

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 590 708**

51 Int. Cl.:

<b>C07C 277/08</b>	(2006.01) <b>A61P 29/00</b>	(2006.01)
<b>C07C 279/14</b>	(2006.01) <b>A61P 25/00</b>	(2006.01)
<b>C07C 279/20</b>	(2006.01) <b>A61Q 19/00</b>	(2006.01)
<b>C07H 13/04</b>	(2006.01)	
<b>A23L 33/17</b>	(2006.01)	
<b>A61K 31/22</b>	(2006.01)	
<b>A61K 31/7024</b>	(2006.01)	
<b>A61P 21/00</b>	(2006.01)	
<b>A61P 25/16</b>	(2006.01)	
<b>A61P 9/00</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2012** **E 12352002 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016** **EP 2692719**

54 Título: **Método para preparar ésteres grasos de creatina, ésteres grasos de creatina preparados de este modo y usos de los mismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.11.2016**

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET  
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (100.0%)  
25, Rue Leblanc, Bâtiment "Le Ponant D"  
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**DEZARD, SOPHIE;  
TARAN, FRÉDÉRIC;  
TROTIER-FAURION, ALEXANDRA y  
MABONDZO, ALOÏSE**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 590 708 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

Método para preparar ésteres grasos de creatina, ésteres grasos de creatina preparados de este modo y usos de los mismos

5

**Campo técnico**

La presente invención pertenece al dominio de los derivados de creatina y de forma notable a los ésteres grasos de creatina.

10

Más en particular, la presente invención se refiere a un método para preparar (o producir) ésteres grasos de creatina llevando a cabo una etapa de apertura de anillo sobre la creatinina diprotéjida usando una molécula que lleva un grupo funcional alcohol.

15

La presente invención también se refiere a ésteres grasos de creatina particulares preparados de este modo y a los diferentes usos de estos nuevos ésteres grasos de creatina en investigación, tratamiento, técnicas de imagen o diagnóstico.

**Estado de la técnica anterior**

20

La creatina es un nutriente endógeno producido de forma natural por el hígado y los riñones en la mayoría de los vertebrados. Los usos de la creatina son muchos, incluyendo su uso como complemento para incrementar la masa muscular y potenciar el rendimiento muscular, así como en aplicaciones emergentes en el tratamiento de diversos trastornos tales como, sin limitación, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, diversos trastornos neuromusculares, hipoxia y encefalopatías isquémicas tales como apoplejía, cardiopatía, diversas distrofias musculares [1] y diversos trastornos cutáneos [2]. La creatina también se puede usar como agente antiinflamatorio [3]. De forma notable, la administración local de creatina se puede lograr por absorción a través de la piel [4].

25

30

Típicamente, la creatina se absorbe en las células musculares por receptores específicos y se convierte en fosfocreatina por la creatina cinasa. Las células musculares, incluyendo el músculo esquelético y el miocardio, funcionan utilizando la energía celular liberada a partir de la conversión de trifosfato de adenosina (ATP) en difosfato de adenosina (ADP). La cantidad de fosfocreatina en la célula muscular determina la cantidad de tiempo que le llevará al músculo recuperar la actividad y regenerar ATP. La fosfocreatina es una fuente rápidamente accesible de fosfato requerida para la regeneración de ATP y uso mantenido del músculo. Por ejemplo, la energía usada para expandir y contraer los músculos se suministra por el ATP. El ATP se metaboliza en el músculo escindiendo un radical fosfato para liberar la energía necesaria para contraer el músculo. El difosfato de adenosina (ADP) se forma como un subproducto de este metabolismo.

35

40

Las fuentes más comunes de ATP son de glucógeno y fosfato de creatina. El fosfato de creatina se ve favorecido como una fuente disponible debido a que puede resintetizar ATP a una tasa mayor de la que se logra típicamente utilizando glucógeno. Por lo tanto, el incremento en la cantidad de creatina en el músculo incrementa las reservas musculares de fosfocreatina y se ha demostrado que incrementa el rendimiento muscular y el incremento en la masa muscular.

45

50

Sin embargo, la propia creatina es poco soluble en una solución acuosa (aproximadamente 10-15 mg/ml). Además, la creatina no se absorbe bien desde el tubo gastrointestinal a un 14 % o menos tasa de absorción desde el tubo GI. La creatina también tiene una biodisponibilidad oral baja debido, en parte, a (i) lipofiliidad baja y por lo tanto mala permeabilidad de membrana, y (ii) conversión rápida en creatinina en el entorno ácido del estómago [5]. Por tanto, los productos actuales requieren la administración de grandes cantidades, típicamente 5 gramos o más, de creatina para que sea eficaz, lo que provoca efectos secundarios como meteorismo, dolor gastrointestinal (GI), diarrea, y similares.

55

Las deficiencias del metabolismo de la creatina, incluyen deficiencias enzimáticas de su biosíntesis (deficiencias en AGAT y GAMT de transmisión autosómica recesiva) y de su transporte intracerebral (gen SLC6A8/CT1, relacionado con X). La incidencia de la enfermedad es de aproximadamente un 2 % de todo el retraso mental ligado al cromosoma X en etiología desconocida. Estas deficiencias dan como resultado un retraso grave con una prevalencia sobre el lenguaje, un síndrome extrapiramidal, trastornos de comportamiento y en determinados casos epilepsia. La enfermedad aparece la mayoría de las veces durante la niñez, pero recientemente se informó de casos en adultos.

60

65

Parece que la respuesta a un tratamiento por creatina es favorable solo en el caso de una deficiencia en la síntesis de creatina, pero no en el caso de una deficiencia de transporte intracerebral de creatina. De hecho, en este caso, los hallazgos de los dos años de tratamiento por creatina por administración oral asociada con sus precursores L-arginina y L-glicina no mostró una mejora auténtica ni un incremento en los niveles de creatina intracerebral. Por tanto, esta es una situación clínica en la que la ausencia de transportadores funcionales de creatina en la barrera hematoencefálica (BHE) evita la entrada de creatina en el cerebro, lo que afecta a las funciones cerebrales. Una definición y una evaluación mejores de nuevas estrategias para la optimización farmacológica para esta enfermedad

metabólica cerebral son actualmente, por tanto, más que necesarias.

Estas enfermedades y los efectos secundarios e insuficiencias descritas anteriormente se pueden evitar por la administración de ésteres de creatina, que se convierten en creatina por las esterasas endógenas encontradas en una variedad de células y líquidos biológicos [1]. Los ésteres de creatina son más lipófilos que la creatina y por lo tanto tienen una mayor biodisponibilidad. Adicionalmente, el grupo funcional de ácido carboxílico de creatina se enmascara a través de la esterificación en ésteres de creatina, evitando de este modo la formación del producto no deseado creatinina.

Todos los métodos de ésteres grasos de creatina descritos en patentes y solicitud de patente implican la reacción catalizada por ácidos de Brønsted de la creatina con alcoholes. Los ésteres de creatina se pueden formar por reacción de la creatina con alcoholes por catálisis con clorhidrato gaseoso [6]. Los ésteres grasos de creatina también se pueden formar a partir de la síntesis directa por producción de ácido *in situ* de un catalizador ácido [7-8]. La solicitud de patente [7] divulga ésteres de creatina obtenibles por esta síntesis (párrafo [0022]). En estos ésteres de creatina, el grupo hidrocárbilo que sustituye el átomo de oxígeno de la función éster puede comprender de 1 a 25 átomos de carbono.

Otros derivados de creatina se divulgan en la técnica anterior. Los anhídridos de ácidos grasos de creatina se preparan por reacción directa de creatina con haluro de acilo graso [9]. Las creatinilamidas se producen por guanidilación de péptido sarcosina para producir aminoácidos con creatinilo [10]. También se describe el enlace amida entre el grupo guanidilo de la creatinina y el ácido graso [11]. No obstante, en manos de los inventores, la preparación de ésteres grasos como anhídridos grasos de acuerdo con estas patentes y solicitudes de patente dieron rendimientos muy bajos. Estos métodos están bien adaptados para alcoholes de bajo peso molecular tales como EtOH, nPrOH y nBuOH, pero los rendimientos se reducen drásticamente en el caso de alcoholes grasos de cadena larga.

Claramente, hay necesidad de un proceso que permita una producción eficaz de ésteres grasos de creatina. De hecho, una síntesis eficaz de ésteres grasos de creatina sería un progreso significativo en los campos terapéutico y de diagnóstico.

### Análisis de la invención

La presente invención resuelve los problemas técnicos enumerados anteriormente y proporciona una solución a la necesidad mencionada anteriormente. De hecho, los inventores describen la producción de ésteres grasos de creatina usando alcoholes grasos con un rendimiento global de un 45 %. La eficacia de este proceso es mayor que la de los descritos previamente en la literatura y permite obtener derivados de creatina que son difíciles de preparar por técnicas conocidas.

Además, la síntesis de acuerdo con la presente invención es barata y se puede aplicar a la escala de multigramos para necesidades terapéuticas.

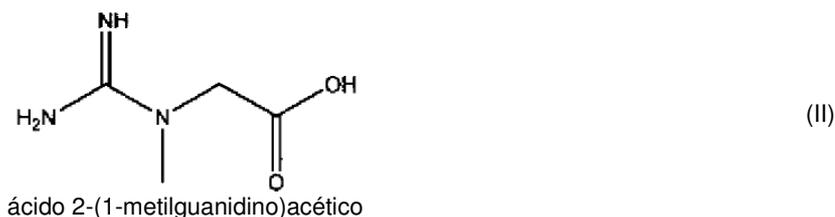
A continuación, el método de preparación de acuerdo con la presente invención se puede llevar a cabo por cualquier alcohol graso, pero también por cualquier molécula que lleve un grupo funcional alcohol tal como, por ejemplo, glucosa.

Más en particular, la presente invención se refiere a un método para preparar un éster graso de creatina o derivado del mismo que comprende al menos una etapa que consiste en hacer reaccionar una creatinina diprotégida con una molécula que lleva al menos un grupo funcional alcohol y de fórmula (I):



en la que R' representa un radical hidrocarburo que contiene al menos 4 átomos de carbono.

En lo que precede y en lo que sigue, la creatina (ácido 2-(1-metilguanidino)acético) se representa por la siguiente fórmula (II):



La creatina también se puede representar por la siguiente fórmula (II'):



En la presente invención, un éster graso de creatina se representa por la fórmula (III):



en la que R' representa un radical hidrocarburo que contiene al menos 4 átomos de carbono.

En la presente invención, un derivado de éster graso de creatina es un éster graso de creatina en el que al menos uno de los átomos de hidrógeno del grupo metilguanidinilo está sustituido con un grupo de ácido carboxílico (-COOH). De forma ventajosa, el derivado de creatina se representa por la siguiente fórmula (IV):



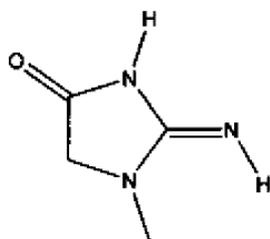
en la que el radical R' representa un radical hidrocarburo que contiene al menos 4 átomos de carbono y los radicales R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub>, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un grupo de ácido carboxílico y al menos uno de entre los radicales R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> es un grupo de ácido carboxílico.

Particularmente, en el derivado de creatina representado por la fórmula (IV), solo un radical de entre R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> es un grupo de ácido carboxílico y los dos otros radicales son átomos de hidrógeno. Más en particular, el radical R<sub>1</sub> es un grupo de ácido carboxílico y los radicales R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son átomos de hidrógeno. En este caso, el derivado de creatina es de la siguiente fórmula (V):



en la que el radical R' representa un radical hidrocarburo que contiene al menos 4 átomos de carbono.

En lo que precede y en lo que sigue, la creatinina (2-imino-1-metilimidazolidin-4-ona) se representa por la siguiente fórmula (VI):



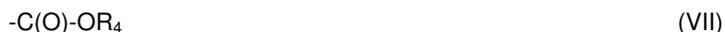
2-imino-1-metilimidazolidin-4-ona

(VI)

En la presente invención, la creatinina diprotegida es una creatinina en la que los dos átomos de hidrógeno que sustituyen los dos átomos de nitrógeno se reemplazan por dos grupos protectores, idénticos o diferentes. Queda claro que la protección no se lleva por el grupo metilo que sustituye el 3º átomo de nitrógeno de la creatinina. En una creatinina diprotegida, los dos grupos protectores son ventajosamente idénticos.

Cualquier grupo protector adaptado conocido por un experto en la técnica se puede usar en el contexto de la presente invención.

De forma ventajosa, el grupo protector implementado en la presente invención se representa por la fórmula (VII):



en la que el radical R<sub>4</sub> representa un grupo hidrocarburo.

El grupo hidrocarburo R<sub>4</sub> es un grupo hidrocarburo con 1 a 20 átomos de carbono tal como un radical alquilo con 1 a 20 átomos de carbono, un radical alquenilo con 2 a 20 átomos de carbono, un radical alcoxi con 1 a 20 átomos de carbono, un radical arilo con 6 a 20 átomos de carbono, y un radical ariloxi con 6 a 20 átomos de carbono.

Dentro del alcance de la presente invención y a menos que se indique de otro modo, por «grupo alquilo con 1 a 20 átomos de carbono» se quiere decir un grupo (hetero)alquilo lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido,

con 1 a 20 átomos de carbono, de manera notable con 1 a 15 átomos de carbono y en particular, con 1 a 10 átomos de carbono, siendo el/los heteroátomo(s) del grupo heteroalquilo N, O, P o S.

5 Dentro del alcance de la presente invención, por «grupo alquenilo con 2 a 20 átomos de carbono» se quiere decir un grupo (hetero)alquenilo lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido, con 2 a 20 átomos de carbono, de manera notable con 2 a 15 átomos de carbono y en particular, con 2 a 10 átomos de carbono, siendo el/los heteroátomo(s) del grupo heteroalquenilo N, O, P o S.

10 Dentro del alcance de la presente invención, por «grupo alcoxi con 1 a 20 átomos de carbono» se quiere decir un átomo de oxígeno sustituido con un alquilo con 1 a 20 átomos de carbono como se define antes.

15 Dentro del alcance de la presente invención, por «grupo arilo con 6 a 20 átomos de carbono», se quiere decir un grupo (hetero)aromático mono- o policíclico, opcionalmente sustituido, que tiene de 6 a 20 átomos de carbono, de manera notable de 6 a 14 átomos de carbono, en particular, de 6 a 8 átomos de carbono, siendo el/los heteroátomo(s) del grupo heteroaromático N, O, P o S.

Dentro del alcance de la presente invención, por «grupo ariloxi con 6 a 20 átomos de carbono» se quiere decir un átomo de oxígeno sustituido con un arilo con 6 a 20 átomos de carbono como se define antes.

20 Dentro del alcance de la presente invención, por «opcionalmente sustituido» se quiere decir un radical que puede estar sustituido con uno o más grupos seleccionados de un grupo alquilo, un grupo arilo, un grupo alcoxi, un halógeno, un hidroxilo, un ciano, un trifluorometilo o un nitro.

25 Dentro del alcance de la presente invención, por «halógeno» se quiere decir un flúor, cloro, bromo o yodo.

30 Particularmente, el grupo protector R<sub>4</sub> implementado en la presente invención se elige del grupo que consiste en un grupo benzoílo opcionalmente sustituido, un grupo terc-butoxicarbonilo (BOC) y un fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Más en particular, el grupo protector implementado en la presente invención es un grupo benzoílo opcionalmente sustituido y de manera notable un grupo benzoílo.

35 El radical R' presente en la molécula que lleva al menos un grupo funcional alcohol y de fórmula (I), en el éster graso de creatina de fórmula (III) y en el éster graso de creatina derivado de fórmula (IV) o (V) es un radical hidrocarburo que contiene al menos 4 átomos de carbono. De forma ventajosa, el radical R' se elige en el grupo que consiste en un radical alquilo con 4 a 30 átomos de carbono, un radical alquenilo con 4 a 30 átomos de carbono, y un radical arilo con 6 a 30 átomos de carbono.

40 Dentro del alcance de la presente invención y a menos que se indique de otro modo, por «grupo alquilo con 4 a 30 átomos de carbono» se quiere decir un grupo (hetero)alquilo lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido, con 4 a 30 átomos de carbono, de manera notable con 4 a 25 átomos de carbono y en particular, con 4 a 20 átomos de carbono, siendo el/los heteroátomo(s) del grupo heteroalquilo N, O, P o S.

45 Dentro del alcance de la presente invención, por «grupo alquenilo con 4 a 30 átomos de carbono» se quiere decir un grupo (hetero)alquenilo lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido, con 4 a 30 átomos de carbono, de manera notable con 4 a 25 átomos de carbono y en particular, con 4 a 20 átomos de carbono, siendo el/los heteroátomo(s) del grupo heteroalquenilo N, O, P o S.

50 Dentro del alcance de la presente invención, por «grupo arilo con 6 a 30 átomos de carbono», se quiere decir un grupo (hetero)aromático mono- o policíclico, opcionalmente sustituido, que tiene de 6 a 30 átomos de carbono, de manera notable de 6 a 25 átomos de carbono, en particular, de 6 a 20 átomos de carbono, siendo el/los heteroátomo(s) del grupo heteroaromático N, O, P o S.

55 En un 1º modo de realización particular de la presente invención, el radical R' presente en la molécula que lleva al menos un grupo funcional alcohol y de fórmula (I), en el éster graso de creatina de fórmula (III) y en el éster graso de creatina derivado de fórmula (IV) o (V) se representa por la siguiente fórmula (VIII):



60 en la que R'<sub>1</sub> es un radical hidrocarburo que contiene al menos 3 átomos de carbono. De forma ventajosa, el radical R' se elige en el grupo que consiste en un radical alquilo con 3 a 30 átomos de carbono, un radical alquenilo con 3 a 30 átomos de carbono, y un radical arilo con 6 a 30 átomos de carbono.

Dentro del alcance de la presente invención y a menos que se indique de otro modo, por «grupo alquilo con 3 a 30 átomos de carbono» se quiere decir un grupo (hetero)alquilo lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido, con 3 a 30 átomos de carbono, de manera notable con 3 a 25 átomos de carbono y en particular, con 3 a 20 átomos de carbono, siendo el/los heteroátomo(s) del grupo heteroalquilo N, O, P o S.

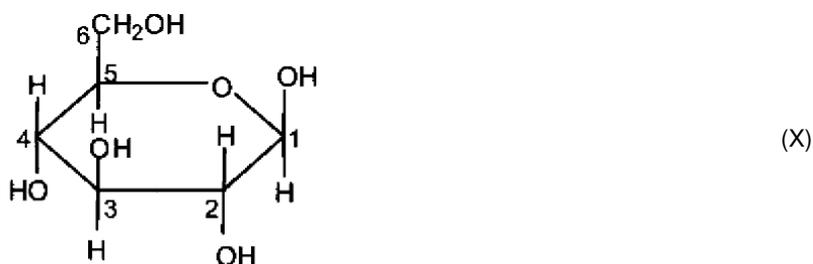
5 Dentro del alcance de la presente invención, por «grupo alquenilo con 3 a 30 átomos de carbono» se quiere decir un grupo (hetero)alquenilo lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido, con 3 a 30 átomos de carbono, de manera notable con 3 a 25 átomos de carbono y en particular, con 3 a 20 átomos de carbono, siendo el/los heteroátomo(s) del grupo heteroalquenilo N, O, P o S.

10 En un 2º modo de realización particular de la presente invención, el radical R' presente en la molécula que lleva al menos un grupo funcional alcohol y de fórmula (I), en el éster graso de creatina de fórmula (III) y en el éster graso de creatina derivado de fórmula (IV) o (V) es un radical glucosilo opcionalmente sustituido.

En lo que sigue, la glucosa se puede representar por la siguiente fórmula de Fischer (IX):



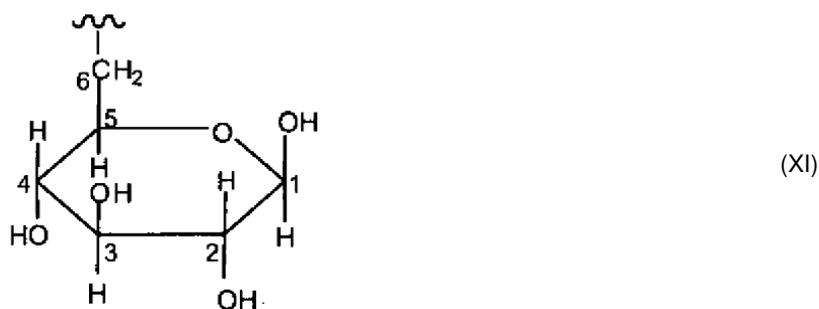
15 De forma alternativa, la glucosa se puede representar por la fórmula (X):



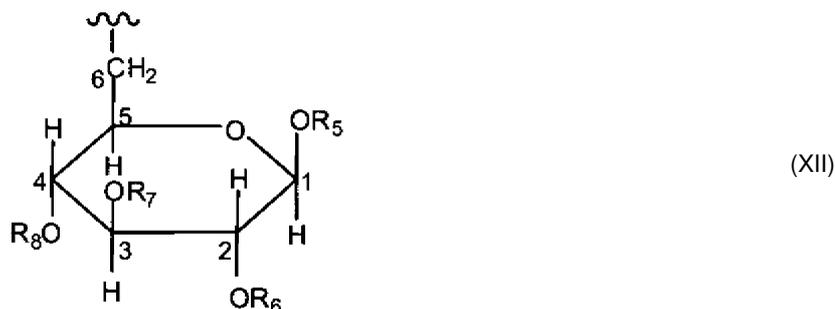
20 Por «radical glucosilo», se quiere decir un radical de fórmula C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>5</sub> derivado de glucosa por eliminación de uno de los grupos hidroxilo de la misma. El grupo hidroxilo eliminado se puede llevar por uno de los 5 átomos de carbono C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> o C<sub>6</sub> (la nomenclatura de los carbonos se refiere a la fórmula (X)).

Por «radical glucosilo sustituido», se quiere decir un radical glucosilo sustituido con uno o más grupos de sustitución seleccionados de un grupo alquilo, un grupo arilo, un grupo alcoxi, un halógeno, un ciano, un trifluorometilo o un nitro.

25 En un 1º modo de realización, el grupo hidroxilo eliminado es el del átomo de carbono C<sub>6</sub> y por tanto el radical glucosilo se puede representar por la siguiente fórmula (XI):



30 En este 1º modo de realización, un radical glucosilo sustituido se puede representar por la siguiente fórmula (XII):

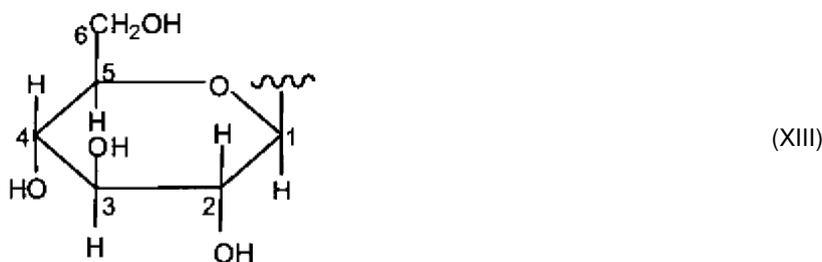


en la que los radicales  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  y  $R_8$ , idénticos o diferentes, representan un grupo de sustitución como se define previamente.

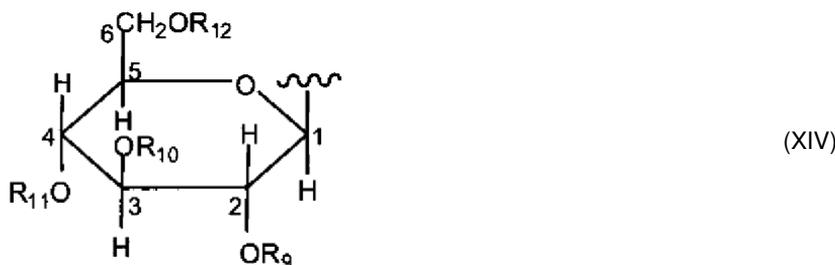
De forma ventajosa, los radicales  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  y  $R_8$  son grupos idénticos y de manera notable cada uno representa un grupo bencilo.

De forma alternativa, los radicales  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  y  $R_8$  representan cada uno un grupo seleccionado de un grupo alquilo tal como un grupo metilo o un grupo etilo y un grupo arilo tal como un grupo bencilo. En particular, el radical  $R_5$  es un grupo metilo y los radicales  $R_6$ ,  $R_7$  y  $R_8$  son grupos bencilo.

En un 2º modo de realización, el grupo hidroxilo eliminado es el del átomo de carbono  $C_1$  y por tanto el radical glucosilo se puede representar por la siguiente fórmula (XIII):



En este 2º modo de realización, un radical glucosilo sustituido se puede representar por la siguiente fórmula (XIV):



en la que los radicales  $R_9$ ,  $R_{10}$ ,  $R_{11}$  y  $R_{12}$ , idénticos o diferentes, representan un grupo de sustitución como se define previamente.

De forma ventajosa, los radicales  $R_9$ ,  $R_{10}$ ,  $R_{11}$  y  $R_{12}$  son grupos idénticos y de manera notable cada uno representa un grupo bencilo.

De forma alternativa, los radicales  $R_9$ ,  $R_{10}$ ,  $R_{11}$  y  $R_{12}$  representan cada uno un grupo seleccionado de un grupo alquilo tal como un grupo metilo o un grupo etilo y un grupo arilo tal como un grupo bencilo.

En la presente invención, los compuestos de fórmulas (I), (II), (II'), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIII) y (XIV) pueden presentar uno o más radioisótopos, de forma ventajosa elegidos de yodo-123, yodo-125, yodo-126, yodo-133, yodo-131, yodo-124, indio-111, indio-113m, bromo-77, bromo-76, galio-67, galio-68, rutenio-95, rutenio-97, tecnecio-99m, fluorine-19, flúor-18, carbono-13, carbono-11, nitrógeno-15, nitrógeno-13, oxígeno-17, oxígeno-15, oxígeno-14, escandio-47, telurio-122m, tulio-165, itrio-199, cobre-64, cobre-62, gadolidio-68 y rubidio-82.

De forma ventajosa, el método de preparación de un éster graso de creatina o derivado del mismo de acuerdo con la presente invención comprende las siguientes etapas sucesivas que consisten en:

a) hacer reaccionar creatinina con un agente protector para obtener una creatinina diprotegida, como se define antes;

b) hacer reaccionar la creatinina diprotegida obtenida en la etapa (a) con una molécula que lleva al menos un grupo funcional alcohol y de fórmula (I) como se define antes para obtener un éster graso de creatina diprotegido; y

c) desproteger el éster graso de creatina o derivado del mismo diprotegido obtenido en la etapa (b), para obtener dicho éster graso de creatina o derivado del mismo como se define antes.

La etapa (a) del método de preparación de acuerdo con la presente invención consiste en proteger el grupo guanidina de la creatinina.

Esta protección se puede llevar a cabo por cualquier método de protección conocido por un experto en la técnica. Este último sabrá, en función de los grupos protectores que deben introducirse en la creatinina, cómo elegir el agente protector y las condiciones experimentales más apropiadas.

5 Como ya se ha explicado, los grupos que protegen el grupo guanidina de la creatinina son de forma ventajosa de fórmula (VI). En estas condiciones, la etapa (a) consiste en poner en contacto la creatinina con un agente protector que puede producir un grupo protector como se define previamente, para obtener una creatinina diprottegida. De forma ventajosa, dicho agente protector es de fórmula (XV):

10



en la que el radical  $R_4$  representa un grupo hidrocarburo, como se define previamente.

15 La etapa (a) se puede llevar a cabo por cualquier método de protección conocido por un experto en la técnica. Este último sabrá, en función del agente protector que se emplea, cómo elegir el método de protección más apropiado.

20 Por ejemplo, cuando dicho agente protector es de fórmula (XV), el disolvente en la solución que contiene creatinina y este agente protector es típicamente diclorometano (DCM) y de manera notable DCM anhidro. Esta solución también puede contener cualquier compuesto químico que puede facilitar la formación de creatinina diprottegida. Por ejemplo, dicho compuesto químico facilitador puede ser la base de Hünig o N,N-diisopropiletilamina (DIEPA). Para un equivalente de creatinina, la solución implementada puede contener entre 1,5 y 7 equivalentes y de manera notable entre 2 y 4 equivalentes de agente protector. De forma similar, para un equivalente de creatinina, la solución implementada puede contener entre 1,5 y 7 equivalentes y de manera notable entre 2 y 4 equivalentes de DIEPA. De forma ventajosa, la cantidad de agente protector y de DIEPA expresados en equivalentes es idéntica en la solución implementada.

25 La etapa (a) se puede realizar en atmósfera inerte y, por ejemplo, en nitrógeno.

30 La solución implementada durante la etapa (a) del método de acuerdo con la presente invención se puede someter a agitación para que la creatinina y el agente protector reaccionen conjuntamente. Cualquier técnica mecánica que permita la agitación se puede usar para este propósito. Como ejemplos de dichas técnicas, se pueden mencionar agitación manual, tratamiento con ultrasonidos, agitación mecánica o una combinación de dichas técnicas. Estas técnicas pueden requerir el uso de un agitador magnético y de una barra imantada o un baño ultrasónico o de un agitador mecánico con varillas, paletas, hélices, etc. Esta agitación puede durar durante de 1 min a 1 h, de manera notable de 15 a 45 min a una temperatura comprendida entre 0 y 10 °C, de manera notable entre 2 y 6 °C y continuar entre 6 y 18 h, de manera notable entre 10 y 15 h a una temperatura comprendida entre 8 y 40 °C, de manera notable 12 y 30 °C y, particularmente, a temperatura ambiente (TA) (es decir, 20 °C ± 4 °C).

40 La creatinina diprottegida obtenida después de la etapa (a) se purifica fácilmente. De hecho, una vez que se logra la etapa (a) del método de acuerdo con la presente invención, la creatinina diprottegida así obtenida se puede purificar antes de la etapa (b) por cualquier técnica de purificación conocida por un experto en la técnica. A modo de ejemplos no limitantes, se pueden mencionar la cromatografía, cromatografía ultrarrápida, cromatografía ultrarrápida en gel de sílice y de manera notable en gel de sílice con gradiente de heptano/acetato de etilo, una HPLC semipreparativa, etc.

45 En el método de la presente invención, la etapa (b) consiste en producir un éster graso de creatina diprottegido, lo que se realiza haciendo reaccionar la creatinina diprottegida con la molécula que lleva al menos un grupo funcional alcohol y de fórmula (I) como se define antes. La reacción consiste en una adición nucleófila de la molécula de fórmula (I) en la creatinina diprottegida.

50 En un modo de realización en particular, la solución de disolvente implementada durante la etapa (b) es la molécula que lleva al menos un grupo funcional alcohol y de fórmula (I). Se puede decir que la etapa (b) se realiza sin disolvente, lo que quiere decir sin ningún otro disolvente distinto de la molécula que lleva al menos un grupo funcional alcohol y de fórmula (I).

55 De forma alternativa, se puede añadir un disolvente adicional a la solución que contiene la creatinina diprottegida y la molécula que lleva al menos un grupo funcional alcohol y de fórmula (I). Como ejemplo de disolvente adicional utilizable, se puede citar el tolueno.

60 En la solución implementada en la etapa (b), para un equivalente de creatinina diprottegida, la cantidad de molécula que lleva al menos un grupo funcional alcohol y de fórmula (I) expresada en equivalente está comprendida entre 1 y 15, de manera notable entre 1 y 10. La tabla 5 a continuación en el presente documento presenta diferentes moléculas que llevan al menos un grupo funcional alcohol y de fórmula (I) y la cantidad de las mismas usada en la etapa (b) de la presente invención.

La etapa (b) se lleva a cabo durante de 1 a 20 h, de manera notable durante de 2 a 16 h, y particularmente, durante de 2 a 10 h. Típicamente, se puede llevar a cabo durante aproximadamente 3 h (es decir, 3 h ± 30 min), aproximadamente 4 h (es decir, 4 h ± 30 min), aproximadamente 5 h (es decir, 5 h ± 30 min) o aproximadamente 6 h (es decir, 6 h ± 1 h). Esta etapa (b) se lleva a cabo a presión atmosférica y a una temperatura comprendida entre 60 y 100 °C, de manera notable 70 y 90 °C y, particularmente, a alrededor de 80 °C (es decir, 80 °C ± 5 °C).

Una vez que se logra la etapa (b) del método de acuerdo con la presente invención, el éster de creatinina diprotegido así obtenida se puede purificar antes de la etapa (c) por cualquier técnica de purificación conocida por un experto en la técnica. A modo de ejemplos no limitantes, se pueden mencionar la cromatografía, cromatografía ultrarrápida, cromatografía ultrarrápida en gel de sílice y de manera notable en gel de sílice con gradiente de heptano/acetato de etilo, una HPLC semipreparativa, etc.

La estructura y pureza del éster graso de creatina diprotegido se determina después de la purificación en gel de sílice por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL/EM), cromatografía en capa fina (TLC), resonancia magnética nuclear (RMN) y, en particular, RMN de <sup>1</sup>H y RMN de <sup>13</sup>C, espectroscopía de infrarrojo (espectroscopía IR) y/o determinación del punto de fusión.

La etapa de desprotección (c) se lleva a cabo pasando del éster graso de creatina diprotegido obtenido en la etapa (b) al éster graso de creatina de fórmula (III) o al éster graso de creatina derivado de fórmula (IV) o (V).

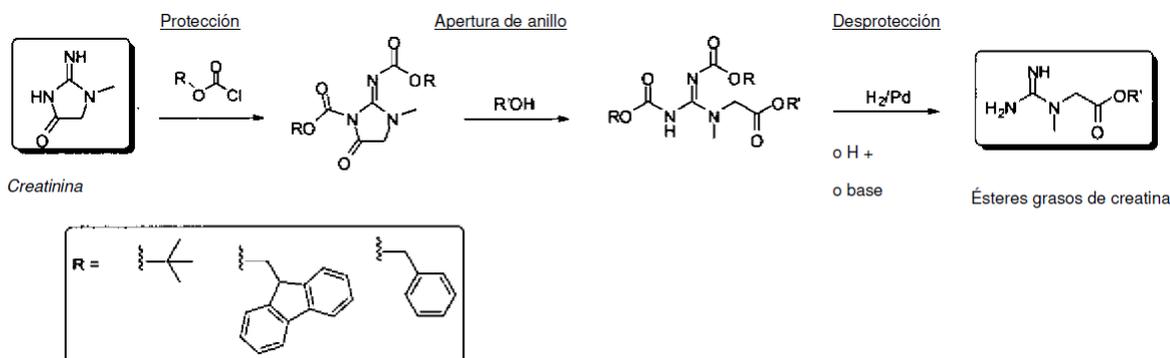
La eliminación de los grupos protectores de las funciones amina del éster graso de creatina diprotegido, es decir, la desprotección, se puede llevar a cabo por cualquier método de desprotección conocido por un experto en la técnica. Este último sabrá, en función de los grupos protectores que se emplean, cómo elegir el método de desprotección más apropiado.

De forma ventajosa, cuando el grupo protector es un compuesto de fórmula (VII), la etapa (c) se logra por hidrógeno en presencia de paladio soportado sobre alúmina o carbón vegetal. Esta reacción se lleva a cabo en un disolvente de forma ventajosa seleccionado de dicloroetano (DCE), diclorometano (DCM), acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) o una mezcla de DCM y un alcohol inferior. Por "alcohol inferior" se quiere decir en el contexto de la presente invención un alcohol alifático que tiene de 1 a 3 átomos de carbono, tal como metanol, etanol y propanol. Más en particular, la mezcla de DCM/alcohol inferior usada como disolvente en la etapa de desprotección (c) es una mezcla de DCM/metanol.

Esta etapa de desprotección (c) se lleva a cabo durante de 1 a 6 h, de manera notable durante de 2 a 4 h y, particularmente, durante aproximadamente 3 h (es decir, 3 h ± 30 min). Esta etapa de desprotección (c) también se lleva a cabo a presión atmosférica y a una temperatura comprendida entre 8 y 40 °C, de manera notable 12 y 30 °C y, particularmente, a temperatura ambiente (TA) (es decir, 20 °C ± 4 °C).

En un modo de realización particular, la etapa de desprotección (c) se puede repetir al menos una vez, en condiciones idénticas a o diferentes de la 1ª etapa de desprotección. Una repetición de este tipo puede ser necesaria si se obtiene un éster graso de creatina monoprotegido después de implementar la 1ª etapa (c).

Las reacciones químicas llevadas a cabo para preparar los ésteres de creatina de acuerdo con los modos de realización particulares de la presente invención se representan en el esquema 1.



La presente invención también se refiere a compuestos que se pueden preparar por un método de acuerdo con la presente invención y, más en particular, por un método en el que el alcohol de fórmula R'-OH es glucosa o glucosa sustituida.

En otras palabras, el compuesto de acuerdo con la presente invención es un compuesto de fórmula (III), (IV) o (V):



5 o



en la que:

- 10 - los radicales  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$ , idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un grupo de ácido carboxílico y al menos uno de entre los radicales  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  es un grupo de ácido carboxílico,  
 - el radical  $R'$  es un radical glucosilo opcionalmente sustituido,  
 15 o una sal del mismo.

Todos los diferentes modos de realización divulgados para los radicales  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R'$  se aplican al compuesto de acuerdo con la presente invención.

- 20 En el contexto de la invención, "sal" se refiere a sales de adición de ácido y sales de adición de base. Dichas sales se pueden formar por medios convencionales, por ejemplo, por reacción de una forma de ácido libre o una forma de base libre de un compuesto de la invención con uno o varios equivalentes de un ácido o base apropiado, opcionalmente en un disolvente, o en un medio en el que la sal sea insoluble, extrayendo a continuación dicho disolvente, o dicho medio, usando técnicas convencionales (por ejemplo, a vacío o por liofilización). Las sales  
 25 también se pueden preparar reemplazando un contraión de un compuesto de la invención en forma de una sal con otro contraión, por ejemplo, usando una resina de intercambio iónico apropiada.

En especial con el propósito de administrarse a un cuerpo humano o animal, las sales de los compuestos de acuerdo con la invención son ventajosamente sales farmacéuticamente aceptables.

- 30 En particular, cuando los compuestos de acuerdo con la invención están en forma de una sal, siendo esta última una sal de metal alcalino, en particular sal de sodio o potasio, o sal de metal alcalinotérreo, en particular magnesio o calcio, o incluso una sal con una amida orgánica, más particularmente con un aminoácido tal como arginina o lisina.

- 35 Cuando los compuestos de acuerdo con la invención que tienen una función amina están en forma de una sal de esta amina, la sal es una sal de ácido inorgánico tal como, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, o ácido bromhídrico, o en forma de una sal orgánica, tal como, por ejemplo, ácido acético, ácido fórmico, ácido tríflico, ácido tartárico, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido trifluoroacético, o ácido metanosulfónico.

- 40 Adicionalmente, la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos un compuesto de acuerdo con la invención tal como se divulga previamente, en un vehículo aceptable. El vehículo dependerá del uso de la composición y el experto en la técnica será capaz de elegir el vehículo más apropiado sin esfuerzo inventivo.

- 45 Como ya se ha explicado, la creatina se puede usar como complemento para reforzar el organismo, incrementar la masa muscular y potenciar el rendimiento muscular. De hecho, el aporte complementario de creatina puede dar como resultado un efecto fisiológico positivo sobre los músculos tales como, por ejemplo, músculos esqueléticos o cardíacos. Como consecuencia, la composición de acuerdo con la presente invención puede ser aditivo alimenticio o un complemento nutricional. La composición de acuerdo con la presente invención puede ser útil para animales o para seres humanos tales como, por ejemplo, deportistas, ancianos, niños, adolescentes o personas vegetarianas.

- 50 Información adicional sobre dicho uso se puede encontrar en [10-11].

- La presente invención se refiere adicionalmente a una composición farmacéutica, de diagnóstico o para técnicas de imagen que comprende al menos un compuesto de acuerdo con la invención tal como se ha divulgado previamente,  
 55 en un vehículo farmacéutico aceptable.

En el contexto de la presente invención, "vehículo farmacéutico aceptable" se refiere a uno o varios aditivos, excipientes, tampones, espesantes y/o agentes auxiliares farmacéuticos convencionales conocidos por un experto en la técnica.

- 60 Los ésteres grasos de creatina y derivados de los mismos de acuerdo con la presente invención proporcionan un

nuevo remedio para el tratamiento de la enfermedad del transportador con carencia de creatina en el cerebro. Además, algunas otras patologías se pueden explorar en vista de estos resultados preliminares prometedores.

5 También se divulga el uso de dichos derivados que pueden cruzar la BHE *in vitro* e *in vivo* sin la implicación del transportador de vehículo grande en el soluto (Solute Large Carrier Transporter, SLC6A8). De modo que la creatina normalmente excluida por la BHE en pacientes con transportador con carencia de creatina se puede producir después de la escisión de los ésteres grasos de creatina dentro de las células endoteliales cerebrales y liberarse en el parénquima cerebral. También se divulga la vectorización potencial de los ésteres grasos de creatina que son potencialmente utilizables *in vivo*.

10 Por tanto, los compuestos y composiciones de acuerdo con la presente invención se pueden usar en medicina y de manera notable en medicina terapéutica, en diagnóstico médico y en técnicas de imagen médicas tales como tomografía de emisión de positrones (TEP). En efecto, el hecho de que parte de la creatina y/o parte del éster graso del éster graso de creatina o del derivado del mismo pueda presentar radioisótopo(s) como se ha divulgado previamente puede ser útil en el diagnóstico y las técnicas de imagen. Por ejemplo, el radical glucosilo presente en el compuesto de acuerdo con la presente invención puede estar sustituido al menos con un radioisótopo tal como  $^{18}\text{F}$  para su uso en técnicas de imagen médicas y más en particular en TEP.

15 Los compuestos y composiciones médicas de acuerdo con la presente invención se pueden usar para el tratamiento o la prevención de al menos una enfermedad, trastorno o afección seleccionado del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, un trastorno neuromuscular, hipoxia, una encefalopatía isquémica tal como apoplejía, una cardiopatía, una distrofia muscular, un trastorno cutáneo e inflamación.

20 Los compuestos y composiciones médicas de acuerdo con la presente invención se pueden usar para el tratamiento de la enfermedad del transportador con carencia de creatina en el cerebro.

25 En otras palabras, también se divulga un método para tratar o prevenir al menos una enfermedad, trastorno o afección seleccionado del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, un trastorno neuromuscular, hipoxia, una encefalopatía isquémica tal como apoplejía, una cardiopatía, una distrofia muscular, un trastorno cutáneo e inflamación, que consiste en administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéutica de un compuesto de acuerdo con la invención o de una composición de acuerdo con la invención.

30 También se divulga un método para tratar la enfermedad del transportador con carencia de creatina en el cerebro, que consiste en administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéutica de un compuesto de acuerdo con la invención o de una composición de acuerdo con la invención.

35 Información adicional sobre dichos métodos de tratamiento se puede encontrar en [1-4].

40 Otras características y ventajas de la presente invención serán adicionalmente evidentes para el experto en la técnica al leer los ejemplos a continuación, que se dan como ilustración y no como limitación, con referencia a las figuras adjuntas.

#### Breve descripción de los dibujos

45 La figura 1 presenta la translocación del éster graso de creatina C18 a través de la BHE.

La figura 2 presenta la conversión de C18 en creatina.

50 La figura 3 presenta la translocación del éster graso de creatina C2 a través de la BHE.

#### Análisis detallado de modos de realización particulares

55 Se adquieren todos los reactivos de Aldrich (Steinheim, Alemania). Se realizó una TLC en placas F 254 de Merck usando un sistema de disolventes especificado. Se realizó una CL/EM analítica y preparativa en el sistema Waters Autopurify System (SCBM). Se realizó una evaluación biológica de las dianas en yyy (SPI). Se registraron los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  a 400 MHz en un espectrómetro Bruker.

### I. RESULTADOS PRELIMINARES COMPARATIVOS

#### 60 1.1. Síntesis directa de ésteres a partir de creatina

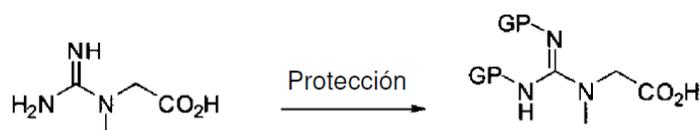
Los inventores trataron de preparar el éster estearoilico de creatina usando los métodos divulgados en [7-8]. Los resultados se presentan en la tabla 1:

65 Tabla 1

Sustrato (1 mM)	Reactivos	Condiciones	Rendimiento
Creatina, hidrato	Alcohol estearílico 10 eq SOCl <sub>2</sub> 3 eq	40°C, durante la noche	0 %
Creatina, hidrato	KOH Alcohol estearílico 10 eq SOCl <sub>2</sub> 3 eq	Producción de cloruro de acilo <i>in situ</i> Sal potásica de creatina Reflujo 1h	0 %
Creatina anhidra	Alcohol estearílico 10 eq SOCl <sub>2</sub> 3 eq	Tubo sellado 80°C 6h	0,1 % Purificado por CL/EM
Creatina anhidra	Alcohol estearílico 10 eq SOCl <sub>2</sub> 3 eq	Microondas 160°C 20min	0 % Producción de creatina, cloruro de acilo
Creatina anhidra	Alcohol estearílico 10 eq CH <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> H 3 eq	130°C 2h30	0 %
Creatina anhidra	Etanol, SOCl <sub>2</sub>	Reflujo 60°C 1h TA 72h	50 % cristalizado

### 1.2. Protección de creatina

5 Los inventores intentaron preparar ésteres grasos de creatina usando creatina protegida. Se desarrollaron dos grupos protectores (GP) sobre creatina (véase la tabla 2) de acuerdo con [12-13] (véase el esquema 2).



*Creatina*

Esquema 2: Protección de creatina

Tabla 2: protección de creatina

Reactivo protector	Esteq.	Condiciones (TA)	Base	Esteq.	Rendimiento
FmocCl	3 eq	DCM	DIEPA	3 eq	5 %
FmocCl	1 eq	DCM	TMSCI/DIEPA	4 eq/3 eq	11 %
Z <sub>2</sub> O	4 eq	Dioxano/agua	NaOH	1 eq	0 %
ZCl	3 eq	DCM	DIEPA	3 eq	33 %

10 Con creatina, solo se produjo el derivado monoprotegido. Desafortunadamente, este compuesto no era reactivo para la siguiente etapa de la síntesis. Además, los inventores aislaron un nuevo compuesto no útil obtenido por la adición del cloroacetilo en el metileno.

15 Además, la síntesis con el grupo FMOC dio lugar a la creatinina diprotegida después de la autociclación en el medio de reacción.

### 1.3. Síntesis de ésteres a partir de la creatina monoprotegida

20 Los protocolos y rendimientos se resumen en la tabla 3.

Tabla 3

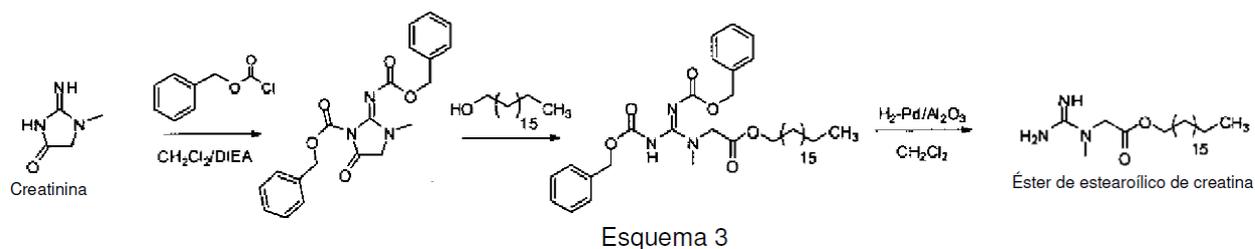
Sustrato	Reactivos	Rendimiento
(Z)creatina	DMF/DCC/DMAP	0 %
(Z)creatina	THF/TEA/cloruro de triclorobenzoílo	0 %
(Z)creatina	Alcohol estearílico/4-pirrolidinopiridina	1,3 %
(Z)creatina-TriCl benzoílo	Producción <i>in situ</i> alcohol estearílico/NaH/THF	0 %

25 Incluso con la activación de la función de ácido de la creatina por cloruro de triclorobenzoílo en la creatina protegida, solo se obtuvieron rendimientos muy bajos.

## II. SÍNTESIS DE ÉSTER ESTEAROÍLICO DE CREATINA DE ACUERDO CON LA PRESENTE INVENCION

### II.1. Procedimiento general

5 Esta síntesis se lleva a cabo abriendo el anillo de creatinina diprotégida, (Z<sub>2</sub>)-creatinina, por alcohol estearoílico seguido de desprotección en hidrógeno/Pd. A continuación en el presente documento, el esquema 3 muestra las secuencias de síntesis de la preparación del éster estearoílico de creatina:



#### A. (Z<sub>2</sub>)-creatinina

15 Se añadió cloruro de benzoilo (4,2 ml - 3 eq) a una solución de diisopropiletilamina (5,2 ml - 3 eq) con creatinina (1,124 g - 1 eq) en 100 ml de diclorometano anhidro en nitrógeno. Se añade gota a gota el cloruro de benzoilo en un baño de hielo. Se deja que la mezcla reaccione con agitación 30 min en el baño de hielo y durante la noche a temperatura ambiente.

20 Se controla la reacción por CCM (sílice, heptano/acetato de etilo) y CL/EM. Se extrae el medio de reacción por adición de diclorometano y agua. Se lava la fase de diclorometano 3 veces con agua y se seca por sulfato de magnesio.

25 Se concentra la solución de diclorometano por evaporación a vacío y se deja que cristalice. Se obtienen 3,25 g de (Z<sub>2</sub>)-creatinina en bruto (87 %). Se puede purificar la (Z<sub>2</sub>)-creatinina en gel de sílice (gradiente de heptano/acetato de etilo) para la determinación de la estructura. Se usa el producto en bruto para realizar la etapa de esterificación.

#### B. Éster estearoílico de (Z<sub>2</sub>)-creatinina

30 Se dejó que el alcohol estearoílico (0,5 g - 2 eq) reaccionara con 1 eq de (Z<sub>2</sub>)-creatinina en bruto en un tubo calentado a 80 °C durante 5 h. Se realiza un seguimiento de la reacción por (sílice, heptano/acetato de etilo) y CL/EM.

35 Se purifica el éster estearoílico de (Z<sub>2</sub>)-creatinina en bruto en gel de sílice (gradiente de heptano/acetato de etilo) para proporcionar 286 mg de éster estearoílico de (Z<sub>2</sub>)-creatinina puro con un rendimiento de un 50 %.

#### C. Éster estearoílico de creatina

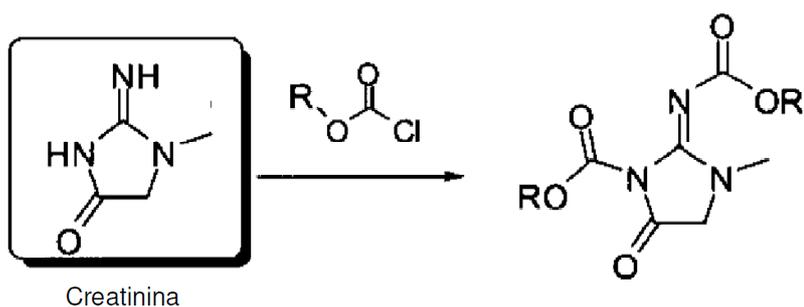
40 Se disuelve el éster estearoílico de (Z<sub>2</sub>)-creatinina puro (140 mg) en solución de diclorometano anhidro/metanol (6 ml/12 ml) en nitrógeno. Se añade Pd/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> al 5 % (20 mg). Se desgasifica la mezcla de reacción a vacío, se congela para la purga y se rompe el vacío por hidrógeno. Se realiza la purga con hidrógeno tres veces. A continuación, se deja que el medio reaccione hasta alcanzar la temperatura ambiente y reacciona con agitación enérgica.

45 Se realiza un seguimiento de la reacción por CCM (sílice, heptano/acetato de etilo) y CL/EM. Cuando se completa la reacción, en general después de 3 h, la filtración en un filtro de 0,5 µm da una solución de éster estearoílico de creatina.

Se evapora el éster estearoílico de creatina a vacío para proporcionar 75 mg (rendimiento cuantitativo).

### II.2. Variantes del método de acuerdo con la presente invención

#### A. Protección de creatinina



Esquema 4: protección de creatinina

Tabla 4

Reactivo protector	Esteq.	Condiciones	Base	Esteq.	Rendimiento
BOC <sub>2</sub> O	5 eq	TA, Dioxano/agua	NaOH	1 eq	0,6 %
BOC <sub>2</sub> O	6 eq	TA, DCM	DIEPA	6 eq	43 %
FmocCl	1,5 eq	TA, DCM	DIEPA	1,5 eq	28 %
ZCl	3 eq	TA, DCM	DIEPA	3 eq	87 %

- 5 Se sometieron a prueba diferentes reactivos protectores para preparar la creatinina protegida. Los resultados se presentan en la tabla 4.

La reacción de creatinina con BOC<sub>2</sub>O presentó un rendimiento muy bajo en condiciones acuosas y la reacción BOC<sub>2</sub>O en condiciones anhidras dio lugar a un compuesto nuevo e inútil con 3 funciones Boc por adición del grupo Boc en el metileno con un rendimiento aislado de un 43 %.

Afortunadamente, la reacción con el cloroformiato de benzoilo (ZCl) proporcionó un 87 % de creatinina diprotegida usada como producto "en bruto" después de la cristalización en hexano.

#### 15 B. Adición nucleófila de alcoholes en la creatinina diprotegida

Se sometieron a prueba diferentes moléculas que llevaban un grupo alcohol para determinar la adición nucleófila sobre la creatinina diprotegida. Los resultados se presentan en la tabla 5.

20 Tabla 5

R'	Esteq.	Condiciones	Rendimiento
C1	como disolvente	TA 2 h	92 %
C2	como disolvente	80 °C 4 h	72 %
iPrOH	4 eq	80 °C 4 h	5,5 %
C4	10 eq	60 °C 4 h	60 %
C8	4 eq	80 °C 4 h	40 %
Octanol-2	4 eq	80 °C 4 h	5 %
C9	8 eq	80 °C 5 h	25 %
C12	8 eq	80 °C 7 h	47 %
C16	6 eq	80 °C 7 h	55 %
C18	1,5 eq	80 °C 16 h	25 %
C18 rad	10 eq	80 °C 5 h	28 % (HPLC)
C18 ins	4 eq	80 °C 5 h	20 %
Glucosa	1 eq	80 °C 3 h 30	0,5 %
Z3,OMe Glu C6-OH	3,25 eq	80 °C 5 h	21 %

En la tabla 5, "C18 rad" quiere decir compuesto marcado en <sup>14</sup>C, "C18 ins" una cadena alifática C18 que presenta insaturación/insaturaciones y "Z3,OMe Glu C6-OH" quiere decir una glucosa en la que 3 de los 4 grupos alcohol llevados por los átomos de carbono 1, 2, 3 y 4 están protegidos, mientras que el grupo alcohol llevado por el átomo de carbono 6 está libre y reacciona durante la etapa de apertura de anillo en el método de acuerdo con la presente invención.

La adición nucleófila de alcoholes se produce de forma espontánea en metanol a temperatura ambiente usando el alcohol como disolvente. El producto diprotegido en bruto mostró una reactividad mejor probablemente debido a que la impureza ácida cataliza la adición.

Se incrementa la longitud de la cadena alifática necesaria para reaccionar calentando hasta 80 °C. El tiempo de reacción fue de aproximadamente 3 h. El incremento del tiempo de reacción puede degradar el compuesto deseado para proporcionar compuestos secundarios como compuestos obtenidos por la desprotección de un grupo protector y la transesterificación por alcohol en exceso.

Finalmente, los inventores obtuvieron rendimientos de un 45 % para la adición de alcoholes alifáticos con longitud de cadena comprendida entre 8 y 18 carbonos.

*C. Desprotección de ésteres grasos de (Z<sub>2</sub>)-creatina*

La desprotección de los grupos Z da lugar a la recuperación de la función guanidina, bien conocida por su carácter muy polar.

Se prefirió paladio sobre albúmina a paladio sobre carbón vegetal debido a que la recuperación del producto deseado necesita etapas de lavado del catalizador con menos cantidades de metanol.

Se obtuvo sistemáticamente creatinina como subproducto debido a la propensión a la ciclación de estos derivados. Se elimina fácilmente la creatinina en columna de fase inversa. La desprotección de la cadena alifática corta no fue exitosa debido a que se completó la formación de creatinina por autociclación y no se pudo obtener éster de creatina.

Los resultados sobre la desprotección se presentan en la tabla 6.

Tabla 6

R'	Reactivos	Condiciones	Rendimiento
C1	TMSI, CH <sub>3</sub> CN	50 °C, 30 min 40 mg/ml	Cuantitativo, rendimiento HPLC
C1	MeOH Pd/C 5 %	PA, 1 h TA 40 mg/ml	0 % (creatinina)
C1	DCE Pd/C 5 %	PA, 4 h TA 40 mg/ml	0 % (creatinina)
C4	DCM Pd/C 5 %	PA, 4 h TA 20 mg/ml	7 % (aislado por CL/EM)
C8	CH <sub>3</sub> CN Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5 %	PA, 4 h TA 1 mg/ml	0 % (mono)
C8	DCM/MeOH (1/1) Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5 %	PA, 3 h TA 10 mg/ml	100 % (+44)
C8	ACN/MeOH (1/1) Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5 %	PA, 4 h TA 10 mg/ml	13 %
C9	DCE Pd/C 5 %	PA, 3 h TA 10 mg/ml	50 %
C12	CH <sub>3</sub> CN Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5 %	PA, 4 h TA 1 mg/ml	0 % (mono)
C12	DCM/MeOH (1/4) Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5 %	PA, 4 h TA 10 mg/ml	100 % (+44)
C12	DCM/MeOH (1/2) Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5 %	PA, 4 h TA 10 mg/ml	100 % (+44)
C16	CH <sub>3</sub> CN Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5 %	PA, 3 h TA 4 mg/ml	0 % (mono)
C16	DCM/MeOH (1/1) Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5 %	PA, TA 10 mg/ml	100 %
C18	DCM/MeOH (1/2) Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5 %	PA, 3 h TA 8 mg/ml	90 %
C18 rad	DCM/MeOH (1/1) Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5 %	PA, 3 h TA 2 mg/ml	65 %
C18 ins	DCE Pd/C 5 %	PA, 2 h TA 20 mg/ml	0 % (análogo saturado)
Glucosa	DCM/MeOH (1/1) Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5 %	PA, 3 h TA 3 mg/ml	Disponibile pic molecular

Dependiendo del disolvente usado y de la proporción de DCM/metanol o acetonitrilo, los inventores produjeron la

forma carbonatada del éster graso de creatina (+44) aislado por cromatografía preparativa CL/EM.

La desprotección de compuestos insaturados (C18 ins) dio los análogos saturados. Se debe usar el método con TMSI/CH<sub>3</sub>CN para estos compuestos.

5 En la tabla 6, "0 % (mono)" quiere decir que se obtuvo el éster graso de creatina monoprotegido y que fue necesaria la etapa de desprotección adicional para preparar la forma desprotegida.

10 Finalmente, los compuestos preparados eran poco o nada solubles en agua o medio biológico y poco o nada estables en solución orgánica. Tuvieron que conservarse en una forma sólida y proceder con el protocolo biológico justo antes de su uso.

15 Este es el motivo por el que los inventores decidieron desarrollar más ésteres hidrófilos por reacción con glucosa protegida. En dichos compuestos, el resto de glucosa actúa como ligando para favorecer el transporte de los derivados de creatina en particular a través de la BHE.

### III. TRANSLOCACIÓN DE ÉSTERES GRASOS DE CREATINA A TRAVÉS DEL MODELO DE BHE BASADO EN CÉLULAS *IN VITRO*

20 El modelo de BHE basado en células *in vitro* que se usa para evaluar la permeabilidad de ésteres grasos consiste en un cultivo conjunto de células gliales y células endoteliales cerebrales.

25 Se añade un tampón de transporte (NaCl 150 mM, KCl 5,2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 6 mM, glucosa 2,8 mM y Hepes 5 mM): 1500 µl a la cámara basolateral (que representa el parénquima cerebral) y 500 µl a la cámara apical (que representa la sangre).

30 Se introducen los ésteres grasos en el compartimento apical. Después de 60 min, se retiran alícuotas de las cámaras apical y basolateral para la determinación de la concentración del fármaco. Se calcula el porcentaje de fármaco de la dosificación inicial que cruzó la BHE como sigue:  $P (\%) = [(Bf \times 1500)/(A0 \times 500)] \times 100$  donde Bf es la cantidad de compuestos sometidos a prueba en el compartimento basolateral en el punto final. A0 es la cantidad inicial en el compartimento apical en el punto temporal 0.

35 Después de 60 min de incubación con ésteres grasos de creatina, los inventores notaron que los ésteres grasos C18 pero no los C2 presentaron una buena permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica.

40 De hecho, en el caso de éster graso de creatina C18, el nivel intracelular de éster estearoilico de creatina se incrementó dentro de las células endoteliales cerebrales después de la incubación de las células con este compuesto (figura 1). De manera notable, este tremendo incremento en el éster estearoilico de creatina coincidió sorprendentemente con la aparición de un contenido de creatina (aproximadamente 700 nM) dentro de las células endoteliales cerebrales así como en el compartimento basal (aproximadamente 31 nM) (figura 2), lo que sugiere la interacción potencial de la creatina proporcionada con las células (por ejemplo, células neuronales) del parénquima cerebral.

45 En el caso del éster graso de creatina C2, los inventores no encontraron translocación de este compuesto dentro de las células endoteliales cerebrales o en el compartimento basal del modelo de barrera hematoencefálica basado en células *in vitro*. Los inventores no encontraron pruebas de la aparición de contenido de creatina dentro de las células o en el compartimento del parénquima cerebral (figura 3).

50 Tomados conjuntamente, los presentes hallazgos informan por primera vez de translocación diferencial en toda la BHE entre ésteres grasos de creatina. En resumen, los inventores aportan las primeras pruebas de la utilidad de la estrategia molecular de diseño para conseguir creatina dentro de las células endoteliales cerebrales el compartimento del parénquima cerebral después de la administración de ésteres grasos de creatina. Por tanto, los ésteres grasos de creatina pueden representar los candidatos prometedores para el desarrollo de nuevos fármacos útiles en el tratamiento del transportador con carencia de creatina.

### 55 **Referencias**

60 [1] Solicitud internacional WO 02/22135 en nombre de Board of Regents of the University of Nebraska y publicada el 21 de marzo de 2002.

[2] Solicitud de patente US 2002/0049253 en nombre de Kaddurah-Daouk y publicada el 25 de abril de 2002.

[3] Solicitud de patente US 2003/0212130 en nombre de Miller *et al.* y publicada el 13 de noviembre de 2003.

65 [4] Patente US 6.413.552 en nombre de Stoll y publicada el 2 de julio de 2002.

- [5] Artículo de Edgar y Shiver, 1925, "The equilibrium between creatine and creatinine in aqueous solution. The effects of hydrogen ion", J. Amer. Chem. Soc., vol. 47, páginas 1179-1188.
- 5 [6] Solicitud de patente CN 1616420 en nombre de XinMao Dacron Chemical General y publicada el 18 de mayo de 2005.
- [7] Solicitud de patente US 2005/0049428 en nombre de Vennerstrom y publicada el 3 de marzo de 2005.
- 10 [8] Solicitud de patente CN 1900056 en nombre de Tiangcheng Pharmaceutical Co. Lt. y publicada el 24 de enero de 2007.
- [9] Solicitud internacional WO 2008/101309 en nombre de Multi Formulations Ltd. y publicada el 28 de agosto de 2008.
- 15 [10] Solicitud de patente US 2011/0269986 en nombre de Burov *et al.* y publicada el 3 de noviembre de 2011.
- [11] Solicitud de patente US 2008/0200705 en nombre de Chaudhuri *et al.* y publicada el jueves, 21 de agosto de 2008.
- 20 [12] Artículo de Gers *et al.*, 2004, "Reagents for efficient conversion of amines to protected guanidines", Synthesis, vol. 2004, páginas 37-42.
- [13] Artículo de Robles *et al.*, 1999, "Towards nucleopeptides containing any trifunctional amino acid", Tetrahedron, vol. 55, páginas 13251-13261.

## REIVINDICACIONES

1. Método para preparar un éster graso de creatina o derivado del mismo que comprende al menos una etapa que consiste en hacer reaccionar una creatinina diprotegida con una molécula que lleva al menos un grupo funcional alcohol y de fórmula (I):



en la que R' representa un radical hidrocarburo que contiene al menos 4 átomos de carbono elegido del grupo que consiste en un radical alquilo con 4 a 30 átomos de carbono, un radical alqueno con 4 a 30 átomos de carbono, un radical arilo con 6 a 30 átomos de carbono y un radical glucosilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos de sustitución seleccionados de un grupo alquilo, un grupo arilo, un grupo alcoxi, un halógeno, un ciano, un trifluorometilo o un nitro;

en el que un derivado de éster graso de creatina es un éster graso de creatina en el que al menos uno de los átomos de hidrógeno del grupo metilguanidinilo está sustituido con un grupo de ácido carboxílico (-COOH).

2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el radical R' se representa por la siguiente fórmula (VIII):



en la que R'<sub>1</sub> es un radical hidrocarburo que contiene al menos 3 átomos de carbono.

3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho método comprende las siguientes etapas sucesivas que consisten en:

a) hacer reaccionar creatinina con un agente protector para obtener una creatinina diprotegida;

b) hacer reaccionar la creatinina diprotegida obtenida en la etapa (a) con una molécula que lleva al menos un grupo funcional alcohol y de fórmula (I) para obtener un éster graso de creatina diprotegido; y

c) desproteger el éster graso de creatina o derivado del mismo diprotegido obtenido en la etapa (b), para obtener dicho éster graso de creatina o derivado del mismo.

4. Método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho agente protector es de la fórmula (XII):



en la que el radical R<sub>4</sub> representa un grupo hidrocarburo.

5. Método de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que el disolvente en la solución que contiene creatinina y el agente protector implementado en la etapa (a) es diclorometano (DCM) y de manera notable DCM anhidro.

6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que la solución que contiene creatinina y el agente protector implementado en la etapa (a) contiene la base de Hünig o N,N-diisopropiletilamina (DIEPA).

7. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que, en la etapa (b), para un equivalente de creatinina diprotegida, la cantidad de molécula que lleva al menos un grupo funcional alcohol y de fórmula (I) expresada en equivalente está comprendida entre 1 y 15, de manera notable entre 1 y 10.

8. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en el que dicha etapa (b) se lleva a cabo durante de 1 a 20 h, de manera notable durante de 2 a 16 h, y particularmente, durante de 2 a 10 h.

9. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en el que dicha etapa (b) se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 60 y 100 °C, de manera notable 70 y 90 °C y, particularmente, alrededor de 80 °C (es decir, 80 °C ± 5 °C).

10. Compuesto que se puede preparar por un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, teniendo dicho compuesto la fórmula (III), (IV) o (V):



o



5 en la que:

- los radicales  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$ , idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un grupo de ácido carboxílico y al menos uno de entre los radicales  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  es un grupo de ácido carboxílico,

10 - el radical  $R'$  es un radical glucosilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos de sustitución seleccionados de un grupo alquilo, un grupo arilo, un grupo alcoxi, un halógeno, un ciano, un trifluorometilo o un nitro,

o una sal del mismo.

15 11. Composición que comprende al menos un compuesto de acuerdo con la reivindicación 10, en un vehículo aceptable, en la que dicha composición es un aditivo alimenticio o un complemento nutricional.

12. Composición farmacéutica, de diagnóstico o para técnicas de imagen que comprende al menos un compuesto de acuerdo con la reivindicación 10, en un vehículo farmacéutico aceptable.

20 13. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 10 o composición de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso como medicamento.

25 14. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 10 o composición de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento o prevención de al menos una enfermedad, trastorno o afección seleccionado del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, un trastorno neuromuscular, hipoxia, una encefalopatía isquémica tal como apoplejía, una cardiopatía, una distrofia muscular, un trastorno cutáneo e inflamación.

30 15. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 10 o composición de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de la enfermedad del transportador con carencia de creatina en el cerebro.

Figura 1

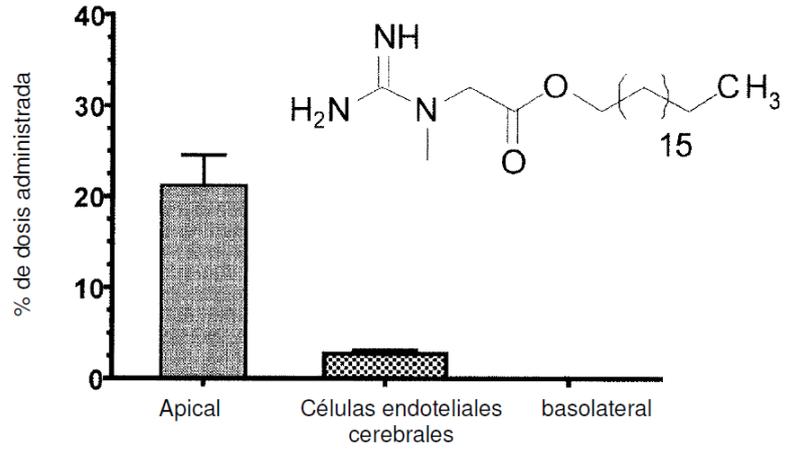


Figura 2

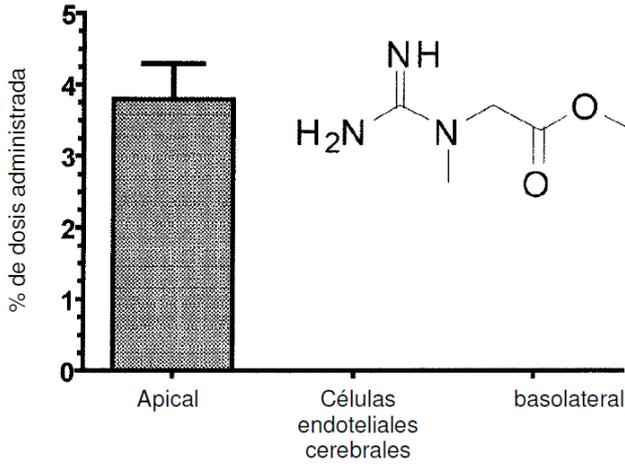
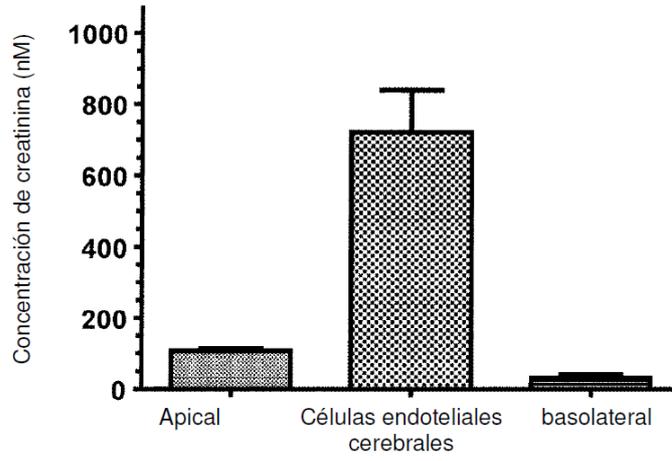


Figura 3