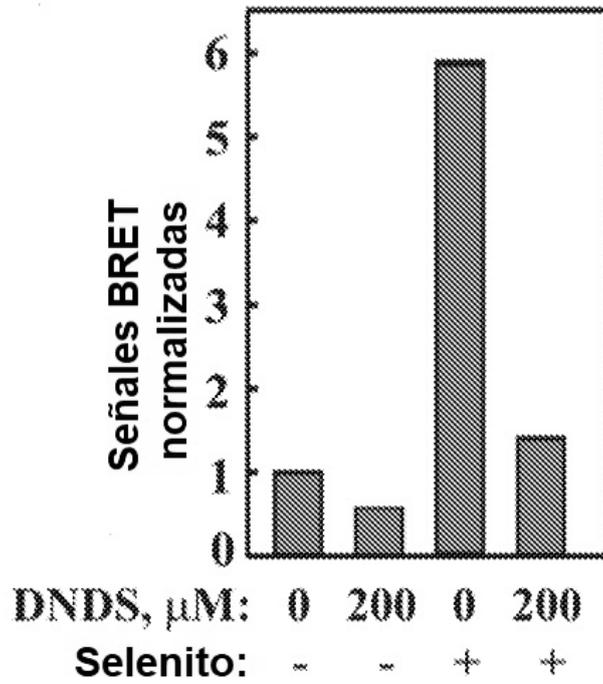


Fig. 13b

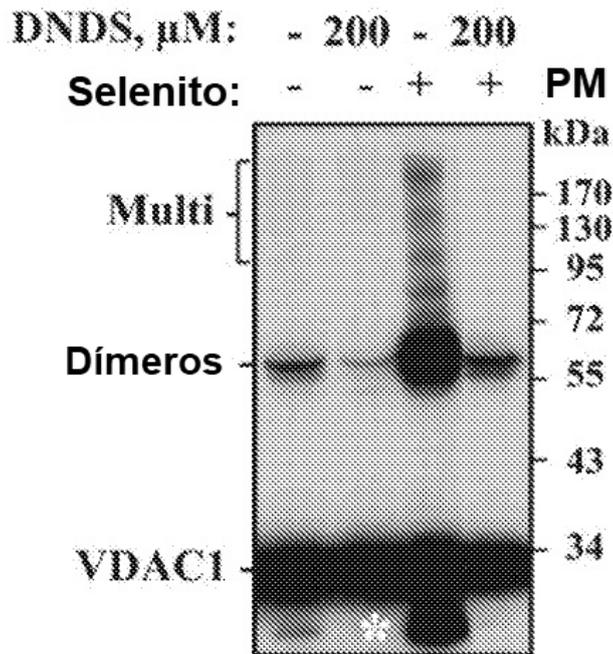


Fig. 14a

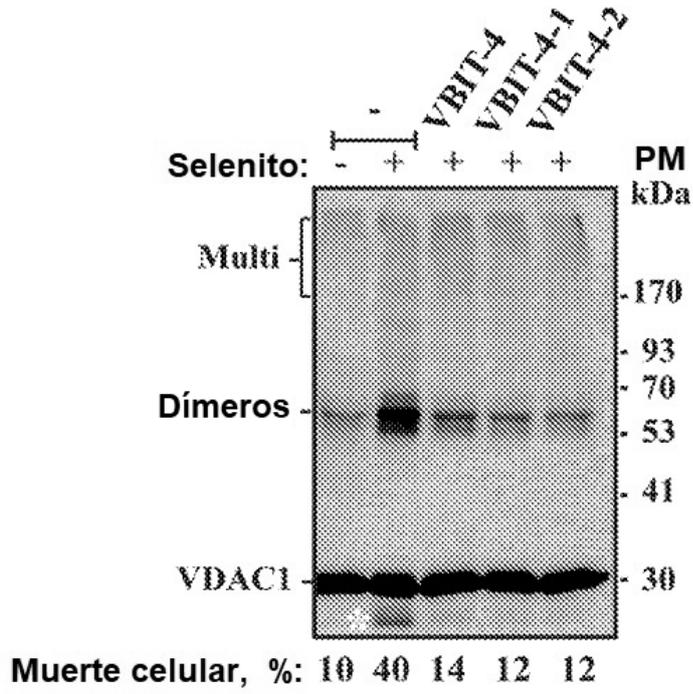


Fig. 14b

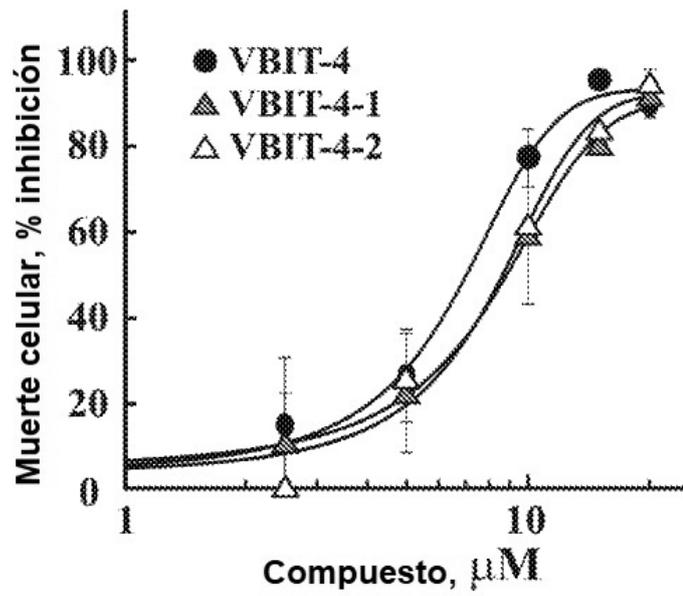


Fig. 15a

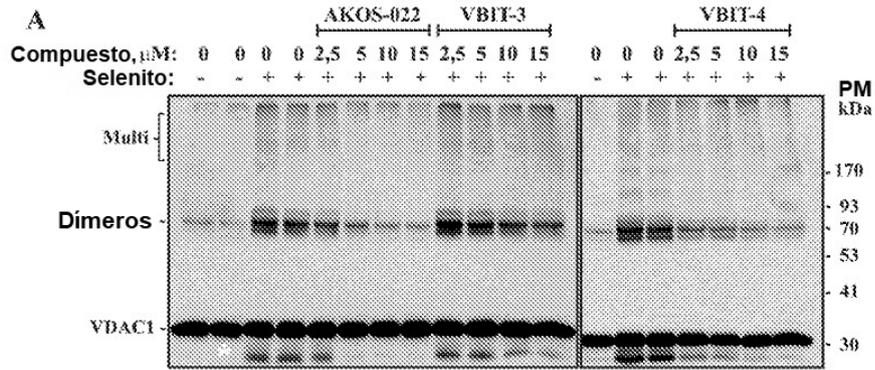


Fig. 15b

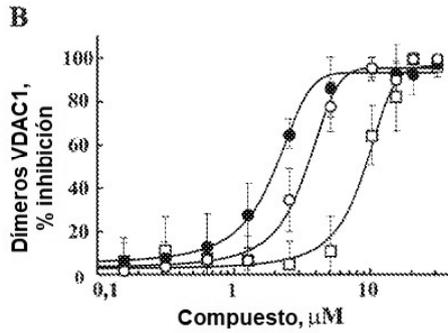


Fig. 15c

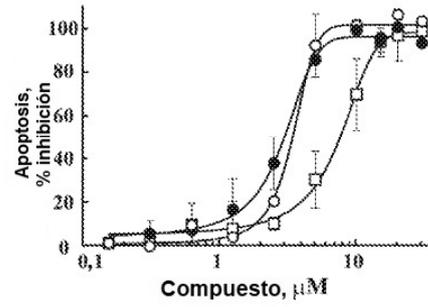


Fig. 15d

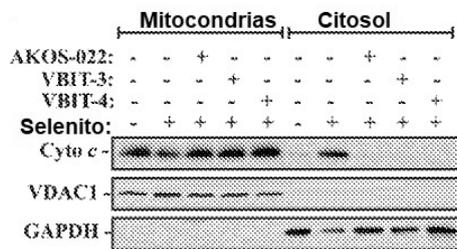


Fig. 15e

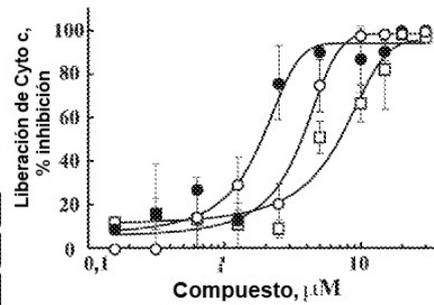


Fig. 16a

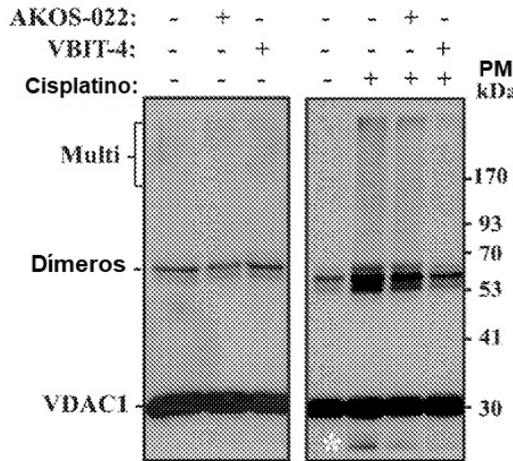


Fig. 16b

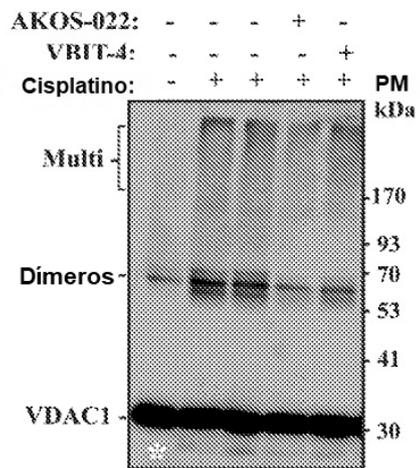


Fig. 16c

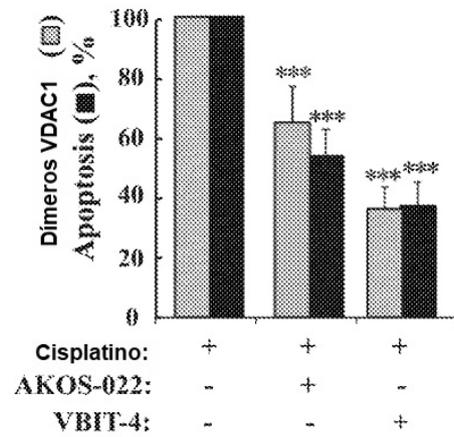


Fig. 16d

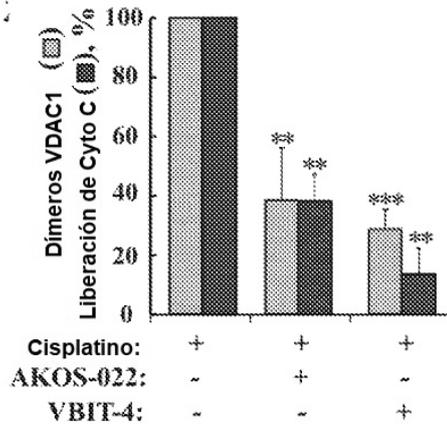


Fig. 17

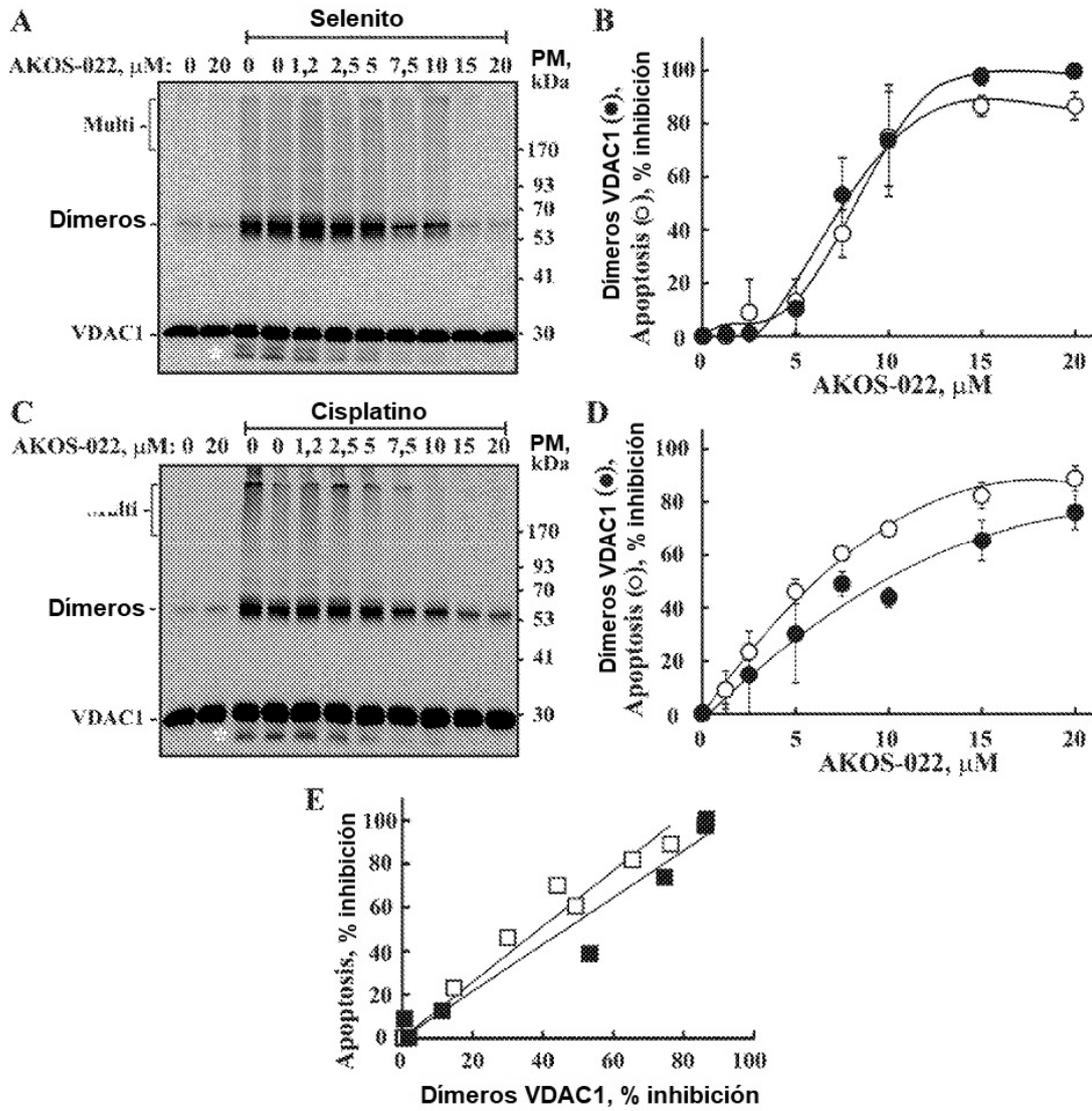


Fig. 18a

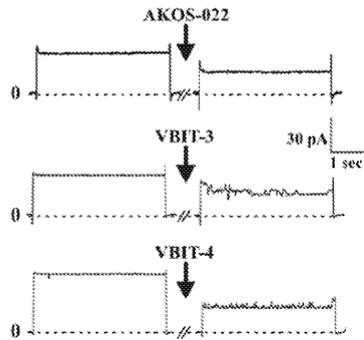


Fig. 18b

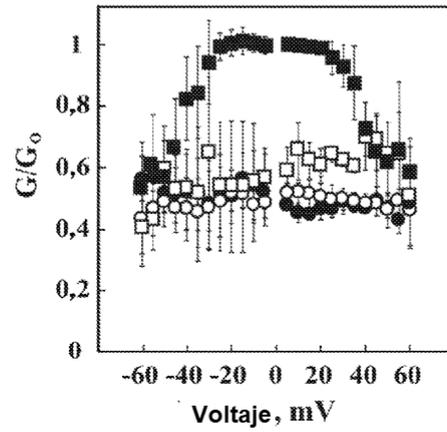


Fig. 18c

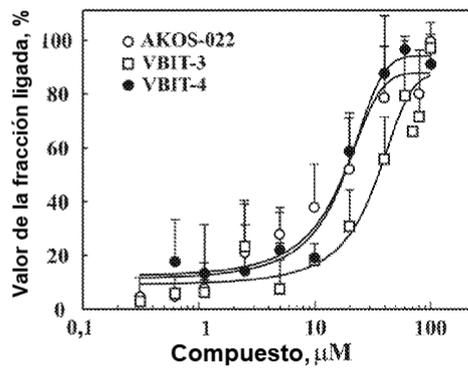


Fig. 19

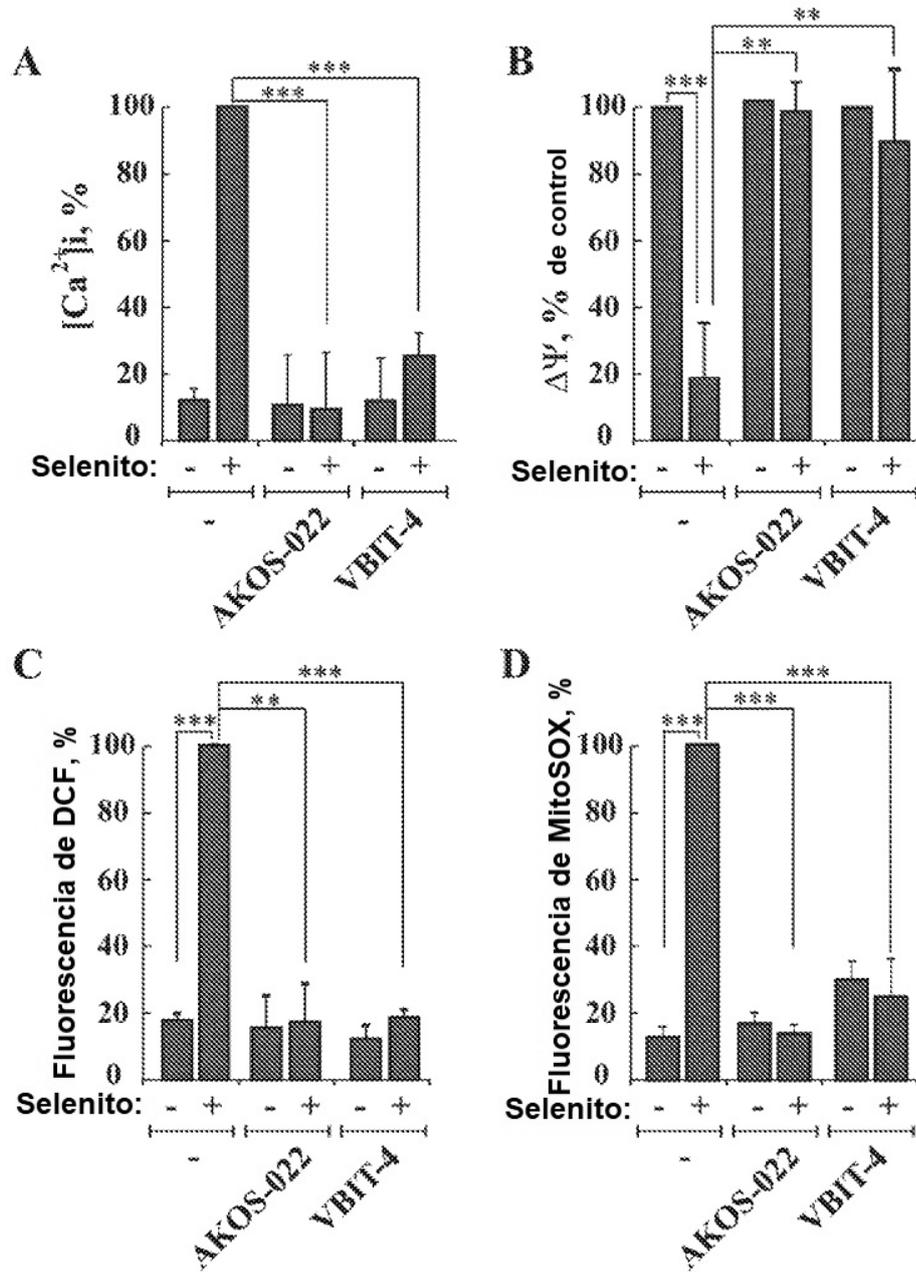


Fig. 20A

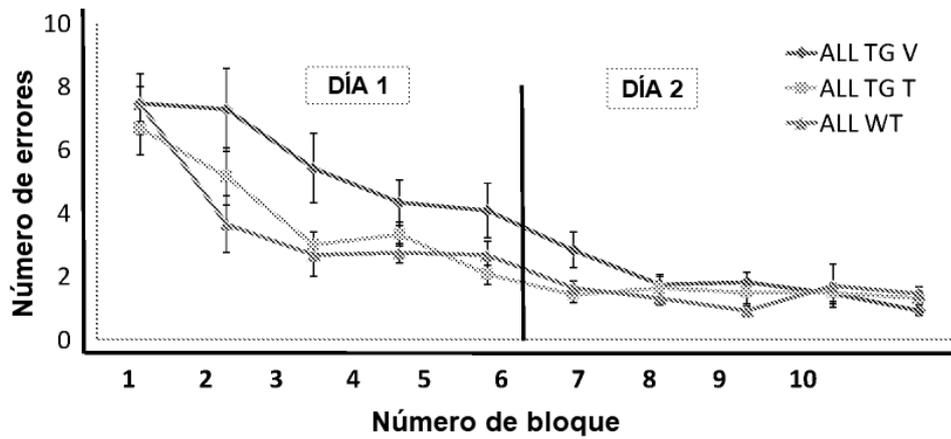


Fig. 20B

