

MÉTODO PARA IDENTIFICAR MITOCETOSCINAS QUE FIJAN COMO
OBJETIVO EL METABOLISMO DE CETONAS, POR MEDIO DE
PROSPECCIÓN VIRTUAL DE ALTO RENDIMIENTO Y PROSPECCIÓN
FENOTÍPICA DE FÁRMACOS

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente descripción se refiere a mitocetoscinas - compuestos no cancerígenos que se enlazan a por lo menos una de ACAT1/2 y OXCT1/2 e inhiben la
10 producción mitocondrial de ATP, así como también a métodos para identificar las mitocetoscinas, métodos para usar los inhibidores para fijar como objetivo células madre cancerosas, para fijar como objetivo bacterias y levadura patógena y para proporcionar beneficios anti-
15 envejecimiento, y composiciones farmacéuticas para tratar cáncer, infecciones bacterianas, infecciones por levadura y envejecimiento, que contienen una o más mitocetoscinas como el ingrediente activo.

20

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los investigadores han pasado dificultades para desarrollar nuevos tratamientos anticancerosos. Las terapias convencionales contra el cáncer (por ejemplo, irradiación, agentes alquilantes tal como ciclofosfamida y
25 anti-metabolitos tal como 5-fluorouracilo) han intentado

detectar y erradicar de manera selectiva células cancerosas que crecen rápidamente al interferir con los mecanismos celulares involucrados en el crecimiento de células y replicación de ADN. Otras terapias contra el cáncer han
5 usado inmunoterapias que se enlazan selectivamente a antígenos mutantes de tumores en las células cancerosas que crecen rápidamente (por ejemplo, anticuerpos monoclonales). Desafortunadamente, los tumores reaparecen frecuentemente después de esas terapias en el(los) mismo(s) o diferente(s)
10 sitio(s), lo que indica que no todas las células cancerosas han sido erradicadas. La recaída puede ser debido a una dosificación quimioterapéutica insuficiente y/o el surgimiento de clones cancerosos que son resistentes a la terapia. Por lo tanto, se necesitan estrategias novedosas
15 para el tratamiento del cáncer.

Las cetonas (3-hidroxibutirato, acetoacetato y acetona) son combustibles mitocondriales de alta energía; son generados naturalmente por hepatocitos durante períodos de restricción calórica, ayuno y/o inanición. Durante la
20 privación de nutrientes, los cuerpos de cetona secretados en la sangre entonces se dirigen hacia el cerebro, donde las neuronas los convierten nuevamente en Acetil-CoA de modo que pueden ser reutilizados de manera efectiva como una fuente de energía. Las dos enzimas neuronales más
25 cruciales para este proceso de reutilización de cetonas son

OXCT1/2 y ACAT1/2, ya que están involucradas directamente en la conversión de cuerpos de cetona en Acetil-CoA. Martinez-Outschoorn y colaboradores, *Nat Rev Clin Oncol* 2017; 14(1):11-31.

5 Los inventores mostraron que un "transportador de cetona" similar también existe en los tumores de humanos, por medio del cual los fibroblastos asociados con el cáncer cetogénicos (CAFs, por sus siglas en inglés) producen localmente cuerpos de cetona para la reutilización por
10 parte de las mitocondrias en células cancerosas de mama humanas adyacentes. Martinez-Outschoorn y colaboradores, *Cell Cycle* 2012; 11(21):3956-63. En un respaldo adicional de esta hipótesis de "emparejamiento metabólico", los inventores descubrieron que la sobreexpresión recombinante
15 de ACAT1/2 u OXCT1/2 en células cancerosas de mama MDA-MB-231 fue suficiente en realidad para promover el crecimiento de tumores y la metástasis pulmonar. Estos datos proporcionan evidencia genética de que la reutilización de cuerpos de cetona puede ayudar a impulsar el progreso y
20 metástasis de tumores.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

En vista de los antecedentes citados, parece que las enzimas ACAT1/2 y OXCT1/2 pueden ser oncogenes
25 metabólicos genuinos. Por lo tanto, un objetivo de esta

descripción es demostrar que la reutilización de cetona desempeña un papel crucial en la propagación y mantenimiento de muchos canceres. Un objetivo de esta descripción también es presentar métodos para identificar

5 las mitocetoscinas, compuestos no cancerígenos que se enlazan a por lo menos una de ACAT1/2 y OXCT1/2 e inhiben la producción mitocondrial de ATP. Un objetivo de esta descripción también es identificar las mitocetoscinas que tienen propiedades anticancerosas y antibióticas. Un

10 objetivo de esta descripción también es identificar las mitocetoscinas que tienen propiedades anti-envejecimiento. Un objetivo de esta descripción también es las mitocetoscinas que funcionan como radiosensibilizadores y fotosensibilizadores. El término "mitocetoscina" se refiere

15 ampliamente a compuestos no cancerígenos que se enlazan a por lo menos una de ACAT1/2 y OXCT1/2 e inhiben la producción mitocondrial de ATP. Estos compuestos se diseñan por lo tanto para fijar como objetivo las enzimas mitocondriales que son responsables de la reutilización de

20 cetona y que tienen propiedades anticancerosas y antibióticas. Estos compuestos se enlazan a cualquiera o ambos sitios catalíticos activos de OXCT1/2 y ACAT1/2 para inhibir la función mitocondrial. La presente descripción se refiere además a métodos para identificar mitocetoscinas,

25 métodos para hacer estas mitocetoscinas y métodos para usar

mitocetoscinas para fines terapéuticos.

Dadas sus propiedades de inhibición mitocondrial, las mitocetoscinas se pueden usar similarmente para fijar como objetivo bacterias y levadura patógena, para proporcionar beneficios anti-envejecimiento, para funcionar como radiosensibilizadores y/o fotosensibilizadores, para sensibilizar células cancerosas a granel y células madre cancerosas a agentes quimioterapéuticos, productos farmacéuticos y/u otras sustancias naturales.

Las mitocetoscinas se pueden identificar a través de un planteamiento convergente de prospección in silico de alto rendimiento virtual seguida por la validación in vitro para la inhibición mitocondrial. Las mitocetoscinas se pueden desarrollar rápidamente al combinar el diseño de fármacos in silico con la prospección fenotípica de fármacos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIGURA 1 muestra un diagrama esquemático que describe en forma general una estrategia de descubrimiento de fármacos de acuerdo con modalidades del presente planteamiento.

La FIGURA 2 ilustra las estructuras químicas de ocho compuestos candidatos de mitocetoscina 1-8 identificados después de la prospección fenotípica de

fármacos.

Las FIGURAS 3A-3F muestran los efectos de seis compuestos candidatos de mitocetoscina sobre la formación de mamíferas en células MCF7.

5 Las FIGURAS 4A-4D muestran los efectos de cuatro compuestos candidatos de mitocetoscina sobre el agotamiento de ATP en células MCF7.

Cada una de las FIGURAS 5A-5B y 6A-6B muestra los efectos de dos compuestos candidatos de mitocetoscina sobre
10 la respiración basal, fuga de protones, respiración vinculada con ATP, respiración máxima y capacidad respiratoria de reserva en células MCF7.

La FIGURA 7A muestra los efectos de cinco compuestos candidatos de mitocetoscina sobre la glicólisis
15 aeróbica en células MCF7. La FIGURA 7B muestra los efectos de cinco compuestos candidatos de mitocetoscina sobre la tasa de acidificación extracelular (ECAR, por sus siglas en inglés) a través del tiempo en células MCF7.

Las FIGURAS 8A-8D ilustran imágenes de
20 acoplamiento de cuatro compuestos candidatos de mitocetoscina.

La FIGURA 9 muestra un diagrama esquemático que describe de forma general como la OXCT1 y la ACAT1 funcionan para impulsar la producción de ATP.

25 La FIGURA 10A muestra cuatro compuestos

candidatos de mitocetoscina y sus valores IC-50 respectivos para inhibir la propagación de CSC. La FIGURA 10B muestra la estructura química de arecolina, un inhibidor de ACAT1 de origen natural.

5 La FIGURA 11A compara las estructuras de dos compuestos candidatos de mitocetoscina. La FIGURA 11B muestra los farmacóforos para dos compuestos candidatos de mitocetoscina.

10 La FIGURA 12A muestra la estructura de la Coenzima A (CoA). La FIGURA 12B compara la estructura de la CoA con dos compuestos candidatos de mitocetoscina.

15 La FIGURA 13 muestra un diagrama esquemático que describe de forma general una estrategia de tratamiento de seguimiento con substratos mitocondriales para mejorar efectos colaterales potenciales de las mitocetoscinas, de acuerdo con modalidades del presente planteamiento.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

20 La siguiente descripción ilustra modalidades del presente planteamiento en detalle suficiente para hacer posible la práctica del presente planteamiento. Aunque el presente planteamiento se describe con referencia a esas modalidades específicas, se debe apreciar que el presente planteamiento se puede incorporar en diferentes formas, y
25 no se debe interpretar que esta descripción limite alguna

reivindicación anexa a las modalidades específicas que se establecen en este documento. Preferiblemente, estas modalidades se proporcionan de modo que esta descripción será detallada y completa, y transmitirá completamente el
5 alcance del presente planteamiento a aquellas personas expertas en el campo.

El metabolismo mitocondrial es una entrada sin explorar para el tratamiento de una variedad de aflicciones, que varían desde cáncer hasta infecciones
10 bacterianas y fúngicas hasta el envejecimiento. Las mitocondrias funcionales se requieren para la propagación de células madre cancerosas. La inhibición del metabolismo mitocondrial en células cancerosas impide la propagación de esas células. Los inhibidores mitocondriales que fijan como
15 objetivo la reutilización de cuerpos de cetona como combustibles mitocondriales representan por lo tanto una nueva clase de agentes terapéuticos anticancerosos. Estos compuestos también pueden inhibir la traducción de proteínas mitocondriales, y por lo tanto pueden funcionar
20 como antibióticos de amplio espectro que fijan como objetivo tanto las bacterias como la levadura patógena. La investigación también ha mostrado que inhibidores mitocondriales tienen propiedades anti-envejecimiento; por lo tanto las mitocetoscinas también pueden conferir
25 beneficios anti-envejecimiento.

Los inhibidores novedosos de la producción mitocondrial de ATP que se enlazan a por lo menos una de OXCT1/2 y ACAT1/2 - mitocetoscinas - se pueden identificar a través de un planteamiento convergente de prospección virtual de alto rendimiento seguida por la validación in vivo para la inhibición mitocondrial. La FIGURA 1 es una visión general de métodos para identificar mitocetoscinas mediante el uso de la prospección de fármacos in silico (mediante computadora) y la prospección fenotípica de fármacos dadas a conocer en este documento. La totalidad o una porción de la estructura tridimensional de las proteínas OXCT1 de porcino y ACAT1 de humano se puede usar en el paso S101 para identificar compuestos novedosos que se enlazan a estas proteínas a través de la prospección virtual de alto rendimiento (vHTS, por sus siglas en inglés) (es decir, prospección de fármacos in silico). La prospección se puede realizar a través de una colección de moléculas. Por ejemplo, durante las investigaciones iniciales los inventores prospectaron una colección de 30,000 compuestos de moléculas pequeñas para compuestos que se esperaba que se enlazaran en cualquier parte a la succinil-CoA: 3-cetoácido CoA transferasa de corazón de cerdo enlazada covalentemente a CoA (PDB código 3OX0) o al sitio de enlace de CoA de la acetoacetil-CoA tiolasa mitocondrial de humano (PDB código 2F2S). La vHTS inicial

puede usar varios programas de prospección, tal como el programa de prospección eHiTS, para identificar un subconjunto de compuestos que tienen una fuerte afinidad de enlace a cualquier proteína. Por ejemplo, los inventores
5 usaron eHiTS para identificar los 1,000 compuestos mejor clasificados de una colección inicial, con base en la afinidad de enlace predicha. eHiTS es un método de prospección que cubre sistemáticamente la parte del espacio de investigación conformacional y posicional que evita
10 colisiones estéricas severas, produciendo posturas de acoplamiento sumamente precisas a una velocidad que es muy adecuada para la prospección virtual de alto rendimiento.

Se debe apreciar que aquellas personas expertas en el campo pueden seleccionar o desarrollar métodos para
15 identificar un subconjunto de compuestos que tienen una afinidad de enlace deseada. Para realizar eficientemente el acoplamiento, se puede preparar una serie de archivos clip que corresponden a la estructura completa de la proteína y cada compuesto acoplado secuencialmente en cada uno de los
20 archivos clip. Una calificación consensual de los compuestos superiores se puede llevar a cabo usando AutoDock 4.2, con base en el mismo sitio de enlace general para cada compuesto predicho a partir de la prospección de eHiTS. Un análisis adicional de la afinidad de enlace
25 predicha y una inspección visual se pueden llevar a cabo

usando una variedad de métodos, que incluyen por ejemplo un programa de diseño de novo tal como SPROUT. Véase Law y colaboradores, *J Mol Struct.* 666: 651-657 (2003), el cual se incorpora a manera de referencia en su totalidad, para
5 información acerca de SPROUT. Dependiendo del tamaño inicial de la colección y los resultados, se puede seleccionar una variedad de compuestos para la prospección fenotípica de fármacos. Por ejemplo, los inventores seleccionaron 227 compuestos que se desempeñaron bien en
10 estos pasos de análisis para la prospección fenotípica de fármacos en el paso S103. Se seleccionaron 84 compuestos para la prospección fenotípica basada en OXCT1 y se seleccionaron 143 compuestos para la prospección fenotípica basada en ACAT1.

15 La prospección fenotípica de fármacos S103 se puede realizar al someter a prueba la inhibición mitocondrial de compuestos seleccionados en una línea de células seleccionada. Por ejemplo, se pueden usar ensayos de agotamiento de ATP. Los inventores sometieron a prueba
20 los 227 compuestos seleccionados sobre su capacidad para inducir funcionalmente el agotamiento de ATP en células de cáncer de mama de humano MCF7. Aproximadamente 85% del ATP celular es generado normalmente por OXPHOS en las mitocondrias, de modo que el agotamiento de ATP es un
25 marcador sustituto para la inhibición mitocondrial. Se debe

apreciar que aquellas personas expertas en el campo pueden emplear otros sustitutos para la inhibición mitocondrial. Sin embargo, para el ensayo de agotamiento de ATP que los inventores emplearon, las células MCF7 (6,000
5 células/pocillo) se colocaron en placas negras de 96 pocillos de fondo claro y se incubaron durante toda la noche antes del tratamiento. Los 227 compuestos identificados por vHTS se aplicaron a las células MCF7 colocadas en placas a una concentración de 20 μM y se
10 prospectaron por el agotamiento de ATP. Los compuestos que mostraban efectos de agotamiento de ATP se prospectaron de nuevo subsecuentemente a una concentración más baja (10 μM) para identificar los ocho compuestos superiores que inducen de manera más potente el agotamiento de ATP. Los compuestos
15 se sometieron a prueba después de 72 horas de incubación y se realizaron experimentos por duplicado. Después del tratamiento, los medios se aspiraron de los pocillos y las placas se lavaron con solución salina amortiguada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) caliente
20 complementada con Ca^{2+} y Mg^{2+} . Luego, las células se incubaron con una solución de tinción Hoechst 33342^{MR} (Sigma) (10 $\mu\text{g/ml}$) durante 30 minutos y se lavaron con PBS para estimar la viabilidad de las células. La fluorescencia se leyó con un lector de placas usando longitudes de onda
25 de excitación/emisión a 355/460 nm. Luego, un ensayo

luminiscente CellTiter-Glo^{MR} (Promega) se realizó para medir la actividad metabólica (contenido de ATP) en los mismos pocillos que se trataron con un compuesto determinado. Los ensayos se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante. La intensidad de fluorescencia (tinción de Hoechst) y la intensidad de luminiscencia (contenido de ATP) se normalizaron a controles tratados solo con vehículo y se exhibieron como porcentaje de control para comparación. Los ocho compuestos de prueba agotaron significativamente los niveles de ATP en células viables. Se debe apreciar que aquellas personas de experiencia en el campo pueden elegir emplear los mismos o similares ensayos de agotamiento de ATP, modificar estos ensayos o pueden reemplazar el ensayo de agotamiento de ATP por otra metodología para prospectar compuestos seleccionados para la inhibición mitocondrial (por ejemplo, ensayos de consumo de oxígeno).

El presente planteamiento incluye métodos para confirmar la viabilidad de células. Las personas de experiencia en el campo pueden seleccionar uno o más métodos para confirmar la viabilidad de células que son adecuados para la modalidad particular. Los inventores usaron inicialmente el ensayo de sulforrodamina (SRB), el cual se basa en la medición del contenido de proteínas celulares. Después del tratamiento durante 72 horas en

placas de 96 pocillos, las células se fijaron con ácido tricloroacético al 10% (TCA) durante 1 hora en la habitación fría, y se secaron durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego, las células se incubaron con
5 SRB durante 15 minutos, se lavaron dos veces con ácido acético al 1% y se secaron con aire durante por lo menos 1 hora. Finalmente, el tinte enlazado a la proteína se disolvió en solución de Tris 10 mM, pH 8.8 y se leyó usando el lector de placas a 540 nm. Usando el ensayo de SRB, los
10 inventores seleccionaron solo los compuestos que agotaban los niveles de ATP sin citotoxicidad prominente para análisis adicionales. La citotoxicidad prominente se definió como menos de 30% de células aún en la placa. Naturalmente, las modalidades que emplean otra metodología
15 de confirmación de viabilidad de células pueden seleccionar compuestos para el análisis adicional con base en otras consideraciones como puede ser sabido en el campo.

El presente planteamiento implica además métodos de validación funcional en el paso S105, durante el cual se
20 puede confirmar la función de un compuesto como un inhibidor mitocondrial. Se puede usar una variedad de métodos para la validación funcional, que incluyen, por ejemplo, análisis de flujo metabólico, ensayos de mamíferos, ensayos de viabilidad, y actividad antibiótica
25 (anti-bacteriana y/o anti-fúngica). Por ejemplo, los

inventores determinaron las tasas de acidificación extracelular (ECAR) y las tasas de consumo de oxígeno en tiempo real (OCR, por sus siglas en inglés) para las células MCF7 usando el analizador de Flujo Extracelular Seahorse^{MR} (XF96) (Seahorse Bioscience, MA, EUA). Las células MCF7 se mantuvieron en DMEM complementado con FBS al 10% (suero bovino fetal), GlutaMAX 2 mM y Pen-Strep al 1%. 5,000 células por pocillo se sembraron en placas de cultivo de células XF96-well^{MR} y se incubaron durante toda la noche a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%. Después de 24 horas, las células se trataron con los compuestos seleccionados que mostraban un agotamiento de ATP sin citotoxicidad prominente a varias concentraciones (o vehículo solo). Después de 72 horas de tratamiento, las células se lavaron en medios de ensayo XF pre-calentados (para la medición de OCR, los medios de ensayo XF se complementaron con glucosa 10 mM, piruvato 1 mM, L-glutamina 2 mM y se ajustaron a pH 7.4). Las células se mantuvieron en 175 µL/pocillo de medio de ensayo XF a 37°C en una incubadora sin CO₂ durante 1 hora. Durante la incubación, 25 µL de glucosa 80 mM, oligomicina 9 µM, 2-desoxiglucosa 1 M (para la medición de ECAR) y 25 µL de oligomicina 10 µM, FCCP 9 µM, rotenona 10 µM, antimicina A 10 µM (para la medición de OCR) en medio de ensayo XF se cargaron en los puertos de inyección del cartucho de sensor

XFe-96. Durante el experimento, el instrumento inyectó estos inhibidores en los pocillos en un punto de tiempo determinado, mientras que la ECAR/OCR se midió continuamente. Las mediciones de ECAR y OCR se normalizaron por medio del contenido de proteínas (usando el ensayo de sulforrodamina B). Los conjuntos de datos se analizaron por medio del software XFe-96^{MR}, usando los cálculos ANOVA de una vía y prueba t de Student. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, y los resultados validaron los efectos de inhibición mitocondrial de los compuestos de mitocetoscina descritos en este documento. Se debe apreciar que numerosos métodos son conocidos para la validación funcional, y que las personas de experiencia en el campo pueden seleccionar uno o más dependiendo de las necesidades de validación (por ejemplo, otros ensayos que miden o aproximan la función mitocondrial).

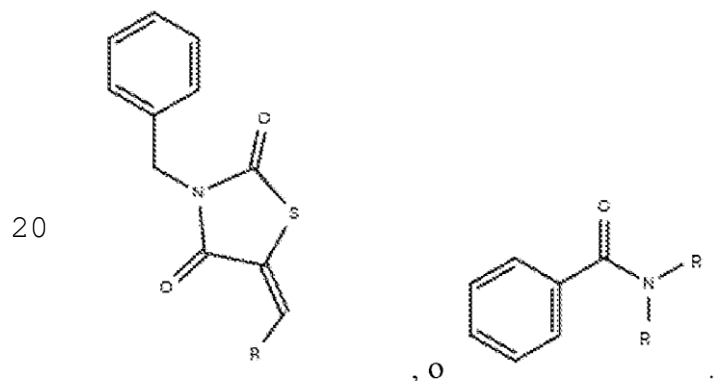
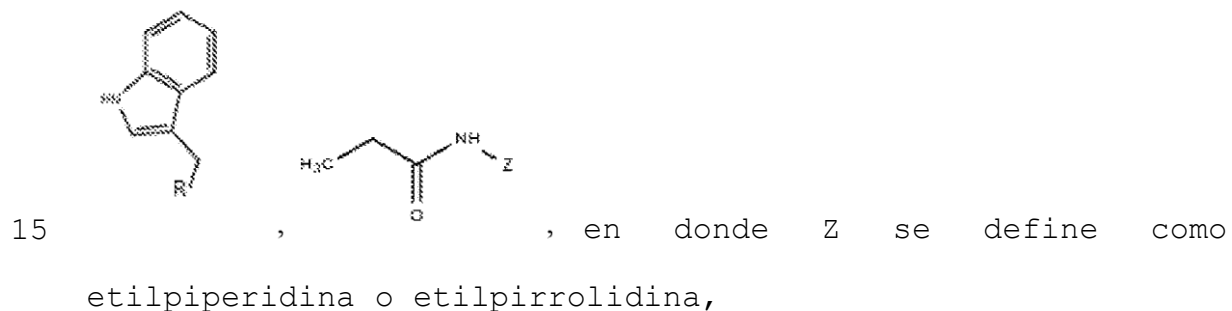
En resumen, el presente planteamiento puede incluir métodos para identificar mitocetoscinas potenciales usando en prospección de fármacos in silico y prospección fenotípica de fármacos. Los compuestos novedosos identificados usando esta metodología se pueden someter a prueba por la actividad anticancerosa (por ejemplo, la capacidad para inhibir la formación de mamíferas y la migración de células) y se pueden someter a prueba además en distintas cepas bacterianas y/o de levadura para

investigar la actividad antimicrobiana. La FIGURA 1 resume los métodos generales para la prospección y validación de fármacos de acuerdo con una modalidad del presente planteamiento, pero se debe apreciar que aquellas personas
5 de experiencia en el campo pueden desviarse de los ejemplos específicos dados a conocer en este documento sin apartarse del presente planteamiento.

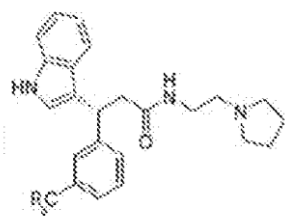
El presente planteamiento ha conducido a la identificación de mitocetoscinas que tienen propiedades
10 anticancerosas, y las modalidades del presente planteamiento pueden tomar la forma de uno o más de estos compuestos, así como también composiciones farmacéuticas que incluyen cantidades efectivas de uno o más de estos compuestos, y varios métodos de tratamiento que usan uno o
15 más de estos compuestos. Con base en la prospección y validación inicial de los inventores, los compuestos identificados en la FIGURA 2 tienen propiedades anticancerosas y por lo tanto son mitocetoscinas. En vista de la investigación de los inventores, estas mitocetoscinas
20 son por lo tanto candidatos para un ensayo inicial. Se debe apreciar que las mitocetoscinas identificadas en la FIGURA 2 no son exhaustivas, sino que son solamente aquellos compuestos que han sido identificados hasta ahora usando la metodología novedosa establecida en este documento. Se debe
25 apreciar por parte de aquellas personas expertas en el

campo que la cantidad terapéuticamente efectiva de cada compuesto, para una terapia particular se puede determinar a través de la aplicación de procedimientos directos como se conocen en el campo.

5 Algunas modalidades pueden tomar la forma de una o más mitocetoscinas. La modalidad se puede incluir en una composición farmacéutica para tratar un cáncer, una infección bacteriana y/o una infección por levadura patógena. Por ejemplo, una mitocetoscina puede ser un
10 farmacóforo general que tiene la siguiente estructura (o una sal del mismo):

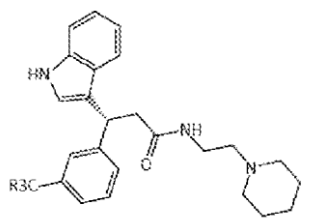


Como otro ejemplo, una mitocetoscina puede ser un farmacóforo general que tiene la siguiente estructura (o
25 una sal del mismo):



5 en donde cada R puede ser el mismo o
diferente y se selecciona del grupo que consiste de
hidrógeno, carbono, nitrógeno, azufre, oxígeno, flúor,
cloro, bromo, yodo, carboxilo, alcanos, alcanos cíclicos,
derivados basados en alcano, alquenos, alquenos cíclicos,
10 derivados basados en alqueno, alquinos, derivado basado en
alquino, cetonas, derivados basados en cetona, aldehídos,
derivados basados en aldehído, ácidos carboxílicos,
derivados basados en ácido carboxílico, éteres, derivados
basados en éter, ésteres y derivados basados en éster,
15 aminas, derivados basados en amino, amidas, derivados
basados en amida, areno monocíclico o policíclico,
heteroarenos, derivados basados en areno, derivados basados
en heteroareno, fenoles, derivados basados en fenol, ácidos
benzoicos y derivados basados en ácido benzoico.

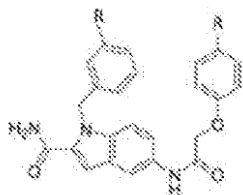
20 Como otro ejemplo, una mitocetoscina puede ser un
farmacóforo general que tiene la siguiente estructura (o
una sal del mismo):



25

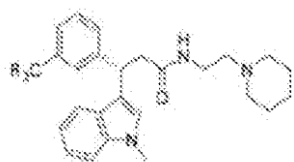
Como un ejemplo adicional, una mitocetoscina puede ser un farmacóforo general que tiene la estructura siguiente (o una sal del mismo):

5



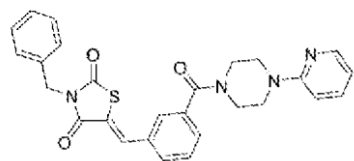
en donde cada R puede ser el mismo o diferente y se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, carbono, nitrógeno, azufre, oxígeno, flúor, cloro, bromo, yodo, carboxilo, alcanos, alcanos cíclicos, derivados basados en alcano, alquenos, alquenos cíclicos, derivados basados en alqueno, alquinos, derivado basado en alquino, cetonas, derivados basados en cetona, aldehídos, derivados basados en aldehído, ácidos carboxílicos, derivados basados en ácido carboxílico, éteres, derivados basados en éter, ésteres y derivados basados en éster, aminas, derivados basados en amino, amidas, derivados basados en amida, areno monocíclico o policíclico, heteroarenos, derivados basados en areno, derivados basados en heteroareno, fenoles, derivados basados en fenol, ácido benzoico y derivados basados en ácido benzoico.

Como otro ejemplo, una mitocetoscina puede ser un farmacóforo general que tiene la siguiente estructura (o una sal del mismo):



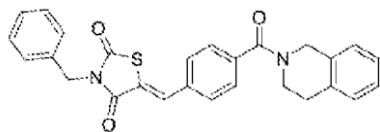
en donde cada R puede ser el mismo o
 5 diferente y se selecciona del grupo que consiste de
 hidrógeno, carbono, nitrógeno, azufre, oxígeno, flúor,
 cloro, bromo, yodo, carboxilo, alcanos, alcanos cíclicos,
 derivados basados en alcano, alquenos, alquenos cíclicos,
 derivados basados en alqueno, alquinos, derivado basado en
 10 alquino, cetonas, derivados basados en cetona, aldehídos,
 derivados basados en aldehído, ácidos carboxílicos,
 derivados basados en ácido carboxílico, éteres, derivados
 basados en éter, ésteres y derivados basados en éster,
 aminas, derivados basados en amino, amidas, derivados
 15 basados en amida, areno monocíclico o policíclico,
 heteroarenos, derivados basados en areno, derivados basados
 en heteroareno, fenoles, derivados basados en fenol, ácido
 benzoico y derivados basados en ácido benzoico.

Otro ejemplo de una mitocetoscina es un
 20 farmacóforo general que tiene la siguiente estructura (o
 una sal del mismo):



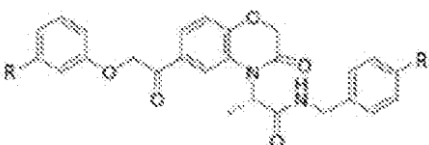
25 Un ejemplo adicional de una mitocetoscina es un

farmacóforo general que tiene la siguiente estructura (o una sal del mismo):



5

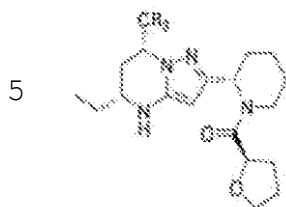
Un ejemplo adicional de una mitocetoscina es un farmacóforo general que tiene la siguiente estructura (o una sal del mismo):



10

en donde cada R puede ser el mismo o diferente y se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, carbono, nitrógeno, azufre, oxígeno, flúor, cloro, bromo, yodo, carboxilo, alcanos, alcanos cíclicos, derivados basados en alcano, alquenos, alquenos cíclicos, derivados basados en alqueno, alquinos, derivado basado en alquino, cetonas, derivados basados en cetona, aldehídos, derivados basados en aldehído, ácidos carboxílicos, derivados basados en ácido carboxílico, éteres, derivados basados en éter, ésteres y derivados basados en éster, aminas, derivados basados en amino, amidas, derivados basados en amida, areno monocíclico o policíclico, heteroarenos, derivados basados en areno, derivados basados en heteroareno, fenoles, derivados basados en fenol, ácido benzoico y derivados basados en ácido benzoico.

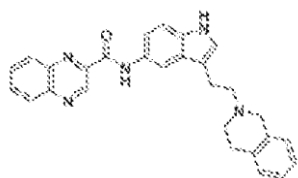
Otro ejemplo de una mitocetoscina es un farmacóforo general que tiene la siguiente estructura (o una sal del mismo):



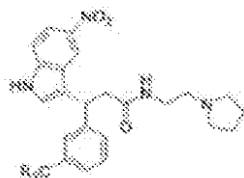
en donde cada R puede ser el mismo o diferente y se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, carbono, nitrógeno, azufre, oxígeno, flúor, cloro, bromo, yodo, carboxilo, alcanos, alcanos cíclicos, derivados basados en alcano, alquenos, alquenos cíclicos, derivados basados en alqueno, alquinos, derivado basado en alquino, cetonas, derivados basados en cetona, aldehídos, derivados basados en aldehído, ácidos carboxílicos, derivados basados en ácido carboxílico, éteres, derivados basados en éter, ésteres y derivados basados en éster, aminas, derivados basados en amino, amidas, derivados basados en amida, areno monocíclico o policíclico, heteroarenos, derivados basados en areno, derivados basados en heteroareno, fenoles, derivados basados en fenol, ácido benzoico y derivados basados en ácido benzoico.

10
15
20

Un ejemplo adicional de una mitocetoscina es un farmacóforo general que tiene la siguiente estructura (o una sal del mismo):



5 Otro ejemplo de una mitocetoscina es un
farmacóforo general que tiene la siguiente estructura (o
una sal del mismo):



10

 en donde cada R puede ser el mismo o
diferente y se selecciona del grupo que consiste de
hidrógeno, carbono, nitrógeno, azufre, oxígeno, flúor,
cloro, bromo, yodo, carboxilo, alcanos, alcanos cíclicos,
15 derivados basados en alcano, alquenos, alquenos cíclicos,
derivados basados en alqueno, alquinos, derivado basado en
alquino, cetonas, derivados basados en cetona, aldehídos,
derivados basados en aldehído, ácidos carboxílicos,
derivados basados en ácido carboxílico, éteres, derivados
20 basados en éter, ésteres y derivados basados en éster,
aminas, derivados basados en amino, amidas, derivados
basados en amida, areno monocíclico o policíclico,
heteroarenos, derivados basados en areno, derivados basados
en heteroareno, fenoles, derivados basados en fenol, ácido
25 benzoico y derivados basados en ácido benzoico. Se debe

apreciar que las mitocetoscinas se pueden seleccionar para el uso terapéutico individualmente, o en combinación con más de una mitocetoscina específica, y/o con otras sustancias para aumentar la eficacia de otros agentes terapéuticos. Los agentes terapéuticos se pueden usar en forma de composiciones farmacéuticas usuales las cuales se pueden preparar usando uno o más métodos conocidos. Por ejemplo, una composición farmacéutica se puede preparar mediante el uso de diluyentes o excipientes tales como, por ejemplo, uno o más materiales de relleno, agentes de carga, sustancias aglutinantes, agentes de humedecimiento, agentes desintegrantes, agentes tensoactivos, lubricantes y similares como se conoce en el campo. Varios tipos de formas unitarias de administración se pueden seleccionar dependiendo del(los) propósito(s) terapéutico(s). Los ejemplos de formas para composiciones farmacéuticas incluyen, pero no están limitadas a, tabletas, píldoras, polvos, líquidos, suspensiones, emulsiones, gránulos, cápsulas, supositorios, preparaciones para inyección (soluciones y suspensiones), cremas tópicas y otras formas como pueden ser conocidas en el campo. Con el propósito de configurar una composición farmacéutica en forma de tabletas, se puede usar cualquier excipiente que sea conocido, por ejemplo portadores tales como lactosa, azúcar blanca, cloruro de sodio, glucosa, urea, almidón, carbonato

de calcio, caolín, ciclodextrinas, celulosa cristalina, ácido silícico y similares; sustancias aglutinantes tales como agua, etanol, propanol, jarabe simple, soluciones de glucosa, soluciones de almidón, soluciones de gelatina, carboximetilcelulosa, goma laca, metilcelulosa, fosfato de potasio, polivinilpirrolidona, etcétera. Adicionalmente, se pueden usar agentes desintegrantes tales como almidón seco, alginato de sodio, agar en polvo, laminaria en polvo, carbonato ácido de sodio, carbonato de calcio, ésteres de ácidos grasos de polioxietilen-sorbitán, laurilsulfato de sodio, monoglicérido de ácido esteárico, almidón, lactosa, etcétera. Se pueden usar inhibidores de desintegración tales como azúcar blanca, estearina, mantequilla de coco, aceites hidrogenados; aceleradores de absorción tales como base de amonio cuaternario, laurilsulfato de sodio, etcétera. Se pueden usar agentes de humedecimiento tales como glicerina, almidón y otros conocidos en el campo. Se pueden usar agentes de adsorción tales como, por ejemplo, almidón, lactosa, caolín, bentonita, ácido silícico coloidal, etcétera. Se pueden usar lubricantes tales como talco purificado, estearatos, ácido bórico en polvo, polietilenglicol, etcétera. Si se desean tabletas, éstas se pueden revestir adicionalmente con materiales de recubrimiento usuales para hacer las tabletas como tabletas revestidas con azúcar, tabletas revestidas con película de

gelatina, tabletas revestidas con recubrimientos entéricos, tabletas revestidas con películas, tabletas de doble capa y tabletas de múltiples capas. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica se
5 pueden formular como ungüentos, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, espumas, atomizaciones, aerosoles o aceites. Estas composiciones farmacéuticas pueden incluir aditivos convencionales los cuales incluyen, pero no están limitados a, conservadores,
10 solventes para ayudar en la penetración de fármacos, co-solventes, emolientes, gases propelentes, agentes modificadores de la viscosidad (agentes gelificantes), surfactantes y portadores.

En algunas modalidades, el presente planteamiento
15 puede involucrar métodos para someter a prueba compuestos, y en particular mitocetoscinas, por las propiedades anticancerosas. Como se planteara anteriormente, la vHTS y la química computacional se pueden usar para identificar inhibidores mitocondriales candidatos. Esas entidades se
20 pueden someter a prueba por las propiedades anticancerosas específicas. Por ejemplo, los inventores compararon siete compuestos candidatos en paralelo por su capacidad para inhibir la formación de mamósferas en células MCF7. La FIGURA 3 demuestra que seis compuestos sometidos a prueba
25 inhibieron la formación de mamósferas. Los Compuesto 2 y 8

(FIGURAS 3A y 3B, respectivamente) fueron los dos candidatos más potentes en la disminución del número de mamosferas, una medida de la actividad de células madre cancerosas, a una concentración de 25 μM . Los Compuestos 6 y 3 también fueron efectivos (FIGURAS 3C y 3D, respectivamente), mientras que los Compuestos 5 y 1 (FIGURAS 3E y 3F, respectivamente) fueron los inhibidores menos potentes del crecimiento de mamosferas.

10	Compuesto	Identificación	IC-50 (μM)
	Aciertos de OXCT1		
	1	ALB-H01004577	160.4
	2	ALB-H09465625	11.3
	3	ALB-H15358970	46.7
15	4	ALB-H15354504	166.8
	Aciertos de ACAT1		
	5	ALB-H04367562	66.7
	6	LEG19576081	22.9
	8	ALB-H01005022	10.1

20 **Tabla 1. Inhibición de Mitocetoscinas de la formación de mamosferas en células MCF7**

La Tabla 1 resume los resultados de la inhibición de formación de mamosferas para siete compuestos candidatos. La Tabla 1 muestra que siete compuestos inhibieron la formación de mamosferas con concentraciones

25

inhibitorias semimáximas (IC-50s) entre 10 y 170 μM . Los Compuestos 1 a 4 se identificaron de la prospección de OXCT1, y los Compuestos 5, 6 y 8 se identificaron de la prospección de ACAT1.

5 En algunas modalidades, el presente planteamiento puede involucrar métodos de validación de funciones de compuestos de mitocetoscina. Por ejemplo, los inventores evaluaron la validación funcional de cuatro candidatos usando el Analizador Seahorse^{MR}, el cual mide
10 cuantitativamente la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la tasa de acidificación extracelular (ECAR). La OCR es un marcador sustituto para OXPHOS y ECAR es un marcador sustituto para la glicólisis y la producción de L-lactato.

 Los resultados de los inventores demostraron que
15 todos los Compuestos 2, 3, 6 y 8 inhibieron de manera dependiente de la dosis el consumo de oxígeno mitocondrial en células MCF7. Las FIGURAS 4A y 4B muestran que los Compuestos 2 y 8 redujeron significativamente la respiración mitocondrial, incluso en dosis tan bajas como 5
20 μM . Los Compuestos 6 y 3 también fueron inhibidores potentes (FIGURAS 4C y 4D). Como se muestra en las FIGURAS 5 y 6, los compuestos redujeron de manera dependiente de la dosis la respiración basal, fuga de protones, respiración vinculada con ATP y respiración máxima. La FIGURA 7 muestra
25 como cuatro compuestos inhibieron significativamente la

glicólisis en comparación con el control.

Algunas modalidades del presente planteamiento pueden incluir someter a prueba compuestos por las propiedades anticancerosas al considerar los efectos de los compuestos sobre la formación de mamosferas. Se debe apreciar que aquellas personas expertas en el campo pueden usar otros métodos conocidos en el campo para evaluar los efectos de un inhibidor mitocondrial candidato sobre una línea particular de células sin apartarse del presente planteamiento. También se debe apreciar que aquellas personas expertas en el campo pueden evaluar los efectos de un inhibidor mitocondrial candidato sobre otros tipos de cánceres, ya que los inhibidores fijan como objetivo células madre cancerosas (CSCs). Las CSCs muestran cualidades conservadas o similares a través de la mayoría de tipos de cáncer.

Las FIGURAS 8A-8D ilustran el modelado molecular de los Compuestos 2, 8, 3 y 6. El propósito del modelado molecular es predecir el modo de enlace predominante de un compuesto a una estructura tridimensional conocida. Las FIGURAS 8A y 8C muestran el acoplamiento molecular de los Compuestos 2 y 3, respectivamente, en el sitio de enlace de succinil-CoA dentro de la estructura cristalina 3D de OXCT1. Una comparación de las FIGURAS 8A y 8C muestra que por lo menos un aminoácido, ASN-373, se predice que se

enlaza directamente a ambos Compuestos 2 y 3. Las FIGURAS 8B y 8D muestran el acoplamiento molecular de los Compuestos 8 y 6, respectivamente, en el sitio de enlace de CoA dentro de la estructura cristalina 3D de ACAT1. Una
5 comparación de las FIGURAS 8B y 8D muestra que por lo menos dos aminoácidos, LEU-184 y HIS-192, se predice que se enlazan directamente a ambos Compuestos 8 y 6. Estos sitios de enlace dominantes predichos pueden ser invaluable para dirigir adicionalmente la optimización.

10 Los cuerpos de cetona se comportan funcionalmente como combustibles mitocondriales, los cuales pueden impulsar de manera activa el crecimiento y metástasis de tumores. En este contexto, la OXCT1 y ACAT1 son dos proteínas mitocondriales que participan en la reutilización
15 de cetona, como se resume en la FIGURA 9. Los inventores fijaron como objetivo de manera molecular la OXCT1 y la ACAT1 para prevenir que las células cancerosas reciclen los cuerpos de cetona en Acetil-CoA, el cual entra normalmente al ciclo de TCA, impulsando la producción mitocondrial de
20 ATP.

Un acierto superior para la prospección de OXCT1 (Compuesto 2) y un acierto para la prospección de ACAT1 (Compuesto 8) tienen estructuras químicas similares, con la excepción de grupos laterales funcionales menores, como se
25 muestra en la FIGURA 10A. El "andamio químico" o

farmacóforo subyacente es el mismo para ambas moléculas pequeñas, como se muestra en la FIGURA 11B. Las estructuras de los Compuestos 2 y 8 también se compararon con la estructura molecular de la coenzima A en la FIGURA 12 para 5 demostrar las similitudes estructurales.

Dos compuestos de la prospección de OXCT1 (Compuestos 3 y 4) son estructuralmente similares entre sí, como se muestra en la FIGURA 11A. Sin embargo, con base en sus valores IC-50 observados, el Compuesto 3 es casi 4 10 veces más potente que el Compuesto 4 en su capacidad para fijar como objetivo la propagación de CSC. Los grupos químicos únicos que distinguen estructuralmente estas dos moléculas (destacados por las flechas en la FIGURA 11A), pueden ser responsables de las diferencias observadas en 15 sus valores IC-50 observados para su inhibición de la propagación de CSC.

Los estudios recientes proporcionan evidencia adicional de un papel para la ACAT1 como un oncogén, ya que estos estudios identificaron la arecolina como un inhibidor 20 potencial de ACAT1. Garcia-Bermudez y colaboradores, *Mol Cell* 2016, 64(5):856-857. La arecolina es un alcaloide basado en ácido nicotínico encontrado dentro de la nuez de areca, la cual es el fruto de la palma de areca (Areca catechu). La arecolina ha mostrado actividad antitumoral, 25 lo que valida adicionalmente que los fármacos que fijan

como objetivo la ACAT1 podrían ser valiosos como agentes anticancerosos. Sin embargo, los inventores no evaluaron su capacidad para fijar como objetivo las CSCs. Ya que la arecolina es una molécula muy pequeña (mostrada en la FIGURA 10B para comparación con los Compuestos 6 y 3), puede ser necesario que sea modificada significativamente por medio de la química medicinal para incrementar su potencia. La arecolina no es una mitocetoscina, debido a que se sabe que el compuesto es carcinógeno.

10 Mientras que el metabolismo normal de cetona ocurre bajo condiciones de inanición del organismo y/o privación severa de nutrientes, esta regulación se pierde en tumores de humanos, y el metabolismo de cetona parece ocurrir de manera constitutiva en las células cancerosas.

15 Se predeciría que la fijación como objetivo del metabolismo de cetona en tumores de humanos, bajo condiciones alimentarias normales, tiene efectos colaterales metabólicos mínimos. No obstante, los efectos colaterales potenciales de los inhibidores de cetona se podrían mejorar

20 o "controlar" significativamente al incluir un paso de "rescate", que consiste de un tratamiento de seguimiento con otros substratos de soporte mitocondriales, tales como glucosa, piruvato, lactato, ácidos grasos y/o acetil-carnitina, como se muestra en la FIGURA 13. Las soluciones

25 intravenosas estériles de D-glucosa y L-lactato (D5W, D5NS,

Ringer-Lactato) ya se usan rutinariamente en hospitales para otras indicaciones clínicas y terapéuticas; por lo tanto, un tratamiento de seguimiento es factible clínicamente.

5 Los inventores han mostrado que los compuestos que inducen el agotamiento agudo de ATP en células cancerosas pueden sensibilizar esas células a la radiación, luz ultravioleta, agentes quimioterapéuticos, sustancias naturales y/o restricción calórica. Las mitocetoscinas, 10 como se plantea en este documento, han demostrado efectos de agotamiento de ATP. Con base en esos resultados preliminares, las mitocetoscinas también se pueden usar como radiosensibilizadores y/o fotosensibilizadores. El uso como radiosensibilizadores y/o fotosensibilizadores puede 15 ser en combinación con otros vectores de tratamiento, que incluyen pero no están limitados a otros métodos de tratamiento de cáncer que pueden ser conocidos en el campo, y el tratamiento de cáncer a través de la inhibición de la biogénesis mitocondrial, como se da a conocer en este 20 documento. Similarmente, las mitocetoscinas se pueden usar para sensibilizar funcionalmente las células cancerosas a granel y las células madre cancerosas hacia agentes quimioterapéuticos, productos farmacéuticos y/u otras sustancias naturales, tales como suplementos alimentarios y 25 restricción calórica.

Además del comportamiento anticanceroso y antibiótico, los inhibidores mitocondriales que se pueden identificar por medio del presente planteamiento tienen el potencial de desacelerar el proceso de envejecimiento de mamíferos. Se ha mostrado que la inhibición genética de la traducción de proteínas mitocondriales tiene efectos colaterales benéficos, y en particular el efecto colateral de desaceleración del proceso de envejecimiento e incremento de la esperanza de vida en organismos modelo.

Los niveles de régimen permanente más bajos de Mrps5 (una proteína mitorribosómica) están correlacionados funcionalmente de manera considerable con la esperanza de vida más larga de murinos, lo que da por resultado un incremento significativo en la esperanza de vida de ~250 días. Además, la supresión selectiva de Mrps5 en *C. elegans* incrementa dramáticamente la esperanza de vida. Los gusanos con supresión de Mrps5 muestran disminuciones significativas en la respiración mitocondrial y la producción de ATP. Similarmente, la supresión de los homólogos de gusanos del complejo mitocondrial I, III, IV y V, así como también varias enzimas del ciclo de TCA, extendieron consistentemente en su totalidad la esperanza de vida, implicando además la actividad reducida de OXPHOS y los niveles más bajo de ATP como el mecanismo.

Finalmente, la inhibición farmacológica de la biogénesis

mitocondrial (usando los efectos no acertados de la doxiciclina) también incrementa significativamente la esperanza de vida en *C. elegans*. De esta manera, las mitocetoscinas se pueden usar para fijar como objetivo
5 terapéuticamente el proceso de envejecimiento y para extender la esperanza de vida.

Las mitocetoscinas también se pueden usar para minimizar y/o invertir la resistencia a fármacos en células cancerosas. Se piensa que la resistencia a fármacos está
10 basada, por lo menos en parte, en la función mitocondrial incrementada en células cancerosas. En particular, se espera que las células cancerosas que demuestran resistencia a terapias endocrinas, tal como tamoxifeno, tengan una función mitocondrial incrementada. Las
15 mitocetoscinas inhiben la función mitocondrial, y por lo tanto pueden ser útiles en la reducción y, en algunos casos la inversión, de la resistencia a fármacos en células cancerosas.

La terminología usada en la descripción de la
20 invención tiene el propósito de describir únicamente modalidades particulares y no se pretende que sea limitante de la invención. Como se usa en la descripción de la invención y las reivindicaciones anexas, se pretende que las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyan las
25 formas plurales también, a menos que el contexto indique

claramente lo contrario. La invención incluye numerosas alternativas, modificaciones y equivalentes como llegará a ser aparente a partir de la consideración de la siguiente descripción detallada.

5 Se entenderá que aunque los términos "primero", "segundo", "tercero", "a)", "b)" y "c)", etcétera se pueden usar en este documento para describir varios elementos de la invención no debe limitar por estos términos. Estos términos solo se usan para distinguir un elemento de la
10 invención de otro. De esta manera, un primer elemento planteado posteriormente podría ser denominado un aspecto de elemento, y similarmente, un tercero sin apartarse de las enseñanzas de la presente invención. De esta manera, los términos "primero", "segundo", "tercero", "a)", "b)" y
15 "c)", etcétera no se pretende que expresen necesariamente una secuencia u otra jerarquía para los elementos asociados, sino que se usan únicamente para fines de identificación. La secuencia de operaciones (o pasos) no está limitada al orden presentado en las reivindicaciones.

20 A menos que se definan de otra manera, todos los términos (que incluyen términos técnicos y científicos) usados en este documento tienen el mismo significado que aquel entendido comúnmente por una persona de experiencia ordinaria en el campo al cual pertenece esta invención. Se
25 entenderá además que términos, tales como aquellos

definidos en diccionarios usados comúnmente, se deben interpretar como que tienen un significado que es consistente con su significado en el contexto de la presente solicitud y la técnica relevante y no se deben
5 interpretar en un sentido idealizado o demasiado formal a menos que se defina expresamente así en este documento. La terminología usada en la descripción de la invención en este documento tiene el propósito de describir únicamente modalidades particulares y no se pretende que sea limitante
10 de la invención. Todas las publicaciones, publicaciones de patente, patentes y otras referencias mencionadas en este documento se incorporan a manera de referencia en su totalidad. En caso de un conflicto en la terminología, la presente especificación prevalece.

15 Como se usa también en este documento, "y/o" se refiere a y comprende cualquiera y la totalidad de posibles combinaciones de uno o más de los elementos listados asociados, así como también la falta de combinaciones cuando se interpreta en caso distinto ("o").

20 A menos que el contexto indique lo contrario, se pretende específicamente que las diversas cualidades de la invención descritas en este documento se pueden usar en cualquier combinación. Por otra parte, la presente invención también contempla que, en algunas modalidades de
25 la invención, cualquier cualidad o combinación de

cualidades expuestas en este documento se pueden excluir u omitir. Para ilustrar, si la especificación establece que un complejo comprende los componentes A, B y C, se pretende específicamente que cualquiera de A, B o C, o una
5 combinación de los mismos, se pueda omitir o desconocer.

Como se usa en este documento, la frase transitoria "que consiste esencialmente de" (y variantes gramaticales) se debe interpretar como que comprende los materiales o pasos expuestos "y aquellos que no afectan
10 materialmente la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s)" de la invención reclamada. De esta manera, el término "que consiste esencialmente de" como se usa en este documento no se debe interpretar como equivalente de "que comprende".

15 Se pretende que el término "aproximadamente", como se usa en este documento cuando se refiere a un valor medible, tal como, por ejemplo, una cantidad o concentración y similares, comprenda variaciones de $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0.5\%$, o incluso $\pm 0.1\%$ de la cantidad
20 especificada. Un intervalo proporcionado en este documento para un valor medible puede incluir cualquier otro intervalo y/o un valor individual en el mismo.

Habiendo descrito de esta manera ciertas modalidades de la presente invención, se debe entender que
25 la invención definida por las reivindicaciones anexas no

debe ser limitada por detalles particulares establecidos en la descripción anterior ya que muchas variaciones aparentes de la misma son posibles sin apartarse del espíritu o alcance de la misma como se reclama posteriormente en este documento.

10

15

20

25