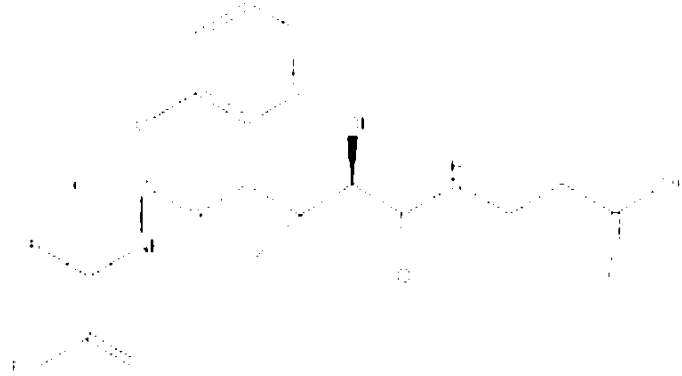


ÖZET**NÖROLOJİK HASTALIKLARIN TEDAVİSİ İÇİN PANTOTENAT TÜREVLERİ**

Bu tarifname, nörolojik hastalıkların (örneğin, pantotenat kinaz ilişkili nörodejenerasyonun) tedavisi için pantotenat türevlerine, bu bileşikleri içeren farmasötik
5 bileşimlere ve bunların nörolojik hastalıkların tedavisinde kullanımına ilişkindir.

İSTEMLER

1. Aşağıdaki formüle sahip bir bileşik:



veya farmasötik olarak uygun bir tuzu olup, burada R, R' ve R'' metildir.

- 5 2. Bir farmasötik bileşim olup, İstem 1'e göre bir bileşiği ve farmasötik olarak uygun bir ekspiyanı içerir.
3. İstem 2'ye göre farmasötik bileşim olup, burada farmasötik bileşim, bir birim dozaj formudur.
- 10 4. İstem 1'e göre bir bileşik olup, bir hastada pantotenat kinaz ilişkili nörodejenerasyonu tedavi etmek için bir ilaç olarak kullanıma yöneliktir.
5. İstem 4'e göre kullanıma yönelik bileşik olup, burada hasta, beyinde demir birikimi içeren nörodejenerasyondan muzdariptir.
6. İstem 1'e göre bir bileşik olup, aşırı demir birikimi olan nöronal hücrelere sahip bir hastayı tedavi etmek için bir ilaç olarak kullanıma yöneliktir.
- 15 7. İstem 1'e göre bir bileşik olup, bir hastada anormal nöronal fonksiyon ile nitelenen bir patolojisi olan hücreleri veya dokuyu tedavi etmek için bir ilaç olarak kullanıma yöneliktir.
8. İstem 7'ye göre bileşik olup, burada patoloji, distoni, ekstrapiramidal etkiler, disfaji, uzuvlarda rijidite ve/veya sertlik, koreoatetoz, titreme, demans, spastisite, kas
- 20 zayıflığı ve felç arasından seçilir.
9. İstem 1'e göre bir bileşik olup, pantoten kinaz enzimi ile ilişkili gen bozukluğundan kaynaklanan işlevsiz nöronal hücreler ile nitelenen bir patolojisi olan hücrelerin veya dokuların tedavisi için bir ilaç olarak kullanıma yöneliktir.

10. İstem 1'e göre bir bileşik olup, pantoten kinaz enzimi ile ilişkili gen ekspresyonu bozukluğundan kaynaklanan işlevsiz nöronal hücreler ile nitelenen bir patolojisi olan hücrelerin veya dokuların tedavisi için bir ilaç olarak kullanıma yöneliktir.
11. İstem 4 ile 10'dan herhangi birine göre kullanıma yönelik bileşik olup, burada hasta bir çocuktur.
12. İstem 11'e göre kullanıma yönelik bileşik olup, burada çocuk 10 ile 15 yaşındadır.
13. İstem 4 ile 10'dan herhangi birine göre kullanıma yönelik bileşik olup, burada hasta bir yetişkindir.

TARİFNAME

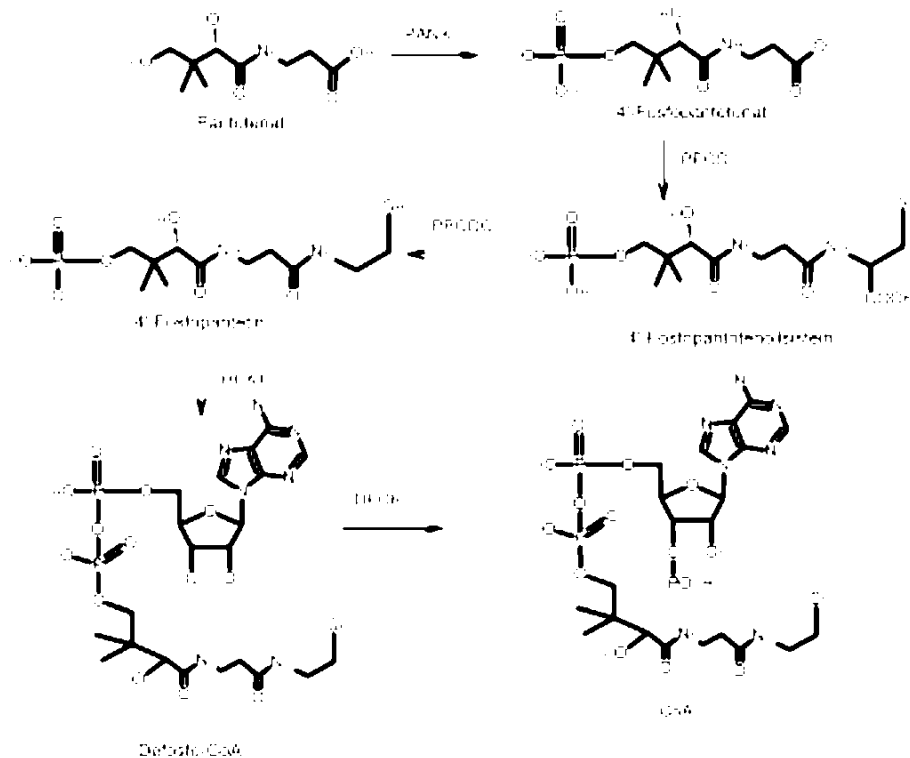
NÖROLOJİK HASTALIKLARIN TEDAVİSİ İÇİN PANTOTENAT TÜREVLERİ

Buluşun Alanı

Bu buluş, nörolojik hastalıkların (örneğin, pantotenat kinaz ilişkili nörodejenerasyonun) tedavisi için pantotenat türevlerine, bu bileşikleri içeren farmasötik bileşimlere ve bunların nörolojik hastalıkların tedavisinde kullanımına ilişkindir.

Buluşla İlgili Bilinen Hususlar

Pantotenat kinaz ilişkili nörodejenerasyon (PKAN), ekstrapiramidal bozukluğa (örneğin distoni, rijidite, koreoatetoz) neden olan, beyinde demir birikimi içeren nörodejenerasyonun (NBIA) yarısından sorumlu olduğu düşünülen bir formdur (A. M. Gregory and S. J. Hayflick, "Neurodegeneration With Brain Iron Accumulation", Orphanet Encyclopedia, Eylül 2004). PKAN'ın, pantotenatın (vitamin B-5) 4'-fosfopantotenata dönüşümünden sorumlu olan pantotenat kinaz enziminin yokluğundan kaynaklanan bir genetik bozukluk olduğu düşünülmektedir. 4'-Fosfopantotenat daha sonra (aşağıda gösterildiği gibi) Koenzim A'ya (CoA) dönüştürülür (R. Leonardi, Y.-M. Zhang, C. O. Rock, and S. Jackowski, "Coenzyme A: Back In Action", Progress in Lipid Research, 2005, 44, 125-153).



Özellikle pantotenat, pantotenat kinaz (PANK) enzimi vasıtasıyla 4'-fosfopantotenata dönüştürülür, bu ise 4'-fosfopantotenoilsistein sentaz (PPCS) enzimi vasıtasıyla 4'-fosfopantotenoilsisteine dönüştürülür ve ardından, 4'-fosfopantotenoilsistein dekarboksilaz (PPCDC) vasıtasıyla 4'-fosfopantetine dekarboksillenir. 4'-fosfopantetin daha sonra, fosfopantetin adeniltransferazın (PPAT) etkisiyle, defosfo CoA vermek üzere adenosine eklenir; defosfo CoA son olarak, defosfo-CoA kinaz (DPCK) vasıtasıyla koenzim A'ya (CoA) dönüştürülür.

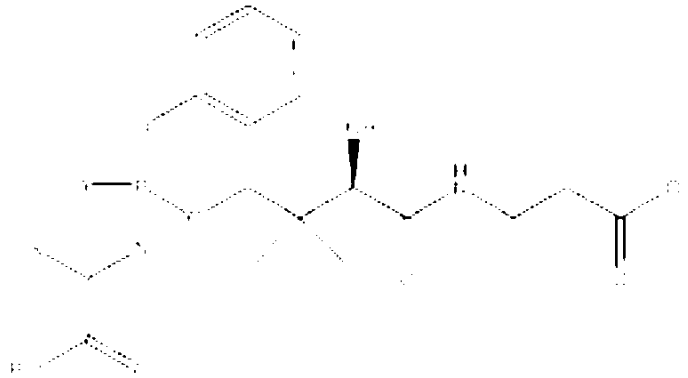
Klasik PKAN genellikle, bir çocuğun ilk on ila on beş yılında kendini gösterir; bununla birlikte 40 yaşına kadar ortaya çıkabilen bir atipik form da vardır. PKAN, yaşam kalitesine yıkıcı bir etkisi olan, kas-iskelet fonksiyonunun kaybına yol açan ilerleyen bir dejeneratif hastalıktır.

PKAN'ı tedavi etmek için bir yaklaşım, enzim reaksiyonunun ürününün, yani 4'-fosfopantotenatın kullanılması olabilir. Bu yaklaşıma literatürde değinilmiş, ancak oldukça yüklü olan molekülün, lipofilik hücre membranını geçemeyeceği kabul edilmiştir (C. J. Balibar, M. F. Hollis-Symynkywicz, and J.Tao, "Pantethine Rescues Phosphopantothenoyleysteine Synthetase And Phosphopantothenoyleysteine Decarboxylase Deficiency In Escherichia Coli But Not In Pseudomonas Aeruginosa", J. Bacteriol., 2011, 193, 3304-3312).

S. J. Hayflick, Current Opinion in Paediatrics, 2003, 15, 572-577, pantotenat kinaz ilişkili nörodejenerasyonu ve muhtemel terapileri açıklar.

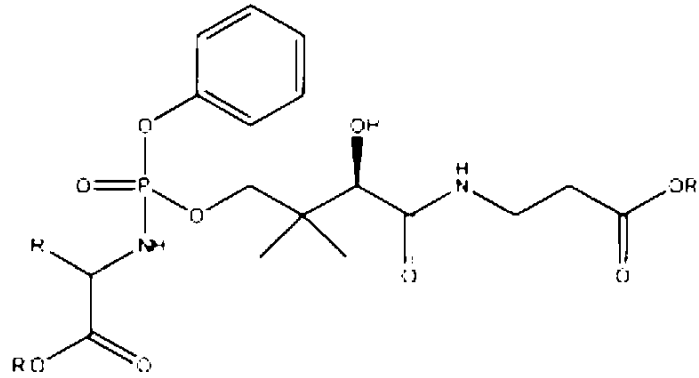
Buluşun Özeti

Bu buluş, aşağıdaki formüle sahip bir bileşiğe,



veya farmasötik olarak uygun bir tuzuna ilişkindir; burada R, R' ve R'' metildir.

Aşağıda, şu formüle sahip bir bileşik,



Formül G

veya farmasötik olarak uygun bir tuzu gösterilmiştir; burada

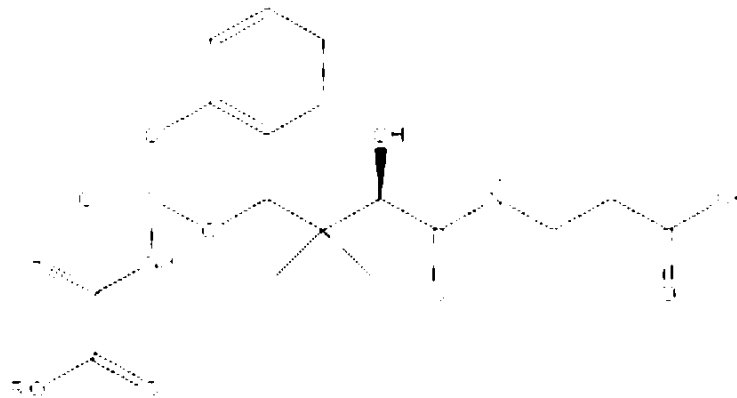
R, bir amino asit yan zinciridir;

- 5 R', C₁-C₆ alkil, süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş C₁-C₆ alkil (örneğin süstitüe edilmemiş C₁-C₆ alkil), süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş C₂-C₆ alkenil, süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş C₂-C₆ alkinil, süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş C₃-C₈ sikloalkil, süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş C₃-C₈ sikloalkenil, süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş C₃-C₈ sikloalkil(C₁-C₆ alkil), süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş C₃-C₈ sikloalkenil(C₁-C₆ alkil), süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş aril, süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş arilalkil, süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş heterosiklil, süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş heteroaril, süstitüe edilmiş ve süstitüe edilmemiş heterosiklilalkil ve süstitüe edilmiş ve süstitüe edilmemiş
- 10
- 15 heteroarilalkil arasından seçilir ve

- R'', süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş C₁-C₆ alkil, süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş C₂-C₆ alkenil, süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş C₂-C₆ alkinil, süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş C₃-C₈ sikloalkil, süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş C₃-C₈ sikloalkenil, süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş C₃-C₈ sikloalkil(C₁-C₆ alkil), süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş C₃-C₈ sikloalkenil(C₁-C₆ alkil), süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş aril, süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş arilalkil, süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş heterosiklil, süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş heteroaril, süstitüe edilmiş ve
- 20

sübstitüe edilmemiş heterosiklilalkil ve sübstitüe edilmiş ve sübstitüe edilmemiş heteroarilalkil arasından seçilir.

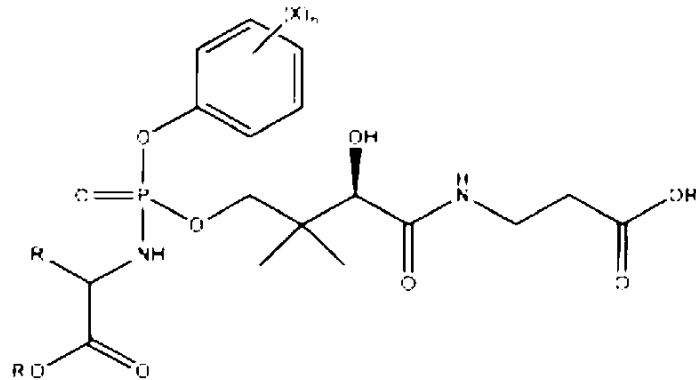
R'nin tanımındaki amino asit yan zinciri, doğal bir amino asidinki olabilir (örneğin, doğal bir L-amino asit). R, gösterilen karbona, karbon *R* veya *S* mutlak konfigürasyonuna (*D* veya *L* görelî konfigürasyonuna) sahip olacak şekilde bağlanabilir. R, bir proteinojenik amino asidin yan zinciri olabilir. R grubunun stereokimyası, molekül aşağıdaki stereokimyaya sahip olacak şekilde olabilir:



G formüllü bileşikte R', C₁-C₆ alkil (örneğin, metil, etil, n-propil, i-propil, n-bütil, i-bütil, t-bütil), benzil, sikloheksil ve metilsiklopropil olabilir.

G formüllü bileşikte R'', C₁-C₆ alkil (örneğin, metil, etil, n-propil, i-propil, n-bütil, i-bütil, t-bütil), benzil, sikloheksil ve metilsiklopropil olabilir.

Aşağıda, şu formüle sahip bir bileşik,



Formül H

veya farmasötik olarak uygun bir tuzu gösterilmiştir; burada

R, bir amino asit yan zinciridir;

X halojendir (örneğin, F);

n, 0, 1, 2, 3, 4 veya 5'tir (örneğin, 0, 1, veya 2);

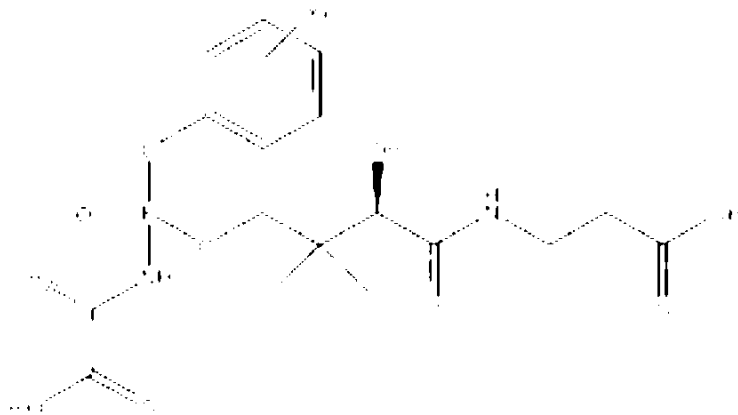
R', C₁-C₆ alkil, C₂-C₆ alkenil, C₂-C₆ alkinil, C₃-C₈ sikloalkil, C₃-C₈ sikloalkenil, C₃-C₈ sikloalkil(C₁-C₆ alkil), C₃-C₈ sikloalkenil(C₁-C₆ alkil), aril, arilalkil, heterosiklil, heteroaril, heterosiklilalkil ve heteroarilalkil arasından seçilir; bunların her biri, isteğe bağlı olarak bir veya birden çok halojen (örneğin, flor) ile süstitüe edilir ve

R'', C₁-C₆ alkil, C₂-C₆ alkenil, C₂-C₆ alkinil, C₃-C₈ sikloalkil, C₃-C₈ sikloalkenil, C₃-C₈ sikloalkil(C₁-C₆ alkil), C₃-C₈ sikloalkenil(C₁-C₆ alkil), aril, arilalkil, heterosiklil, heteroaril, heterosiklilalkil ve heteroarilalkil arasından seçilir; bunların her biri, isteğe bağlı olarak bir veya birden çok halojen (örneğin, flor) ile süstitüe edilir.

Söz konusu bileşikte n, 0 olabilir. Söz konusu bileşikte n, 1 de olabilir.

Söz konusu bileşikte, R'nin tanımındaki amino asit yan zinciri, doğal bir amino asidinkidir (örneğin, doğal bir L-amino asit). R, gösterilen karbona, karbon R veya S mutlak konfigürasyonuna (D veya L göreli konfigürasyonuna) sahip olacak şekilde bağlanabilir.

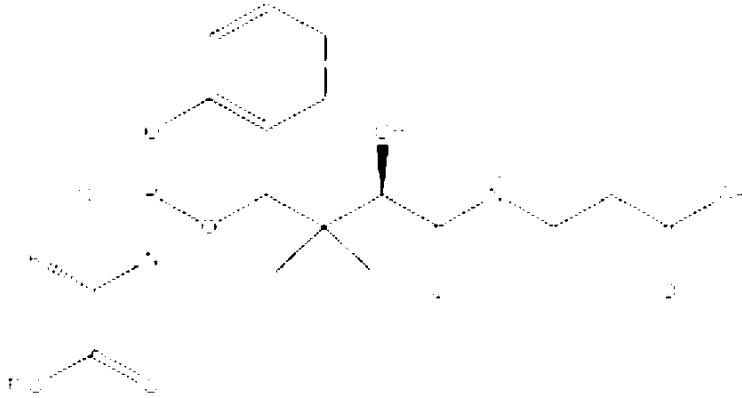
Daha çok tercih edilen bir düzenlemede R, bir proteinojenik amino asidin yan zinciridir. Tercih edilen bir düzenlemede, R grubunun stereokimyası, molekül aşağıdaki stereokimyaya sahip olacak şekildedir:



H formüllü bileşikte R', C₁-C₆ alkil (örneğin, metil, etil, n-propil, i-propil, n-bütil, i-bütil veya t-bütil), benzil, sikloheksil veya metilsiklopropil olabilir; bunların her biri, isteğe bağlı olarak bir veya birden çok halojen (örneğin, flor) ile süstitüe edilir.

H formüllü bileşikte R'', C₁-C₆ alkil (örneğin, metil, etil, n-propil, i-propil, n-bütil, i-bütil veya t-bütil), benzil, sikloheksil veya metilsiklopropil olabilir; bunların her biri, isteğe bağlı olarak bir veya birden çok halojen (örneğin, flor) ile süstitüe edilir.

Bir düzenlemede, yukarıda belirtilen bileşik aşağıdaki stereokimyaya sahiptir:



Başka bir düzenleme, bu buluşun bir bileşiğini ve farmasötik olarak uygun bir eksipiyayı içeren bir farmasötik bileşimdir. Bir düzenlemede farmasötik bileşim, bir nörolojik

- 5 hastalığı tedavi etmek için bileşiğin etkili bir miktarını içerir. Farmasötik bileşim, bir tablet veya kapsül gibi bir birim dozaj formu olabilir.

Başka bir düzenleme, bir hastada pantotenat kinaz ilişkili nörodejenerasyonun tedavisi için bir usulde kullanıma yönelik bir bileşiktir. Usul, bu buluşun bir bileşiğinin etkili bir miktarının hastaya verilmesini içerir. Hasta, beyinde demir birikimi içeren

- 10 nörodejenerasyondan muzdarip olabilir.

Başka bir düzenleme, bir hastada anormal nöronal fonksiyon ile nitelenen bir patolojisi olan hücreleri veya dokuyu tedavi etmeye yönelik bir usulde kullanım için bir bileşiktir.

Usul, bu buluşun bir bileşiğinin etkili bir miktarının hastaya verilmesini içerir. Patoloji distoni, ekstrapiramidal etkiler, disfaji, uzuvlarda rijidite ve/veya sertlik, koreoatetoz,

- 15 titreme, demans, spastisite, kas zayıflığı ve felç arasından seçilebilir.

Başka bir düzenleme, pantoten kinaz enzimi ile ilişkili gen bozukluğundan kaynaklanan işlevsiz nöronal hücreler ile nitelenen bir patolojisi olan hücrelerin veya dokunun tedavi edilmesine yönelik bir usulde kullanım için bir bileşiktir. Usul, bu buluşun bir bileşiğinin etkili bir miktarının hastaya verilmesini içerir.

- 20 Başka bir düzenleme, bir hastada pantoten kinaz enzimi ile ilişkili gen bozukluğundan kaynaklanan işlevsiz nöronal hücreler ile nitelenen bir patolojinin tedavi edilmesine yönelik bir usulde kullanım için bir bileşiktir. Usul, bu buluşun bir bileşiğinin etkili bir miktarının hastaya verilmesini içerir.

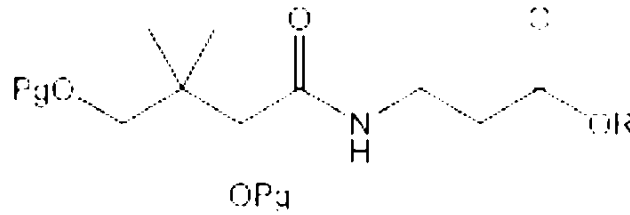
Başka bir düzenleme, pantoten kinaz enzimi ile ilişkili gen ekspresyonu bozukluğundan kaynaklanan işlevsiz nöronal hücreler ile nitelenen bir patolojisi olan hücrelerin veya dokunun tedavi edilmesine yönelik bir usulde kullanım için bir bileşiktir. Usul, bu buluşun bir bileşiğinin etkili bir miktarının hastaya verilmesini içerir.

- 5 Başka bir düzenleme, aşırı demir birikimi olan nöronal hücrelere sahip bir hastayı tedavi etmeye yönelik bir usulde kullanım için bir bileşiktir. Usul, bu buluşun bir bileşiğinin etkili bir miktarının hastaya verilmesini içerir.

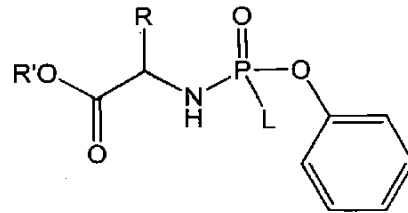
Yukarıda belirtilen usullerde hasta, bir çocuk (örneğin 10 ila 15 yaşında) veya bir yetişkin olabilir.

- 10 G veya H formüllü bir bileşik, aşağıdaki gibi hazırlanabilir:

- (a) pantotenik asidin her iki hidroksil grubunun korunması;
 (b) korunmuş pantotenik asidin asit molekül parçasının, aşağıdaki formüle sahip bir bileşiği oluşturmak üzere esterleştirilmesi:



- 15 burada her Pg, bağımsız olarak bir koruyucu grubu belirtir ve R", G veya H formülüne ilişkin olarak yukarıdaki gibi tanımlanmıştır;
 (c) hidroksil gruplarının korumasının kaldırılması;
 (d) koruması kaldırılan bileşiğin, aşağıdaki formüle sahip bir bileşikle fosforlanması:

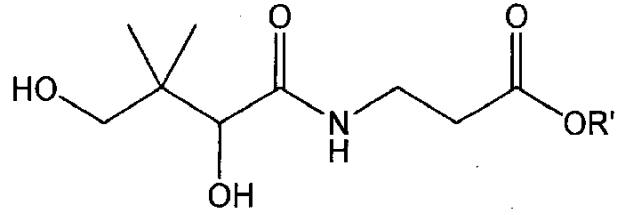


- 20 burada L, bir ayrılan gruptur (örneğin, kloro gibi halojen) ve R ve R', G veya H formülüne ilişkin olarak yukarıdaki gibi tanımlanmıştır ve
 (e) isteğe bağlı olarak, (d) aşamasında oluşan bileşiğin bir tuzunun oluşturulması.

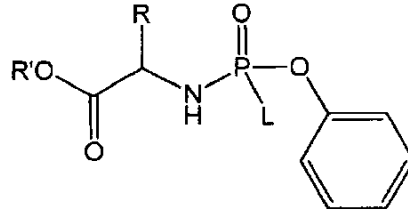
G veya H formüllü bir bileşik, aşağıdaki gibi de hazırlanabilir:

- (a) pantotenik asidin, aşağıdaki formüle sahip bir bileşiği oluşturmak üzere, R"OH formüllü bir alkolle esterleştirilmesi:

25



- burada R'', G veya H formülüne ilişkin olarak yukarıdaki gibi tanımlanmıştır;
 (b) esterleştirilmiş bileşiğin, aşağıdaki formüle sahip bir bileşikle forforlanması:



- 5 burada L, bir ayrılan gruptur (örneğin, halojen) ve R ve R', G veya H formülüne ilişkin olarak yukarıdaki gibi tanımlanmıştır ve
 (c) isteğe bağlı olarak, (b) aşamasında oluşan bileşiğin bir tuzunun oluşturulması.
 Aşama (a)'daki esterifikasyon, pantotenik asidin Fischer esterifikasyon koşullarına tabi tutulması vasıtasıyla gerçekleştirilebilir.

10 **Sekillere Yönelik Özet Açıklama**

Şekil 1, Örnek 2, 5, 7 ve 12'nin bileşikleriyle tedavinin ardından, insan HEK 293T hücrelerinde, kütle spektrometrisi vasıtasıyla ölçülen asetil CoA seviyelerini gösteren bir çubuk grafikidir.

- 15 Şekil 2, tedavi görmemiş Pank^{1+/+} farelerde (WT), tedavi görmemiş Pank^{1-/-} inaktif edilmiş farelerde (pank1KO) ve PANK inaktif edilmiş farelerde, Örnek 2'deki bileşik uygulandıktan sonra (Pank KO + Örnek 2), mBBR CoA seviyelerini gösteren bir çubuk grafikidir.

Buluşun Detaylı Açıklaması

Tanımlar

- 20 Burada kullanıldığı şekliyle, bazı öğeler aşağıdaki tanımlanmış anlamlara sahiptir:
 Tarifnamede ve istemlerde kullanıldığı şekliyle, bağlam açıkça başka türlü dikte etmediği sürece, "bir" in tekili, çoğul referansları kapsar. Örneğin, "bir hücre" terimi, hücrelerin karışımları dahil, birçok hücreyi kapsar. Benzer şekilde, ilaçların burada tarif edildiği gibi hazırlanmasında tedaviye yönelik "bir bileşiğin" kullanımı, bağlam açıkça başka türlü dikte

etmediği sürece, bu tedavi veya hazırlama için bir veya birden çok bileşiğin kullanımını gerektirir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "içeren" teriminin, bileşimlerin ve usullerin, atıfta bulunulan elemanları içerdiği, ancak başkalarını dışlamadığı anlamını belirtmesi amaçlamıştır

- 5 Dolayısıyla, esasen burada tanımlanan elemanlardan oluşan bir bileşim, ayırma ve saflaştırma usulünden iz kontaminantları ve fosfat tamponlu tuzlu su çözeltisi, koruyucu maddeler gibi farmasötik olarak uygun taşıyıcı maddeleri dışlamayacaktır. "Oluşan" terimi, buluşun bileşimini uygulamak için, diğer bileşenlerin iz elementlerinden ve önemli usul aşamalarından fazlasının hariç tutulması anlamına gelir. Geçiş terimlerinden her biri
- 10 tarafından tanımlanan düzenlemeler, bu buluşun kapsamı içindedir.

- "Alkil" terimi, sadece karbon ve hidrojen atomlarından oluşan, doymamışlık içermeyen bir düz veya dallanmış hidrokarbon zincir radikale atıfta bulunur. Farklı şekilde belirtilmediği sürece "alkil" terimi, bir ila sekiz karbon atomuna (örneğin, bir ila altı karbon atomuna veya bir ila dört karbon atomuna) sahip olan ve molekülün geri kalanına
- 15 tek bir bağ ile bağlı olan bir gruba atıfta bulunur. Alkil gruplarının örnekleri, metil, etil, n-propil, i-propil, n-bütil, t-bütil, s-bütil, n-pentil ve s-pentili içerir.

- "Alkenil" terimi, bir karbon-karbon çift bağını içeren ve lineer veya dallanmış bir zincir olabilen bir alifatik hidrokarbon grubuna atıfta bulunur. Farklı şekilde belirtilmediği sürece "alkenil" terimi, 2 ila yaklaşık 10 karbon atomuna sahip bir gruba, örneğin etenil, 1-propenil, 2-propenil (alil), iso-propenil, 2-metil-1-propenil, 1-bütenil ve 2-bütenile atıfta
- 20 bulunur.

- "Alkinil" terimi, en az bir karbon-karbon üçlü bağına sahip bir düz veya dallanmış zincir hidrokarbil radikale atıfta bulunur. Farklı şekilde belirtilmediği sürece "alkinil" terimi, 2 ila yaklaşık 12 arasında karbon atomuna (örneğin, 2 ila 10 karbon atomuna) sahip bir
- 25 gruba, örneğin etinil, propinil ve bütinile atıfta bulunur.

"Sikloalkil", siklopropil, siklobütil, siklopentil ve sikloheksil gibi yaklaşık 3 ila yaklaşık 12 karbon atomuna sahip aromatik olmayan, mono veya multisiklik bir halka sistemini belirtir.

- "Sikloalkilalkil" terimi, bir alkil grubuna doğrudan bağlı yaklaşık 3'ten 8'e kadar olan
- 30 aralıktaki karbon atomu içeren radikali içeren bir siklik halkaya atıfta bulunur; alkil grubu

ana yapıya, alkil grubundaki herhangi bir karbondan bağlanır; bunun sonucunda, siklopropilmetil, siklobütiletil ve siklopentiletil gibi stabil bir yapı oluşur.

"Aril" terimi, fenil, naftil, tetrahidronaftil, indanil ve bifenil gibi, 6 ila 20 arasında karbon atomuna sahip bir mono- veya multi-siklik aromatik radikale atıfta bulunur.

- 5 "Arilalkil" terimi, yukarıda tanımlanan gibi bir alkil grubuna doğrudan bağlı, yukarıda tanımlanan gibi bir aril grubuna atıfta bulunur; örneğin $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, ve $-\text{C}_2\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_5$.

"Heterosiklik" terimi, karbon atomlarından ve azot, fosfor, oksijen ve kükürtten seçilen en az bir heteroatomdan oluşan aromatik olmayan 3 ila 15 elemanlı bir halka radikale atıfta bulunur. Heterosiklik halka radikali, kaynaşmış, köprülü veya spiro halka sistemlerini içerebilen bir mono-, bi-, tri- veya tetrakisiklik halka sistemi olabilir ve heterosiklik halka radikalindeki azot, fosfor, karbon, oksijen veya kükürt atomları, isteğe bağlı olarak farklı oksidasyon durumlarına oksitlenebilir. Buna ek olarak, azot atomu isteğe bağlı olarak kuaternize edilebilir.

- 15 "Heterosiklikalkil" terimi, yukarıda tanımlanan gibi bir alkil grubuna doğrudan bağlı, yukarıda tanımlanan gibi bir heterosiklik grubuna atıfta bulunur.

"Heteroaril" terimi, halka atomları olarak N, O ve S'den seçilen bir veya birden fazla heteroatoma sahip, isteğe bağlı olarak süstitüe edilmiş 5-14 elemanlı bir aromatik halkaya atıfta bulunur. Heteroaril, bir mono-, bi- veya trisiklik halka sistemi olabilir. Bu gibi heteroaril halka radikallerinin örnekleri, oksazolil, tiazolil imidazolil, pirolil, furanil, 20 piridinil, pirimidinil, pirazinil, benzofuranil, indolil, benzotiazolil, benzoksazolil, karbazolil, kinolil ve izokinolil içerir.

"Heteroarilalkil" terimi, yukarıda tanımlanan gibi bir alkil grubuna doğrudan bağlı, yukarıda tanımlanan gibi bir aril grubuna atıfta bulunur; örneğin $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{N}$ ve $-\text{C}_2\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_4\text{N}$.

- 25 "Halojen" terimi, F, Cl, Br ve I'yi içerir.

"Amino asit yan zinciri" terimi, $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{R})-\text{COOH}$ formüllü bir alfa amino asidin yan zincirine (R) atıfta bulunur. Örneğin, metilin yan zinciri alanindir, glisin yan zinciri hidrojenidir, valinin yan zinciri izo-propildir ve triptofanın yan zinciri (1*H*-indol-3-il)metildir. Bu buluşun bileşiklerindeki uygun amino asit yan zincirleri, proteinojenik amino asitler dahil, doğal amino asitlerin yan zincirlerini kapsar. Doğal amino asitlerin sınırlayıcı olmayan örnekleri, standart amino asitleri veya proteinojenik amino asitleri

içerir; bunlar alanin, arginin, asparagin, aspartik asit, sistein, glutamik asit, glutamin, glisin, histidin, izolösin, lösin, lisin, metiyonin, fenilalanin, prolin, pirolisin, selenosistein, serin, treonin, triptofan, tirosin ve valini içerir.

"Süstitüe edilmiş" terimi, farklı şekilde belirtilmediği sürece, aşağıdaki süstitüentlerden

- 5 herhangi biri veya herhangi bir kombinasyonu ile süstitüsyona atıfta bulunur: hidrojen, hidroksi, halojen, karboksil, siyano, nitro, okso (=O), tio (=S), alkil, alkoksi, alkenil, alkinil, aril, arilalkil, sikloalkil, sikloalkenil, aril, heterosiklil, heteroaril, -COOR^x, -C(O)R^x, -C(S)R^x, -C(O)NR^xR^y, -C(O)ONR^xR^y, -NR^yR^z, -NR^xCONR^yR^z, -N(R^x)SOR^y, -N(R^x)SO₂R^y, -(=N-N(R^x)R^y), -NR^xC(O)OR^y, -NR^xR^y, -NR^xC(O)R^y-, -NR^xC(S)R^y -
- 10 NR^xC(S)NR^yR^z, -SONR^xR^y-, -SO₂NR^xR^y-, -OR^x, -OR^xC(O)NR^yR^z, -OR^xC(O)OR^y-, -OC(O)R^x, -OC(O)NR^xR^y, -R^xNR^yC(O)R^z, -R^xOR^y, -R^xC(O)OR^y, -RC(O)NR^yR^z, -R^xC(O)R^x, -R^xOC(O)R^y, -SR^x, -SOR^x, -SO₂R^x, ve -ONO₂; burada yukarıdaki gruplardan herhangi birindeki R^x, R^y ve R^z, hidrojen atomu, alkil, alkoksi, alkenil, alkinil, aril, arilalkil, sikloalkil, sikloalkenil, amino, aril, heteroaril, heterosiklil olabilir veya R^x, R^y ve
- 15 R^z'den herhangi ikisi, isteğe bağlı olarak aynı veya farklı olabilen ve O, NH veya S'den seçilen heteroatomlar içerebilen, doymuş veya doymamış 3-10 elemanlı bir halkayı oluşturmak üzere birleştirilebilir. Bir düzenlemede, süstitüe edilmiş terimi, bir veya birden çok halojen (örneğin, flor) ile süstitüsyona atıfta bulunur.

- "Hasta" terimi, bir evcil hayvan (örneğin, bir köpek veya bir kedi) veya insan gibi bir
- 20 memeliye atıfta bulunur. Tercihen, hasta bir insandır.

"Etkili miktar" ifadesi, bir süjeye veya hastaya bir hastalığı tedavi etmek için uygulandığında, hastalığın bu tedavisini etkilemeye yetecek miktara atıfta bulunur.

- "Tedavi" veya "tedavi etme", (1) bir hastalığın patolojisine veya semptomatolojisine maruz kalan bir süjede veya hastada, hastalığın engellenmesini (örneğin, patolojinin ve/veya
- 25 semptomatolojinin daha da gelişmesinin durdurulmasını), (2) bir hastalığın patolojisine veya semptomatolojisine maruz kalan bir süjede veya hastada, hastalığın iyiye gitmesini (örneğin, patolojinin ve/veya semptomatolojinin gerilemesini) (3) bir hastalığın patolojisine veya semptomatolojisine maruz kalan bir süjede veya hastada, hastalıkta ölçülebilir herhangi bir azalmanın gerçekleşmesini içerir.

Farmasötik Formülasyonlar ve Uygulama Yolları

Bu buluşun bileşikleri, ağızdan ve enjeksiyon vasıtasıyla (örneğin deri altından, intravenöz ve intraperitoneal olarak) dahil, çeşitli yollarla verilebilir.

Bileşikler ağızdan, bir katı veya sıvı dozaj formunda verilebilir. Her ikisinde bileşik, onu etkisiz hale getirebilecek asitlerin etkisinden ve başka doğal koşullardan korumak için bir malzeme ile kaplanabilir. Bileşikler, sulu çözeltiler, sıvı dağılımlar, (hazmedilebilir) tabletler, ağız içi tabletler, troşlar, kapsüller, eliksirler, süspansiyonlar, şuruplar ve yassı haplar olarak formüle edilebilir. Oral dozaj formları, bağlayıcı maddeler, parçalayıcı maddeler, tat verici maddeler, antioksidanlar ve koruyucu maddeler gibi teknikte bilinen ekspiyanları içerebilir. Sıvı dozaj formları, tuzlu su çözeltisi veya bir sulu tampon gibi seyreltici maddeler içerebilir.

Bileşikler ayrıca, enjeksiyon vasıtasıyla uygulanabilir. Enjeksiyon için uygun formülasyonlar, (suda çözünür olduğu durumda) steril sulu çözeltileri veya dağılımları ve steril enjektabl çözeltilerin veya dağılımların anında hazırlanması için steril tozları

içerebilir. Bileşim, steril olabilir ve şırınga ile kolayca uygulanabilirliğinin mevcut olduğu ölçüde akışkan olmalıdır. İmalat ve depolama koşulları altında stabil olabilir ve bakteriler ve mantarlar gibi mikroorganizmaların kontamine edici etkisine karşı korunmuş olmalıdır.

Taşıyıcı madde, örneğin su, etanol, poliol (örneğin gliserol, propilen glikol ve sıvı polietilen glikol) ve bunların uygun karışımlarını içeren bir çözücü madde veya dağılım ortamı olabilir. Doğru akışkanlık, örneğin lesitin gibi bir kaplamanın kullanımı vasıtasıyla, dağılım durumunda gerekli partikül boyutunun korunması vasıtasıyla ve yüzey aktif maddelerin kullanımı vasıtasıyla korunabilir. Mikroorganizmaların etkisinin önlenmesi, çeşitli antibakteriyel ve antifungal maddeler, örneğin parabenler, klorobütanol, fenol ve askorbik asit vasıtasıyla elde edilebilir. Birçok durumda, bileşime izotonik maddelerin, örneğin şekerlerin, sodyum klorürün veya manitol ve sorbitol gibi polialkollerin dahil edilmesi tercih edilecektir. Enjektabl bileşimlerin uzatılmış emilişi, bileşime emişi geciktiren bir maddenin, örneğin alüminyum monostearatın veya jelatinin dahil edilmesiyle gerçekleştirilebilir.

Steril enjektabl çözeltiler, terapötik bileşiğin gerektiğinde, yukarıda belirtilen bileşenlerden biri veya bunların bir kombinasyonu ile birlikte uygun bir çözücü madde içine gereken miktarda katılması, ardından filtrasyonlu sterilizasyon ile hazırlanabilir. Genellikle dağılımlar, terapötik bileşiğin, temel bir dağılım ortamını ve yukarıda belirtilen gerekli

olan başka bileşenleri içeren bir steril taşıyıcı maddenin içine katılması vasıtasıyla hazırlanır. Steril enjektabl çözeltilerin hazırlanmasına yönelik steril tozlar durumunda hazırlama usulleri, aktif bileşenin (yani terapötik bileşiğin) artı daha önceden steril olarak filtrelenmiş çözeltiden istenen ek herhangi bir bileşenin bir tozunu veren vakumlu

5 kurutmayı ve dondurarak kurutmayı içerir.

Bir hastaya uygulanan bileşiğin gerçek dozaj miktarı, yaş, cinsiyet, vücut ağırlığı, hastalığın şiddeti, tedavi edilecek hastalığın tipi, önceki veya eş zamanlı terapötik müdahaleler, hastanın idyopatisi ve uygulama yolu gibi fiziksel ve fizyolojik faktörler vasıtasıyla belirlenebilir. Bu faktörler, teknikte uzman bir kişi tarafından belirlenebilir.

10 Uygulamadan sorumlu pratisyen doktor, bileşimdeki aktif bileşenin (bileşenlerin) konsantrasyonunu ve tekil hasta için uygun dozu (dozları) tipik olarak belirleyecektir.

Bir düzenlemede, bir insan hastaya yaklaşık 0,01 mg/kg ila yaklaşık 100 mg/kg'lık günlük dozlar verilmektedir.

Bileşiklerin tek veya birden fazla dozları düşünülmüştür. Birden çok dozun verilmesi için
15 istenen zaman aralıkları, teknikte sıradan uzmanlık sahibi kişi tarafından sadece rutin testler kullanılarak belirlenebilir. Örnek olarak, hastalara yaklaşık 12 saat ara ile günlük iki doz verilebilir. Bazı düzenlemelerde, bileşik günde bir kez verilir.

Bileşikler, bir rutin programa göre verilebilir. Burada kullanıldığı şekliyle, rutin program, önceden belirlenmiş bir zaman periyoduna atıfta bulunur. Rutin program, önceden
20 belirlenmiş olduğu sürece, aynı olan veya uzunluğu farklı olan zaman periyodlarını kapsayabilir. Örneğin, rutin program, günden iki kez, her gün, iki günde bir, üç günde bir, dört günde bir, beş günde bir, altı günde bir, haftalık bazda, aylık bazda veya arada kalan belirlenmiş herhangi bir gün veya hafta sayısı bazında verilmesini içerebilir. Alternatifli olarak, önceden belirlenmiş rutin program, birinci hafta boyunca günde iki kez bazında,
25 ardından birkaç ay boyunca günlük bazda verilmesini içerebilir. Başka düzenlemelerde buluş, maddenin (maddelerin) ağızdan alınabilmesini ve zamanlamasının gıda alımına bağımlı olmamasını öngörür. Dolayısıyla, örneğin madde, hastanın ne zaman yediğini veya yiyeceğini dikkate almadan, her sabah ve/veya her akşam alınabilir.

Kombine tedavi

30 Bileşikler, monoterapi olarak kullanımlarına ek olarak, kombine terapilerde de kullanım alanı bulurlar. Etkili kombine tedavi, her iki maddeyi içeren tek bir bileşim veya

farmakolojik formülasyonla veya aynı anda uygulanan iki farklı bileşim veya formülasyonla gerçekleştirilebilir; burada bir bileşim bu buluşun bir bileşiğini ve diğeri ikinci maddeyi (maddeleri) içerir. Alternatifli olarak terapi, dakikalar ila aylar arasında değişen aralıklarla, diğere madde tedavisinden önce veya sonra uygulanabilir.

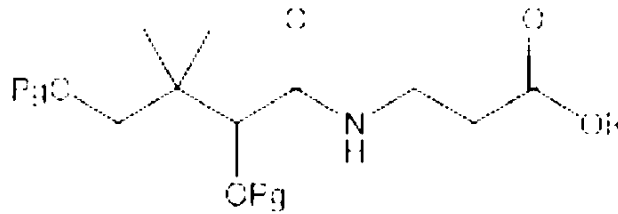
- 5 Ek madde veya maddeler, bir nörolojik hastalığı tedavi etmek için yararlı herhangi bir madde veya maddelerden, örneğin pantotenat kinaz, 4'-fosfopantotenat veya Koenzim A eksikliğini tedavi etmek için yararlı herhangi bir madde veya maddelerden seçilebilir. Bir düzenlemede, ek madde veya maddeler, bilişsel fonksiyonun geliştirilmesinde yararlıdır: örnek olarak, fizostigmin, neostigmin, piridostigmin, ambenonyum, demarkaryum,
- 10 rivastigmin, galantamin, donezepil ve bunların kombinasyonları gibi bir asetilkolinesteraz inhibitörü sayılabilir. Başka bir düzenlemede, ek madde veya maddeler, deferipron, deferoksamin, deferasiroks gibi bir demir şelatlaştırıcı madde ve bunların kombinasyonlarıdır.

Fosfopantotenat Türevlerinin Sentezi

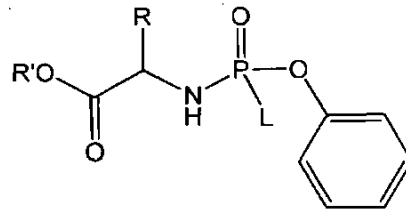
- 15 Bu buluşun bileşikleri, kolaylıkla elde edilebilen pantotenik asitten (vitamin B5) hazırlanabilir. Pantotenik asidin sentezi, örneğin 2,676,976 ve 2,870,188 sayılı ABD Patentlerinde açıklanmıştır.

G formüllü bileşik aşağıdaki şekilde hazırlanabilir: (a) pantotenik asidin her iki hidroksil grubunun korunması; (b) korunmuş pantotenik asidin asit molekül parçasının, aşağıdaki

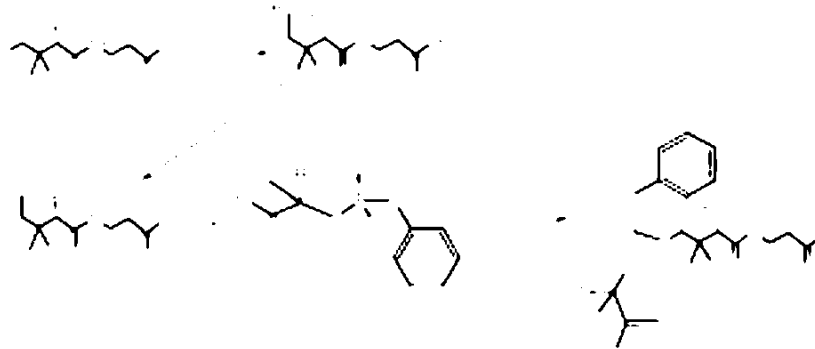
- 20 formüle sahip bir bileşiği oluşturmak üzere esterleştirilmesi:



burada Pg, bağımsız olarak bir koruyucu grubu belirtir ve R", G formülüne ilişkin olarak yukarıdaki gibi tanımlanmıştır; (c) hidroksil gruplarının korunmasının kaldırılması; (d) korunması kaldırılan bileşiğin, aşağıdaki formüle sahip bir bileşikle fosforlanması:



burada L, bir ayrılan gruptur (örneğin, halojen) ve R ve R', G formülüne ilişkin olarak yukarıdaki gibi tanımlanmıştır ve (e) isteğe bağlı olarak, (d) aşamasında oluşan bileşiğin bir tuzunun oluşturulması. Bu reaksiyon şeması aşağıda gösterilmiştir (burada L, Cl'dir):



5

(Not: son aşamadaki R¹ hidrojen olabilir)

Koruma aşaması (a), pantotenik asit, uygun asetali vermek üzere benzaldehit ve çinko klorürle işlenerek gerçekleştirilebilir (T. W. Green ve P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley-Interscience, New York, 1999, 217-224, 716-719). Pantotenik asit ayrıca, uygun asidi vermek üzere aseton ve tolüen sülfonik asitle işlem görmesi vasıtasıyla korunabilir (M. Carmack ve C. J. Kelley, "Synthesis of optically active Cleland's reagent [(-)-1,4-dithio-L-threitol]", *J. Org. Chem.*, 1968, 33, 2171-2173). Başka bir örnekte, pantotenik asit, di-*O*-benzillenmiş pantotenik asidi vermek üzere sodyum hidrürle, ardından benzil bromürle işlem görür (T. W. Green ve diğerleri, *supra*).

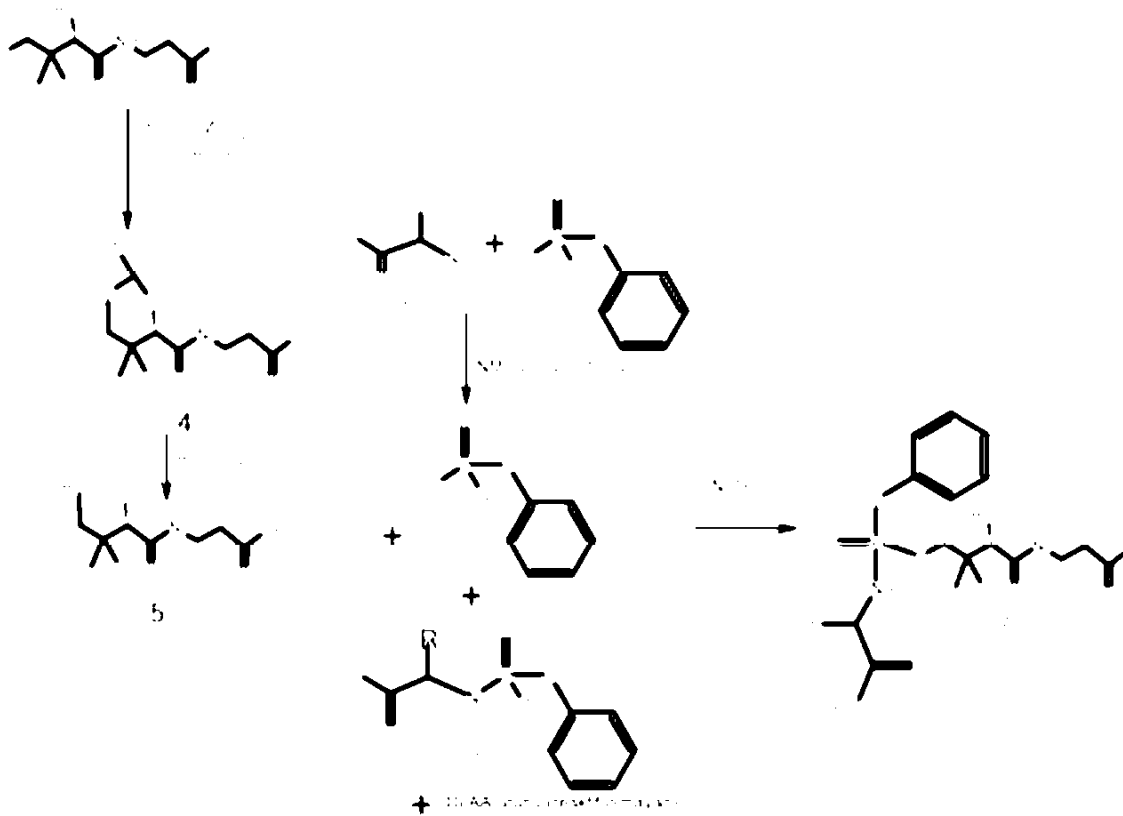
- 15 Hidroksil gruplarının korumasının kaldırılmasından sonra, bir esterin (R") oluşması, örneğin, koruması kaldırılan pantotenik asidin, uygun bir alkol ve disikloheksildikarbodimid (DCC) veya dietilazodikarboksilat (DEAD) ve trifenilfosfinle reaksiyona girmesi vasıtasıyla gerçekleştirilebilir (bir Mitsunobu reaksiyonu). Alternatifli olarak, korunmuş pantotenik asit, (örneğin, tiyonil klorür veya oksalil klorürle) uygun asit
- 20 klorüre dönüştürülebilir, ardından uygun alkolle işlem görebilir.

Korumanın kaldırılması, T. W. Green ve diğerleri, *supra*'da açıklanan gibi, teknikte bilinen herhangi bir usulle gerçekleştirilebilir.

Aşama (a) ila (c)'ye alternatif olarak pantotenik asit, R"OH formüllü bir alkolle, örneğin pantotenik asit Fischer esterifikasyon koşullarına (yani, alkol fazlası ve geriye akış altında katalitik asit) tabi tutularak esterleştirilebilir.

Aşama (c)'de oluşan bileşiğin birincil hidroksil grubu, seçici şekilde fosforlanabilir.

- 5 (Bakınız J. D. Patrone, J. Yao, N. E. Scott, ve G. D. Dotson, "Selective Inhibitors of Bacterial Phosphopantothenoylcysteine Synthetase", J. Am. Chem. Soc., 2009, 131, 16340-16341). D. M. Lehsten, D. N. Baehr, T. J. Lobl, ve A. R. Vaino, "An Improved Procedure for the Synthesis of Nucleoside Phosphoramidates", Organic Process Research & Development, 2002, 6, 819-822'de tarif edilen koşullar, bu reaksiyon için kullanılabilir.
- 10 Bu usul, fosforilasyon reaktif maddesini hazırlamak için bir usulle birlikte, aşağıda gösterilmiştir.



İsteğe bağlı olarak, nihai ürünün veya aşamalar arasında, ara ürünlerden birine kiral separasyonu uygulanarak, optik olarak saf bir ürün elde edilebilir.

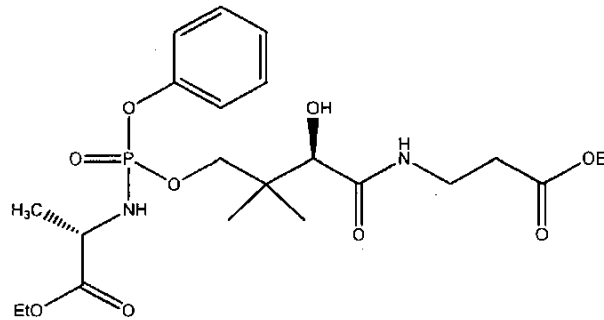
- 15 Alternatif olarak, bu buluşun bileşikleri, B. S. Ross, P. G. Reddy, H.-R. Zhang, S. Rachakonda, ve M. J. Sofia, "Synthesis of Diastereomerically Pure Nucleotide Phosphoramidates", J. Org. Chem., 2011, 76, 8311-8319'de açıklanan yolla hazırlanabilir.

Bu yolla, bir nihai kiral separasyon aşaması uygulanmadan, optik olarak saf bir ürün elde edilebilir.

Örnekler

Referans Örnek 1

- 5 Etil-3-((2R)-4-((((S)-1-etoksi-1-oksopropan-2-il)amino)(fenoksi) fosforil)oksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbütanamido)propanoatın sentezi

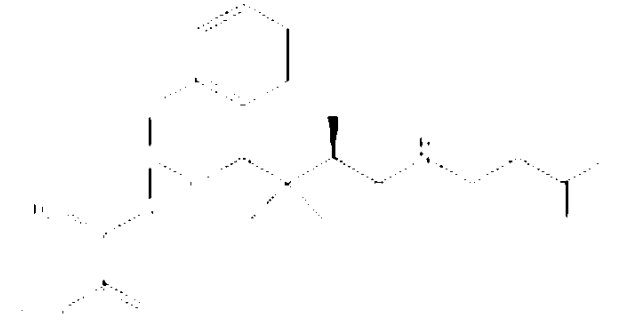


- L-Alanin etil ester hidroklorür (0,50 g, 3,25 mmol), 10 mL CH₂Cl₂'de süspansiyon haline getirilmiş ve -10°C'ta ve azot atmosferi altında, fenil fosforodikloridat (0,50 mL, 3,35 mmol) ile işlem görmüştür. İyi karıştırılan karışım daha sonra, N-metilimidazol (1,0 mL, 12,5 mmol) ile damla damla işlem görmüştür. 1 saat sonra ve yine -10 °C'ta, 3 mL CH₂Cl₂'ye etil pantotenat (0,70 g, 2,8 mmol) yavaş yavaş ilave edilmiştir. Bu karışımın oda sıcaklığına ısınmasına izin verilmiş ve 3 saat sonra, 2 mL metanol ilave edilmiştir. Ekstraksiyon ardışık olarak, 1 M HCl, su, % 5 NaHCO₃ ve tuzlu su ile gerçekleştirilmiştir.
- 15 Organik faz kurutulmuş (Na₂SO₄) ve çözücü madde, 1,11 g berrak, renksiz bir şurup vererek buharlaşmıştır. Bu malzeme, 30 g silis jeli kullanılarak ve % 5 EtOH içeren 1:1 EtOAc/heksan ile ayrıştırılarak, ani kolon kromatografisi vasıtasıyla saflaştırılmıştır. İşlem, 1,1 g fosforamidat elde edilinceye kadar tekrarlanmıştır. HPLC ürünü, % 97 saflığa sahip, bir 1:1 dizastereomer karışımı olarak göstermiştir. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1,08 (s, 3H, CH₃), 1,21 (d, 3H, *J* = 2,7 Hz, CH₃), 1,27 (m, 6H, CH₃), 1,35 (t, 3H, *J* = 6,9 Hz, CH₃), 2,53 (q, 2H, *J* = 4,2 Hz, CH₂), 3,50 (m, 2H, CH₂), 3,60 (m, 1H, CH), 3,78 (d, *J* = 7,5 Hz, CH), 3,9 (m, 2H, CH₂), 4,10 (m, 6H, CH₂), 4,79 (t, 1H, *J* = 6,5 Hz, CH), 7,15 ve 7,40 (2Ms, 5H, Ph). Beklenen Mol Ağırlığı 502,21, Gözlemlenen Mol Ağırlığı 503,09 [M + H⁺].

- 25 Örnek 2

Metil-3-((2R)-2-hidroksi-4-((((S)-1-metoksi-1-oksopropan-2-il)amino)(fenoksi)

fosforil)oksi)-3,3-dimetilbütanamido)propanoatın sentezi



L-Alanin metil ester hidroklorür (1,35 g, 9,65 mmol), diklorometanda (20 mL) süspansiyon haline getirilmiş ve -78 °C'ta argon atmosferi altında, fenil fosforodikloridat (1,51 mL, 10,15 mmol) ile işlem görmüştür. Diizopropiletilamin (2,6 mL, 20,27 mmol), damla damla ilave edilmiştir. Karışım, -78°C'ta 30 dakika boyunca karıştırılmış, ardından 1 saat boyunca oda sıcaklığına ısınmasına izin verilmiştir. Karışım, -5°C'a soğutulmuş ve metil pantotenat (1,6 mL, 20,27 mmol), diklorometana damla damla ilave edilmiştir. *N*-metilimidazol (1,6 mL, 20,27 mmol) ilave edilmiş ve 30 dakika boyunca -5°C'ta ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra, 2 mL metanol ilave edilmiştir. Karışım, ardışık olarak su (30 mL), % 5 sitrik asit (30 mL) ve tuzlu su (10 mL) ile yıkanmıştır. Organik faz kurutulmuş (Na₂SO₄) ve çözücü madde, düşük basınç altında giderilmiştir. Saflaştırma, berrak renksiz bir yağ halinde ürün verecek şekilde, 1:1 EtOAc:heksan karışımı ile elde edilmiştir. (1,1 g, % 24 verim). HPLC ürünü, % 97 saflığa sahip, bir 1:1 dizastereomer karışımı olarak göstermiştir. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1,11 (s, 3H, CH₃), 1,27, 1,39 ve 1,40 (2 ss, 3H, CH₃), 1,41 (örtüşen d, 3H, *J* = 1,2 Hz, CHCH₃), 3,55 (m, 2H, CH₂), 3,60 (m, 1H, CH₂), 3,63 (m, 1H, CH), 3,66 ve 3,68 (2 ss, 3H, COCH₃), 3,70 ve 3,74 (2 ss, 3H, COCH₃), 3,78 (m, 1H, CH), 4,03 (m, 1H, CH), 4,17 (m, 1H, CH), 7,16 ve 7,35 ve 7,40 (2 Ms, 5H, Ph). Beklenen Mol Ağırlığı 474,18, Gözlemlenen Mol Ağırlığı 475,03 [M + H⁺].

Referans Örnek 3-14

Aşağıdaki tabloda gösterilen bileşikler, uygun başlangıç malzemeleri kullanılarak, Referans Örnek 1 ve 2'de belirtilen sentetik prosedürlere göre hazırlanmıştır.

Referans Örnek	R (Amino asit)	R'	R''	İzole Edilen Kütle (g)	Safılık (%)	Beklenen Mol. Ağırlığı	Gözlemlenen Mol Ağırlığı [M+H ⁺]
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
9	i-Pr (L-Val)	Et	Et	0,39	94	530,24	531,14
10	Melndol (L-Trp)	Me	Me	1,43	95	589,22	590,16
11	Melndol (L-Trp)	Et	Et	0,45	95	617,25	618,21
12	Melndol (L-Trp)	Bn	Et	0,47	91	679,27	680,17
13	Melndol (L-Trp)	Et	Bn	1,33	95	679,27	680,17
14	Melndol (L-Trp)	Bn	Bn	0,13	90	741,28	742,24

Örnek 15: *In Vitro* Bakteri Testi

SJ16 *Escherichia coli*'inin, çoğalmak için pantotenik asit ilavesine ihtiyaç gösteren bir suşudur (yani, pantotenik asit gayrı faal olacak şekilde bir mutasyona sahiptir). Dolayısıyla bu test, bir bileşiğin, PKAN'ın nedeni olan yetersiz PANK'ı olan bir organizmayı kurtarıp kurtaramayacağını belirlenmesinde yararlı bir deney işlevini görür. Bu buluşun bileşikleri, toksisite ve izin veren ve vermeyen koşullar altında, *Escherichia coli* K-12 suşları SJ16'yı (bakınız örneğin, Jackowski ve diğerleri, J. Bacteriol., 148, 926-932, 1981) ve DV70'yi (bakınız örneğin, Vallari ve diğerleri, J. Bacteriol., 169, 5795-5800, 1987) büyütme kabiliyeti açısından test edilmiştir. Bir çözücü maddedeki (dimetilsülfoksit, DMSO) test bileşiği, büyüme ortamına, 8 µM nihai konsantrasyonda ilave edilmiştir. Büyüme ortamına, kontrol olarak, ≤ % 0,1 µM nihai konsantrasyonda sadece çözücü madde (DMSO) ilave edilmiştir.

SJ16 suşu, agar (% 1,5), M9 minimum ölçüde gerekli tuzlar (bakınız, Miller, Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1972), glikoz (% 0,4) metiyonin (50 µg/ml) içeren ve kalsiyum pantotenat (1 µM) içeren (izin veren) ve içermeyen (izin vermeyen) bir katı ortamda 37°C'ta 18 saat boyunca

- 5 büyütülmüştür. Kalsiyum pantotenat ilavesiyle büyüme olmaması, toksisiteyi göstermiştir. Kalsiyum pantotenat ilavesi olmadan büyüme, bakterilerin, pantotenat veya β-alanin verecek şekilde, bileşiği metabolize etme kabiliyetini göstermiştir.

DV70 suşu, agar (% 1,5), M9 minimum ölçüde gerekli tuzlar, glikoz (% 0,4) metiyonin (50 µg/ml) ve kalsiyum pantotenat (1 µM) içeren bir katı ortamda 30°C'ta (izin veren) veya 10 42°C'ta (izin vermeyen) 18 saat boyunca büyütülmüştür. 30°C'ta büyüme olmaması, toksisiteyi göstermiştir. 42°C'ta büyüme olması, bakterilerin bileşiği metabolize ettiğini ve ardından koenzim A'ya dönüştürdüğünü göstermiştir.

Örnek 2 ve Referans Örnek 5, 7 ve 12'nin bileşikleri için SJ16 toparlanma sonuçları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir. "Evet" sonucu, bakterilerin 18 saat sonra canlı olduklarını 15 belirtir. Örnek 2 ve Referans Örnek 5, 7 ve 12'nin bileşikleri, DV70 suşunun toparlanması ile sonuçlanmamıştır.

Örnek	Kullanılan DMSO	SJ16 Toparlanması
2	< 10%	Evet
5 (Referans)	> 50%	Evet
7 (Referans)	> 60%	Evet
12 (Referans)	> 70%	Evet*
* test bileşiği çökelmiştir		

Örnek 16

Örnek 2 ve Referans Örnek 5, 7 ve 12'nin bileşikleri, ölümsüzleştirilmiş insan hücrelerinde (HEK 293T) test edilmiştir. Örnek 2 ve Referans Örnek 5, 7 ve 12'nin bileşiklerinin 20 uygulanmasından sonra, asetil-CoA miktarı (PANK'ın işlem sonrası sonucu), kütle spektrometrisi vasıtasıyla ölçülmüştür. Sonuçlar Şekil 1'de gösterilmiştir.

Şekil 1'den görülebileceği gibi, HEK 293T hücrelerinin, Örnek 2'nin bileşiğinden 200 µM ile işlem görmesi, asetil CoA'nın referans değeri üzerinde % 42'lik bir artış vermiştir ($p < 0,0005$). HEK 293T hücrelerinin, Referans Örnek 7'nin bileşiğinden 20 µM ile işlem 25 görmesi, asetil CoA'nın referans değeri üzerinde % 38'lik bir artış vermiştir ($p < 0,005$).

Örnek 17: *In Vivo* Test

Buluşun bileşikleri etkinlik açısından, yaşları eşleşen *Pank1*^{+/+} (suş 129SvJ x C57BL/6J) yavrularla kıyaslanan 8-12 hafta yaşında *Pank1*^{-/-} farelerde (suş 129SvJ x C57BL/6J arkaplan) test edilmiştir. Her fare, kodlu bir kulak künyesi ile tanımlanmış ve testin birinci
5 gününde kodlanmıştır. Her bileşik, beş gün boyunca günde bir kez, 5 µL dimetilsülfoksit içinde 1,2 µmol/ g vücut ağırlığı dozunda, intraperitoneal enjeksiyon vasıtasıyla 4-5 fareye 5 gün boyunca verilmiş ve fareler daha sonra gece boyunca aç bırakılmış, tartılmış ve ötenazi uygulanmıştır. Tedavi görmeyen fareler, 5 gün boyunca günde bir kez 5 µL dimetilsülfoksit almış ve ardından gece boyunca aç bırakılarak tartılmış ve ötenazi
10 uygulanmıştır. Karaciğerler her fareden kesilip çıkarılmış, alikotlar sıvı azotta şoklanarak dondurulmuş ve -80° C'ta depolanmıştır. 7 gün içinde karaciğer numuneleri buz üzerinde çözündürülmüş, tartılmış ve aşağıda açıklandığı gibi, koenzim A için analiz edilmiştir. Etkinlik, işlem görmeyen *Pank1*^{-/-} farelerinin karaciğerleri ile kıyaslandığında, *Pank1*^{-/-} farelerin karaciğerlerinde Koenzim A seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışla ve
15 işlem görmeyen *Pank1*^{+/+} farelerinde Koenzim A seviyelerine kıyasla eşdeğerlilik vasıtasıyla belirtilmiştir.

CoA Ölçümleri: Fibroblastların ve Karaciğerin Ekstraksiyonu ve Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisinden (HPLC) önce Koenzim A'nın Türevlendirilmesi

Fibroblastların veya karaciğerin ekstraksiyonu, daha önce açıklanan bir usulün
20 modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir (bakınız, Minkler ve diğerleri, Anal. Biochem., 376, 275-276, 2008). Koenzim A'nın türevlendirilmesi, daha önce açıklanan bir usulün modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir (bakınız, Shimada ve diğerleri, J. Chromatogr. B Biomed. Appl., 659, 227-241, 1994).

Karaciğer (20-50 mg), 2 mL 1 mM KOH içinde homojenleştirilmiş ve pH, 0,25 M KOH ile
25 12'ye ayarlanmıştır. Fibroblastlar kültür kabından kazınmış ve 1 mL suda toplanmış, bu ise 200 µL 0,25 M NaOH'a aktarılmıştır. Karaciğer homojenatı daha sonra, 55°C'ta 2 saat boyunca inkübe edilmiş ve fibroblast hücreleri, 55°C'ta 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. pH, 1 M Trizma-HCl ile pH 8'e ayarlanmış ve 100 mM monobromobimandan (mBBR, Life Technologies, NY) 10 µL, 2 saat boyunca karanlıkta ilave edilmiştir. Reaksiyon asetik asit
30 ile asitleştirilmiş ve 15 dakika boyunca 500 g'da santrifüjlenmiştir. Süpernatant daha sonra, 1 mL % 50 metanol/% 2 asetik asitle dengelenen, bir 2-(2-piridil)etil kolonuna (Supelco) ilave edilmiştir. Kolon, 2 x 1 mL % 50 metanol/% 2 asetik asit ve 1 mL su ile yıkanmıştır.

Numuneler, % 95 etanolde 2 x 1 mL 50 mM amonyum formatla ayrıştırılmıştır.

Numuneler, nitrojen altında buharlaştırılmış ve 300 µL suda yeniden süspansiyon haline getirilmiştir. Örnekler, HPLC'den önce herhangi bir çökteltici maddeyi gidermek için, bir Spin-X Santrifüj Boru Filtrede (0,22 µm Selüloz Asetat, Costar) döndürülmüştür.

5 Koenzim A Miktarının HPLC ile Belirlenmesi

Koenzim A'nın mBBR türevi, Phenomenex (Torrance, CA) ürünü bir Gemini C₁₈ 3 µm kolon (150 x 4,60 mm) kullanılarak, ters faz HPLC vasıtasıyla ayrılmıştır. Kullanılan kromatografi sistemi, bir UV/Vis dedektörlü bir Waters e2695 separasyon modülüdür ve Empower 3 yazılımı vasıtasıyla kumanda edilmektedir. Çözücü madde A, 50 mM

10 potasyum fosfat pH 4,6'dır ve çözücü madde B, % 100 asetonitrildir. 20 µL numune kolona enjekte edilmiştir ve debi 0,5 mL/dakikadır. HPLC programı aşağıdaki gibidir:

% 90 A/% 10 B çözücü madde karışımı ile başlanması; 0'dan 2 dakikaya kadar % 10 B ile izokratik, 2'den ve 9 dakikaya kadar % 10 B'den % 25 B'ye lineer gradyent, 9'dan 23 dakikaya kadar % 25 B'den % 40 B'ye içbükey gradyent, 23'ten 25 dakikaya kadar

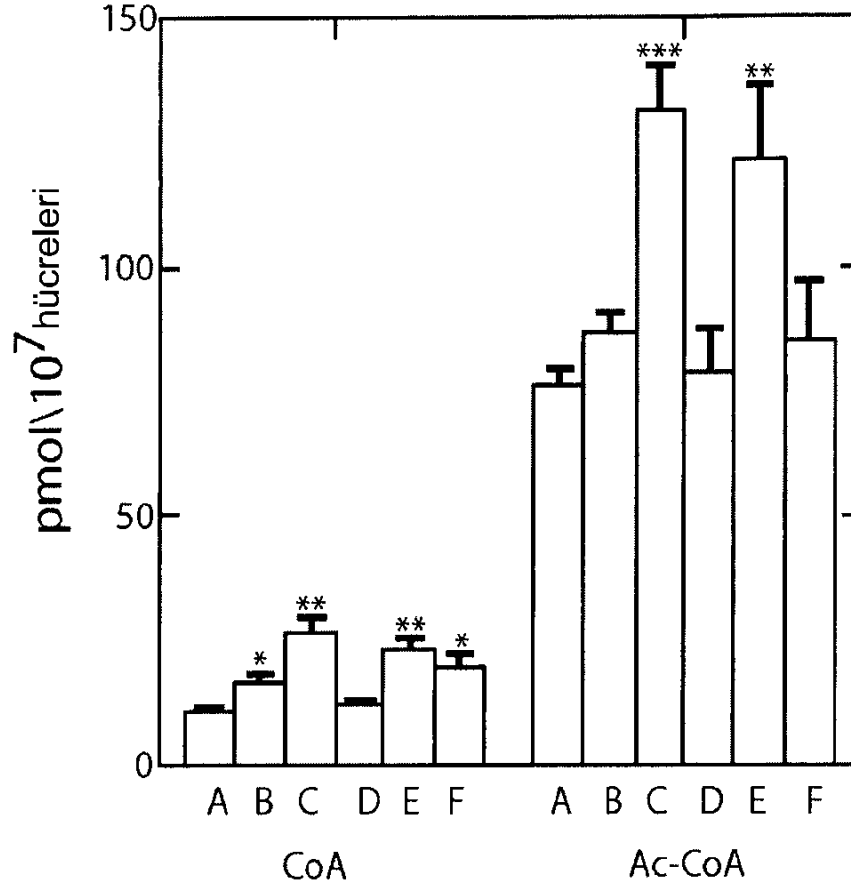
15 % 40'tan % 10'a lineer gradyent ve 25'ten 30 dakikaya kadar % 10 B ile izokratik.

Dedektör, λ393 nm'ye ayarlanmıştır. mBBR'den türevine dönüşen Koenzim A pikinin altındaki alanın integrali alınmış ve ticari Koenzim A'dan hazırlanan mBBR-Koenzim A standart konsantrasyon eğrisi ile kıyaslanmıştır.

Şekil 2, PANK inaktive edilmiş farelerde, Örnek 2'deki bileşik uygulandıktan sonra mBBR CoA seviyelerini göstermektedir. Şekil 2'den görülebileceği gibi, Örnek 2'nin bileşiği, CoA seviyelerini normal farelerde görülen seviyelere geri döndürmüştür. Bu, aşağıdaki tabloda da görülmektedir.

	pmol mBBR-CoA / mg Karaciğer		
	Ortalama	SEM	n
AĞIRLIK	522.545	18.279	4
pank 1 KO	339.560	11.496	5
pank 1 KO + Örnek 2	563.358	44.959	5

ŞEKİL 1



A Kontrol
 B Örnek 2 (80 μ M)
 C Örnek 2 (200 μ M)
 D Örnek 5 (20 μ M)
 E Örnek 7 (20 μ M)
 F Örnek 12 (12 μ M)

P Değerleri
 (Anlam)
 * $P < 0.05$
 ** $P < 0.005$
 *** $P < 0.0005$

ŞEKİL 2

