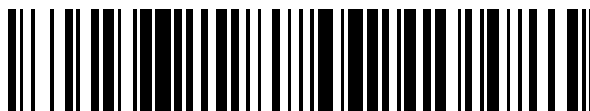


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 813**

51 Int. Cl.:

**C07F 9/24** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**A61K 31/661** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2013 E 16001739 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 3112372**

54 Título: **Derivados del pantotenato para el tratamiento de trastornos neurológicos**

30 Prioridad:

**27.04.2012 US 201261639602 P**

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

**11.04.2019**

73 Titular/es:

**RETROPHIN, INC. (100.0%)  
3721 Valley Centre Drive, Suite 200  
San Diego, CA 92130, US**

72 Inventor/es:

**VAINO, ANDREW;  
BIESTEK, MAREK y  
SHKRELI, MARTIN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 708 813 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

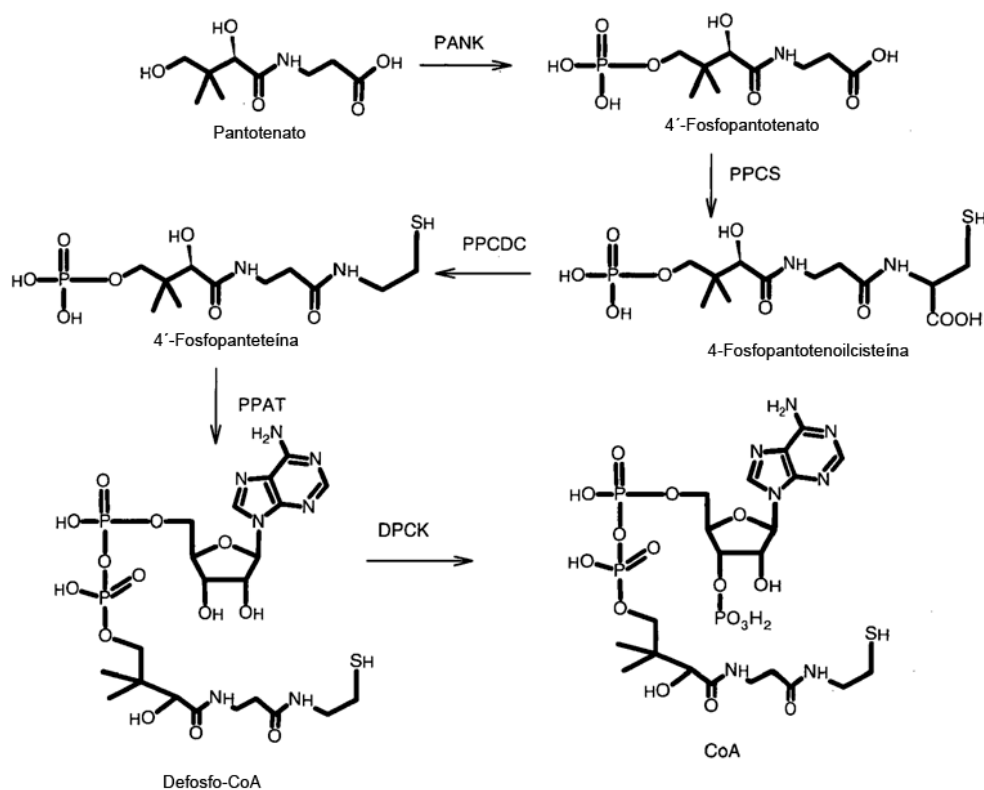
Derivados del pantotenato para el tratamiento de trastornos neurológicos

## Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a derivados de pantotenato para el tratamiento de trastornos neurológicos (tales como neurodegeneración asociada a pantotenato quinasa), a composiciones farmacéuticas que contienen tales compuestos, y a su uso en el tratamiento de trastornos neurológicos.

## Antecedentes de la invención

10 La neurodegeneración asociada a pantotenato quinasa (PKAN, por sus siglas en inglés) es una forma, que se cree que es responsable de la mitad de neurodegeneración con acumulación de hierro en el cerebro (NBIA, por sus siglas en inglés) que causa disfunción extrapiramidal (p. ej., distonía, rigidez, coreoatetosis). (A. M. Gregory and S. J. Hayflick, "Neurodegeneration With Brain Iron Accumulation", Orphanet Encyclopedia, Septiembre 2004). Se cree que PKAN es un trastorno genético que resulta de la falta de la enzima pantotenato quinasa, que es responsable de la conversión de pantotenato (vitamina B-5) a 4'-fosfopantotenato. El 4'-fosfopantotenato se convierte posteriormente en coenzima A (CoA) (como se muestra a continuación) (R. Leonardi, Y.-M. Zhang, C. O. Rock, and S. Jackowski, "Coenzyme A: Back In Action", Progress in Lipid Research, 2005, 44, 125-153).



15 En particular, el pantotenato se convierte en 4'-fosfopantotenato a través de la enzima pantotenato quinasa (PANK, por sus siglas en inglés), que se convierte en 4'-fosfopantotenoilcisteína a través de la enzima 4'-fosfopantotenoilcisteína sintasa (PPCS, por sus siglas en inglés), y posteriormente se descarboxila en 4'-fosfopanteteína sintasa a través de 4'-fosfopantotenoilcisteína decarboxilasa (PPCDC, por sus siglas en inglés). La 4'-fosfopanteteína se añade después a la adenosina por la acción de la fosfopanteteína adeniltransferasa (PPAT, por sus siglas en inglés) para proporcionar la defosfo CoA, que finalmente se convierte en coenzima A (CoA) a través de la quinasa de fosfato-CoA (DPCK, por sus siglas en inglés).

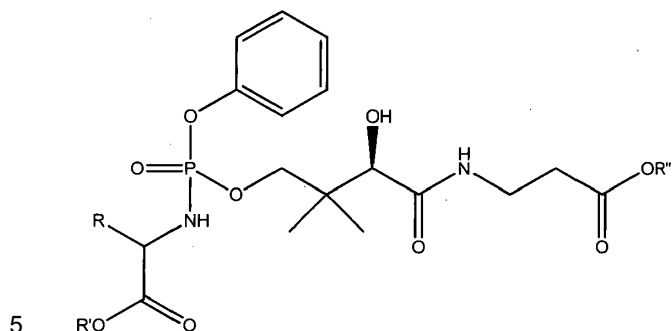
20 La PKAN clásica generalmente se presenta en los primeros diez a quince años de un niño, aunque también existe una forma atípica que puede ocurrir hasta los 40 años. La PKAN es una enfermedad progresivamente degenerativa, que conduce a la pérdida de la función musculoesquelética con un efecto devastador en la calidad de vida.

25 Un enfoque para tratar la PKAN podría ser utilizar el producto de la reacción enzimática, es decir, 4'-fosfopantotenato. Este enfoque se ha mencionado en la literatura, pero se ha reconocido que la molécula altamente cargada no podría permear la membrana celular lipofílica. (C. J. Balibar, M. F. Hollis-Symynkywicz, and J. Tao, "Pantethine Rescues Phosphopantothencycysteine Synthetase And Phosphopantothencycysteine Decarboxylase Deficiency In Escherichia Coli But Not In Pseudomonas Aeruginosa", J. Bacteriol., 2011, 193, 3304-3312).

S. J. Hayflick, Current Opinion in Pediatrics 2003, 15, 572-577 describe la neurodegeneración asociada a pantotenato quinasa y posibles terapias.

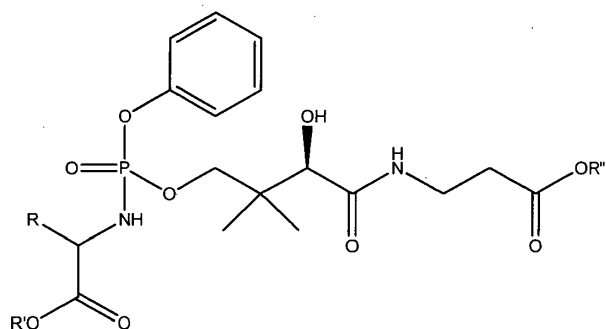
**Compendio de la invención**

La presente invención se refiere a un compuesto que tiene la fórmula:



o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R, R' y R'' son metilo.

A continuación se muestra un compuesto que tiene la fórmula:



Fórmula G

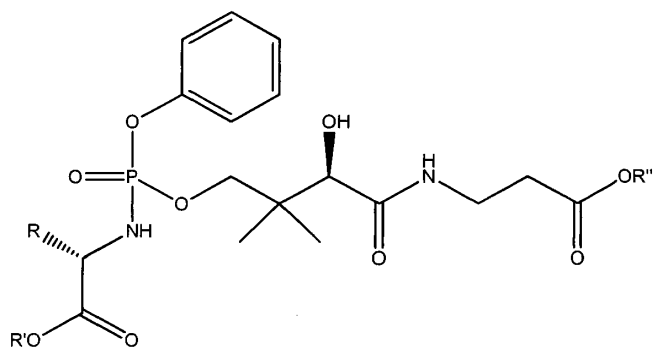
10 o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

R es una cadena lateral de aminoácido;

15 R' se selecciona de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido (tal como alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> no sustituido), alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> sustituido o no sustituido, cicloalqueno C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> sustituido o no sustituido, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sustituido o no sustituido, cicloalqueno C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, heterociclilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterociclilalquilo sustituido y no sustituido, y heteroarilalquilo sustituido y no sustituido; y

20 R'' se selecciona de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> sustituido o no sustituido, cicloalqueno C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> sustituido o no sustituido, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sustituido o no sustituido, cicloalqueno C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, heterociclilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterociclilalquilo sustituido y no sustituido y heteroarilalquilo sustituido y no sustituido.

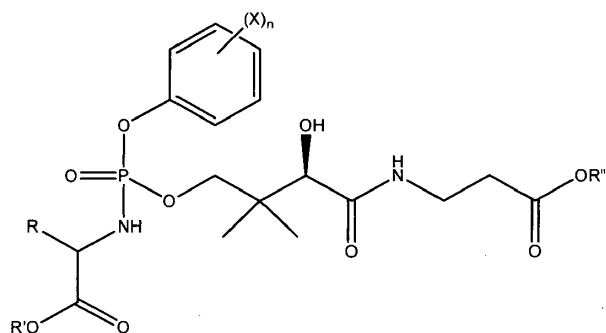
25 La cadena lateral de aminoácidos en la definición de R puede ser la de un aminoácido natural (p. ej., un L-aminoácido natural). R se puede unir al carbono representado de manera que el carbono tiene la configuración absoluta R o S (configuración relativa D o L). R puede ser la cadena lateral de un aminoácido proteínogénico. La estereoquímica del grupo R puede ser de manera que la molécula tiene la siguiente estereoquímica:



En el compuesto de fórmula G, R' puede ser alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> (p. ej., metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, t-butilo), bencilo, ciclohexilo y metilciclopropilo.

5 En el compuesto de fórmula G, R'' puede ser alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> (p. ej., metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, t-butilo), bencilo, ciclohexilo y metilciclopropilo.

A continuación se muestra un compuesto que tiene la fórmula:



Fórmula H

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

10 R es una cadena lateral de aminoácido;

X es un halógeno (p. ej., F);

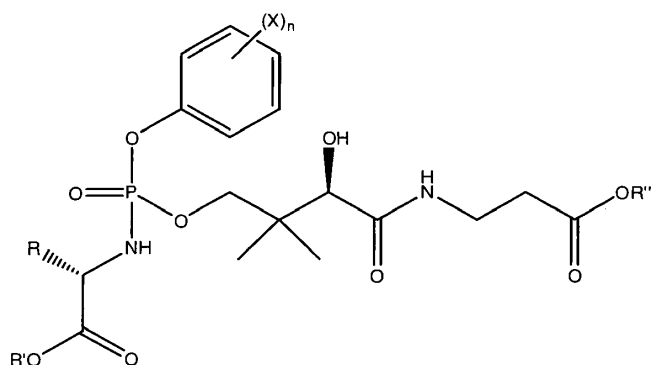
n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 (p.ej., 0, 1 ó 2);

15 R' se selecciona de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, cicloalquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), cicloalquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), arilo, arilalquilo, heterocíclico, heteroarilo, heterociclilalquilo, y heteroarilalquilo; cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos (p. ej., flúor); y

R'' se selecciona de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, cicloalquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), cicloalquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), arilo, arilalquilo, heterocíclico, heteroarilo, heterociclilalquilo y heteroarilalquilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos (p. ej., flúor).

En dicho compuesto n puede ser 0. En dicho compuesto n puede ser también 1.

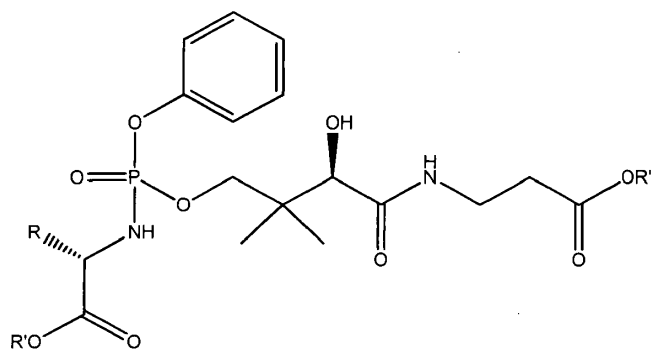
20 En dicho compuesto, la cadena lateral de aminoácidos en la definición de R es la de un aminoácido natural (p. ej., un L-aminoácido natural). R se puede unir al carbono representado de manera que el carbono tiene la configuración absoluta R o S (configuración relativa D o L). En una realización más preferida, R es la cadena lateral de un aminoácido proteínogénico. En una realización preferida, la estereoquímica del grupo R es de manera que la molécula tiene la siguiente estereoquímica:



En el compuesto de fórmula H, R' puede ser alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> (p. ej., metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo o t-butilo), bencilo, ciclohexilo o metilciclopropilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos (p. ej., flúor).

- 5 En el compuesto de fórmula H, R" puede ser alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> (p. ej., metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo o t-butilo), bencilo, ciclohexilo o metilciclopropilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos (p. ej., flúor).

En una realización, el compuesto mencionado anteriormente tiene la siguiente estereoquímica:



- 10 Otra realización más es una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica incluye una cantidad eficaz del compuesto para tratar un trastorno neurológico. La composición farmacéutica puede ser una forma farmacéutica de dosis unitaria, tal como un comprimido o una cápsula.

- 15 Otra realización más es un compuesto para uso en un método para tratar la neurodegeneración asociada a pantotenato quinasa en un sujeto. El método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención. El sujeto puede sufrir de neurodegeneración con acumulación de hierro cerebral.

- 20 Otra realización más es un compuesto para uso en un método para tratar células o tejido implicado en una patología caracterizada por una función neuronal anormal en un sujeto. El método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención. La patología se puede seleccionar de distonía, efectos extrapiramidales, disfagia, rigidez y/o rigidez de las extremidades, coreoatetosis, temblor, demencia, espasticidad, debilidad muscular y convulsiones.

- 25 Otra realización más es un compuesto para uso en un método para tratar células o tejidos implicados en una patología caracterizada por células neuronales disfuncionales causada por la regulación errónea del gen asociado con la enzima pantoteno quinasa. El método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención.

- Otra realización más es un compuesto para uso en un método para tratar una patología caracterizada por células neuronales disfuncionales causadas por la regulación errónea del gen asociado con la enzima pantoteno quinasa en un sujeto. El método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención.

- 30 Otra realización más es un compuesto para uso en un método para tratar células o tejidos implicados en una patología caracterizada por células neuronales disfuncionales causada por la regulación errónea de la expresión del gen asociado con la enzima pantoteno quinasa. El método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención.

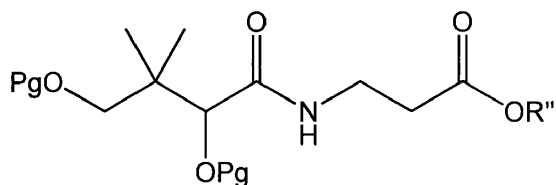
Otra realización más es un compuesto para uso en un método para tratar a un sujeto que tiene células neuronales con

una acumulación excesiva de hierro. El método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención.

En los métodos antes mencionados, el sujeto puede ser un niño (por ejemplo, de 10 a 15 años) o un adulto.

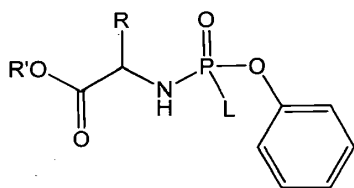
Un compuesto de fórmula G o H se puede preparar como sigue:

- 5 (a) proteger ambos grupos hidroxilo del ácido pantoténico;  
 (b) esterificar el resto ácido del ácido pantoténico protegido para formar un compuesto de la fórmula:



10 donde cada Pg representa independientemente un grupo protector, y R'' se define como anteriormente con respecto a la fórmula G o H;

- 15 (c) desproteger los grupos hidroxilo;  
 (d) fosforilar el compuesto desprotegido con un compuesto de la fórmula:

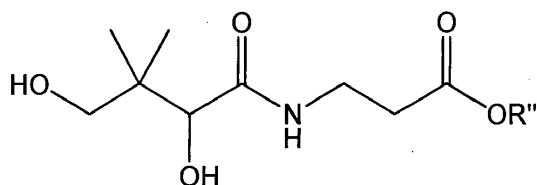


20 en donde L es un grupo saliente (p. ej., halógeno tal como cloro), y R y R' se definen como anteriormente con respecto a la fórmula G o H; y

(e) opcionalmente, formar una sal del compuesto formado en la etapa (d).

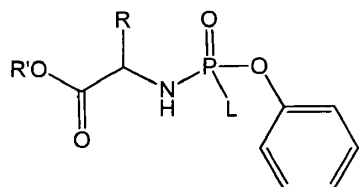
Un compuesto de fórmula G o H también se puede preparar como sigue:

- 25 (a) esterificar ácido pantoténico con un alcohol de la fórmula R''OH para formar un compuesto de la fórmula:



en donde R'' se define como anteriormente con respecto a la fórmula G o H;

- 30 (b) fosforilar el compuesto esterificado con un compuesto de la fórmula:



35 en donde L es un grupo saliente (p. ej., halógeno), y R y R' se definen como anteriormente con respecto a la fórmula G o H; y

(c) opcionalmente, formar una sal del compuesto formado en la etapa (b). La esterificación en la etapa (a) se puede

realizar sometiendo el ácido pantoténico a las condiciones de esterificación de Fischer.

### Breve descripción de los dibujos

5 La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra los niveles de acetyl CoA en células HEK 293T humanas, medidos por espectrometría de masas, después del tratamiento con los compuestos de los Ejemplos 2, 5, 7 y 12.

10 La Figura 2 es un gráfico de barras que muestra los niveles de mBBR CoA en ratones Pank<sup>1+/+</sup> no tratados (WT), ratones knock out Pank<sup>1-/-</sup> no tratados (pank1KO) y ratones knock out PANK después de la administración del compuesto de Ejemplo 2 (Pank KO + Ejemplo 2).

### Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

15 Como se utiliza en la presente memoria, ciertos elementos pueden tener los siguientes significados definidos.

20 Como se utiliza en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, el singular para "un", "una" y "el" "la" incluye referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, que incluye mezclas de las mismas. De manera similar, el uso de "un compuesto" para el tratamiento de preparación de medicamentos como se describe en la presente memoria contempla el uso de uno o más compuestos de la invención para tal tratamiento o preparación, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

25 Como se utiliza en la presente memoria, el término "que comprende" pretende significar que las composiciones y los métodos incluyen los elementos citados, pero no excluyen otros. Por lo tanto, una composición que consiste esencialmente en los elementos como se define en la presente memoria no excluiría contaminantes traza del método de aislamiento y purificación y los vehículos farmacéuticamente aceptables, tal como la solución salina tamponada con fosfato, los conservantes. "Que consiste en" significará excluir más que elementos traza de otros ingredientes y etapas del método sustanciales para administrar la composición de esta invención. Las realizaciones definidas por cada uno de los términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

35 El término "alquilo" se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificado que consiste únicamente en átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene insaturación. A menos que se especifique lo contrario, el término "alquilo" se refiere a un grupo que tiene de uno a ocho átomos de carbono (por ejemplo, de uno a seis átomos de carbono, o de uno a cuatro átomos de carbono), y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, s-butilo, n-pentilo y s-pentilo.

40 El término "alqueno" se refiere a un grupo hidrocarburo alifático que contiene un doble enlace carbono-carbono y que puede ser una cadena lineal o ramificada o ramificada. A menos que se especifique lo contrario, el término "alqueno" se refiere a un grupo que tiene de 2 a aproximadamente 10 átomos de carbono, p. ej., etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo (alilo), iso-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-butenilo, y 2-butenilo.

45 El término "alquino" se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. A menos que se especifique lo contrario, el término "alquino" se refiere a un grupo que tiene en el intervalo de 2 hasta aproximadamente 12 átomos de carbono (por ejemplo, de 2 a 10 de 2 a 10 átomos de carbono), por ejemplo, etinilo, propinilo y butinilo.

50 El término "cicloalquilo" denota un sistema de anillos no aromático mono o multicíclico de aproximadamente 3 a 12 átomos de carbono, tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

55 El término "cicloalquilalquilo" se refiere a un radical que contiene un anillo cíclico que contiene en el intervalo de aproximadamente 3 hasta 8 átomos de carbono unidos directamente a un grupo alquilo que se une después a la estructura principal en cualquier carbono en el grupo alquilo que resulta en la creación de una estructura estable tal como ciclopropilmetilo, ciclobutilmetilo y ciclopentilmetilo.

El término "arilo" se refiere a un radical aromático monocíclico o multicíclico que tiene en el intervalo de 6 hasta 20 átomos de carbono tales como fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo y bifenilo.

60 El término "arilalquilo" se refiere a un grupo arilo como se definió anteriormente unido directamente a un grupo alquilo como se definió anteriormente, p. ej., -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, y -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>.

65 El término "heterocíclico" se refiere a un radical de anillo no aromático de 3 a 15 miembros que consiste en átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado de nitrógeno, fósforo, oxígeno y azufre. El radical de anillo heterocíclico puede ser un sistema de anillos mono-, bi-, tri- o tetracíclico, que puede incluir sistemas de anillo de forma condensada, con puente o espiro, y los átomos de nitrógeno, fósforo, carbono, oxígeno o azufre en el radical

de anillo heterocíclico pueden estar opcionalmente oxidados a diversos estados de oxidación. Además, el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado.

5 El término "heterociclilalquilo" se refiere a un grupo heterociclilo como se definió anteriormente unido directamente a un grupo alquilo como se definió anteriormente.

10 El término "heteroarilo" se refiere a un anillo aromático de 5-14 miembros opcionalmente sustituido que tiene uno o más heteroátomos seleccionados de N, O y S como átomos del anillo. El heteroarilo puede ser un sistema de anillos mono-, bi- o tricíclico. Los ejemplos de tales radicales de anillo heteroarilo incluyen oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, pirrolilo, furanilo, piridinilo, pirimidinilo, pirazinilo, benzofuranilo, indolilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, carbazolilo, quinolilo e isoquinolilo.

15 El término "heteroarilalquilo" se refiere a un grupo heteroarilo como se definió anteriormente unido directamente a un grupo alquilo como se definió anteriormente, p. ej.,  $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{N}$ , y  $-\text{C}_2\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_4\text{N}$ .

El término "halógeno" incluye F, Cl, Br, y I.

20 El término "cadena lateral de aminoácido" se refiere a la cadena lateral R de un alfa-aminoácido de la fórmula  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{R})-\text{COOH}$ . Por ejemplo, la cadena lateral de alanina es metilo, la cadena lateral de glicina es hidrógeno, la cadena lateral de valina es isopropilo y la cadena lateral de triptófano es (1*H*-indol-3-il)metilo. Las cadenas laterales de aminoácidos adecuadas en los compuestos de la presente invención incluyen las de aminoácidos naturales, que incluyen aminoácidos proteínogénicos. Ejemplos no limitantes de aminoácidos naturales incluyen aminoácidos estándar o aminoácidos proteínogénicos incluyen a alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, pirrolisina, selenocisteína, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina.

30 El término "sustituido", a menos que se especifique lo contrario, se refiere a la sustitución con uno cualquiera o cualquier combinación de los siguientes sustituyentes: hidrógeno, hidroxilo, halógeno, carboxilo, ciano, nitro, oxo (=O), tio (=S), alquilo, alcoxi, alquenoilo, alquiniilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquenoilo, arilo, heterociclilo, heteroarilo,  $-\text{COOR}^x$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{R}^x$ ,  $-\text{C}(\text{S})\text{R}^x$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^y\text{R}^z$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{ONR}^y\text{R}^z$ ,  $-\text{NR}^y\text{R}^z$ ,  $-\text{NR}^x\text{CONR}^y\text{R}^z$ ,  $-\text{N}(\text{R}^x)\text{SOR}^y$ ,  $-\text{N}(\text{R}^x)\text{SO}_2\text{R}^y$ ,  $-(=\text{N}-\text{N}(\text{R}^x)\text{R}^y)$ ,  $-\text{NR}^x\text{C}(\text{O})\text{OR}^y$ ,  $-\text{NR}^x\text{R}^y$ ,  $-\text{NR}^x\text{C}(\text{O})\text{R}^y$ ,  $-\text{NR}^x\text{C}(\text{S})\text{R}^y$ ,  $-\text{NR}^x\text{C}(\text{S})\text{NR}^y\text{R}^z$ ,  $-\text{SONR}^x\text{R}^y$ ,  $-\text{SO}_2\text{NR}^x\text{R}^y$ ,  $-\text{OR}^x$ ,  $-\text{OR}^x\text{C}(\text{O})\text{NR}^y\text{R}^z$ ,  $-\text{OR}^x\text{C}(\text{O})\text{OR}^y$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^x$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^y\text{R}^z$ ,  $-\text{R}^x\text{NR}^y\text{C}(\text{O})\text{R}^z$ ,  $-\text{R}^x\text{OR}^y$ ,  $-\text{R}^x\text{C}(\text{O})\text{OR}^y$ ,  $-\text{RC}(\text{O})\text{NR}^y\text{R}^z$ ,  $-\text{R}^x\text{C}(\text{O})\text{R}^x$ ,  $-\text{R}^x\text{OC}(\text{O})\text{R}^y$ ,  $-\text{SR}^x$ ,  $-\text{SOR}^x$ ,  $-\text{SO}_2\text{R}^x$ , y  $-\text{ONO}_2$ , en donde  $\text{R}^x$ ,  $\text{R}^y$  y  $\text{R}^z$  en cada uno de los grupos anteriores pueden ser átomos de hidrógeno, alquilo, alcoxi, alquenoilo, alquiniilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, cicloalquenoilo, amino, arilo, heteroarilo, heterociclilo o dos de los  $\text{R}^x$ ,  $\text{R}^y$  y  $\text{R}^z$  se pueden unir para formar un anillo saturado o insaturado de 3-10 miembros, que puede incluir opcionalmente heteroátomos que pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan de O, NH o S. En una realización, el término sustituido se refiere a la sustitución con uno o más halógenos (p. ej., flúor).

40 El término "sujeto" se refiere a un mamífero, tal como una mascota doméstica (por ejemplo, un perro o un gato) o un humano. Preferiblemente, el sujeto es un humano.

45 La frase "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad que, cuando se administra a un sujeto o paciente para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar tal tratamiento para la enfermedad.

50 "Tratamiento" o "que trata" incluye (1) inhibir una enfermedad en un sujeto o paciente que experimenta o muestra la patología o sintomatología de la enfermedad (p. ej., detiene además el desarrollo de la patología y/o la sintomatología), (2) mejorar una enfermedad en un sujeto o paciente que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad (p. ej., revertir la patología y/o la sintomatología), y/o (3) efectuar cualquier disminución medible de una enfermedad en un sujeto o paciente que esté experimentando o mostrando la patología y la sintomatología de la enfermedad.

#### Formulaciones farmacéuticas y vías de administración

55 Los compuestos de la presente invención se pueden administrar mediante una variedad de vías que incluyen la administración oral y mediante inyección (por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa e intraperitoneal).

60 Los compuestos se pueden administrar por vía oral en forma de una forma farmacéutica sólida o líquida. En ambos, el compuesto puede estar recubierto en un material para protegerlo de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto. Los compuestos se pueden formular como soluciones acuosas, dispersiones líquidas, comprimidos (ingeribles), comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes y sellos. Las formas farmacéuticas orales pueden incluir excipientes conocidos en la técnica, tales como aglutinantes, agentes desintegrantes, saborizantes, antioxidantes y conservantes. Las formas farmacéuticas líquidas pueden incluir diluyentes tales como solución salina o un tampón acuoso.

65 Los compuestos también se pueden administrar mediante inyección. Las formulaciones adecuadas para inyección



5 pueden incluir soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones, y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La composición puede ser estéril y ser fluida en la medida en que exista una fácil jeringabilidad. Puede ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y conservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (tal como glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), mezclas adecuadas de ellos y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de surfactantes. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol y ácido ascórbico. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio o polialcoholes tales como manitol y sorbitol, en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

15 Las disoluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto terapéutico en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto terapéutico a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación incluyen secado al vacío y liofilización que produce un polvo del ingrediente activo (es decir, el compuesto terapéutico) más cualquier ingrediente adicional deseado de una disolución previamente filtrada y estéril del mismo.

25 La cantidad de dosis real del compuesto administrado a un sujeto se puede determinar mediante factores físicos y fisiológicos, tal como la edad, el sexo, el peso corporal, la gravedad de la afección, el tipo de enfermedad que se está tratando, las intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, la idiopatía del sujeto y en la vía de administración. Estos factores pueden ser determinados por un experto en la técnica. El profesional responsable de la administración determinará típicamente la concentración de ingrediente activo o ingredientes activos en una composición y dosis apropiada o apropiadas para el sujeto individual.

30 En una realización, a un sujeto humano se le administran dosis diarias de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg.

35 Se contemplan dosis únicas o múltiples de los compuestos. Los intervalos de tiempo deseados para la administración de dosis múltiples pueden ser determinados por un experto en la técnica que no emplee más que la experimentación rutinaria. Como ejemplo, a los sujetos se les pueden administrar dos dosis diarias a intervalos de aproximadamente 12 horas. En algunas realizaciones, el compuesto se administra una vez al día.

40 Los compuestos se pueden administrar en un programa de rutina. Como se utiliza en la presente memoria, un programa de rutina se refiere a un período de tiempo designado predeterminado. El programa de rutina puede abarcar períodos de tiempo idénticos o que difieran en longitud, siempre que el horario esté predeterminado. Por ejemplo, el programa de rutina puede implicar la administración dos veces al día, todos los días, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días, semanalmente, mensualmente o cualquier número de días establecido o semanas en medio. Alternativamente, el programa de rutina predeterminado puede incluir administración dos veces al día durante la primera semana, seguido de una vez al día durante varios meses. En otras realizaciones, la invención establece que el agente o los agentes se pueden tomar por vía oral y que el momento del cual depende o no depende de la ingesta de alimentos. Así, por ejemplo, el agente se puede tomar todas las mañanas y/o todas las tardes, independientemente de cuándo el sujeto haya comido o vaya a comer.

50 Terapia de combinación

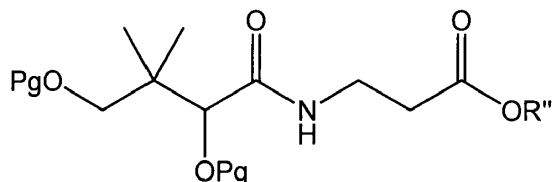
Además de utilizarse como monoterapia, los compuestos también pueden ser útiles en terapias combinadas. La terapia de combinación eficaz se puede lograr con una composición única o una formulación farmacológica que incluye ambos agentes, o con dos composiciones o formulaciones distintas, administradas al mismo tiempo, en donde una composición incluye un compuesto de esta invención, y la otra incluye el segundo agente o agentes. Alternativamente, la terapia puede preceder o seguir al otro agente de tratamiento mediante intervalos que oscilan de minutos a meses.

60 El agente o agentes adicionales se pueden seleccionar de cualquier agente o agentes útiles para tratar un trastorno neurológico, por ejemplo, cualquier agente o agentes útiles para tratar una deficiencia de pantotenato quinasa, 4'-fosfopantotenato o coenzima A. En una realización, el agente o agentes adicionales es útil para mejorar la función cognitiva, p. ej., un inhibidor de acetilcolinesterasa, tal como fisostigmina, neostigmina, piridostigmina, ambenonio, demecario, rivastigmina, galantamina, donepezilo y combinaciones de ellos. En otra realización, el agente o agentes adicionales es un quelante de hierro, tal como deferiprona, deferoxamina, deferasirox y combinaciones de ellos.

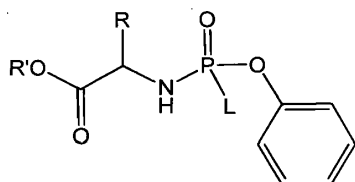
65 Síntesis de derivados de fosfopantotenato

Los compuestos de la presente invención se pueden preparar a partir de ácido pantoténico (vitamina B5), que está fácilmente disponible. La síntesis de ácido pantoténico se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. números 2.676.976 y 2.870.188.

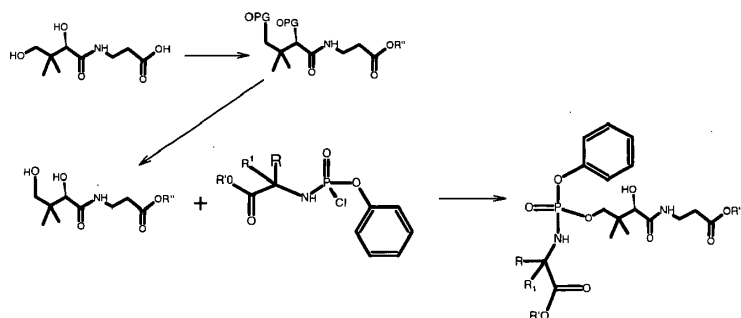
- 5 El compuesto de fórmula G se puede preparar (a) protegiendo ambos grupos hidroxilo del ácido pantoténico, (b) esterificando el resto ácido del ácido pantoténico protegido para formar un compuesto de la fórmula:



- 10 donde cada Pg representa independientemente un grupo protector, y R'' se define como anteriormente con respecto a la fórmula G, (c) desprotegiendo los grupos hidroxilo, (d) fosforilando el compuesto desprotegido con un compuesto de la fórmula:



- 15 en donde L es un grupo saliente (p. ej., halógeno), y R y R' se definen como anteriormente con respecto a la fórmula G; y (e) opcionalmente, formando una sal del compuesto formado en la etapa (d). Este esquema de reacción se muestra a continuación (donde L es Cl):



- 20 (Nota: R' en la última etapa puede ser hidrógeno)

- 25 La etapa de protección (a) se puede realizar tratando ácido pantoténico con benzaldehído y cloruro de zinc para proporcionar el acetal correspondiente (TW Green y PGM Wuts, Grupos de protección en síntesis orgánica, Wiley-Interscience, Nueva York, 1999, 217-224, 716-719). El ácido pantoténico también se puede proteger mediante el tratamiento de ácido pantoténico con acetona y ácido toluenosulfónico (M. Carmack and C. J. Kelley, "Synthesis of optically active Cleland's reagent [(-)-1,4-dithio-L-threitol]", J. Org. Chem., 1968, 33, 2171-2173) para proporcionar el acetal correspondiente. En otro ejemplo, el ácido pantoténico se trata con hidruro de sodio seguido de bromuro de bencilo para proporcionar el ácido pantoténico di-O-bencilado (T. W. Green et al., *Supra*).

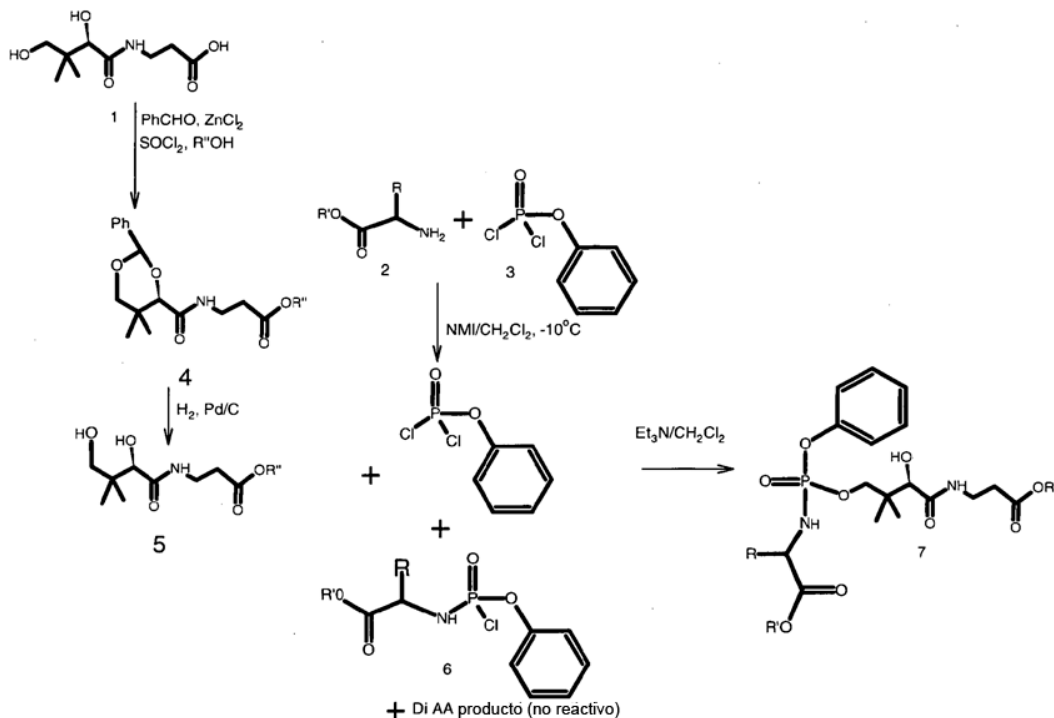
- 30 Después de la diprotección de los grupos hidroxilo, la formación de un éster (R'') se puede lograr, por ejemplo, haciendo reaccionar el ácido pantoténico diprotegido con un alcohol apropiado y dicitclohexildicarbodimida (DCC), o dietilazodicarboxilato (DEAD) y trifetilfosfina (una reacción de Mitsunobu). Alternativamente, el ácido pantoténico protegido se puede convertir en el correspondiente cloruro ácido (por ejemplo, con cloruro de tionilo o cloruro de oxalilo), seguido de un tratamiento con el alcohol correspondiente.

- 35 La desprotección se puede realizar mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como se describe en T. W. Green et al., *supra*.

- 40 Como alternativa a las etapas (a) a (c), el ácido pantoténico se puede esterificar con un alcohol de fórmula R''OH, por ejemplo, sometiendo el ácido pantoténico a condiciones de esterificación de Fischer (es decir, alcohol en exceso y ácido catalítico bajo reflujo).

- 5 El grupo hidroxilo primario en el compuesto formado en la etapa (c) puede ser fosforilado selectivamente. Véase J. D. Patrone, J. Yao, N. E. Scott, and G. D. Dotson, "Selective Inhibitors of Bacterial Phosphopantothenoylcysteine Synthetase", *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 16340-16341). Las condiciones descritas en D. M. Lehsten, D. N. Baehr, T. J. Lobl, and A. R. Vaino, "An Improved Procedure for the Synthesis of Nucleoside Phosphoramidates", *Organic Process Research & Development*, 2002, 6, 819-822, se pueden utilizar para esta reacción.

Este método se muestra a continuación con un método para preparar el reactivo de fosforilación.



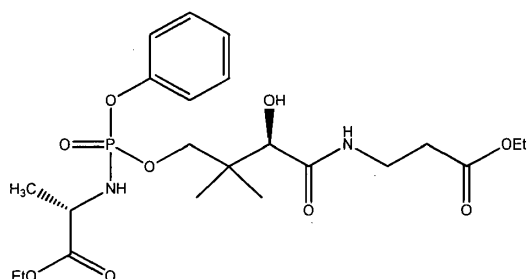
Opcionalmente, se puede obtener un producto ópticamente puro realizando una separación quiral del producto final, o uno de los intermedios entre las etapas de la síntesis.

- 15 Alternativamente, los compuestos de la presente invención se pueden preparar por la ruta descrita en B. S. Ross, P. G. Reddy, H.-R. Zhang, S. Rachakonda, and M. J. Sofia, "Synthesis of Diastereomerically Pure Nucleotide Phosphoramidates", *J. Org. Chem.*, 2011, 76, 8311-8319. Esta ruta puede producir un producto ópticamente puro sin realizar una etapa final de separación quiral.

## 20 Ejemplos

Ejemplo de referencia 1

- 25 Síntesis de 3-((2R)-4-(((S)-1-etoxi-1-oxopropan-2-il)amino)(fenoxi)fosforil)oxi)-2-hidroxi-3,3-dimetilbutanamido) propanoato de etilo

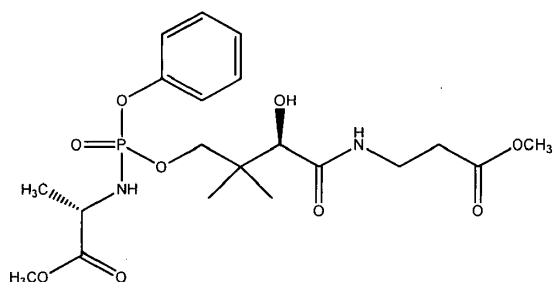


- 30 Se suspendió clorhidrato de éster etílico de L-alanina (0,50 g, 3,25 mmol) en 10 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se trató con fenil fosfordicloridato (0,50 ml, 3,35 mmol) a una temperatura de  $-10^\circ\text{C}$  y bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla bien agitada se trató después gota a gota con N-metilimidazol (1,0 ml, 12,5 mmol). Después de 1 h y aún a una temperatura

de -10°C, se añadió lentamente pantotenato de etilo (0,70 g, 2,8 mmol) en 3 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Esta mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y, después de 3 horas, se añadieron 2 ml de metanol. La extracción se realizó de forma secuencial con HCl 1 M, agua, NaHCO<sub>3</sub> al 5% y salmuera. La fase orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y el disolvente se evaporó proporcionando 1,11 g de un jarabe transparente e incoloro. Este material se purificó por cromatografía en columna flash utilizando 30 g de gel de sílice y eluyendo con EtOAc/hexano 1:1 que contenía EtOH al 5%. El proceso se repitió hasta obtener 1,1 g de fosforamidato. La HPLC mostró el producto, como una mezcla 1: 1 de diastereoisómeros naturales, que tenía una pureza del 97%. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,21 (d, 3H, *J* = 2,7 Hz, CH<sub>3</sub>), 1,27 (m, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,35 (t, 3H, *J* = 6,9 Hz, CH<sub>3</sub>), 2,53 (q, 2H, *J* = 4,2 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,60 (m, 1H, CH), 3,78 (d, *J* = 7,5 Hz, CH), 3,9 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,10 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 4,79 (t, 1H, *J* = 6,5 Hz, CH), 7,15 y 7,40 (2Ms, 5H, Ph). Peso molecular esperado de 502,21. Peso molecular observado 503,09 (M + H<sup>+</sup>).

## Ejemplo 2

Síntesis de 3-((2R)-2-hidroxi-4-(((S)-1-metoxi-1-oxopropan-2-il)amino)(fenoxi)fosforil)oxi)-3,3-dimetilbutanamido) propanoato de metilo



El clorhidrato de éster metílico de L-alanina (1,35 g, 9,65 mmol) se suspendió en diclorometano (20 ml) y se trató con fenilfosfodichloridato (1,51 ml, 10,15 mmol) a una temperatura de -78°C bajo una atmósfera de argón. Se añadió gota a gota diisopropiletilamina (2,6 ml, 20,27 mmol). La mezcla se agitó a una temperatura de -78°C durante 30 minutos, después se dejó calentar a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se enfrió a -5°C y se añadió gota a gota pantotenato de metilo (1,6 ml, 20,27 mmol) en diclorometano. Se añadió N-metilimidazol (1,6 ml, 20,27 mmol) y, después de agitar a una temperatura de -5°C durante 30 minutos y a temperatura ambiente durante 1 hora, se añadieron 2 ml de metanol. La mezcla se lavó secuencialmente con agua (30 ml), ácido cítrico al 5% (30 ml) y salmuera (10 ml). La fase orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y el disolvente se retiró a presión reducida. La purificación se logró con una mezcla 1:1 de EtOAc:hexano para proporcionar el producto como un aceite incoloro transparente. (1,1 g, 24% de rendimiento). La HPLC mostró el producto, como una mezcla 1:1 de diastereoisómeros, que tenía una pureza del 97%. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,27, 1,39 y 1,40 (2 Ss, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,41 (superposición d, 3H, *J* = 1,2 Hz, CHCH<sub>3</sub>), 3,55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,60 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 3,63 (m, 1H, CH), 3,66 y 3,68 (2 Ss, 3H, COCH<sub>3</sub>), 3,70 y 3,74 (2 Ss, 3H, COCH<sub>3</sub>), 3,78 (m, 1H CH), 4,03 (m, 1H, CH), 4,17 (m, 1H, CH), 7,16 y 7,35 y 7,40 (2 Ms, 5H, Ph). Peso molecular esperado 474,18. Peso molecular observado 475,03 (M + H<sup>+</sup>).

## Ejemplos de referencia 3-14

Los compuestos mostrados en la siguiente tabla se prepararon según los procedimientos sintéticos descritos en el Ejemplo 1 y Ejemplo 2 de referencia, utilizando los materiales de partida apropiados.

Ejemplo referencia	de R (Aminoácido)	R'	R''	Masa aislada (g)	Pureza (%)	Peso molecular esperado	Peso molecular observado [M+H <sup>+</sup> ]
3	Me (L-Ala)	n-Bu	n-Bu	0,34	91	558,27	559,24
4	Me (L-Ala)	Bn	Et	1,87	97	564,22	565,07
5	Me (L-Ala)	Et	Bn	1,36	97	564,22	565,14
6	Me (L-Ala)	Bn	Bn	1,38	98	626,24	627,32
7	Me (L-Ala)	MeCyPr	MeCyPr	1,77	100	554,24	555,23
8	H (Gly)	Bn	Et	0,44	93	550,21	551,02

Ejemplo de referencia	R (Aminoácido)	R'	R''	Masa aislada (g)	Pureza (%)	Peso molecular esperado	Peso molecular observado [M+H <sup>+</sup> ]
9	i-Pr (L-Val)	Et	Et	0,39	94	530,24	531,14
10	Me Indol (L-Trp)	Me	Me	1,43	95	589,22	590,16
11	MeIndole (L-Trp)	Et	Et	0,45	95	617,25	618,21
12	MeIndole (L-Trp)	Bn	Et	0,47	91	679,27	680,17
13	MeIndole (L-Trp)	Et	Bn	1,33	95	679,27	680,17
14	MeIndole (L-Trp)	Bn	Bn	0,13	90	741,28	742,24

Ejemplo 15: Ensayos *in vitro* con bacterias

5 SJ16 es una cepa de *Escherichia coli* que requiere la adición de ácido pantoténico para proliferar (es decir, tiene una mutación de manera que el ácido pantoténico está inactivo). Por lo tanto, sirve como un ensayo útil para determinar si un compuesto puede rescatar un organismo deficiente en PANK, la causa de la PKAN. Los compuestos de la presente invención se ensayaron para determinar la toxicidad y la capacidad para soportar el crecimiento de las cepas de *Escherichia coli* K-12 SJ16 (véase, p. ej., Jackowski et al., J. Bacteriol., 148, 926-932, 1981) y DV70 (véase, p. ej., Vallari et al., J. Bacteriol., 169, 5795-5800, 1987) bajo condiciones permisivas y no permisivas. El compuesto de ensayo en un disolvente (dimetilsulfóxido, DMSO) se añadió a un medio de crecimiento a una concentración final de 8 µM. Se añadió un disolvente solo (DMSO) al medio de crecimiento a una concentración final ≤ 0,1% como control.

15 La cepa SJ16 se cultivó a una temperatura de 37°C durante 18 horas en un medio sólido que contenía agar (1,5%), sales esenciales mínimas M9 (véase Miller, Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1972), glucosa (0,4%), metionina (50 µg/ml) y con (permisiva) o sin (no permisiva) pantotenato de calcio (1 µM). La falta de crecimiento con la suplementación de pantotenato de calcio indicó toxicidad. El crecimiento sin la suplementación con pantotenato de calcio indicó la capacidad de las bacterias para metabolizar el compuesto para producir pantotenato o β-alanina.

20 La cepa DV70 se cultivó a una temperatura de 30°C (permisiva) o 42°C (no permisiva) durante 18 horas en medio sólido que contenía agar (1,5%), sales esenciales mínimas M9, glucosa (0,4%), metionina (50 µg/ml) , y pantotenato de calcio (1 µM). La falta de crecimiento a una temperatura de 30°C indicó toxicidad. El crecimiento a una temperatura de 42°C indicó el metabolismo del compuesto y la subsiguiente conversión a la coenzima A por las bacterias.

25 Los resultados de la recuperación de SJ16 para los compuestos de los Ejemplos 2 y los Ejemplos de referencia 5, 7 y 12 se muestran en la Tabla a continuación. Un resultado "Sí" indica que las bacterias estaban vivas después de 18 horas. Los compuestos de los Ejemplos 2 y los Ejemplos de referencia 5, 7 y 12 no dieron como resultado la recuperación de la cepa DV70.

Ejemplo	DMSO utilizado	Recuperación de SJ16
2	< 10%	Sí
5 (Referencia)	> 50%	Sí
7 (Referencia)	> 60%	Sí
12 (Referencia)	> 70%	Sí*
* compuesto de ensayo precipitado		

## Ejemplo 16

Los compuestos del Ejemplo 2 y los Ejemplos de referencia 5, 7 y 12 se ensayaron en células humanas inmortalizadas (HEK 293T). La cantidad de acetil-CoA (el resultado subsiguiente de PANK) después de la administración de los compuestos de los Ejemplos 2 y los Ejemplos de referencia 5, 7 y 12 se midió por espectrometría de masas. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Como se puede ver en la Figura 1, el tratamiento de células HEK 293T con 200  $\mu$ M del compuesto del Ejemplo 2 produjo un aumento del 42% en acetil CoA con respecto al inicio ( $p < 0,0005$ ). El tratamiento de células HEK 293T con 20  $\mu$ M del compuesto del Ejemplo de referencia 7 produjo un aumento del 38% en acetil CoA con respecto al inicio ( $p < 0,005$ ).

Ejemplo 17: Ensayo *in vivo*

Los compuestos de la invención se ensayaron para determinar su eficacia en ratones Pank<sup>1-/-</sup> (cepa 129SvJ x C57BL/6J fondo) que se compararon con crías Pank<sup>1+/+</sup> (cepa 129SvJ x C57BL/6J) de la misma edad, de 8 a 12 semanas. Cada ratón se identificó con una etiqueta en la oreja codificada y se pesó el primer día de ensayo. Cada compuesto se administró a 4-5 ratones mediante inyección intraperitoneal a una dosis de 1,2  $\mu$ moles/g de peso corporal en 5  $\mu$ L de dimetilsulfóxido una vez al día durante 5 días, y los ratones estuvieron después en ayunas durante la noche, se pesaron y se sometieron a eutanasia. Los ratones no tratados recibieron 5  $\mu$ L de dimetilsulfóxido una vez al día durante 5 días y después estuvieron en ayunas durante la noche antes del pesaje y la eutanasia. Se extirparon los hígados de cada ratón, se congelaron instantáneamente las alícuotas en nitrógeno líquido y se almacenaron a una temperatura de -80°C. En 7 días, las muestras de hígado se descongelaron en hielo, se pesaron y se analizaron para determinar el contenido de coenzima A como se describe a continuación. La eficacia se indicó por un aumento estadísticamente significativo en los niveles de coenzima A del hígado en los ratones Pank<sup>1-/-</sup> en comparación con el hígado de ratones Pank<sup>1-/-</sup> no tratados y por equivalencia en comparación con los niveles de coenzima A en los ratones Pank<sup>1+/+</sup> no tratados.

Mediciones de CoA: extracción de fibroblastos e hígado y derivatización de la coenzima A antes de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

La extracción de fibroblastos o hígado se realizó mediante la modificación de un método descrito anteriormente (véase, Minkler et al., Anal. Biochem., 376, 275-276, 2008). La derivatización de coenzima A se realizó mediante la modificación de un método descrito anteriormente (véase, Shimada et al., J. Chromatogr. B Biomed. Appl., 659, 227-241, 1994).

El hígado (20-50 mg) se homogeneizó en 2 ml de KOH 1 mM, y el pH se ajustó a 12 con KOH 0,25 M. Los fibroblastos se rasparon de la placa de cultivo y se recolectaron en 1 ml de agua, que se transfirió a 200  $\mu$ l de NaOH 0,25 M. El homogeneizado de hígado se incubó después a una temperatura de 55°C durante 2 horas y las células de fibroblastos se incubaron durante 1 hora a una temperatura de 55°C. El pH se ajustó a pH 8 con Trizma-HCl 1 M y se añadieron 10  $\mu$ L de monobromobimane 100 mM (mBBr, Life Technologies, NY) durante 2 horas en la oscuridad. La reacción se acidificó con ácido acético y se centrifugó a 500 g durante 15 minutos. Después se añadió el sobrenadante a una columna de 2-(2-piridil)etilo (Supelco) que se equilibró con 1 ml de metanol al 50%/ácido acético al 2%. La columna se lavó con 2 x 1 ml de metanol al 50%/ácido acético al 2% y 1 ml de agua. Las muestras se eluyeron con 2 x 1 ml de formiato de amonio 50 mM en etanol al 95%. Las muestras se evaporaron bajo nitrógeno y se resuspendieron en 300  $\mu$ l de agua. Las muestras se centrifugaron a través de un filtro de tubo de centrifuga Spin-X (0,22  $\mu$ m de acetato de celulosa, Costar) para retirar cualquier precipitado antes de la HPLC.

## Cuantificación de coenzima A mediante HPLC

El derivado mBBr de coenzima A se separó mediante HPLC de fase inversa utilizando una columna Gemini C<sub>18</sub> de 3  $\mu$ m (150 x 4,60 mm) de Phenomenex (Torrance, CA). El sistema de cromatografía utilizado fue un módulo de separación Waters e2695 con un detector UV/Vis y se controló mediante el software Empower 3. El disolvente A era fosfato de potasio 50 mM, pH 4,6, y el disolvente B era acetonitrilo al 100%. Se inyectaron 20  $\mu$ l de muestra en la columna, y la velocidad de flujo fue de 0,5 ml/min. El programa de HPLC fue el siguiente: mezcla de disolventes inicial de 90% de A/10% de B, 0 a 2 min isocrático con 10% de B, 2 a 9 min de gradiente lineal de 10% de B a 25% de B, 9 a 23 min de gradiente cóncavo 25% de B a 40% de B, 23 a 25 min de gradiente lineal de 40% a 10% y 25 a 30 min isocrático con 10% de B. El detector se ajustó a  $\lambda$ 393 nm. El área bajo el pico de coenzima A derivatizada con mBBr se integró y se comparó con una curva de concentración estándar de mBBr-coenzima A preparada a partir de coenzima A comercial.

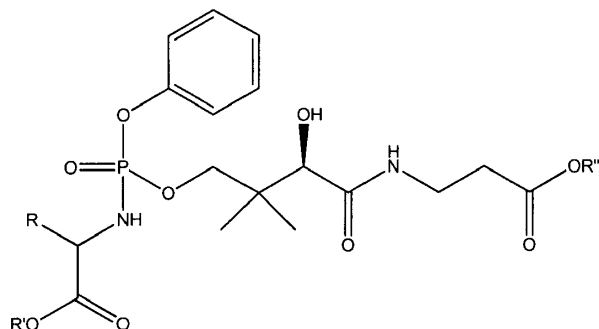
La Figura 2 representa los niveles de mBBr CoA en ratones knockout PANK después de la administración del compuesto del Ejemplo 2. Como se puede ver en la Figura 2, el compuesto del Ejemplo 2 restauró los niveles de CoA a los observados en ratones normales. Esto también se muestra en la siguiente tabla.

ES 2 708 813 T3

	pmol mBBR-CoA/mg hígado		
	Media	Desviación estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés)	n
WT	522,545	18,279	4
KO pank1	339,560	11,496	5
KO pank 1 + Ejemplo 2	563,358	44,959	5

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que R, R' y R'' son metilo.

10 2. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la reivindicación 1, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en donde la composición farmacéutica es una forma farmacéutica de dosis unitaria.

15 4. Un compuesto de la reivindicación 1 para uso como un medicamento para tratar la neurodegeneración asociada a pantotenato quinasa en un sujeto.

20 5. El compuesto para uso de la reivindicación 4, en donde el sujeto sufre neurodegeneración con acumulación de hierro en el cerebro.

6. Un compuesto de la reivindicación 1 para uso como un medicamento para tratar a un sujeto que tiene células neuronales con una acumulación excesiva de hierro.

25 7. Un compuesto de la reivindicación 1 para uso como un medicamento para tratar células o tejido implicado en una patología caracterizada por una función neuronal anormal en un sujeto.

30 8. El compuesto de la reivindicación 7, en donde la patología se selecciona entre distonía, efectos extrapiramidales, disfagia, rigidez y/o rigidez de las extremidades, coreoatetosis, temblor, demencia, espasticidad, debilidad muscular y convulsiones.

9. Un compuesto de la reivindicación 1 para uso como un medicamento para tratar células o tejidos implicados en una patología caracterizada por células neuronales disfuncionales causada por la regulación errónea del gen asociado con la enzima pantotenato quinasa.

35 10. Un compuesto de la reivindicación 1 para uso como un medicamento para tratar células o tejidos implicados en una patología caracterizada por células neuronales disfuncionales causada por la regulación errónea de la expresión del gen asociado con la enzima pantotenato quinasa.

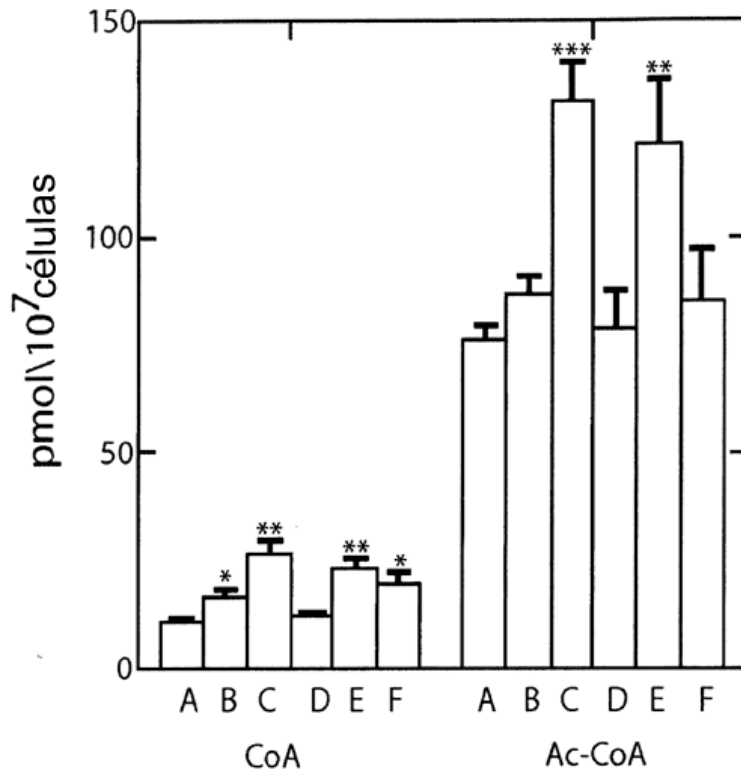
40 11. El compuesto para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4-10, en donde el sujeto es un niño.

12. El compuesto para uso de la reivindicación 11, en donde el niño tiene de 10 a 15 años.

13. El compuesto para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4-10, en donde el sujeto es un adulto.



Figura 1



- A Control
- B Ejemplo 2 (80  $\mu$ M)
- C Ejemplo 2 (200  $\mu$ M)
- D Ejemplo 5 (20  $\mu$ M)
- E Ejemplo 7 (20  $\mu$ M)
- F Ejemplo 12 (12  $\mu$ M)

Valores P  
(significancia)  
\* P < 0,05  
\*\* P < 0,005  
\*\*\* P < 0,0005

Figura 2

