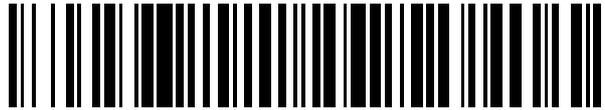


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 134**

51 Int. Cl.:

<b>C07C 43/178</b>	(2006.01)	<b>C07C 43/13</b>	(2006.01)
<b>C07F 9/10</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/075</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/08</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/11</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/19</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/20</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/215</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/225</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/24</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/685</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2004 E 04735088 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013 EP 1626728**

54 Título: **Lípidos oxidados y usos de los mismos en el tratamiento de enfermedades y trastornos inflamatorios**

30 Prioridad:

**27.05.2003 US 445347**

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

**13.11.2013**

73 Titular/es:

**VASCULAR BIOGENICS LTD. (100.0%)  
6 JONATHAN NETANYAHU STREET  
60376 OR YEHUDA, IL**

72 Inventor/es:

**HARATS, D.;  
GEORGE, JACOB;  
HALPERIN, GIDEON;  
YACOV, NIVA y  
KOVALEVSKI-ISHAI, ETI**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 429 134 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

Lípidos oxidados y usos de los mismos en el tratamiento de enfermedades y trastornos inflamatorios

## CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a lípidos oxidados novedosos como se definen en las reivindicaciones y a dichos lípidos oxidados para uso en métodos de tratamiento o prevención de una inflamación asociada a lípidos oxidados endógenos, por ejemplo, para uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades y trastornos asociados a la inflamación tales como, por ejemplo, aterosclerosis y trastornos relacionados, enfermedades o trastornos autoinmunes y enfermedades o trastornos proliferativos.

10 La enfermedad cardiovascular es un riesgo sanitario importante en todo el mundo industrializado. La aterosclerosis, la más prevalente de las enfermedades cardiovasculares, es la causa principal de ataque al corazón, apoplejía y gangrena de las extremidades y, como tal, la causa principal de muerte en los Estados Unidos. La aterosclerosis es una enfermedad compleja que implica muchos tipos celulares y factores moleculares (para una revisión detallada, véase Ross, 1993, *Nature* 362: 801-809). El proceso, que aparece como respuesta a ataques a células del endotelio y músculo liso (CML) de la pared arterial, consiste en la formación de lesiones o placas fibrograsas y fibrosas precedida y  
15 acompañada por inflamación. La desestabilización de placas puede conducir a complicaciones adicionales tales como ruptura y trombosis, que son el resultado de una respuesta inflamatoria-fibroproliferativa excesiva ante numerosas formas de ataques diferentes. Por ejemplo, los estreses por cizalla se cree que son responsables de la frecuente aparición de placas ateroscleróticas en regiones del sistema circulatorio donde aparece flujo sanguíneo turbulento, tales como puntos de ramificación y estructuras irregulares.

20 El primer acontecimiento observable en la formación de una placa aterosclerótica aparece cuando células inflamatorias tales como macrófagos derivados de monocitos se adhieren a la capa endotelial vascular y transmigran a través del espacio subendotelial. Los niveles plasmáticos elevados de LDL conducen a un congestión lipídica de las paredes de los vasos, produciendo las células endoteliales adyacentes lipoproteína de baja densidad (LDL) oxidada. Además, el atropamiento de lipoproteínas por la matriz extracelular conduce a la oxidación progresiva de LDL por lipooxigenasas, especies de oxígeno reactivas, peroxinitrito y/o mieloperoxidasa. Estas LDL oxidadas se captan entonces en grandes  
25 cantidades por monocitos mediante receptores secuestrantes expresados sobre sus superficies.

Los monocitos y células derivadas de músculo liso (CML) rellenos de lípidos se denominan células espumosas y son el constituyente principal de las estrías grasas. Las interacciones entre células espumosas, células endoteliales y células de músculo liso que las rodean produce un estado de inflamación local crónica que puede conducir eventualmente a la  
30 activación de células endoteliales, una apoptosis de macrófagos aumentada, la proliferación y migración de células de músculo liso y la formación de una placa fibrótica (Hajjar, DP y Haberland, ME, *J. Biol. Chem.*, 12 de septiembre de 1997; 272(37): 22975-78). La ruptura de placa y trombosis taponan los vasos sanguíneos afectados y limitan por tanto el flujo de sangre, dando como resultado isquemia, una afección caracterizada por la falta de suministro de oxígeno en tejidos de órganos debido a una perfusión inadecuada. Cuando las arterias implicadas bloquean el flujo de sangre al corazón, la persona está aquejada por un "ataque al corazón"; cuando se taponan las arterias cerebrales, la persona experimenta una apoplejía. Cuando se estrechan las arterias a los miembros, el resultado es dolor grave, movilidad física reducida y  
35 posiblemente la necesidad de amputación.

La LDL oxidada se ha implicado en la patogénesis de aterosclerosis y aterotrombosis por su acción sobre los monocitos y células de músculo liso, y por inducir la apoptosis de células endoteliales, empeorando el equilibrio anticoagulante en el endotelio. La LDL oxidada inhibe también la descomposición antiaterogénica asociada a HDL de fosfolípidos oxidados  
40 (Mertens, A y Holvoet, P, *FASEB J.* octubre de 2001; 15(12): 2073-84). Esta asociación está también apoyada por muchos estudios que demuestran la presencia de LDL oxidada en las placas de diversos modelos animales de aterogénesis y el retardo de la aterogénesis mediante la inhibición de la oxidación por manipulaciones farmacológicas y/o genéticas (véanse, por ejemplo, Witztum J y Steinberg, D, *Trends Cardiovasc. Med.* abril-mayo de 2001; 11(3-4): 93-102 para una revisión de la bibliografía actual). Es más, la LDL oxidada y la LDL modificada con malondialdehído (MDA) se han propuesto recientemente como marcadores sanguíneos exactos de la 1ª y 2ª etapas de enfermedad arterial coronaria (patentes de EE.UU. n.º 6.309.888 de Holvoet *et al.* y 6.255.070 de Witztum *et al.*).

La reducción de la oxidación y actividad de LDL ha sido el objetivo de una serie de aplicaciones clínicas sugeridas para el tratamiento y la prevención de enfermedad cardiovascular. Bucala *et al.* (patente de EE.UU. n.º 5.869.534) dan a  
50 conocer métodos para la modulación de la peroxidación lipídica mediante la reducción del producto final de glucosilación avanzada, lípido característico de la formación de células espumosas relacionadas con la edad, enfermedad y diabetes. Tang *et al.*, de Incyte Pharmaceuticals, Inc. (patente de EE.UU. n.º 5.945.308) han dado a conocer la identificación y aplicación clínica propuesta de un receptor de LDL oxidada humana en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y autoinmunes y cáncer.

55 **Aterosclerosis y enfermedad autoinmune**

Debido al presunto papel de la respuesta inflamatoria-fibroproliferativa excesiva en aterosclerosis e isquemia, un creciente número de investigadores han intentado definir un componente autoinmune de la lesión vascular. En las enfermedades autoinmunes, el sistema inmunitario reconoce y ataca componentes corporales normalmente no

antigénicos (autoantígenos), además de atacar los antígenos extraños invasores. Las enfermedades autoinmunes se clasifican como enfermedades mediadas por autoanticuerpos o mediadas por células. Las enfermedades autoinmunes mediadas por autoanticuerpos típicas son miastenia grave y púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), mientras que las enfermedades mediadas por células típicas son tiroiditis de Hashimoto y diabetes de tipo I (juvenil).

- 5 El reconocimiento de que los procesos inmunomediados prevalecen en las lesiones ateroscleróticas ha partido de la observación consistente de linfocitos y macrófagos en las etapas más tempranas, a saber las estrías grasas. Se ha encontrado que estos linfocitos, que incluyen una población predominante de células CD4+, (siendo el resto células CD8+), eran más abundantes frente a los macrófagos en lesiones tempranas, en comparación con las lesiones más avanzadas, en que esta relación tiende a invertirse. Estos descubrimientos plantearon la pregunta de si reflejan una
- 10 inmunosensibilización primaria ante un posible antígeno o como alternativa representan un simple epifenómeno de un daño a tejido local inducido anteriormente. Independientemente de los factores responsables del agrupamiento de estas células inflamatorias en la placa temprana, parecen exhibir un estado activado manifestado por la expresión simultánea de receptor de HLA-DR de MHC de clase II e interleucina (IL) así como de antígeno común de leucocitos (CD45R0) y la integrina antígeno muy tardío 1 (VLA-1).
- 15 La reacción inflamatoria en curso en las etapas tempranas de la lesión aterosclerótica puede ser el acontecimiento iniciador primario que conduce a la producción de diversas citocinas por las células locales (concretamente, células endoteliales, macrófagos, células de músculo liso y células inflamatorias), o puede ser que esta reacción sea una forma del sistema inmunitario de defensa del cuerpo contra el proceso nocivo. Algunas de las citocinas que se ha mostrado que se regulan positivamente por las células residentes incluyen TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  y péptido
- 20 quimioattractor de monocitos 1 (MCP-1). Se ha mostrado que se sobreexpresan también el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de tipo insulina (IGF), que se expresan por todos los constituyentes celulares de las placas ateroscleróticas, intensificando por tanto posiblemente la reacción inflamatoria preexistente mediante un soporte coestimulador en forma de un factor mitogénico y quimiotáctico. Recientemente, Ujemura *et al.* ("Cross regulatory roles of IL-12 and IL-10 in atherosclerosis". J. Clin. invest. 1996 97; 2130-2138) han
- 25 diucidado el patrón de citocinas de linfocitos T de tipo 1 en lesiones ateroscleróticas humanas, ejemplificado por una fuerte expresión de ARNm de IFN- $\gamma$  pero no de IL-4 en comparación con arterias normales. Además, se ha encontrado que IL-12, un factor de crecimiento de linfocitos T producido principalmente por monocitos activados y un inductor selectivo del patrón de citocinas Th1, estaba sobreexpresado en lesiones, como se manifestaba por la abundancia de ARNm de su forma heterodimérica principal p70 y de p40 (su proteína inducible dominante).
- 30 De forma similar a las fuertes evidencias de la dominancia del sistema inmunitario celular en la placa aterosclerótica, existen también numerosos datos que apoyan la implicación del sistema inmunitario humoral local. Por tanto, se ha mostrado la deposición de inmunoglobulinas y componentes de complemento en las placas además de la expresión potenciada de los receptores C3b y C3Bi en macrófagos residentes.
- 35 Proceden de modelos animales valiosas pistas con respecto a la contribución de la inflamación inmunomediada a la progresión de la aterosclerosis. Los ratones inmunodeprimidos (deficientes en MHC de clase I) tienden a desarrollar aterosclerosis acelerada en comparación con ratones inmunocompetentes. Adicionalmente, el tratamiento de ratones C57BL/6 (Emeson EE, Shen ML. "Accelerated atherosclerosis in hyperlipidemic C57BL/6 mice treated with cyclosporin A". Am. J. Pathol. 1993; 142: 1906-1915) y conejos blancos de Nueva Zelanda (Roselaar SE, Schonfeld G, Daugherty A. "Enhanced development of atherosclerosis in cholesterol fed rabbits by suppression of cell mediated immunity". J. Clin. Invest. 1995; 96: 1389-1394) con ciclosporina A, un potente supresor de la transcripción de IL-2, dio como resultado una
- 40 aterosclerosis significativamente potenciada a una "carga" lipoproteica "normal". Estos últimos estudios pueden proporcionar conocimientos sobre los posibles papeles del sistema inmunitario para contrarrestar el proceso inflamatorio autoperpetuante en la placa aterosclerótica.
- 45 La aterosclerosis no es una enfermedad autoinmune clásica, aunque algunas de sus manifestaciones tales como la producción de placa que obstruye los vasos sanguíneos puede estar relacionada con sensibilidad inmunitaria aberrante. En la enfermedad autoinmune clásica, puede definirse a menudo muy claramente el autoantígeno sensibilizante atacado por el sistema inmunitario y el componente o componentes del sistema inmunitario que reconoce el autoantígeno (humoral, concretamente autoanticuerpos, o celular, concretamente linfocitos). Por encima de todo, puede mostrarse que la enfermedad puede inducirse mediante la transferencia pasiva de estos componentes del sistema inmunitario a
- 50 animales sanos, o en el caso de seres humanos, la enfermedad puede transferirse de una madre embarazada enferma a su descendencia. Gran parte de lo anterior no se aplica a la aterosclerosis. Además, la enfermedad tiene definitivamente factores de riesgo comunes tales como hipertensión, diabetes, falta de actividad física, tabaquismo y otros, la enfermedad afecta a ancianos y tiene una preponderancia genética diferente que en las enfermedades autoinmunes clásicas.
- 55 El tratamiento de enfermedades inflamatorias autoinmunes puede dirigirse hacia la supresión o inversión de la inmunorreactividad general y/o específica de enfermedad. Por tanto, Aiello, por ejemplo, (patentes de EE.UU. nº 6.034.102 y 6.114.395) da a conocer el uso de compuestos de tipo estrógeno para el tratamiento y la prevención de aterosclerosis y progresión de lesión aterosclerótica mediante la inhibición de la agrupación de células inflamatorias. De forma similar, Medford *et al.* (patente de EE.UU. nº 5.846.959) da a conocer métodos para la prevención de la formación
- 60 de PUFA oxidados, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias cardiovasculares y no cardiovasculares mediadas por la molécula de adhesión celular VCAM-1. Además, Falb (patente de EE.UU. nº 6.156.500) designa una

serie de moléculas de señalización y adhesión celular abundantes en placa y enfermedad aterosclerótica como dianas potenciales de terapias antiinflamatorias.

Puesto que la LDL oxidada se ha implicado claramente en la patogénesis de la aterosclerosis (véase anteriormente), se ha investigado la contribución de estos importantes componentes de placa a la autoinmunidad en procesos patológicos ateromatosos.

#### **Inmunosensibilidad ante LDL oxidada**

Es conocido que la LDL oxidada (LDL ox) es quimiotáctica para linfocitos T y monocitos. La LDL ox y sus subproductos son también conocidos por inducir la expresión de factores tales como factor quimiotáctico de monocitos 1, la secreción de factor estimulante de colonias y propiedades activadoras de plaquetas, todos los cuales son potentes estimulantes del crecimiento.

La implicación activa de la respuesta inmunitaria celular en la aterosclerosis se ha verificado recientemente por Stemme S., et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995; 92: 3893-97), que aislaron CD4+ en clones de placas sensibles a LDL ox como estímulos. Los clones correspondientes a LDL ox (4 de 27) producían principalmente interferón  $\gamma$  y en lugar de IL-4. Queda por ver si los clones de linfocitos T anteriores representan un simple contacto del sistema inmunitario celular con el inmunógeno fuerte estimulante (LDL ox) o si esta reacción proporciona medios para combatir el proceso aterosclerótico aparentemente poco activo.

Los datos referentes a la implicación de los mecanismos humorales y su significado son mucho más controvertidos. Un estudio reciente ha reseñado niveles aumentados de anticuerpos contra MDA-LDL, un metabolito de la oxidación de LDL, en mujeres que padecen enfermedad cardíaca y/o diabetes (Dotevall, et al., Clin. Sci., noviembre de 2001; 101(5): 523-31). Otros investigadores han demostrado anticuerpos que reconocen múltiples epítomos en LDL oxidada, que representan inmunorreactividad ante componentes de lipídicos y apolipoproteicos (Steinerova A. et al., Physiol. Res. 2001; 50(2): 131-41) en aterosclerosis y otras enfermedades tales como diabetes, síndrome vasculorrenal, uremia, fiebre reumática y lupus eritematoso. Varios artículos han asociado niveles aumentados de anticuerpos contra LDL ox con la progresión de la aterosclerosis (expresada por el grado de estenosis carótida, la gravedad de la enfermedad vascular periférica, etc.). Más recientemente, Sherer et al. (Cardiology 2001; 95(1): 20-4) han demostrado niveles elevados de anticuerpos contra cardiolipina,  $\beta$ -2GPI y LDL ox, en enfermedad cardíaca coronaria. Por tanto, parece haber un consenso de la presencia de anticuerpos contra LDL ox en forma de inmunocomplejos en placa aterosclerótica, aunque no se haya establecido la trascendencia real de este descubrimiento.

Se ha teorizado que los anticuerpos contra LDL ox desempeñan un papel activo en el metabolismo lipoproteico. Por tanto, es conocido que los inmunocomplejos de LDL ox y sus correspondientes anticuerpos se captan más eficazmente por macrófagos en suspensión en comparación con LDL ox. No pueden extraerse conclusiones de este descubrimiento consistente sobre la patogénesis de la aterosclerosis, puesto que la cuestión de si la captación acelerada de LDL ox por los macrófagos es beneficiosa o dañina no se ha resultado todavía.

Proceden de modelos animales datos importantes en cuanto a la trascendencia del sistema inmunitario humoral en la aterogénesis. Se ha encontrado que la hiperinmunización de conejos deficientes en receptor de LDL con LDL oxidada homóloga daba como resultado la producción de altos niveles de anticuerpos anti-LDL ox y estaba asociada a una reducción significativa de la extensión de las lesiones ateroscleróticas en comparación con un grupo de control expuesto a disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Se ha logrado también una reducción de la formación de placa mediante la inmunización de ratones con liposomas ricos en colesterol con la producción simultánea de anticuerpos anticolesterol, aunque este efecto estaba acompañado por un 35% de reducción de los niveles de colesterol de lipoproteína de muy baja densidad.

Por tanto, se ha demostrado extensamente en laboratorio y estudios clínicos tanto el papel patogénico de los componentes de LDL oxidados como su importancia como autoantígenos en aterosclerosis así como otras enfermedades.

#### **Inmunomodulación mediada por vía mucosa en el tratamiento de enfermedad autoinmune**

Recientemente, se han encontrado nuevos métodos y formulaciones farmacéuticas que son útiles para tratar enfermedades autoinmunes (y trastornos inflamatorios mediados por linfocitos T relacionados tales como rechazo de aloinjerto y enfermedad neurológica asociada a retrovirus). Estos tratamientos modulan el sistema inmunitario induciendo tolerancia, por vía oral o mucosa, por ejemplo por inhalación, usando como tolerizantes autoantígenos, antígenos circunstanciales o fragmentos o análogos de autoantígenos o antígenos circunstanciales supresores de la enfermedad. Dichos tratamientos se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.935.577 de Weiner et al. Los autoantígenos y antígenos circunstanciales se definen a continuación (para una revisión general de la tolerancia mucosa véase Nagler-Anderson, C., Crit. Rev. Immunol. 2000; 20(2): 103-20). Se ha encontrado que la administración intravenosa de autoantígenos (y fragmentos de los mismos que contienen regiones epitópicas inmunodominantes de sus moléculas) induce inmunosupresión mediante un mecanismo llamado anergia clonal. La anergia clonal causa la desactivación de solo los linfocitos T de ataque inmunitario específico a un antígeno particular, siendo el resultado una reducción significativa de la respuesta inmunitaria ante este antígeno. Por tanto, los linfocitos T promotores de respuesta autoinmune ante un autoantígeno, una vez anergizados, no proliferan ya en respuesta a ese antígeno. Esta reducción

de la proliferación reduce también las reacciones inmunitarias responsables de los síntomas de enfermedad autoinmune (tales como el daño de tejido neuronal que se observa en EM). Existen también evidencias de que la administración oral de autoantígenos (o fragmentos inmunodominantes) en una sola dosis y en cantidades sustancialmente mayores que las que desencadenan la "supresión activa" puede inducir también tolerancia mediante anergia (o delección clonal).

5 Se ha dado a conocer también un método de tratamiento que se desarrolla mediante supresión activa. La supresión activa funciona mediante un mecanismo diferente que la anergia clonal. Este método, discutido extensamente en la solicitud PCT PCT/US93/01705, implica la administración oral o mucosa de antígenos específicos del tejido bajo ataque autoinmune. Estos se denominan "antígenos circunstanciales". Este tratamiento causa la inducción de linfocitos T reguladores (supresores) en el tejido linfoide asociado al intestino (TLAI) o el tejido linfoide asociado a los bronquios (TLAB) o, más generalmente, el tejido linfoide asociado a la mucosa (TLAM) (TLAM incluye TLAI y TLAB). Estas células reguladoras se liberan en la sangre o tejido linfático, migran entonces al órgano o tejido afectado por la enfermedad autoinmune y suprimen el ataque autoinmune del órgano o tejido afectado. Los linfocitos T desencadenados por el antígeno circunstancial (que reconocen al menos un determinante antigénico del antígeno circunstancial usado para desencadenarlos) se orientan al lugar del ataque autoinmune donde median la liberación local de ciertos factores inmunomoduladores y citocinas, tales como factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), interleucina 4 (IL-4) y/o interleucina 10 (IL-10). De estos, el TGF- $\beta$  es un factor inmunosupresor no específico de antígeno porque suprime el ataque inmunitario independientemente del antígeno que desencadene el ataque. (Sin embargo, debido a que la tolerización oral o mucosa con un antígeno circunstancial causa solo la liberación de TGF- $\beta$  en la cercanía del ataque autoinmune, no resulta inmunosupresión sistémica). IL-4 e IL-10 son también citocinas inmunorreguladoras no específicas de antígeno. IL-4 en particular potencia la respuesta auxiliar T de tipo 2 (Th<sub>2</sub>), concretamente, actúa sobre los precursores de linfocitos T y causa que se diferencien preferentemente en células Th<sub>2</sub> a expensas de las respuestas Th<sub>1</sub>. IL-4 inhibe indirectamente también la exacerbación de Th<sub>1</sub>. IL-10 es un inhibidor directo de las respuestas Th<sub>1</sub>. Después de la tolerización oral de mamíferos afectados por condiciones de enfermedad autoinmune con antígenos circunstanciales, se observan niveles aumentados de TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-10 en el lugar de ataque autoinmune (Chen, Y. *et al.*, *Science*, 265: 1237-1240, 1994). El mecanismo de supresión circunstancial se ha confirmado por von Herreth *et al.*, (*J. Clin. Invest.*, 96: 1324-1331, septiembre de 1996).

Más recientemente, se ha aplicado eficazmente una inmunomodulación mediada por vía oral que da como resultado tolerancia oral en el tratamiento de modelos animales de enfermedad inflamatoria intestinal alimentando bacterias probióticas (Dunne, C, *et al.*, *Antonie Van Leeuwenhoek*, julio-noviembre de 1999; 76(1-4): 279-92), glomerulonefritis autoinmune alimentando membrana basal glomerular (Reynolds, J. *et al.*, *J. Am. Soc. Nephrol.*, enero de 2001; 12(1): 61-70), encefalomiелitis alérgica experimental (EAE, que es el equivalente de esclerosis múltiple o EM) alimentando proteína básica de mielina (PBM), artritis por coadyuvante y artritis por colágeno alimentando a un sujeto colágeno y HSP-65, respectivamente. Una compañía radicada en Boston llamada Autoimmune ha llevado a cabo varios experimentos en seres humanos para prevenir diabetes, esclerosis múltiple, artritis reumatoide y uveítis. Los resultados de los experimentos en seres humanos han sido menos impactantes que en no humanos, sin embargo ha habido cierto éxito con la prevención de artritis.

Se ha investigado también la inmunomodulación mediante la inducción de tolerancia oral ante autoantígenos encontrados en lesiones de placa aterosclerótica. El estudio de los epítomos reconocidos por linfocitos T y los títulos de Ig en modelos clínicos y experimentales de aterosclerosis han indicado tres antígenos candidatos para la supresión de la inflamación en lesiones ateromatosas: LDL oxidada, la proteína de choque térmico relacionada con el estrés HSP 65 y la proteína de unión a cardiolipina  $\beta$ 2-GP1. La solicitud de patente de EE.UU. nº 09/806.400 de Shoenfeld *et al.* (presentada el 30 de septiembre de 1999) da a conocer una reducción de aproximadamente un 30% de la aterogénesis en las arterias de ratones transgénicos deficientes en receptor de LDL-RD genéticamente predispuestos alimentados con LDL humana oxidada. Sin embargo, este efecto protector se conseguía alimentando una preparación de antígeno bruto consistente en LDL sérica humana centrifugada, filtrada y purificada que se había sometido a un largo proceso de oxidación con Cu<sup>++</sup> o malondialdehído (MDA). Aunque se consiguió una inhibición significativa de la aterogénesis, presuntamente por tolerancia oral, no se hizo una identificación de los antígenos lipídicos o componentes de LDL inmunogénicos específicos. Otro obstáculo encontrado fue la inestabilidad inherente de la LDL oxidada bruta *in vivo*, debido a la actividad enzimática y la captación de la LDL oxidada por el hígado y mecanismos inmunitarios celulares, y su heterogeneidad entre diferentes donantes. Es plausible que un análogo de LDL oxidada estable más cuidadosamente definido hubiera proporcionado inmunomodulación (por ejemplo, por tolerancia oral) de mayor eficacia.

Se demostrado la inducción de inmunotolerancia y la posterior prevención o inhibición de procesos inflamatorios autoinmunes usando exposición a antígenos supresores a través de sitios mucosos distintos del intestino. El tejido membranoso alrededor de los ojos y la mucosa de la cavidad nasal, así como el intestino, están expuestos a muchos antígenos invasores así como autoantígenos y poseen mecanismos de inmunorreactividad. Por tanto, Rossi *et al.* (*Scand. J. Immunol.*, agosto de 1999; 50(2): 177-82) encontraron que la administración nasal de gliadina era tan eficaz como la administración intravenosa en la regulación negativa de la respuesta inmunitaria ante antígeno en un modelo de enfermedad celíaca en ratón. De forma similar, la exposición nasal a antígeno de receptor de acetilcolina era más eficaz que la exposición oral en el retardo y reducción de la debilidad muscular y proliferación linfocítica específica en un modelo de miastenia grave en ratón (Shi, FD. *et al.*, *J. Immunol.*, 15 de mayo de 1999; 162 (10): 5757-63). Por lo tanto, los compuestos inmunogénicos pretendidos para administración intravenosa o intraperitoneal deberían ser óptimamente adaptables a la administración nasal y otras vías de administración membranosa.

Por tanto, existe claramente la necesidad de derivados de fosfolípidos oxidados sintéticos novedosos bien definidos y de sustancias relacionadas que exhiban una estabilidad metabólica potenciada y una inmunomodulación eficaz inducidas, por ejemplo, por administración oral, intravenosa, intraperitoneal y mucosa.

### **Síntesis de fosfolípidos oxidados**

5 La modificación de fosfolípidos se ha empleado para una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, pueden incorporarse fosfolípidos portadores de compuestos activos liposolubles a composiciones para aplicación transdérmica y transmembrana (patente de EE.UU. nº 5.985.292 de Fournrou *et al.*) y pueden incorporarse derivados de fosfolípidos a liposomas y biovectores para suministro de fármacos (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 6.261.597 y 6.017.513 de Kurtz y Betbeder, *et al.*, respectivamente, y la patente de EE.UU. nº 4.614.796). La patente de EE.UU. nº 5.660.855 da a conocer constructos lipídicos de colesterol derivatizado con aminomanosa adecuados para orientarse a células o tejido de músculo liso, formulados en liposomas. Estas formulaciones están dirigidas a reducir la reestenosis en arterias usando procedimientos de PTCA. El uso de liposomas para tratar aterosclerosis se ha dado a conocer adicionalmente en el documento WO 95/23592, de Hope y Rodríguez, quienes enseñan composiciones farmacéuticas de liposomas unilamelares que pueden contener fosfolípidos. Los liposomas dados a conocer en el documento WO 15 95/23592 están dirigidos a optimizar el flujo de colesterol de la placa aterosclerótica y son típicamente fosfolípidos no oxidados.

Los derivados de fosfolípidos modificados que imitan la estructura del factor activador de plaquetas (PAF) son conocidos por ser farmacéuticamente activos en una variedad de trastornos y enfermedades, afectando a funciones tales como permeabilidad vascular, presión sanguínea, inhibición de la función cardíaca, etc. Se ha sugerido que un grupo de estos 20 derivados puede tener actividad anticancerosa (patente de EE.UU. nº 4.778.912 de Inoue *et al.*). La patente de EE.UU. nº 4.329.302 enseña compuestos de fosfoglicéridos sintéticos-derivados de lisolecitina que son utilizables para mediar la activación de plaquetas. Mientras que los compuestos dados a conocer en la patente de EE.UU. nº 4.329.302 son 1-O-alkiléter- o 1-O-(acil graso)-fosfoglicéridos, se encontró que la acilación de cadena corta de la lisolecitina daba lugar a compuestos con comportamiento activador de plaquetas, en contraposición con la acilación de cadena larga, y que los 25 1-O-alkiléteres eran biológicamente superiores a los correspondientes derivados de 1-O-acil graso en la imitación de PAF.

Se ha investigado también el efecto estructural de diversos fosfolípidos sobre la actividad biológica de los mismos por Tokumura *et al.* (Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, julio de 1981, Vol. 219, Nº 1) y en la patente de EE.UU. nº 4.827.011 de Wissner *et al.* con respecto a la hipertensión.

30 Se ha dado a conocer otro grupo de derivados etéricos de fosfolípidos modificados en la patente CH nº 642.665 de Berchtold. Estos derivados etéricos de fosfolípidos modificados se han encontrado útiles en separación cromatográfica, pero podrían tener cierto efecto fisiológico.

La oxidación de fosfolípidos aparece *in vivo* por la acción de radicales libres y reacciones enzimáticas abundantes en placa aterosclerótica. *In vitro*, la preparación de fosfolípidos oxidados implica habitualmente una sencilla oxidación química de una LDL nativa o componente fosfolipídico de LDL. Los investigadores que estudian el papel de la LDL oxidada han 35 empleado, por ejemplo, iones ferrosos y ácido ascórbico (Itabe, H. *et al.*, J. Biol. Chem. 1996; 271: 33208-217) y sulfato de cobre (George, J. *et al.*, Atherosclerosis. 1998; 138: 147-152; Ameli, S. *et al.*, Arteriosclerosis Thromb. Vasc. Biol. 1996; 16: 1074-79) para producir moléculas fosfolipídicas oxidadas, o débilmente oxidadas, similares a las asociadas a componentes de placa. Se ha mostrado que moléculas preparadas de forma similar son idénticas a autoantígenos asociados a la aterogénesis (Watson A.D. *et al.*, J. Biol. Chem. 1997; 272: 13597-607) y capaces de inducir inmunotolerancia anti-aterogénica protectora (solicitud de patente de EE.UU. nº 09/806.400 de Shoenfeld *et al.*, presentada el 30 de septiembre de 1999) en ratones. Igualmente, Koike (patente de EE.UU. nº 5.561.052) da a conocer un método de producción de lípidos y fosfolípidos oxidados usando sulfato de cobre y superóxido dismutasa para producir ácidos araquidónico o linoleico oxidados y LDL oxidada para uso de diagnóstico. Davies *et al.* (J. Biol. Chem. 45 2001, 276: 16015) enseñan el uso de fosfolípidos oxidados como agonistas de receptor activado por proliferador de peroxisoma.

La 1-palmitoil-2-(5-oxovaleroil)-sn-glicero-3-fosfocolina (POVPC, véase el Ejemplo I para una descripción estructural bidimensional) y derivados de la misma tales como 1-palmitoil-2-glutaroil-sn-glicero-3-fosfocolina (PGPC) son ejemplos representativos de fosfolípidos esterificados oxidados que se han estudiado con respecto a la aterogénesis (véanse, por ejemplo, Boullier *et al.*, J. Biol. Chem.. 2000, 275: 9163; Subbanagounder *et al.*, Circulation Research, 1999, pág. 311). Se ha estudiado también el efecto de diferentes análogos estructurales que pertenecen a esta clase de fosfolípidos oxidados (véanse, por ejemplo, Subbanagounder *et al.*, Arterioscler. Thromb. Nasc. Biol. 2000, pág. 2248; Leitinger *et al.*, Proc. Nat. Ac. Sci. 1999, 96: 12010).

55 El documento WO 02/41827 da a conocer los compuestos ALLE, concretamente 1-hexadecil-2-(5'-oxopentanoil)-sn-glicero-3-fosfocolinéter, y POVPC, concretamente 1-hexadecil-2-(5'-oxopentanoil)-sn-3-fosfocolina, y composiciones farmacéuticas de los mismos para uso en el tratamiento de inflamación.

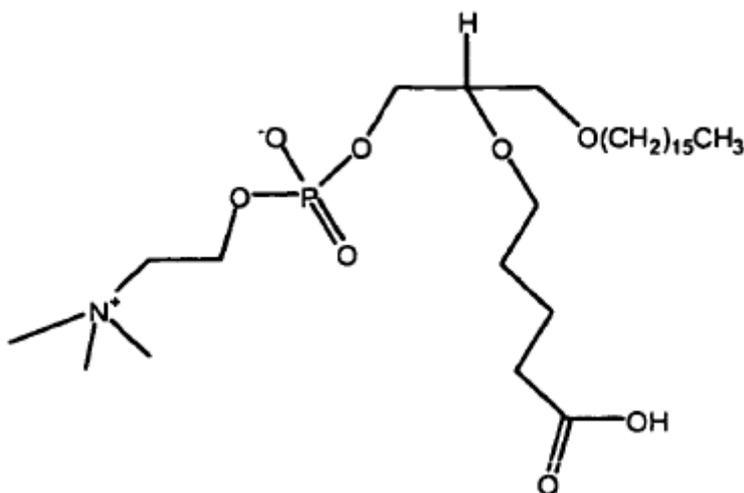
Sin embargo, las aplicaciones *in vivo* que emplean fosfolípidos oxidados preparados como anteriormente tienen la desventaja de la predisposición al reconocimiento, unión y metabolismo del componente activo en el cuerpo, haciendo de la dosificación y estabilidad después de la administración una consideración importante.

5 Además, las técnicas de oxidación empleadas no son específicas, proporcionando una variedad de productos oxidados que necesitan una purificación adicional o el uso de compuestos antigénicos impuros. Esto es una preocupación aún mayor con LDL nativa, incluso si está purificada.

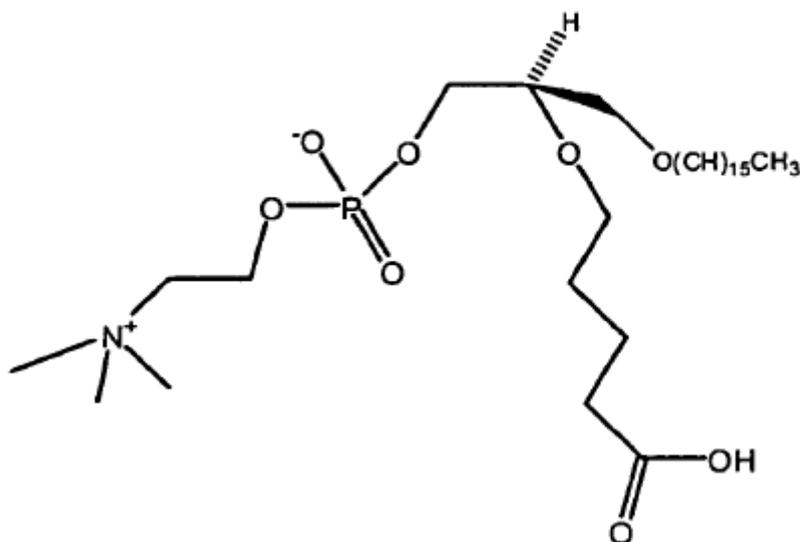
Por tanto, es ampliamente reconocida la necesidad de, y sería altamente ventajoso, disponer de un fosfolípido oxidado sintético novedoso, métodos mejorados para sintetizar el mismo y usos del mismo como inmunomodulador desprovisto de las limitaciones anteriores.

10 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un compuesto que tiene la fórmula:

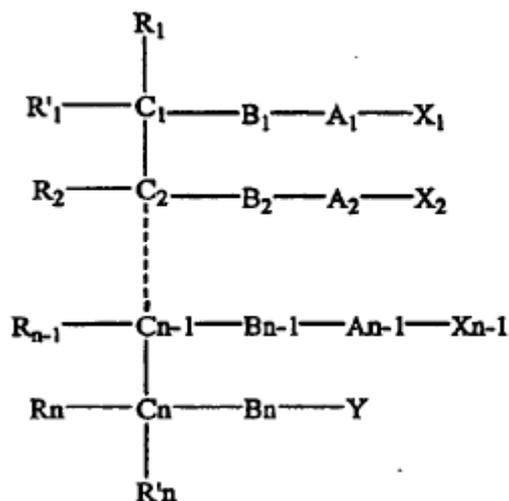


15 o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. El compuesto puede seleccionarse de 1-hexadecil-2-(4'-carboxibutil)-sn-glicero-3-fosfocolina y 3-hexadecil-2-(4'-carboxibutil)-sn-glicero-1-fosfocolina. En particular, la invención se refiere a un compuesto que tiene la fórmula:



La presente invención se refiere adicionalmente a una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, cualquiera de los compuestos anteriores y un portador farmacéuticamente aceptable.

Se da a conocer también en la presente memoria un compuesto que tiene la fórmula general I:

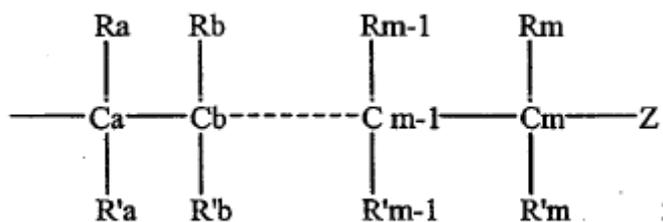


Fórmula I

en la que:

n es un entero de 1-6, mientras que si n=1, C<sub>n</sub>, B<sub>n</sub>, R<sub>n</sub>, R'<sub>n</sub> e Y están ausentes;

- 5 cada uno de B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ...B<sub>n-1</sub> y B<sub>n</sub> se selecciona independientemente del grupo consistente en oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo y silicio, en los que cada uno de dichos nitrógeno, fósforo y silicio está sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo consistente en hidrógeno, par de electrones solitario, alquilo, halógeno, cicloalquilo, arilo, hidroxilo, tiohidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, tioariloxilo, tioalcoxilo y oxo;
- cada uno de A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, ...A<sub>n-1</sub> y A<sub>n</sub> se selecciona independientemente del grupo consistente en CR<sup>n</sup>R<sup>m</sup>, C=O y C=S,
- 10 Y se selecciona del grupo consistente en hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo, carboxilo, sacárido, ácido fosfórico, fosforilcolina, fosforiletanolamina, fosforilserina, fosforilcardiolipina, fosforilinositol, etilfosfocolina, fosforilmetanol, fosforiletanol, fosforilpropanol, fosforilbutanol, fosforiletanolamino-N-lactosa, fosfoetanolamino-N-[metoxi(propilenglicol)], 4-fosfato de fosfoinositol, 4,5-bifosfonato de fosfoinositol, pirofosfato, dietilentriaminopentaacetato de fosfoetanolamina, dinitrofenilfosfoetanolamina y fosfoglicerol; y
- 15 cada uno de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, ...X<sub>n-1</sub> es independientemente un hidrocarburo saturado o insaturado que tiene la fórmula general II:

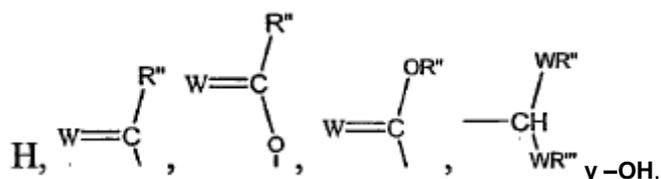


Fórmula II

en la que:

m es un entero de 1-26; y

- 20 Z se selecciona del grupo consistente en:



mientras que:

W se selecciona del grupo consistente en oxígeno, azufre, nitrógeno y fósforo, en los que cada uno de dichos nitrógeno y fósforo está sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo consistente en hidrógeno, par de electrones solitario, alquilo, halógeno, cicloalquilo, arilo, hidroxilo, tiohidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, tioariloxilo, tioalcoxilo y oxo;

5 y

en al menos uno de  $X_1, X_2, \dots, X_{n-1}, Z$  no es hidrógeno;

y en la que:

10 cada uno de  $R_1, R'_1, R_2, \dots, R_{n-1}, R_n, R'_n$ , cada uno de  $R''$  y  $R'''$  y cada uno de  $R_a, R'_a, R_b, R'_b, \dots, R_{m-1}, R'_{m-1}, R_m$  y  $R'_m$  se selecciona independientemente del grupo consistente en hidrógeno, un enlace, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, halógeno, trihalogenometilo, hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, tiohidroxilo, tioalcoxilo, tioariloxilo, fosfonato, fosfato, fosfinilo, sulfonilo, sulfino, sulfonamida, amida, carbonilo, tiocarbonilo, C-carboxilo, O-carboxilo, C-carbamato, N-carbamato, C-tiocarboxilo, S-tiocarboxilo y amino o, como alternativa, al menos dos de  $R_1, R'_1, R_2, \dots, R_{n-1}, R_n$  y  $R'_n$  y/o al menos dos de  $R_a, R'_a, R_b, R'_b, \dots, R_{m-1}, R'_{m-1}, R_m$  y  $R'_m$  forman al menos un anillo aromático, heteroaromático, alicíclico o heteroalíclico de 4, 5 o 6 miembros; y

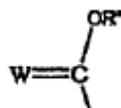
15 cada uno de  $C_1, C_2, \dots, C_{n-1}, C_n$  y cada uno de  $C_a, C_b, \dots, C_{m-1}, C_m$  es un átomo de carbono quiral o no quiral, en los que cada átomo de carbono quiral tiene una configuración S y/o una configuración R,

una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Según rasgos adicionales de las realizaciones descritas a continuación, al menos uno de  $A_1, A_2, \dots$  y  $A_{n-1}$  es  $CR''R'''$ , y al menos uno de estos  $A_1, A_2, \dots$  y  $A_{n-1}$  está ligado a  $X_1, X_2, \dots$  o  $X_{n-1}$  que comprende un Z diferente de hidrógeno.

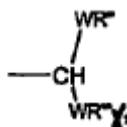
20 Según otros rasgos adicionales de las realizaciones descritas, n es igual a 3 y al menos uno de  $A_1$  y  $A_2$  es  $CR''R'''$ .  $A_2$  puede ser  $CR''R'''$  y  $X_2$  puede comprender un Z diferente de hidrógeno. Adicionalmente, cada uno de  $A_1$  y  $A_2$  puede ser  $CR''R'''$ .

Según otros rasgos adicionales de las realizaciones descritas, Z se selecciona del grupo consistente en



25

y



en los que W puede ser oxígeno y cada uno de  $R''$  y  $R'''$  se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo.

Según otros rasgos adicionales de las realizaciones descritas, n es igual a 1 y al menos uno de  $R_1$  y  $R'_1$  es un fosfato o fosfonato.

30 Según otros rasgos adicionales de las realizaciones descritas, n es igual a 5 o 6 y al menos uno de  $R_1, R'_1$  y al menos uno de  $R_n$  y  $R'_n$  forman al menos un anillo heteroalíclico, por ejemplo un anillo monosacárido.

Según otro aspecto dado a conocer en la presente memoria, se proporciona una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, el compuesto descrito anteriormente en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable.

35 Según rasgos adicionales de las realizaciones preferidas de la invención descritas a continuación, la composición farmacéutica se envasa en un material de envasado y se identifica por impresión en o sobre dicho material de envasado para uso en el tratamiento o prevención de una inflamación asociada a un lípido oxidado endógeno, como se detalla a continuación en la presente memoria.

40 Según más rasgos adicionales de las realizaciones preferidas descritas, la composición farmacéutica comprende adicionalmente al menos un compuesto adicional capaz de tratar o prevenir la inflamación asociada a un lípido oxidado endógeno como se detalla a continuación en la presente memoria.

- Según otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un compuesto o una composición farmacéutica para uso en un método de tratamiento o prevención de una inflamación asociada a un lípido oxidado endógeno, de acuerdo con las reivindicaciones, que comprende administrar a un sujeto necesitado de ello una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un lípido oxidado, tratando o previniendo así la inflamación asociada a un lípido oxidado endógeno en el sujeto.
- Según más rasgos adicionales de las realizaciones dadas a conocer en la presente memoria, el lípido oxidado se selecciona del grupo consistente en un fosfolípido oxidado, un factor activador de plaquetas, un plasmalógeno, un hidrocarburo de 3-30 átomos de carbono sustituido o no sustituido terminado en un grupo oxidado, un esfingolípido oxidado, un glicolípido oxidado, un lípido de membrana oxidado y cualquier análogo o derivado de los mismos.
- Según más rasgos adicionales de las realizaciones dadas a conocer en la presente memoria, el lípido oxidado tiene la fórmula general I representada anteriormente en la presente memoria.
- Según más rasgos adicionales de las realizaciones dadas a conocer en la presente memoria, el lípido oxidado se selecciona del grupo consistente en: 1-palmitoil-2-azelaoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-hexadecil-2-azelaoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-palmitoil-2-glutaroil-sn-glicero-3-fosfocolina (PGPC), 1-palmitoil-2-(5-oxovaleroil)-sn-glicero-3-fosfocolina (POVPC), 1-palmitoil-2-(9-oxononanoil)-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-hexadecil-2-acetoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-octadecil-2-acetoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-hexadecil-2-butirol-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-octadecil-2-butirol-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-palmitoil-2-acetoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-octadecil-2-acetoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-hexadecil-2-(homogammalinolenol)-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-hexadecil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-hexadecil-2-eicosapentenoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-hexadecil-2-docosahexenoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-octadecil-2-metil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-hexadecil-2-butenoil-sn-glicero-3-fosfocolina, Lyso PAF C16, Lyso PAF C18, 1-O-1'-(Z)-hexadecenil-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]dodecanoil]-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-O-1'-(Z)-hexadecenil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-O-1'-(Z)-hexadecenil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-O-1'-(Z)-hexadecenil-2-docosahexenoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-O-1'-(Z)-hexadecenil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1-O-1'-(Z)-hexadecenil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina y 1-O-1'-(Z)-hexadecenil-2-docosahexenoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.
- Según más rasgos adicionales de las realizaciones preferidas descritas, el método comprende adicionalmente administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto adicional capaz de tratar o prevenir una inflamación asociada a LDL oxidada endógena.
- El al menos un compuesto adicional se selecciona preferiblemente del grupo consistente en un inhibidor de HMGCoA reductasa (una estatina), un coadyuvante mucoso, un corticosteroide, un fármaco antiinflamatorio esteroideo, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, un analgésico, un factor de crecimiento, una toxina, una HSP, una  $\beta$ 2-glucoproteína I, un inhibidor de proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP), un agonista de receptor activado por proliferador de peroxisoma (PPAR), un fármaco antiaterosclerótico, un agente antiproliferativo, ezetimida, ácido nicotínico, un inhibidor de escualeno y una ApoE Milano.
- La inflamación según la presente invención está asociada a enfermedades y trastornos tales como, por ejemplo, enfermedades o trastornos inflamatorios idiopáticos, enfermedades o trastornos inflamatorios crónicos, enfermedades o trastornos inflamatorios agudos, enfermedades o trastornos autoinmunes, enfermedades o trastornos infecciosos, enfermedades o trastornos inflamatorios malignos, enfermedades o trastornos inflamatorios relacionados con trasplantes, enfermedades o trastornos inflamatorios degenerativos, enfermedades o trastornos asociados a hipersensibilidad, enfermedades o trastornos inflamatorios cardiovasculares, enfermedades o trastornos inflamatorios cerebrovasculares, enfermedades o trastornos vasculares periféricos, enfermedades o trastornos inflamatorios glandulares, enfermedades o trastornos inflamatorios gastrointestinales, enfermedades o trastornos inflamatorios cutáneos, enfermedades o trastornos inflamatorios hepáticos, enfermedades o trastornos inflamatorios neurológicos, enfermedades o trastornos inflamatorios musculoesqueléticos, enfermedades o trastornos inflamatorios renales, enfermedades o trastornos inflamatorios reproductivos, enfermedades o trastornos inflamatorios sistémicos, enfermedades o trastornos inflamatorios del tejido conectivo, tumores inflamatorios, necrosis, enfermedades o trastornos inflamatorios relacionados con implantes, procesos inflamatorios de envejecimiento, enfermedades o trastornos por inmunodeficiencia, enfermedades y trastornos proliferativos y enfermedades o trastornos inflamatorios pulmonares, como se detalla a continuación en la presente memoria.
- La presente invención se enfrenta exitosamente a los inconvenientes de las configuraciones actualmente conocidas proporcionando lípidos oxidados sintéticos novedosos desprovistos de las limitaciones asociadas a los lípidos oxidados sintéticos actualmente conocidos, y lípidos oxidados sintéticos para uso en métodos de tratamiento o prevención de una inflamación asociada a un lípido oxidado endógeno.
- A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por el especialista en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. En caso de conflicto, predominará la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- La invención se describe en la presente memoria, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica detallada ahora a los dibujos, se destaca que los pormenores mostrados lo son a modo de ejemplo y solo con fines de discusión ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención, y se presentan con motivo de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente entendible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se han intentado mostrar los detalles estructurales de la invención con más detalle del necesario para una comprensión fundamental de la invención, resultando evidente para los especialistas en la materia por la descripción tomada con los dibujos cómo pueden llevarse a la práctica las diversas formas de la invención.
- 5 En los dibujos:
- La FIG. 1 es un diagrama de flujo que representa la síntesis de 2,5'-aldehidolecitinéter, 1-hexadecil-2-(5'-oxopentanol)-sn-glicero-3-fosfolina (para D-ALLE) o 3-hexadecil-2-(5'-oxopentanol)-sn-glicero-1-fosfolina (para L-ALLE) (ALLE), según el método de síntesis dado a conocer en la presente memoria.
- La FIG. 2 es un diagrama de flujo que representa la síntesis de POVPC.
- 15 La FIG. 3 es una representación gráfica que demuestra la inhibición de la aterogénesis temprana en ratones deficientes en apoE mediante inmunización intraperitoneal con los isómeros D y L de ALLE mezclados. Se inmunizaron ratones de 5-7 semanas Apo-E KO con 150 µg/ratón de isómeros D o L de ALLE mezclados acoplados con derivado de proteína tuberculina purificado (ALLE L+D) (n=6), derivado de proteína tuberculina purificado (PPD) solo (n= 5) o (CONTROL) no inmunizado (n=7). La aterogénesis se expresa como el área de lesiones ateromatosas en el seno aórtico 4,5 semanas después de la 4ª inmunización.
- 20 La FIG. 4 es una representación gráfica que demuestra la inhibición de la aterogénesis temprana en ratones Apo-E KO mediante administración oral de ALLE. Se alimentaron ratones de 6-7,5 semanas Apo-E KO con isómeros D y L de ALLE mezclados: 10 µg/ratón (ALLE L+D 10 µg) (n=11) o 1 mg/ratón (ALLE L+D 1 mg) (n=11); o PBS (CONTROL) (n=12) cada dos días durante 5 días. La aterogénesis se expresa como el área de lesiones ateromatosas en el seno aórtico 8 semanas después de la última alimentación.
- 25 La FIG. 5 es una representación gráfica que demuestra la inhibición de la aterogénesis temprana en ratones Apo-E KO mediante administración oral y nasal de L-ALLE. Se alimentaron ratones de 7-10 semanas Apo-E KO con 1 mg/ratón de L-ALLE cada dos días durante 5 días (OT L-ALLE) (n= 11) o se administraron por vía intranasal 10 µg/ratón de L-ALLE cada dos días durante 3 días (NT L-ALLE) (n= 11). Se alimentaron los ratones de control con un volumen idéntico (0,2 ml) de PBS (PBS ORAL) (n= 12). La aterogénesis se expresa como el área de lesiones ateromatosas en el seno aórtico 8 semanas después de la última exposición oral o nasal.
- 30 La FIG. 6 es una representación gráfica que demuestra la supresión de la inmunorreactividad ante antígenos de placa aterosclerótica inducida por la alimentación oral con los fosfolípidos oxidados sintéticos L-ALLE y POVPC. Se alimentaron ratones macho de 6 semanas Apo-E KO con 1 mg/ratón de L-ALLE (L-ALLE) (n=2) o POVPC (POVPC) (n=3) en 0,2 ml de PBS; o PBS solo (CONTROL) (n=3) cada dos días durante 5 días. Una semana después de la última alimentación, se inmunizaron los ratones con una sola inyección subcutánea de 50 µg de antígeno LDL oxidada humana. 7 días después, se prepararon linfocitos T de nódulo linfático inguinal como se describe en la sección de Materiales y Métodos siguiente, y se expusieron al antígeno LDL ox humana sensibilizante para la valoración *in vitro* de la proliferación. La proliferación, que indica inmunorreactividad, se expresa como la relación entre la incorporación de timidina marcada al ADN de linfocitos T en presencia y ausencia de antígeno LDL ox humana (índice de estimulación, I.E.).
- 35 La FIG. 7 es una representación gráfica que demuestra la inhibición de la progresión de la aterogénesis de etapa tardía en ratones Apo-E KO por administración oral de los fosfolípidos oxidados sintéticos D-ALLE, L-ALLE o POVPC. Se alimentaron ratones de 24,5 semanas Apo-E KO con 1 mg/ratón de L-ALLE (L-ALLE) (n= 11), D-ALLE (D-ALLE) (n= 9) o POVPC (POVPC) (n= 10) cada dos días durante 5 días, a intervalos de 4 semanas durante un periodo de 12 semanas. Se alimentaron los ratones de control con un volumen idéntico (0,2 ml) y régimen de PBS (CONTROL) (n= 10). La aterogénesis se expresa como el área de lesiones ateromatosas en el seno aórtico 12 semanas después de la primera alimentación, en comparación con las puntuaciones de lesión de ratones de 24,5 semanas no tratados antes de la alimentación (sacrificados a tiempo 0).
- 40 La FIG. 8 es una representación gráfica que demuestra la reducción del contenido de triglicéridos de VLDL en ratones Apo-E KO inducida por la alimentación de los fosfolípidos oxidados sintéticos D-ALLE, L-ALLE o POVPC. Se alimentaron ratones de 24,5 semanas Apo-E KO con 1 mg/ratón de L-ALLE (triángulo) (n= 11), D-ALLE (triángulo invertido) (n= 9) o POVPC (cuadrado) (n= 10) cada dos días durante 5 días, a intervalos de 4 semanas durante un periodo de 12 semanas. Se alimentaron los ratones de control con un volumen idéntico (0,2 ml) y régimen de PBS (círculo) (n= 10). Se midió el contenido de triglicéridos (Tg, mg/ml) a las 9 semanas desde t= 0, mediante un método colorimétrico enzimático, en las fracciones de VLDL después de la separación de las muestras de sangre combinadas por FPLC, como se describe en la sección de Materiales y Métodos siguiente.
- 45
- 50
- 55

La FIG. 9 es una representación gráfica que demuestra la reducción del contenido de colesterol de VLDL en ratones Apo-E KO inducida por la alimentación de los fosfolípidos oxidados sintéticos D-ALLE, L-ALLE o POVPC. Se alimentaron ratones de 24,5 semanas Apo-E KO con 1 mg/ratón de L-ALLE (triángulo) (n= 11), D-ALLE (triángulo invertido) (n= 9) o POVPC (cuadrado) (n= 10) cada dos días durante 5 días, a intervalos de 4 semanas durante un periodo de 12 semanas. Se alimentaron los ratones con un volumen idéntico (0,2 ml) y régimen de PBS (círculo) (n= 10). Se midió el contenido de colesterol (colesterol, mg/ml) a las 9 semanas desde t= 0, mediante un método colorimétrico enzimático, en las fracciones de VLDL después de la separación de las muestras de sangre combinadas por FPLC, como se describe en la sección de Materiales y Métodos siguiente.

La FIG. 10 presenta descripciones estructurales bidimensionales de 1-hexadecil-2-(5'-carboxibutil)-sn-glicero-3-fosfocolina (CI-201, compuesto VII), 1-hexadecil-2-(5',5'-dimetoxipentiloxi)-sn-glicero-3-fosfocolina (compuesto VIIIa) y 1-hexadecil-2-(5',5'-dietoxipentiloxi)-sn-glicero-3-fosfocolina (compuesto VIIIb).

La FIG. 11 es una representación gráfica que demuestra la inhibición de la aterogénesis temprana en ratones Apo-E KO por administración oral de CI-201. Se alimentaron ratones de 12 semanas Apo-E KO con CI-201: 0,025 mg/ratón (n= 14); o 0,2 ml de PBS (CONTROL) (n= 15) cada dos días durante 8 semanas (5 veces por semana). La aterosclerosis se expresa como el área de lesión ateromatosa en el seno aórtico 11 semanas después de la primera alimentación.

Las FIG. 12a-d presentan fotografías que demuestran los niveles de expresión de citocina en la aorta de ratones tratados con ALLE, CI-201, su derivado de etilacetil (Et-acetal), su derivado de metilacetil (Me-acetal), LDL ox o PBS. Particularmente, las Figuras 12a y 12b presentan la elevación del nivel de expresión de IL-10 en la aorta de ratones tratados con ALLE, CI-201, Et-acetal, Me-acetal y LDL ox en comparación con ratones no tratados (PBS) y los niveles de expresión reducida de IFN- $\gamma$  en aortas de ratones tratados con ALLE, CI-201, Me-acetal y LDL ox en comparación con ratones tratados con PBS, y las Figuras 12c y 12d presentan la expresión reducida de IL-12 en ratones tratados con ALLE, CI-201 y Et-acetal en comparación con el grupo tratado con PBS. Se alimentaron ratones de 10-12 semanas Apo-E KO con 1 mg/ratón/0,2 ml del antígeno ensayado (ALLE, CI-201, Et-acetal, Me-acetal) o 0,1 mg/ratón/0,2 ml de LDL ox o se administraron 0,2 ml de PBS. Las administraciones orales tuvieron lugar 5 veces cada dos días y la expresión de citocina se evaluó 8 semanas después de la última administración oral.

La FIG. 13 presenta un gráfico de barras que demuestra la atenuación de la aterogénesis en ratones LDL-RD por administración oral de LDL ox. Se alimentaron los ratones LDL-RD con PBS o 10, 100 y 1.000  $\mu$ g/dosis de LDL ox, 5 veces cada dos días. La aterogénesis se expresa como el área de lesiones ateromatosas en el seno aórtico 5 semanas después de la última alimentación.

Las FIG. 14a-b presentan gráficos de barras que demuestran la inhibición de la aterogénesis en ratones Apo-E KO por administración oral de CI-201. Se alimentaron ratones Apo-E KO con PBS (control) o 0,1, 1 y 10  $\mu$ g/dosis de CI-201 en tres series al inicio de cada mes, 5 veces cada dos días en cada serie. La aterogénesis se expresa como el área de lesiones ateromatosas en el seno aórtico 12 semanas después de la primera alimentación. La Figura 14a presenta la extensión de la aterosclerosis en cada grupo.

La Figura 14b presenta el efecto drástico del tratamiento con CI-201 a dosis baja sobre la aterosclerosis, en comparación con el grupo "de estado basal" (sacrificado el día 0) y el grupo de control.

Las FIG. 15a-b presentan gráficos de barras que demuestran la elevación de los niveles séricos de IL-10 (Figura 15a) y la prevención de la elevación de SAA (Figura 15b) en ratones Apo-E KO tratados con CI-201. Se alimentaron ratones Apo-E KO con PBS (control) o CI-201, 5 veces cada dos días. Se recogió suero al inicio del experimento, 2 semanas y 4 semanas después de la primera alimentación. Se evaluaron los niveles de marcadores como se describe en la sección de Materiales y Métodos siguiente.

Las FIG. 16a-b presentan fotografías (Figura 16a) y una representación gráfica (Figura 16b) que demuestran los niveles de expresión de citocina en la aorta de ratones tratados con CI-201 o PBS. Particularmente, las Figuras 16a y 16b presentan la elevación del nivel de expresión de IL-10 en la aorta de ratones tratados con CI-201, en comparación con ratones no tratados (PBS) y los niveles de expresión reducidos de IFN- $\gamma$  en aortas de ratones tratados con CI-201, en comparación con ratones tratados con PBS. Se alimentaron ratones Apo-E KO con 1 mg/ratón de CI-201 o con 0,2 ml/ratón de PBS 5 veces cada dos días. Se determinaron la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10 y la citocina proinflamatoria IFN- $\gamma$  8 semanas después de la última alimentación.

La FIG. 17 presenta fotografías que demuestran el tratamiento oral con CI-201 orientado a aorta en ratones Apo-E KO. Aunque en la aorta el tratamiento con CI-201 indujo la elevación del nivel de expresión de IL-10 y la reducción de los niveles de expresión de IFN- $\gamma$ , en comparación con el tratamiento con PBS, no se observaron diferencias en la expresión de citocina en bazo e intestino delgado entre el grupo tratado con CI-201 y el grupo de control, tratado con PBS.

La FIG. 18 es una presentación gráfica del diseño de estudio que evalúa la atenuación de la artritis inducida por coadyuvante (AIC) en ratas pretratadas con CI-201.

La FIG. 19 presenta un gráfico de barras que demuestra el efecto de la administración oral de CI-201 en ratas con artritis inducida por coadyuvante (AIC) en términos de hinchamiento de pata. Se alimentaron ratas Lewis con CI-201 o

PBS (CONTROL) 5 veces cada dos días y se les inyectó después de ello por vía intradérmica una suspensión de tuberculosis.

La FIG. 20 es una presentación gráfica del diseño de estudio para evaluar la atenuación de artritis inducida por coadyuvante (AIC) en ratas tratadas continuamente con CI-201.

5 La FIG. 21 presenta un gráfico de barras que demuestra el efecto de la administración oral de CI-201 en ratas Lewis inducidas con AIC en términos de hinchamiento de pata. Se alimentaron las ratas Lewis con CI-201 o PBS (CONTROL) 5 veces cada dos días, se sometieron después de ello a la inducción de artritis y se trataron entonces continuamente con CI-201 mediante alimentación 3 veces por semana.

10 La FIG. 22 presenta gráficas comparativas que demuestran la valoración de la puntuación de artritis monitorizada durante el desarrollo de artritis en ratas tratadas con diversas concentraciones de CI-201, en comparación con ratas tratadas con PBS.

La FIG. 23 presenta gráficas comparativas que demuestran el porcentaje de ratas que tienen síntomas de artritis después del tratamiento con PBS (control) y diversas concentraciones de CI-201.

15 La FIG. 24 presenta un gráfico de barras que demuestra el efecto sobre la aterogénesis temprana en ratones Apo-E KO inducido por la administración oral de compuesto V preoxidado. Se alimentaron ratones hembra de 8-10 semanas Apo-E KO con compuesto V: 5 mg/ratón (n= 6), 1 mg/ratón (n= 6), 0,2 mg/ratón (n= 6) o PBS (control) (n= 7) cada dos días durante 5 días. La aterogénesis se expresa como el área de lesiones ateromatosas en el seno aórtico 8 semanas después de la última alimentación.

20 La FIG. 25 presenta gráficos de barras que demuestran el efecto sobre la aterogénesis en ratones Apo-E KO inducido por la administración oral de compuesto V preoxidado. Se sacrificaron ratones de 23-26 semanas Apo-E KO al inicio del experimento (estado basal, grupo EB, n= 10) o se alimentaron con PBS (control, n= 11) o 0,1 µg/dosis de compuesto V (n=10), en tres series al inicio de cada mes, 5 veces cada dos días en cada serie. La aterogénesis se expresa como el área de lesiones ateromatosas en el seno aórtico 12 semanas después de la primera alimentación.

#### DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

25 La presente invención es de métodos y composiciones que emplean lípidos oxidados que pueden utilizarse en el tratamiento o prevención de una inflamación asociada a lípidos oxidados endógenos. Particularmente, la presente invención es de (i) lípidos oxidados novedosos como se definen en las reivindicaciones, (ii) composiciones farmacéuticas que contienen los mismos; (iii) los lípidos oxidados novedosos para uso en métodos para el tratamiento o  
30 prevenir así enfermedades y trastornos asociados a inflamación tales como, pero sin limitación, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cerebrovasculares, enfermedades vasculares periféricas, estenosis, reestenosis, estenosis en endoprótesis vascular, enfermedades o trastornos autoinmunes, enfermedades o trastornos inflamatorios, enfermedades o trastornos infecciosos y enfermedades o trastornos proliferativos.

35 Los principios y operación de la presente invención pueden comprenderse mejor con referencia a los dibujos y descripciones adjuntas.

40 Antes de explicar al menos una realización de la invención con detalle, se entiende que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos. La invención puede tener otras realizaciones o ser practicada o llevada a cabo de diversos modos. También ha de entenderse que la fraseología y terminología empleada en la presente memoria es con fines de descripción y no debería considerarse como limitante.

45 Las evidencias experimentales y clínicas indican un papel causante de la LDL oxidada (LDL ox) y los componentes de LDL en la etiología de una respuesta inflamatoria excesiva en aterosclerosis. Se han demostrado tanto inmunorreactividad celular como humoral ante LDL oxidada relacionada con placa, sugiriendo un importante componente autoinmune anti-LDL oxidada en la aterogénesis. Por tanto, LDL, LDL oxidada y componentes de las mismas han sido dianas de numerosas terapias para la prevención y el tratamiento de enfermedad cardíaca, enfermedad cerebrovascular y enfermedad vascular periférica.

50 Los estudios de la técnica anterior asociados al papel de la LDL oxidada y componentes de la misma en la reducción de la respuesta inmunitaria ante LDL oxidada endógena (por ejemplo, relacionada con placa) empleaban una preparación de antígeno bruto consistente en LDL sérica humana centrifugada, filtrada y purificada que se había sometido a un largo proceso de oxidación con Cu<sup>++</sup> o MDA, o análogos de LDL oxidada preparados sintéticamente. Puesto que los fosfolípidos se consideran componentes de LDL activos, los estudios con análogos de LDL oxidada preparados sintéticamente implicaban típicamente fosfolípidos oxidados (por ejemplo, POVPC y PGPC).

55 Aunque la técnica anterior enseña que la administración oral de LDL oxidada puede dar como resultado un 30% de reducción de la aterogénesis, sugiriendo por tanto un efecto protector de la LDL oxidada, presuntamente por tolerancia oral, no se ha realizado la identificación de los antígenos de lípidos ni componentes de LDL inmunogénicos específicos.

Otro obstáculo encontrado por estos estudios de la técnica anterior fue la inestabilidad inherente de la LDL oxidada bruta *in vivo*, debido a la actividad enzimática y la captación de LDL oxidada por el hígado y los mecanismos inmunitarios celulares. Dicha inestabilidad inherente está también asociada a aplicaciones *in vivo* que utilizan derivados de LDL oxidada sintéticos tales como POVPC y PGPC (descritos anteriormente en la presente memoria).

5 Por ello, hasta ahora no se ha establecido una correlación directa entre la LDL oxidada exógena o componentes de la misma y la LDL oxidada endógena, en términos de inmunomodulación. No se han descubierto tampoco hasta ahora análogos de LDL oxidados, desprovistos de la inestabilidad inherente y otras limitaciones implicadas con la administración de LDL oxidada, que puedan modular la respuesta inmunitaria y/o inflamatoria asociada a LDL oxidada endógena y otros lípidos oxidados endógenos.

10 Al concebir la presente invención, se teorizó que los lípidos oxidados definidos sintéticamente en general, y los análogos de LDL oxidada en particular, podían modular la inmunorreactividad ante lípidos oxidados endógenos en general y LDL oxidada en particular, y por tanto usarse en el tratamiento o la prevención de multitud de enfermedades y trastornos asociados a la inflamación y/o a una respuesta inmunitaria alterada tales como, por ejemplo, aterosclerosis y enfermedades o trastornos relacionados, así como otras enfermedades y trastornos asociados a lípidos oxidados endógenos.

La inflamación implicada en la aterogénesis a menudo conduce a complicaciones tales como ruptura de placa y trombosis (Libby *et al.*, "Inflammation and atherosclerosis". Circulation. 2002; 105: 1135-1143).

20 La presencia de linfocitos T activados en la lesión aterosclerótica humana puede conllevar su implicación en la iniciación y progresión de la enfermedad (Ross R. "Atherosclerosis-an inflammatory disease". NEJM. 1999; 340: 115-126). La clase principal de linfocitos T, CD4+, puede diferenciarse en los linajes Th1 o Th2, que se definen funcionalmente por la citocina producida: interferón (IFN)  $\gamma$ , secretado por las células Th1, e interleucina (IL) 4 secretada por las células Th2. Entre los inductores principales de células Th1 y Th2 están IL-12 e IL-10, respectivamente (Daugherty A y Rateri DL, "T lymphocytes in atherosclerosis the Yin-Yang of Th1 and Th2 Influence on lesion formation", Circ. Res. 2002; 90: 1039-1040; Hansson GK, "Vaccination against atherosclerosis science or fiction". Circulation. 2002; 106: 1599-1601).

25 Los linfocitos T aislados de sangre completa de pacientes con síndromes coronarios agudos o recogidos de placas carótidas humanas han mostrado reconocer específicamente LDL ox y proliferar cuando se exponen a LDL ox (Hansson GK. "Immune mechanisms in atherosclerosis". Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2001; 21: 1, 876-90). La LDL ox y subproductos lipídicos oxidados de la misma (por ejemplo, fosfolípidos oxidados) están presentes en placas ateroscleróticas (Witztum 2001, *supra*).

30 Por ello, aunque la modificación oxidativa de LDL puede ser un prerrequisito para la acumulación rápida de LDL en macrófagos y la formación de células espumosas, puede inducir adicionalmente epítomos inmunogénicos en la molécula de LDL, que conducen a la formación de anticuerpos contra LDL ox.

35 Por lo tanto, los epítomos de LDL oxidada sirven como ligandos importantes, mediando la unión a y aclaramiento de partículas lipoproteicas dañadas oxidativamente y células apoptóticas, e induciendo una respuesta inmunitaria innata que afecta a su eliminación. Por otro lado, los epítomos de LDL oxidada pueden desempeñar un papel en la inmunoadaptación que caracteriza la placa aterosclerótica progresiva.

40 En vista de lo anterior, los presentes inventores postularon que los compuestos que pueden servir como epítomos de LDL oxidada pueden modular la respuesta inmunitaria para inducir un efecto beneficioso más que dañino sobre la aterogénesis. En otras palabras, se postuló que administrar, preferiblemente por vía oral, análogos de LDL oxidada tales como fosfolípidos oxidados, induciría tolerancia ante la LDL oxidada endógena formada durante la aterogénesis y reduciría por tanto la respuesta inflamatoria ante la misma y atenuaría la progresión de la aterogénesis.

45 Se han publicado recientemente evidencias que apoyan la inmunomodulación como un nuevo enfoque terapéutico para tratar la aterosclerosis (Nicoletti *et al.* "Induction of neonatal tolerance to oxidized lipoprotein reduces atherosclerosis in Apo E knockout (Apo-E KO) mice". Mol. Med. 2000; 6(4): 283-290). Se ha mostrado que la inyección intraperitoneal de LDL oxidada a ratones (Apo-E KO) en el nacimiento inducía la tolerancia a linfocitos T debido a delección clonal, reducía la respuesta inmunitaria ante LDL oxidada y, como resultado, reducía la predisposición a la aterosclerosis.

50 La inmunidad adaptativa e innata se han implicado en la patogénesis de aterosclerosis así como en muchas otras enfermedades y trastornos. Dada su abundancia en la lesión, los lípidos son posibles dianas de la respuesta inmunitaria asociada a la aterosclerosis. Recientemente, se ha mostrado los linfocitos T citolíticos naturales (NKT) pueden reconocer antígenos lipídicos presentados por moléculas de CD1. Las moléculas de CD1 presentan antígenos lipídicos ante linfocitos T, al contrario que las moléculas de complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II evolutivamente relacionadas, que exponen antígenos peptídicos. Como las moléculas de MHC de clase I, sin embargo, las moléculas de CD1 consisten en una cadena pesada asociada con la cadena ligera de microglobulina  $\beta_2$  ( $\beta_2$ M). Las estructuras cristalinas de las dos isoformas de CD1, CD1b humana y CD1d de ratón, muestran una organización de dominios global que se parece a las moléculas de MHC de clase I. Señaladamente, el sitio de unión a antígeno en CD1 es hidrófobo, formando canales (CD1b) o bolsas (CD1d de ratón) que pueden acomodar las cadenas hidrocarbonadas de lípidos. Una estrecha abertura entre las hélices  $\alpha$  permite la exposición de restos polares del lípido en una región accesible para el reconocimiento por receptores de linfocitos T (TCR). Este sistema facilita la unión de diferentes

moléculas lipídicas ligadas a diversos grupos de cabeza polares, creando así un enorme agrupamiento de antígenos presentados por CD1 potenciales (Zeng *et al.* "Crystal structure of mouse CD1: an MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove". *Science* 1997; 277: 339-345).

5 Las moléculas de CD1 se unen a antígenos lipídicos extraños a medida que salen de los compartimentos endosómicos de células presentadoras de antígeno infectadas. Al contrario que los linfocitos T que reconocen lípidos extraños limitados a CD1, los linfocitos T limitados a CD1 que son reactivos a autoantígenos funcionan como "autoefectores" que se estimulan rápidamente llevando a cabo funciones auxiliares y efectoras tras interacción con células presentadoras de antígeno que expresan CD1. Las distinciones funcionales entre los subconjuntos de linfocitos T limitados a CD1 y las rutas mediante las que estas células influyen en los efectos tanto inflamatorios como tolerogénicos de células dendríticas y activan linfocitos citolíticos naturales y otros linfocitos proporcionan conocimientos de cómo los linfocitos T limitados a CD1 regulan las respuestas antimicrobianas, la inmunidad antitumoral y el equilibrio entre tolerancia y autoinmunidad (Vincent *et al.* "Understanding the function of CD 1-restricted T cells". *Nat. Immunol.* 2003; 4: 517-23).

15 Tupin *et al.* ("CD1d-dependent Activation of NKT Cells Aggravates Atherosclerosis". *J. Exp. Med.* 2004; 199: 417-22) han explorado el papel de los linfocitos NKT limitados a CD1d en aterosclerosis usando ratones deficientes en apolipoproteína E (apoE (-/-)) y ratones ApoE(-/-) cruzados con ratones CD1d(-/-) (CD1d(-/-)apoE(-/-)) que exhibían un 25% de reducción del tamaño de lesión en comparación con ratones apoE(-/-). La administración de  $\alpha$ -galactosilceramida, un glucolípido sintético que activa los linfocitos NKT a través de CD1d, inducía un 50% de aumento del tamaño de lesión en ratones apoE(-/-), mientras que no afectaba al tamaño de lesión en ratones apoE(-/-)CD1d(-/-). Estos resultados muestran que la activación de linfocitos NKT limitados a CD1d exacerba la aterosclerosis. Zhou *et al.* ("Editing of CD1d-bound lipid antigens by endosomal lipid transfer proteins". *Science*. 2004; 303: 523-7) han reseñado que los ratones deficientes en prosaposina, el precursor de una familia de proteínas de transferencia de lípido endosómico (LTP), exhiben defectos específicos en la presentación de antígeno mediada por CD1d y carecen de linfocitos NKT V $\alpha$ 14. *In vitro*, las saposinas extraían los lípidos monoméricos de las membranas y de CD1, promoviendo así tanto la carga como la corrección de lípidos en CD1. Los complejos transitorios entre CD1, lípido y LTP sugerían un modelo de "tira y afloja" en que el intercambio lipídico entre CD1 y LTP es la base de sus respectivas afinidades por lípidos. Las LTP constituyen una conexión anteriormente desconocida entre el metabolismo lipídico y la inmunidad, y probablemente ejercen una profunda influencia sobre el repertorio de autoantígenos, antígenos tumorales y lipídicos microbianos.

30 La activación de macrófagos de tipo 2 (M2) es una ruta alternativa a la activación de macrófagos clásica. Estas células M2 son CPA que se presentan en la lámina propia del intestino como parte del sistema inmunitario asociado al intestino. Estas células M2 responderán con expresión de IL-10 en lugar de la respuesta de citocina Th1 clásica de macrófagos como se describe a continuación.

Los macrófagos activados se usan como células presentadoras de antígeno (CPA). El reconocimiento de antígeno por linfocitos T es el evento clave que controla la respuesta inmunitaria adaptativa.

35 La ruta clásica de activación dependiente de IFN- $\gamma$  de macrófagos por respuestas de tipo Th1 es un rasgo bien establecido de inmunidad celular. La activación de macrófagos depende de los productos de los linfocitos T de tipo Th1 auxiliares y linfocitos citolíticos naturales activados específicamente, en particular, IFN- $\gamma$  y la red de citocinas que abarca IL-12 e IL-18, que se producen por CPA. El concepto de ruta alternativa de activación de macrófagos por las citocinas de tipo Th2 IL-4 e IL-13, junto con IL-10, ha ganado crédito en la última década, para dar cuenta de un fenotipo de macrófagos distintivo que es consistente con un papel diferente en la inmunidad humoral y reparación.

40 IL-4 e IL-13 regulan positivamente la expresión del receptor de manosa y las moléculas de MHC de clase II por macrófagos, que estimulan la endocitosis y presentación de antígenos.

45 Las inmunoglobulinas y complejos inmunitarios pueden unirse tanto a receptores activadores como inhibidores de Fc y complemento. También el ligamiento Fc-receptor induce efectos notables sobre la liberación de citocinas tales como IL-12/IL-10 e IL-4, por las CPA mismas y por otras células de los sistemas inmunitarios innato y adquirido (Gordon S. "Alternative Activation of Macrophages". *Nat. Rev. Immunol.* 3: 23-34; 2003).

50 Los macrófagos expuestos a estímulos inflamatorios (IFN- $\gamma$ , por ejemplo) e introducidos en complejos inmunitarios invertirían drásticamente su acción, en lugar de una respuesta Th1: niveles elevados de IL-12 y niveles moderados de IL-10, hay una drástica reducción de los niveles de IL-12 y aumento de los de IL-10. IL-10 ejerce efectos inmunosupresores sobre macrófagos (Anderson, C. F. y Mosser, D. M. A "Novel Phenotype for an Activated Macrophages: the Type 2 Activated Macrophage". *J. Leukoc. Biol.* 72: 101-106; 2002). IL-10 actúa sobre un receptor de membrana plasmática distinto a los de IL-4 e IL-13, y su efecto sobre la expresión génica de macrófagos es diferente, implicando una inhibición más profunda de una serie de funciones presentadoras de antígeno y efectoras, junto con la activación de genes o funciones seleccionados (Gordon S. "Alternative Activation of Macrophages". *Nat. Rev. Immunol.* 3: 23-34; 2003).

Por ello, además de su efecto sobre la aterosclerosis y otras enfermedades que están directamente asociadas a LDL oxidada, se postuló adicionalmente que la inmunomodulación y efecto antiinflamatorio inducidos por análogos de LDL oxidada (sintéticos) pueden utilizarse en el tratamiento y la prevención de otras enfermedades y trastornos, asociados

directa o indirectamente con LDL oxidada endógena y otros lípidos oxidados. Esto se apoyó por varios estudios, que se dirigían a la inmunoterapia de enfermedades autoinmunes humanas tales como artritis reumatoide (AR), diabetes de tipo I y esclerosis múltiple, mediante la modulación de rutas inmunitarias individuales implicadas en la inflamación o mediante la tolerización ante diversos antígenos (Bielekova *et al.* "Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: Results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand". Nat. Med. 2000; 6: 1167-1175; Kappos *et al.* "Induction of a non-encephalitogenic type 2 T helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in a placebo-controlled, randomized phase II trial". Nat. Med. 2000; 6: 1176-1182).

Por ello, hay abundantes datos que apoyan la relación entre lípidos, inflamación y sistema inmunitario, indicando una conexión directa entre ellos.

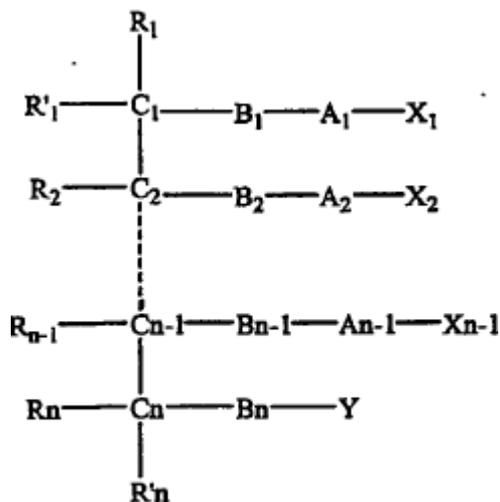
En un intento de mejorar el tratamiento de inflamación y enfermedades y trastornos asociados a lípidos oxidados, los presentes inventores han diseñado fosfolípidos oxidados sintéticos novedosos y compuestos relacionados estructuralmente que están desprovistos de las limitaciones asociadas a LDL oxidada y otros fosfolípidos y lípidos oxidados conocidos (como se concretan anteriormente en la presente memoria).

Como se demuestra en la sección de Ejemplos siguiente, al reducir la presente invención a la práctica, se confirmó de hecho que la administración oral y/o mucosa de los análogos de LDL oxidada recién diseñados modula la respuesta inflamatoria y/o inflamatoria ante LDL oxidada endógena, reduciendo así la respuesta inflamatoria en enfermedades inflamatorias tales como aterosclerosis y artritis reumatoide. Estos resultados demuestran claramente el efecto de los lípidos oxidados exógenos sobre los procesos inflamatorios e inmunitarios que implican lípidos oxidados endógenos.

Por tanto, según un aspecto de la presente invención, se proporcionan compuestos novedosos como se definen en las reivindicaciones, diseñados para imitar el efecto de inmunomodulación inducido por LDL oxidada y/o una inflamación asociada a LDL oxidada y/u otros lípidos oxidados, evitando las limitaciones asociadas a LDL oxidada y otros lípidos oxidados, que son por tanto altamente adecuados para el tratamiento oral/mucoso de enfermedades y trastornos asociados a la inflamación que implican lípidos oxidados.

Puesto que los fosfolípidos oxidados son conocidos como componentes activos de LDL ox y adicionalmente puesto que las membranas biológicas incluyen fosfolípidos, y principalmente fosfoglicéridos, los compuestos según la presente invención están estructuralmente basados en fosfolípidos oxidados en general, y fosfoglicéridos oxidados en particular.

Se dan a conocer en la presente memoria también compuestos según la fórmula general I:



Fórmula I

en la que

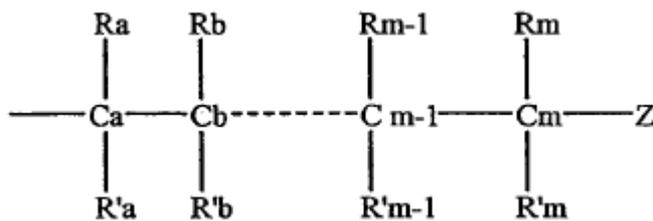
n es un entero de 1-6, mientras que si n = 1, C<sub>n</sub>, B<sub>n</sub>, R<sub>n</sub>, R'<sub>n</sub> e Y están ausentes;

cada uno de B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ...B<sub>n-1</sub> y B<sub>n</sub> se selecciona independientemente del grupo consistente en oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo y silicio, en los que cada uno de nitrógeno, fósforo y silicio está sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo consistente en hidrógeno, par de electrones solitario, alquilo, halógeno, cicloalquilo, arilo, hidroxilo, tihidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, tioariloxilo, tioalcoxilo y oxo;

cada uno de A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, ...A<sub>n-1</sub> y A<sub>n</sub> se selecciona independientemente del grupo consistente en CR''R''', C=O y C=S,

Y se selecciona del grupo consistente en hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo, carboxilo, sacárido, ácido fosfórico, fosforilcolina, fosforiletanolamina, fosforilserina, fosforilcardiolipina, fosforilinositol, etilfosfocolina, fosforilmetanol, fosforiletanol, fosforilpropanol, fosforilbutanol, fosforiletanolamino-*N*-lactosa, fosfoetanolamino-*N*-[metoxi(propilenglico)], 4-fosfato de fosfoinositol, 4,5-bisfosfonato de fosfoinositol, pirofosfato, dietilentriaminopentaacetato de fosfoetanolamina, dinitrofenilfosfoetanolamina y fosfoglicerol; y

cada uno de  $X_1, X_2, \dots, X_{n-1}$  es independientemente un hidrocarburo saturado o insaturado que tiene la fórmula general II:

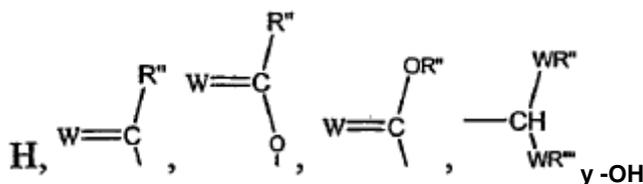


Fórmula II

en la que:

10  $m$  es un entero de 1-26; y

$Z$  se selecciona del grupo consistente en:



en los que:

15  $W$  se selecciona del grupo consistente en oxígeno, azufre, nitrógeno y fósforo, en los que cada uno de nitrógeno y fósforo está sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo consistente en hidrógeno, par de electrones solitario, alquilo, halógeno, cicloalquilo, arilo, hidroxilo, tiohidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, tioariloxilo, tioalcoxilo y oxo;

y

en al menos uno de  $X_1, X_2, \dots, X_{n-1}$   $Z$  no es hidrógeno;

y en los que:

20 cada uno de  $R_1, R'_1, R_2, \dots, R_{n-1}, R_n, R'_n$ , cada uno de  $R''$  y  $R'''$  y cada uno de  $R_a, R'_a, R_b, R'_b, \dots, R_{m-1}, R'_{m-1}, R_m$  y  $R'_m$  se selecciona independientemente del grupo consistente en hidrógeno, un enlace, alquilo, alquenoilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, halógeno, trihalogenometilo, hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, tiohidroxilo, tioalcoxilo, tioariloxilo, fosfonato, fosfato, fosfinilo, sulfonilo, sulfínulo, sulfonamida, amida, carbonilo, tiocarbonilo, C-carboxilo, O-carboxilo, C-carbamato, N-carbamato, C-tiocarboxilo, S-tiocarboxilo y amino, o como alternativa, al menos dos de  $R_1, R'_1, R_2, \dots, R_{n-1}, R_n$  y  $R'_n$  y/o al menos dos de  $R_a, R'_a, R_b, R'_b, \dots, R_{m-1}, R'_{m-1}, R_m$  y  $R'_m$  forman al menos un anillo aromático, heteroaromático, alicíclico o heterocíclico de 4, 5 o 6 miembros; y

cada uno de  $C_1, C_2, \dots, C_{n-1}, C_n$ , y cada uno de  $C_a, C_b, \dots, C_{m-1}$  y  $C_m$  es un átomo de carbono quiral o no quiral, en los que cada átomo de carbono quiral tiene una configuración *S* y/o una configuración *R*,

una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 Se apreciará por el especialista en la materia que la viabilidad de localizar cada uno de los sustituyentes (por ejemplo,  $R_1$ - $R_n, R_a$ - $R_m, R'', R'''$ ) en las posiciones indicadas depende de la valencia y compatibilidad química del sustituyente, de la posición sustituida y de los otros sustituyentes.

35 Como se usa a lo largo de la presente memoria, el término "alquilo" hace referencia a un hidrocarburo alifático saturado que incluye grupos de cadena lineal y ramificada. Preferiblemente, el grupo alquilo tiene de 1 a 20 átomos de carbono. Siempre que se estipule en la presente memoria un intervalo numérico, por ejemplo "1-20", eso implica que el grupo, en este caso el grupo alquilo, puede contener 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc. hasta e incluyendo 20 átomos de carbono. Más preferiblemente, el alquilo es un alquilo de tamaño medio que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Lo más preferiblemente, a menos que se indique otra cosa, el alquilo es un alquilo inferior que tiene de 1 a 4 átomos de carbono.

Un grupo "cicloalquilo" hace referencia a un grupo de anillo todo de carbono monocíclico o fusionado (concretamente, anillos que comparten un par adyacente de átomos de carbono), en el que uno o más de los anillos no tienen un sistema de electrones pi completamente conjugado. Son ejemplos, sin limitación, de grupos cicloalquilo ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclohexano, ciclohexadieno, cicloheptano, cicloheptatrieno y adamantano.

- 5 Un grupo "alquenilo" hace referencia a un grupo alquilo que consiste en al menos dos átomos de carbono y al menos un doble enlace carbono-carbono.

Un grupo "alquiniilo" hace referencia a un grupo alquilo que consiste en al menos dos átomos de carbono y al menos un triple enlace carbono-carbono.

- 10 Un grupo "arilo" hace referencia a grupos todo de carbono monocíclicos o policíclicos de anillo fusionado (concretamente, anillos que comparten pares adyacentes de átomos de carbono) que tienen un sistema de electrones pi completamente conjugado. Son ejemplos, sin limitación, de grupos arilo fenilo, naftalenilo y antraceno. El grupo arilo puede estar sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido, el grupo sustituyente puede ser, por ejemplo, alquilo, alquenilo, alquiniilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroalíclicilo, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, tiohidroxilo, tioalcoxilo, tioariloxilo, sulfinilo, sulfonilo, ciano, nitro, azida, sulfonilo, sulfinilo, sulfonamida, fosfonilo, fosfinilo, oxo, carbonilo, tiocarbonilo, urea, tiourea, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, C-carboxilo, O-carboxilo, sulfonamido y amino, como se definen estos términos en la presente memoria.

- 20 Un grupo "heteroarilo" hace referencia a un grupo de anillo monocíclico o fusionado (concretamente, anillos que comparten un par adyacente de átomos), teniendo el anillo o anillos uno o más átomos tales como, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y azufre y, además, teniendo un sistema de electrones pi completamente conjugado. Los ejemplos, sin limitación, de grupos heteroarilo incluyen pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, piridina, pirimidina, quinolina, isoquinolina y purina. El grupo heteroarilo puede estar sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido, el grupo sustituyente puede ser, por ejemplo, alquilo, alquenilo, alquiniilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroalíclicilo, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, tiohidroxilo, tioalcoxilo, tioariloxilo, sulfinilo, sulfonilo, ciano, nitro, azida, sulfonilo, sulfinilo, sulfonamida, fosfonilo, fosfinilo, oxo, carbonilo, tiocarbonilo, urea, tiourea, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, C-carboxilo, O-carboxilo, sulfonamido y amino, como estos términos se definen en la presente memoria.

- 30 Un grupo "heteroalíclicilo" hace referencia a un grupo de anillo monocíclico o fusionado que tiene en el anillo o anillos uno o más átomos tales como nitrógeno, oxígeno y azufre. Los anillos pueden tener también uno o más doble enlaces. Sin embargo, los anillos no tienen un sistema de electrones pi completamente conjugado. El heteroalíclicilo puede estar sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido, el grupo sustituido puede ser, por ejemplo, un par de electrones solitario, alquilo, alquenilo, alquiniilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroalíclicilo, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, tiohidroxilo, tioalcoxilo, tioariloxilo, sulfinilo, sulfonilo, ciano, nitro, azida, sulfonilo, sulfinilo, sulfonamida, fosfonilo, fosfinilo, oxo, carbonilo, tiocarbonilo, urea, tiourea, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, C-carboxilo, O-carboxilo, sulfonamido y amino, como estos términos se definen en la presente memoria. Son ejemplos representativos piperidina, piperazina, tetrahidrofurano, tetrahidropirano, morfolino y similares.

Un grupo "hidroxilo" hace referencia a un grupo -OH.

Un grupo "azida" hace referencia a un grupo -N=N.

Un grupo "alcoxilo" hace referencia tanto a un grupo -O-alquilo como -O-cicloalquilo, como se definen en la presente memoria.

- 40 Un grupo "ariloxilo" hace referencia tanto a un grupo -O-arilo como -O-heteroarilo, como se definen en la presente memoria.

Un grupo "tiohidroxilo" hace referencia a un grupo -SH.

Un grupo "tioalcoxilo" hace referencia tanto a un grupo -S-alquilo como -S-cicloalquilo, como se definen en la presente memoria.

- 45 Un grupo "tioariloxilo" hace referencia tanto a un grupo -S-arilo como -S-heteroarilo, como se definen en la presente memoria.

Un grupo "carbonilo" hace referencia a un grupo -C(=O)-R, en que R es hidrógeno, alquilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo (unido a través de un carbono de anillo) o heteroalíclicilo (unido a través de un carbono de anillo) como se definen en la presente memoria.

- 50 Un grupo "aldehído" hace referencia a un grupo carbonilo en que R es hidrógeno.

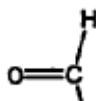
Un grupo "tiocarbonilo" hace referencia a un grupo -C(=S)-R en que R es como se define en la presente memoria.

Un grupo "C-carboxilo" hace referencia a un grupo -C(=O)-O-R en que R es como se define en la presente memoria.

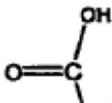
- Un grupo "O-carboxilo" hace referencia a un grupo  $RC(=O)-O-$  en que R es como se define en la presente memoria.
- Un grupo "oxo" hace referencia a un grupo  $=O$ .
- Un grupo "ácido carboxílico" hace referencia a un grupo C-carboxilo en que R es hidrógeno.
- Un grupo "halógeno" hace referencia a flúor, cloro, bromo o yodo.
- 5 Un grupo "trihalogenometilo" hace referencia a un grupo  $-CX_3$  en que X es un grupo halógeno como se define en la presente memoria.
- Un grupo "sulfinilo" hace referencia a un grupo  $-S(=O)-R$  en que R es como se define en la presente memoria. Un grupo "sulfonilo" hace referencia a un grupo  $-S(=O)_2-R$  en que R es como se define en la presente memoria.
- 10 Un grupo "S-sulfonamido" hace referencia a un grupo  $-S(=O)_2-NR_2$ , con cada uno de R como se define en la presente memoria.
- Un grupo "N-sulfonamido" hace referencia a un grupo  $RS(=O)_2-NR$  en que cada uno de R es como se define en la presente memoria.
- Un grupo "O-carbamilo" hace referencia a un grupo  $-OC(=O)-NR_2$  en que cada uno de R es como se define en la presente memoria.
- 15 Un grupo "N-carbamilo" hace referencia a un grupo  $ROC(=O)-NR-$  en que cada uno de R es como se define en la presente memoria.
- Un grupo "O-tiocarbamilo" hace referencia a un grupo  $-OC(=S)-NR_2$  en que cada uno de R es como se describe en la presente memoria.
- 20 Un grupo "N-tiocarbamilo" hace referencia a un grupo  $ROC(=S)NR-$  en que cada uno de R es como se describe en la presente memoria.
- Un grupo "amino" hace referencia a un grupo  $-NR_2$  en que cada uno de R es como se describe en la presente memoria.
- Un grupo "C-amido" hace referencia a un grupo  $-C(=O)-NR_2$  en que cada uno de R es como se describe en la presente memoria.
- 25 Un grupo "N-amido" hace referencia a un grupo  $RC(=O)-NR-$  en que cada uno de R es como se describe en la presente memoria.
- Un grupo "urea" hace referencia a un grupo  $-NRC(=O)-NR_2$  en que cada uno de R es como se describe en la presente memoria.
- Un grupo "guanidino" hace referencia a un grupo  $-RNC(=N)-NR_2$  en que cada uno de R es como se describe en la presente memoria.
- 30 Un grupo "guanilo" hace referencia a un grupo  $R_2NC(=N)-$  en que cada uno de R es como se describe en la presente memoria.
- Un grupo "nitro" hace referencia a un grupo  $-NO_2$ .
- Un grupo "ciano" hace referencia a un grupo  $-C\equiv N$ .
- 35 El término "fosfonilo" o "fosfonato" describe un grupo  $-P(=O)(OR)_2$ , con R como se define anteriormente en la presente memoria. El término "fosfato" describe un grupo  $-O-P(=O)(OR)_2$ , con cada uno de R como se define anteriormente en la presente memoria.
- Un "ácido fosfórico" es un grupo fosfato en que cada uno de R es hidrógeno. El término "fosfinilo" describe un grupo  $-PR_2$ , con cada uno de R como se define anteriormente en la presente memoria.
- 40 El término "tiourea" describe un grupo  $-NR-C(=S)-NR-$ , con cada uno de R como se define anteriormente en la presente memoria.
- El término "sacárido" hace referencia a una o más unidades de azúcar, una unidad de azúcar de cadena abierta o una unidad de azúcar cíclica (por ejemplo, unidades basadas en piranosa o furanosa), y comprende cualquier monosacárido, disacárido y oligosacárido a menos que se indique otra cosa.
- 45 Como se muestra en la fórmula general I anterior, los compuestos dados a conocer en la presente memoria incluyen un esqueleto de 1-6 átomos de carbono en el que al menos uno de estos átomos de carbono del esqueleto está unido covalentemente a hidrógeno, un grupo hidrocarburo (alquilo, arilo, etc.), un grupo carboxilo (por ejemplo, acilo, ácido

- carboxílico, etc.) o un grupo fosforilo (al que se hace referencia también en la presente memoria como un grupo fosfato o simplemente fosfato), y los demás 1-5 átomos de carbono del esqueleto están unidos covalentemente a cadenas hidrocarbonadas ( $X_1$ - $X_{n-1}$ ) a través de un heteroátomo ( $B_1$ - $B_n$  en la fórmula general I anterior). Estas cadenas hidrocarbonadas pueden incluir cadenas saturadas o insaturadas, sustituidas o no sustituidas, opcionalmente interrumpidas con restos aromáticos, alicíclicos, heteroalíclicos y/o heteroaromáticos, todos como se describen anteriormente en la presente memoria y se representan en la fórmula general II, en la que al menos una de estas cadenas termina en un grupo oxidado, definido anteriormente en la presente memoria como Z, que es diferente de hidrógeno.
- Como se usa en la presente memoria, el término "hidrocarburo" hace referencia a un compuesto que incluye átomos de hidrógeno y átomos de carbono, unidos covalentemente entre sí. Cuando el hidrocarburo está saturado, cada uno de  $C_a$ - $C_m$  está unido covalentemente a sus átomos vecinos por un solo enlace sigma. Cuando el hidrocarburo está insaturado, al menos dos átomos vecinos de  $C_a$ - $C_m$  están unidos entre sí por un doble o triple enlace.
- Cada una de las cadenas hidrocarbonadas puede incluir entre 1 y 26 átomos de carbono, por ejemplo entre 3 y 26 átomos de carbono. Las cadenas hidrocarbonadas que terminan en el grupo oxidado Z son típicamente cadenas de tamaño menor, por ejemplo que tienen entre 3 y 10 átomos de carbono, particularmente entre 3 y 6 átomos de carbono, no incluyendo el átomo de carbono en el grupo oxidado.
- La LDL es una lipoproteína compuesta por restos funcionalmente diferentes (componentes). Entre estos restos, están los fosfolípidos, que se considera que desempeñan un papel importante en el efecto de la LDL oxidada sobre enfermedades relacionadas con placa.
- Como se usa a lo largo de la presente memoria, el término "resto" o "componente" hace referencia a una porción mayoritaria de una molécula funcional que está ligada a otra molécula, reteniendo su actividad. Los fosfolípidos son sustancias naturales que incluyen un grupo lipídico no polar y un grupo fosfatidilo altamente polar en el extremo. Los fosfolípidos más frecuentes en la naturaleza son los fosfoglicéridos, que incluyen un esqueleto de glicerol y restos de acilo graso unidos al mismo. Los fosfoglicéridos tales como fosfoglicéridos de 1,2-O-acilo graso, así como modificaciones oxidativas de los mismos tales como POVPC y PGPC, se han implicado en estudios relacionados con la aterogénesis, como se describe con detalle anteriormente en la presente memoria.
- Además de LDL, fosfolípidos y fosfoglicéridos, otros lípidos están implicados en diversos procesos biológicos tales como inflamación. Estos incluyen, por ejemplo, esfingolípidos, glicolípidos y otros lípidos de membrana.
- Los compuestos descritos anteriormente, incluyendo también los compuestos de la presente invención como se definen en las reivindicaciones, se han diseñado principalmente según la estructura básica de los fosfoglicéridos, de tal forma que n en la fórmula general I anterior es igual a 3. Se hace referencia a dichos compuestos en la presente memoria como análogos de fosfoglicéridos oxidados, mientras que se hace referencia colectivamente en la presente memoria a los compuestos dados a conocer en la presente memoria como lípidos oxidados, e incluyen análogos y derivados de los mismos.
- Como se usa a lo largo de la presente memoria, el término "análogos" hace referencia a compuestos que están estructuralmente relacionados con la molécula en cuestión (por ejemplo, fosfolípidos oxidados, LDL oxidada, etc.) y por lo tanto pueden ejercer la misma actividad biológica.
- El término "derivados" hace referencia a moléculas en cuestión que se han modificado químicamente pero retienen una porción mayoritaria de las mismas intacta, por ejemplo, moléculas en cuestión que están sustituidas con sustituyentes adicionales o diferentes, moléculas en cuestión en que se ha oxidado o hidrolizado una porción de las mismas, y similares.
- En vista de la inestabilidad inherente del resto de O-acilo graso en los fosfoglicéridos de origen natural, así como en otros compuestos estructuralmente relacionados, resultante de su alta propensión a la hidrólisis rápida en sistemas biológicos por la fosfolipasa  $A_2$  (véase, por ejemplo, "A Textbook of Drug Design and Development", Povl Krogsgaard-Larsen and Hans Bundgaard, eds., Harwood Academic Publishers, capítulo 13, páginas 478-480), se han diseñado los compuestos dados a conocer en la presente memoria, incluyendo también los compuestos de la presente invención como se definen en las reivindicaciones, para incluir al menos un resto O-éter graso, de tal modo que en la fórmula general I anterior, cuando n es igual a 3, al menos uno de  $A_1$  y  $A_2$  sea un grupo CR''R'''. Se hace referencia a los compuestos en que uno de  $A_1$  y  $A_2$  es un grupo CR''R''' en la presente memoria como análogos de fosfoglicéridos monoeterificados, mientras que se hace referencia a los compuestos en que ambos  $A_1$  y  $A_2$  son CR''R''' como análogos de fosfoglicéridos dieterificados, y se caracterizan por una estabilidad *in vivo* mejorada, particularmente en comparación con los fosfoglicéridos oxidados sintéticos conocidos (por ejemplo, POVPC y PGPC).
- Como se define en la fórmula general I anterior, cuando n es igual a 3, al menos uno de  $X_1$  y  $X_2$  es una cadena hidrocarbonada que termina en un grupo oxidado tal que Z no sea hidrógeno. Sin embargo, puesto que los derivados de LDL oxidada de origen natural la cadena alquilo oxidada está localizada típicamente en la segunda posición, y puesto que se ha demostrado que la actividad biológica de varios fosfolípidos depende directamente de la estructura de los mismos (véase la sección de antecedentes para una discusión detallada), en otra realización dada a conocer en la presente memoria,  $X_2$  es una cadena hidrocarbonada que termina en un grupo oxidado.

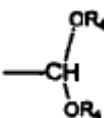
Como se describe adicionalmente en la fórmula general II anteriormente en la presente memoria, el grupo oxidado puede ser, por ejemplo,



(aldehído),



(ácido carboxílico) y



(acetal),

así como derivados de los mismos tales como, por ejemplo, cualquier derivado de carboxilo o tiocarboxilo (por ejemplo, un éster carboxílico en que W es oxígeno y R'' es un alquilo, arilo, cicloalquilo y similares), como se definen anteriormente en la presente memoria, derivados de imino (en que W es un átomo de nitrógeno), derivados de amido (en que W es oxígeno y R'' es una amina), derivados de fosfina o fosfonatos y muchos más, como se definen anteriormente en la presente memoria.

Es un ejemplo de un fosfoglicérido oxidado eterificado dado a conocer en la presente memoria 2,5'-aldehidolecitinéter (ALLE): 1-hexadecil-2-(5'-oxopentanol)-sn-glicero-3-fosfocolina (D-ALLE), 3-hexadecil-2-(5'-oxopentanol)-sn-glicero-1-fosfocolina (L-ALLE)] y la mezcla racémica de los mismos, cuya síntesis y uso se detallan adicionalmente en la sección de Ejemplos siguiente.

Sin embargo, como los aldehídos son conocidos como compuestos inestables que tienden a oxidarse fácilmente, es un ejemplo de los fosfoglicéridos oxidados eterificados novedosos según la presente invención el derivado de ácido 1-hexadecil-2-(4'-carboxibutil)-sn-glicero-3-fosfocolina (al que también se hace referencia de aquí en adelante como CI-201). Se dan a conocer también en la presente memoria sus correspondientes acetales 1-hexadecil-2-(5',5'-dimetoxipentiloxi)-sn-glicero-3-fosfocolina y 1-hexadecil-2-(5',5'-dietoxipentiloxi)-sn-glicero-3-fosfocolina (véase la Figura 10 para fórmulas estructurales bidimensionales). Se detallan adicionalmente la síntesis y uso de estos compuestos en la sección de Ejemplos siguiente.

Aunque los lípidos oxidados descritos anteriormente derivan de fosfoglicéridos, se dan a conocer también en la presente memoria lípidos oxidados derivados, por ejemplo, de esfingolípidos. Dichos análogos de esfingolípidos oxidados dados a conocer en la presente memoria tienen la fórmula general I anterior, en la que n es igual a 3, Y es hidrógeno, B<sub>2</sub> es NH y A<sub>2</sub> es C=O, en los que la cadena hidrocarbonada que termina en un grupo oxidado está unida a la amida, como X<sub>2</sub>, o a C<sub>1</sub>.

Aunque los fosfoglicéridos oxidados derivan del glicerol, que es una molécula de monosacárido, y los esfingolípidos derivan de la esfingosina, un aminoalcohol, se concibe que los fosfolípidos oxidados derivados de otras unidades basadas en alcohol biológicamente frecuentes ejercerían el mismo efecto. Además, puesto que no se ha establecido ninguna correlación entre la distancia del resto oxidado y el resto de fosfatidilo en los fosfolípidos oxidados, se concibe que los lípidos oxidados que derivan de un esqueleto de 4-6 átomos de carbono tendrían características estructurales similares a las de los fosfoglicéridos oxidados y como tales poseerían con toda probabilidad la misma antigenicidad y actividad de inmunomodulación, y se emplearían y aplicarían de forma similar a los derivados de fosfoglicéridos oxidados descritos en la presente memoria.

Es un ejemplo de dicha unidad basada en alcohol una unidad basada en un monosacárido tal como, por ejemplo, glucosa, eritritol y treitol.

Por tanto, en otra realización, los compuestos dados a conocer en la presente memoria incluyen hasta 6 átomos de carbono en la cadena principal. Los átomos de carbono en la cadena principal pueden estar unidos linealmente entre sí, para formar un esqueleto de monosacárido de cadena abierta o, como alternativa, pueden formar un esqueleto de monosacárido heterocíclico, a saber un esqueleto de piranos o furanos, de tal modo que en la fórmula general anterior, uno de R<sub>1</sub> y R'<sub>1</sub> esté unido covalentemente con uno de R<sub>n</sub> o R'<sub>n</sub> por un enlace etérico (un enlace R-O-R)

- 5 También como alternativa, los compuestos dados a conocer en la presente memoria pueden incluir 4-6 átomos de carbono en la cadena principal que forman un anillo no sacarídico, a saber, un anillo carbocíclico o heterocíclico de 4, 5 o 6 miembros, de tal modo que en la fórmula general I anterior uno de  $R_1$  y  $R'_1$  esté unido covalentemente a uno de  $R_n$  o  $R'_n$ , por enlaces diferentes (por ejemplo, un enlace sigma, un enlace pi, un enlace carboxílico, un enlace éter, un enlace tioéter y cualquier otro enlace).
- Como se describe adicionalmente en la fórmula general I anteriormente en la presente memoria, Y es un resto fosforilo (por ejemplo, fosforilcolina, fosforiletanolamina, etc.) o un resto no fosforilo (por ejemplo, hidrógeno, acilo o alquilo). Cuando Y es un resto no fosforilo, el compuesto resultante no es un fosfolípido, sino un compuesto diglicérido para  $n=3$ , o cualquier otro compuesto derivado de alcohol, por ejemplo derivado de monosacárido.
- 10 Puesto que hasta ahora no se ha enseñado ninguna actividad particular del grupo fosforilo con respecto a la actividad de inmunomodulación de LDL oxidada, se concibe adicionalmente que dichos compuestos no de fosforilo retendrían características estructurales similares a los fosfolípidos oxidados anteriores, y como tales con toda probabilidad poseerían antigenicidad y actividad de inmunomodulación y podrían emplearse y aplicarse de forma similar a los derivados de fosfolípidos oxidados descritos en la presente memoria.
- 15 En una realización dada a conocer en la presente memoria, Y es un sacárido como se define anteriormente en la presente memoria, y por tanto el compuesto dado a conocer en la presente memoria es un análogo oxidado de glicolípidos.
- En otra realización, el compuesto dado a conocer en la presente memoria es un análogo oxidado de cualquier lípido de membrana.
- 20 Los rasgos estructurales descritos anteriormente con respecto a los fosfoglicéridos oxidados se aplican para todos los compuestos descritos anteriormente en la presente memoria. Por ello, en una realización dada a conocer en la presente memoria, al menos uno de  $A_1, A_2, \dots$  y  $A_{n-1}$  es un grupo  $CR''R'''$ , de tal modo que el compuesto incluya al menos una cadena lateral eterificada. Debido a la inestabilidad de la cadena lateral de O-acilo, se prefiere adicionalmente que al menos uno de los grupos oxidados en  $X_1-X_{n-1}$  esté ligado con dicha cadena lateral eterificada.
- 25 Aunque los fosfolípidos de origen natural y fosfolípidos oxidados incluyen típicamente cadenas de O-acilo, existen evidencias de que los derivados de tiol de fosfolípidos oxidados, que incluyen por ejemplo cadenas de S-acilo, pueden ejercer la misma actividad biológica (véanse, por ejemplo, Reddy *et al.* "Antitumor ether lipids: an improved synthesis of ilmofosine and an entioselective synthesis of an ilmofosine analog". *Tetrahedron Letters*, 1994; 17: 2679-2682; Batia y Hajdu. "Stereospecific synthesis of ether and thioether phospholipids. The use of L-glyceric acid as a chiral phospholipids precursor". *J. Org. Chem.* 1988; 53: 5034-5039; Bosies *et al.* *Lipids*, 1987; 22: 947; Bosies *et al.* pub. alem. DE 3.906.952 [C.A. 1991, 114, 102394w] y Herrmann *et al.* "NCI-EORTC Symposium on New Drugs in Cancer Therapy", Amsterdam, marzo de 1992). Como los tioles se caracterizan por una bioestabilidad potenciada, dichos compuestos pueden ser altamente beneficiosos adicionalmente.
- 30 Por ello, en una realización dada a conocer en la presente memoria, al menos uno de  $B_1-B_n$  es azufre, de tal modo que al menos una de las cadenas laterales sea un S-acilo tiolado o una cadena de S-alquilo. En otra realización dada a conocer en la presente memoria, al menos uno de  $X_1-X_{n-1}$  que comprende un grupo oxidado está ligado con dicha cadena lateral tiolada.
- Como alternativa, cada uno de  $B_1-B_n$  puede ser un heteroátomos biocompatible distinto de oxígeno y azufre tal como, por ejemplo, nitrógeno, fósforo o silicio, como se describe en la fórmula general I anteriormente en la presente memoria.
- 40 Aunque los compuestos dados a conocer en la presente memoria se han diseñado básicamente a partir de fosfolípidos oxidados tales como fosfoglicéridos, los presentes inventores prevén también que una sola cadena hidrocarbonada oxidada, que esté opcionalmente unida a un grupo polar, ejercería esa misma antigenicidad y actividad de inmunomodulación que los análogos fosfolipídicos oxidados descritos anteriormente.
- 45 Dicha cadena hidrocarbonada oxidada es un rasgo común de los metabolitos de ácido araquidónico. El ácido araquidónico es un ácido graso poliinsaturado que tiene 20 átomos de carbono que se produce *in vivo* mediante la hidrólisis enzimática de fosfolípidos que contienen el mismo. Tras su liberación, el ácido araquidónico se oxida a una serie de autacoïdes importantes por ciertas lipooxigenasas, y después de una cascada de reacciones enzimáticas adicionales, los autacoïdes se metabolizan hasta una familia clásica de prostaglandinas (PG), prostaciclina ( $PGI_2$ ) y tromboxano (TX)  $A_2$ , que son activos en muchas rutas biológicas. Todos estos metabolitos incluyen un rasgo común de una cadena de 6 carbonos terminada en un doble enlace oxidable.
- 50 Como se describe anteriormente en la presente memoria y se demuestra adicionalmente en la sección de Ejemplos siguiente, la presencia de un grupo oxidado en análogos de LDL oxidada que se diseñan para imitar la inmunomodulación inducida por LDL ox es esencial. Por tanto, en estudios comparativos, se ha mostrado, por ejemplo, que el compuesto V, el compuesto no oxidado correspondiente a CI-201 (compuesto VII) no es activo mientras que CI-201 lo es (véanse, por ejemplo, los ejemplos XIV y XV en la sección de Ejemplos siguiente). Además, basándose en la ruta metabólica del ácido araquidónico, se supone que otros fosfolípidos oxidados experimentan la misma ruta, que da como resultado la liberación de la cadena lateral oxidada. Como se describe adicionalmente anteriormente en la
- 55

- 5 presente memoria, la cadena lateral oxidada incluye preferiblemente entre 3 y 7 átomos de carbono, y por lo tanto es similar al rasgo de cadena de 6 carbonos en los metabolitos de ácido araquidónico. Además, el mecanismo de CD1 descrito anteriormente, que sugiere un papel para los lípidos en el sistema inmunitario, indica que la cabeza hidrófila, concretamente el grupo de cabeza del carbono C2 y/o el carbono C3 en CD1d, es lo más probablemente el epítipo antigénico presentado ante el sistema inmunitario ya que es la parte que presenta el surco de CD1 que esconde la parte hidrófoba de la molécula, indicando un papel de epítipo hidrófilo en el carbono C2.
- En fosfolípidos oxidados tales como fosfoglicéridos, la cadena lateral oxidada se une a un esqueleto de fosfoglicerol. Sin embargo, como se menciona anteriormente en la presente memoria, no se ha sugerido un papel particular para el esqueleto de fosfoglicerol.
- 10 Por ello, en una realización dada a conocer en la presente memoria,  $n$  es igual a 1, de tal modo que el compuesto dado a conocer en la presente memoria sea una sola cadena hidrocarbonada terminada en un grupo oxidado. Aunque dicha cadena hidrocarbonada única oxidada no es polar, puede unirse a un grupo polar tal como un grupo fosforilo, de tal modo que en la fórmula general I anteriormente en la presente memoria, cuando  $n$  es igual a 1, al menos uno de  $R_1$  y  $R'_1$  sea un grupo fosfato o fosfonato. Como alternativa, al menos uno de  $R_1$  y  $R'_1$  puede seleccionarse de otros grupos polares biocompatibles tales como, por ejemplo, péptidos, sacáridos y similares.
- 15 Dependiendo de los sustituyentes, cada uno de los átomos de carbono en cada uno de los compuestos descritos anteriormente, a saber  $C_1-C_n$  y  $C_a-C_m$ , puede ser quiral o no quiral. Cualquier átomo de carbono quiral que esté presente en los compuestos dados a conocer en la presente memoria, incluyendo también los compuestos de la presente invención como se definen en las reivindicaciones, puede estar en configuración R, configuración S o racémica. Por tanto, la presente invención comprende cualquier combinación de átomos de carbono quirales y racémicos, incluyendo todos los estereoisómeros, isómeros ópticos, enantiómeros y anómeros posibles. Como se demuestra en la sección de Ejemplos siguiente, los compuestos dados a conocer en la presente memoria, incluyendo también los compuestos de la presente invención, pueden sintetizarse reteniendo la configuración del material de partida. Los compuestos pueden sintetizarse selectivamente además en términos de la estereoquímica del grupo oxidado. Por ello, al seleccionar los materiales de partida apropiados y las condiciones de síntesis apropiadas, puede determinarse la pureza óptica (por ejemplo, la inclusión de carbonos quirales y/o racémicos) y los estereoisómeros obtenidos de los compuestos resultantes. En los casos en que se obtienen mezclas racémicas, pueden usarse técnicas conocidas para separar los isómeros ópticos o estereoisómeros. Dichas técnicas se describen, por ejemplo, en "Organic chemistry, 4ª edición de Paula Yurkanis Bruice, páginas 180-185 y página 214, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ 07458.
- 20 25 30 La presente invención comprende adicionalmente cualquier sal, hidrato y solvato farmacéuticamente aceptable de los compuestos de la invención como se definen en las reivindicaciones.
- La frase "sal farmacéuticamente aceptable" hace referencia a una especie cargada del compuesto original y a su contraión, que se usa típicamente para modificar las características de solubilidad del compuesto original y/o para reducir cualquier irritación significativa en el organismo por el compuesto original, aunque sin anular la actividad biológica y propiedades del compuesto administrado. Un ejemplo, sin limitación, de una sal farmacéuticamente aceptable sería un anión carboxilato y un catión tal como, pero sin limitación, amonio, sodio, potasio y similares.
- 35 El término "solvato" hace referencia a un complejo de estequiometría variable (por ejemplo, di-, tri-, tetra-, penta-, hexa- y demás), que se forma por un soluto (el compuesto de la presente invención) y un disolvente, en los que el disolvente no interfiere con la actividad biológica del soluto. Los disolventes adecuados incluyen, por ejemplo, etanol, ácido acético y similares.
- 40 El término "hidrato" hace referencia a un solvato, como se define anteriormente en la presente memoria, en que el disolvente es agua.
- Como se detalla a continuación en la presente memoria, los compuestos recién diseñados de la presente invención ejercen una actividad de inmunomodulación altamente beneficiosa y por lo tanto pueden utilizarse en diversas aplicaciones terapéuticas. Utilizar estos compuestos en aplicación terapéutica implica la administración de los mismos tal cual o como parte de una composición farmacéutica en que se mezclan con portadores o excipientes adecuados.
- 45 Por tanto, según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, cualquiera de los compuestos de la invención como se definen en las reivindicaciones y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 50 Como se usa en la presente memoria, una "composición farmacéutica" hace referencia a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en la presente memoria con otros componentes químicos tales como portadores y excipientes fisiológicamente adecuados. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.
- 55 En la presente memoria, el término "ingrediente activo" hace referencia a los compuestos (por ejemplo, ALLE y CI-201 y otros compuestos representados en la fórmula general I anteriormente en la presente memoria) responsables del efecto biológico.

De aquí en adelante, las frases "portador fisiológicamente aceptable" y "portador farmacéuticamente aceptable", que pueden usarse intercambiamente, hacen referencia a un portador o diluyente que no causa una irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y propiedades del compuesto administrado. Se incluye un coadyuvante en estas frases.

5 En la presente memoria, el término "excipiente" hace referencia a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un ingrediente activo. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

10 Pueden encontrarse técnicas para la formulación y administración de fármacos en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, suministro oral, rectal, transmucoso, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas o intramedulares así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares directas.

15 Como alternativa, puede administrarse la composición farmacéutica de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección de la composición farmacéutica directamente en una región de tejido de un paciente.

En una realización preferida de la presente invención, las composiciones farmacéuticas se diseñan para modular una respuesta inmunitaria y/o inflamatoria mediante administración mucosa.

20 En otra realización preferida de la presente invención, las composiciones farmacéuticas se diseñan para modular una respuesta inmunitaria y/o inflamatoria mediante administración oral.

Más preferiblemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se diseñan para administración nasal o intraperitoneal, como se detalla más adelante en la presente memoria.

25 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden fabricarse mediante procesos bien conocidos en la materia, por ejemplo, mediante procesos de mezclado, disolución, granulación, preparación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atropamiento o liofilización convencionales.

Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención pueden formularse por tanto de manera convencional, usando uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

30 Para inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica pueden formularse en disoluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank, disolución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para administración transmucosa, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que se va a permear. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la materia.

35 Para administración oral, la composición farmacéutica puede formularse fácilmente combinando los compuestos activos con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la materia. Dichos portadores posibilitan que la composición farmacéutica se formule como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones densas, suspensiones y similares, para ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral pueden prepararse usando un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados si se desean, obteniéndose comprimidos o núcleos de gragea. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

45 Los núcleos de gragea se proporcionan con recubrimientos adecuados. Con este fin, pueden usarse disoluciones concentradas de azúcar que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, disoluciones de lacado y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Pueden añadirse tintes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de gragea para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

50 Las composiciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos mezclados con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los ingredientes activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados tales como ácidos grasos, parafina líquida

o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deberían estar en dosificaciones adecuadas para la vía elegida de administración.

Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas masticables formulados de manera convencional.

- 5 Para administración por inhalación nasal, los ingredientes activos para uso según la presente invención se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverizador de aerosol de un envase a presión o un nebulizador con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol a presión, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos, por ejemplo de gelatina, para uso en un dispensador, que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

- 15 La composición farmacéutica descrita en la presente memoria puede formularse para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, opcionalmente con un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión.

- 20 Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de la preparación activa en forma hidrosoluble. Adicionalmente, las suspensiones de ingredientes activos pueden prepararse como suspensiones de inyección basadas en aceite o agua apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizantes o agentes adecuados que aumenten la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.

- 25 Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo disolución basada en agua estéril exenta de pirógenos, antes del uso.

La composición farmacéutica de la presente invención puede formularse también en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención usando, por ejemplo, bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

- 30 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el fin pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de ingredientes activos eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de un trastorno (por ejemplo aterosclerosis) o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando.

- 35 La determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz está bien dentro de las capacidades de los especialistas en la material especialmente a la vista de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria.

- 40 Para cualquier preparación usada en los métodos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro* y de cultivo celular. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir una concentración o título deseado. Dicha información puede usarse para determinar más exactamente las dosis útiles en seres humanos.

- 45 La toxicidad y eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en la presente memoria pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándares *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos *in vitro* y de cultivo celular y estudios animales pueden usarse para formular una serie de dosificaciones para uso en seres humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación, vía de administración y dosificación exactas pueden elegirse por el facultativo individual a la vista del estado del paciente (véase, por ejemplo, Fingl *et al.*, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", cap. 1, pág.1).

- 50 La cantidad e intervalo de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles plasmáticos o cerebrales del ingrediente activo que sean suficientes para inducir o suprimir la angiogénesis (concentración eficaz mínima, CEM). La CEM variará para cada preparación, pero puede estimarse a partir de datos *in vitro*. Las dosificaciones necesarias para conseguir la CEM dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Pueden usarse ensayos de detección para determinar las concentraciones plasmáticas.

- 55 Dependiendo de la gravedad y sensibilidad de la afección para tratar, la dosificación puede ser una sola o una pluralidad de administraciones, durando un curso de tratamiento de varios días a varias semanas o hasta que se efectúa la curación o se consigue una reducción del estado patológico.

La cantidad de composición para administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se esté tratando, de la gravedad de la afección, del modo de administración, del criterio del facultativo a cargo, etc.

5 Las composiciones de la presente invención pueden presentarse, si se desea, en un paquete o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El paquete puede estar compuesto, por ejemplo, por metal o lámina de plástico, tal como un blíster. El paquete o dispositivo dispensador puede estar acompañado de instrucciones para administración. El paquete o dispensador puede alojar también un aviso asociado al envase en una forma prescrita por una agencia gubernamental reguladora de la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, reflejando dicho aviso la aprobación por la agencia de la forma de composición para administración humana o veterinaria. Dicho aviso puede ser, por ejemplo, una etiqueta aprobada por la U.S. Food and Drug Administration para fármacos con receta o un inserto de producto aprobado. Pueden prepararse también composiciones que comprenden una preparación de la invención formulada en un portador farmacéutico compatible, disponerse en un envase apropiado y etiquetarse para el tratamiento de la afección indicada, como se detalla adicionalmente a continuación en la presente memoria.

10 Por tanto, en una realización preferida de la presente invención, la composición farmacéutica se envasa en un material de envasado y se identifica por impresión, en o sobre el material de envasado, para uso en el tratamiento o prevención de una inflamación asociada a un lípido oxidado endógeno. Se proporciona a continuación en la presente memoria una lista de ejemplos representativos de enfermedades y trastornos asociados a dicha inflamación.

15 Como se describe con detalle adicionalmente a continuación en la presente memoria, la composición farmacéutica de la presente invención puede incluir adicionalmente un compuesto adicional que sea útil en el tratamiento o la prevención de la inflamación anterior.

20 Como se describe con detalle en la sección de Ejemplos siguiente, los ejemplos representativos de los compuestos recién diseñados de la presente invención se han encontrado eficaces en la modulación de una respuesta inmunitaria y/o una respuesta inflamatoria asociada a LDL oxidada endógena, conduciendo por tanto a la atenuación de enfermedades asociadas a LDL oxidada endógena. Estos resultados sugieren claramente que (i) la modulación de una respuesta inmunitaria y/o inflamatoria ante LDL oxidada endógena en particular, y lípidos oxidados endógenos en general, puede inducirse mediante cualquier compuesto que esté estructuralmente relacionado con un lípido oxidado; y (ii) los compuestos capaces de modular una respuesta inmunitaria y/o inflamatoria ante lípidos oxidados pueden utilizarse para tratar o prevenir la inflamación asociada a lípidos oxidados endógenos.

25 Por ello, según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto o una composición farmacéutica para uso en un método de tratamiento o prevención de una inflamación asociada a un lípido oxidado endógeno de acuerdo con las reivindicaciones. El método según este aspecto de la presente invención se efectúa mediante la administración a un sujeto necesitado de ello de una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más lípidos oxidados como se definen en las reivindicaciones.

30 Como se usa en la presente memoria, la frase “un lípido oxidado endógeno” hace referencia a uno o más lípidos oxidados que están presentes o se forman *in vivo*, como resultado de procesos inflamatorios y otros mediados por células o humorales.

35 El término “método” hace referencia a modos, medios, técnicas y procedimientos para lograr una tarea dada incluyendo, pero sin limitación, aquellos modos, medios, técnicas y procedimientos conocidos o fácilmente desarrollados a partir de modos, medios, técnicas y procedimientos conocidos por practicantes de las técnicas química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

40 Como se usa en la presente memoria, la frase “tratar o prevenir” incluye anular, inhibir sustancialmente, retardar o invertir la progresión de una enfermedad, mejorar sustancialmente síntomas clínicos de una enfermedad o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos de una enfermedad.

45 Los ejemplos de sujetos adecuados para dicho tratamiento incluyen sujetos que padecen una enfermedad o trastorno asociado a una inflamación, como se detalla a continuación en la presente memoria. Los sujetos individuales preferidos según la presente invención son mamíferos tales como caninos, felinos, ovinos, porcinos, equinos y bovinos. Preferiblemente, los sujetos individuales según la presente invención son seres humanos.

50 La frase “lípido oxidado” hace referencia a un compuesto natural, o preferiblemente preparado sintéticamente, que tiene rasgos estructurales comunes con un lípido natural, un lípido oxidado y cualquier componente, resto, análogo y derivado del mismo. Por ejemplo, la LDL oxidada está compuesta por varios restos funcional y estructuralmente diferentes, y esta frase comprende cualquier compuesto preparado sintéticamente que tenga rasgos estructurales comunes con uno cualquiera de estos restos. Esta frase comprende adicionalmente cualquier derivado de dichos análogos.

55 Los ejemplos representativos de lípidos oxidados incluyen, sin limitación, fosfolípidos oxidados, análogos de factor activador de plaquetas, análogos de plasmalógeno, hidrocarburos de 3-30 átomos de carbono sustituidos o no sustituidos que terminan en un grupo oxidado, análogos oxidados de esfingolípidos, análogos oxidados de glicolípidos, análogos oxidados de lípidos de membrana y cualquier análogo o derivado de los mismos.

Los fosfolípidos en general y fosfoglicéridos en particular son lípidos bien conocidos que son también componentes de la LDL oxidada. Los fosfoglicéridos son derivados de fosfoglicerol que incluyen uno o más grupos acilo graso o acilo unidos al esqueleto de fosfoglicerol.

5 Por ello, los fosfolípidos oxidados preparados sintéticamente pueden usarse eficazmente en el método dado a conocer en la presente memoria. Los ejemplos representativos de fosfolípidos oxidados sintéticos conocidos incluyen, sin limitación, 1-palmitoil-2-azelaoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-hexadecil-2-azelaoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-palmitoil-2-glutaroil-sn-glicero-3-fosfocolina (PGPC), 1-palmitoil-2-(5-oxovaleroil)-sn-glicero-3-fosfocolina (POVPC) y 1-palmitoil-2-(9-oxononanoil)-sn-glicero-3-fosfocolina.

10 Los ejemplos adicionales de fosfolípidos oxidados sintéticos incluyen los compuestos dados a conocer anteriormente en la presente memoria, incluyendo aquellos compuestos en que  $n = 1$ . Estos últimos se concretan en la presente memoria como hidrocarburos de 3-30 átomos de carbono sustituidos o no sustituidos que terminan en un grupo oxidado.

Son otros compuestos que están estructuralmente relacionados con los fosfoglicéridos oxidados, y pueden por lo tanto usarse eficazmente en este y otros aspectos dados a conocer en la presente memoria, análogos de factor activador de plaquetas (PAF).

15 Los PAF son 1-alquilo-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolinas, glicerolípidos ligados por éter de origen natural. La cadena alquilo en la posición sn-1 es típicamente un alquilo insaturado que tiene 16-18 átomos de carbono. Algunos análogos de PAF bien conocidos incluyen típicamente la sustitución del resto acilo en posición sn-2 por un resto acilo de cadena larga (por ejemplo, un acilo de ácido graso). Los análogos de PAF adicionales incluyen una modificación oxidativa, en la cadena O-alquilo insaturada presente en la posición sn-1 o en la cadena de acilo graso presente en la posición sn-2.

20 Los ejemplos representativos de análogos de PAF conocidos que pueden usarse en este contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, 1-palmitoil-2-(9-oxononanoil)-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-hexadecil-2-acetoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-octadecil-2-acetoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-hexadecil-2-butirolil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-octadecil-2-butirolil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-palmitoil-2-acetoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-octadecenil-2-acetoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-hexadecil-2-(homogammalinolenoil)-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-hexadecil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-hexadecil-2-eicosapentenoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-hexadecil-2-docosahexenoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-octadecil-2-metil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-hexadecil-2-butenoil-sn-glicero-3-fosfocolina, Lyso PAF C16 y Lyso PAF C18. Sin embargo, puede usarse adicionalmente en este contexto cualquier otro análogo de PAF o derivado de mismo.

25 Son compuestos adicionales, que están estructuralmente relacionados con fosfoglicéridos oxidados y por lo tanto pueden usarse eficazmente en este y otros aspectos dados a conocer en la presente memoria, los análogos de plasmalógeno.

30 Los plasmalógenos son 1-alquilo-2-acetil-sn-glicero-3-fosfatidilos, glicerolípidos ligados por éter de origen natural en que la cadena alquilo en posición sn-1 está típicamente saturada. Algunos análogos de plasmalógeno bien conocidos incluyen típicamente la sustitución del resto acilo en la posición sn-2 por un resto acilo de cadena larga (por ejemplo, un ácido graso) e incluyen adicionalmente una modificación oxidativa, en posición sn-1 o en posición sn-2.

35 Los ejemplos representativos de análogos de plasmalógeno conocidos que pueden usarse como se da a conocer en la presente memoria incluyen, sin limitación, 1-O-1'-(Z)-hexadecenil-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]dodecanoil]-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-O-1'-(Z)-hexadecenil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-O-1'-(Z)-hexadecenil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-O-1'-(Z)-hexadecenil-2-docosahexenoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-O-1'-(Z)-hexadecenil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1-O-1'-(Z)-hexadecenil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina y 1-O-1'-(Z)-hexadecenil-2-docosahexanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina. Sin embargo, pueden usarse adicionalmente en este contexto otros análogos de plasmalógeno o derivados de los mismos.

40 Como se usa en la presente memoria, la frase "una inflamación asociada a un lípido oxidado endógeno" describe una inflamación que está asociada a la formación *in vivo* o la presencia de uno o más lípidos oxidados (por ejemplo, LDL oxidada, lípidos de membrana, etc.).

45 La inflamación es la respuesta protectora del cuerpo ante una lesión. Varias citocinas desempeñan papeles clave en la mediación de reacciones inflamatorias, entre ellas IFN- $\gamma$  e IL-10. IFN- $\gamma$  se ha implicado en la patogénesis de una variedad de afecciones autoinmunes e inflamatorias crónicas. Por otro lado, IL-10 inhibe la producción de IFN- $\gamma$  por células inmunitarias activadas tales como células TH2 y M2, y esta citocina (IL-10) sirve como "puerta" antiinflamatoria principal.

50 Una inflamación excesiva es a menudo nociva, al implicar o conducir a una multitud de enfermedades y trastornos. Como se explica con detalle anteriormente en la presente memoria, una respuesta inflamatoria excesiva está asociada típicamente a epítotos lipídicos oxidados.

55 Como se muestra en la sección de Ejemplos siguiente, la modulación de la respuesta inmunitaria ante LDL oxidada por análogos de LDL oxidada sintéticos está asociada a un efecto antiinflamatorio. Este efecto antiinflamatorio puede utilizarse en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno asociado a la inflamación en que esté implicada

LDL oxidada endógena o cualquier otro lípido oxidado endógeno. Dichas enfermedades y trastornos incluyen, por ejemplo, enfermedades o trastornos asociados a la formación de placa incluyendo, pero sin limitación, aterosclerosis, enfermedad cardiovascular aterosclerótica, enfermedad cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, estenosis, reestenosis y estenosis en endoprótesis vascular, así como enfermedades o trastornos autoinmunes, enfermedades o trastornos neurodegenerativos, enfermedades o trastornos proliferativos y procesos de envejecimiento.

Por tanto, los ejemplos representativos de enfermedades o trastornos asociados a una inflamación, que a su vez está asociada a un lípido oxidado endógeno, y son por tanto tratables de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, enfermedades o trastornos inflamatorios idiopáticos, enfermedades o trastornos inflamatorios crónicos, enfermedades o trastornos inflamatorios agudos, enfermedades o trastornos autoinmunes, enfermedades o trastornos infecciosos, enfermedades o trastornos inflamatorios malignos, enfermedades o trastornos inflamatorios relacionados con trasplantes, enfermedades o trastornos inflamatorios degenerativos, enfermedades o trastornos asociados a hipersensibilidad, enfermedades o trastornos inflamatorios cardiovasculares, enfermedades o trastornos inflamatorios cerebrovasculares, enfermedades o trastornos vasculares periféricos, enfermedades o trastornos inflamatorios glandulares, enfermedades o trastornos inflamatorios gastrointestinales, enfermedades o trastornos inflamatorios cutáneos, enfermedades o trastornos inflamatorios hepáticos, enfermedades o trastornos inflamatorios neurológicos, enfermedades o trastornos inflamatorios musculoesqueléticos, enfermedades o trastornos inflamatorios renales, enfermedades o trastornos inflamatorios reproductivos, enfermedades o trastornos inflamatorios sistémicos, enfermedades o trastornos inflamatorios de tejido conectivo, tumores inflamatorios, necrosis, enfermedades o trastornos inflamatorios relacionados con implantes, procesos inflamatorios de envejecimiento, enfermedades o trastornos por inmunodeficiencia, enfermedades y trastornos proliferativos y enfermedades o trastornos inflamatorios pulmonares, como se detalla a continuación en la presente memoria.

Los ejemplos no limitantes de hipersensibilidades incluyen hipersensibilidad de tipo I, hipersensibilidad de tipo II, hipersensibilidad de tipo III, hipersensibilidad de tipo IV, hipersensibilidad inmediata, hipersensibilidad mediada por anticuerpos, hipersensibilidad mediada por complejos inmunitario, hipersensibilidad mediada por linfocitos T, hipersensibilidad de tipo retardado, hipersensibilidad mediada por linfocitos T auxiliares, hipersensibilidad mediada por linfocitos T citotóxicos, hipersensibilidad mediada por linfocitos TH1 e hipersensibilidad mediada por linfocitos TH2.

Los ejemplos no limitantes de enfermedad o trastorno inflamatorio cardiovascular incluyen enfermedades o trastornos oclusivos, aterosclerosis, una enfermedad valvular cardíaca, estenosis, reestenosis, estenosis en prótesis endovascular, infarto de miocardio, enfermedad arterial coronaria, síndromes coronarios agudos, insuficiencia cardíaca congestiva, angina de pecho, isquemia de miocardio, trombosis, granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu, síndrome de Kawasaki, enfermedad o trastorno autoinmune anti-factor VIII, vasculitis necrosante de vasos pequeños, poliangiitis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis necrosante focal pauciinmunitaria, glomerulonefritis semilunar, síndrome antifosfolípido, insuficiencia cardíaca inducida por anticuerpos, púrpura trombocitopénica, anemia hemolítica autoinmune, autoinmunidad cardíaca, enfermedad o trastorno de Chagas y autoinmunidad anti-linfocitos T auxiliares.

La estenosis es una enfermedad oclusiva de los vasos causada comúnmente por placa ateromatosa y actividad plaquetaria aumentada, que afecta lo más críticamente a los vasos coronarios.

La reestenosis es la reoclusión progresiva, a menudo después de la reducción de oclusiones en los vasos estenóticos. En casos en que la patencia de los vasos requiera un soporte mecánico con una prótesis endovascular, puede aparecer estenosis en la prótesis endovascular, reocluyendo el vaso tratado.

Los ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos cerebrovasculares incluyen apoplejía, inflamación cerebrovascular, hemorragia cerebrovascular e insuficiencia arterial vertebral.

Los ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos vasculares periféricos incluyen gangrena, vasculopatía diabética, enfermedad isquémica intestinal, trombosis, retinopatía diabética y nefropatía diabética.

Los ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos autoinmunes incluyen todas las enfermedades causadas por una respuesta inmunitaria tales como inmunidad mediada por autoanticuerpos o células ante un autoantígeno y similares. Son ejemplos representativos artritis reumatoide crónica, artritis reumatoide juvenil, lupus sistémico eritematoso, esclerodermia, enfermedad del tejido conectivo mixto, poliarteritis nodular, polimiositis/dermatomiositis, síndrome de Sjögren, enfermedad de Behçet, esclerosis múltiple, diabetes autoinmune, enfermedad de Hashimoto, psoriasis, mixedema primario, anemia perniciosa, miastenia grave, hepatitis crónica activa, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, uveítis, vasculitis y trombocitopenia inducida por heparina.

Los ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos inflamatorios glandulares incluyen enfermedades o trastornos pancreáticos, diabetes de tipo I, enfermedades o trastornos del tiroides, enfermedad de Graves, tiroiditis, tiroiditis autoinmune espontánea, tiroiditis de Hashimoto, mixedema idiopático, autoinmunidad ovárica, infertilidad autoinmune antiespermática, prostatitis autoinmune y síndrome poliglandular autoinmune de tipo I.

Los ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos inflamatorios gastrointestinales incluyen colitis, ileitis, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal crónica, síndrome inflamatorio intestinal, enfermedad

inflamatoria crónica del intestino, enfermedad celíaca, colitis ulcerosa, úlcera, úlcera cutánea, escara de decúbito, úlcera gástrica, úlcera péptica, úlcera bucal, úlcera nasofaríngea, úlcera esofágica, úlcera duodenal y úlcera gastrointestinal.

Los ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos inflamatorios cutáneos incluyen acné y una enfermedad cutánea ampollosa autoinmune.

- 5 Los ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos inflamatorios hepáticos incluyen hepatitis autoinmune, cirrosis hepática y cirrosis biliar.

Los ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos inflamatorios neurológicos incluyen esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, miastenia grave, neuropatía motora, síndrome de Guillain-Barre, neuropatía autoinmune, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, enfermedad o trastorno neurológico paraneoplásico, atrofia cerebelar paraneoplásica, síndrome de la persona rígida no paraneoplásico, atrofia cerebelar progresiva, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydeham, síndrome de Gilles de la Tourette, poliendocrinopatía autoinmune, neuropatía disinmunitaria, neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple, enfermedad de Huntington, demencia asociada a SIDA, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple, apoplejía, enfermedad o trastorno inflamatorio retiniano, enfermedad o trastorno inflamatorio ocular, neuritis óptica, encefalopatía esponjiforme, migraña, cefalea, cefalea en brotes y síndrome de la persona rígida.

10

15

Los ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos inflamatorios del tejido conectivo incluyen miositis autoinmune, síndrome de Sjögren primario, enfermedad o trastorno autoinmune de músculo liso, miositis, tendinitis, inflamación de ligamento, condritis, inflamación de articulación, inflamación sinovial, síndrome del túnel carpiano, artritis, artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, inflamación esquelética, enfermedad o trastorno autoinmune del oído y enfermedad o trastorno autoinmune del oído interno.

20

Los ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos inflamatorios renales incluyen nefritis intersticial autoinmune y/o cáncer renal.

Los ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos inflamatorios reproductivos incluyen pérdida fetal recurrente, quiste ovárico o enfermedad o trastorno asociado a la menstruación.

- 25 Los ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos inflamatorios sistémicos incluyen lupus sistémico eritematoso, esclerosis sistémica, choque séptico, síndrome del choque tóxico y caquexia.

Los ejemplos no limitantes de enfermedad o trastorno infeccioso incluyen enfermedades o trastornos infecciosos crónicos, una enfermedad o trastorno infeccioso subagudo, una enfermedad o trastorno infeccioso agudo, una enfermedad o trastorno vírico, una enfermedad o trastorno bacteriano, una enfermedad o trastorno protozoario, una enfermedad o trastorno parasitario, una enfermedad o trastorno fúngico, una enfermedad o trastorno por micoplasma, gangrena, sepsis, una enfermedad o trastorno priónico, gripe, tuberculosis, malaria, síndrome de inmunodeficiencia adquirida y síndrome respiratorio agudo grave.

30

Los ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos inflamatorios relacionados con trasplantes incluyen rechazo de injerto, rechazo de injerto crónico, rechazo de injerto subagudo, rechazo de injerto agudo, rechazo de injerto hiperagudo y enfermedad o trastorno del injerto contra el hospedador. Los implantes ejemplares incluyen implante protésico, implante de mama, implante de silicona, implante dental, implante de pene, implante cardiaco, articulación artificial, dispositivo de reparación de fractura ósea, implante de reemplazo óseo, implante de suministro de fármaco, catéter, marcapasos, corazón artificial, válvula cardiaca artificial, implante de liberación de fármaco y tubo respirador.

35

Los ejemplos no limitantes de tumores inflamatorios incluyen tumor maligno, tumor benigno, tumor sólido, tumor metastásico y tumor no sólido.

40

Los ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos inflamatorios pulmonares incluyen asma, asma alérgica, enfisema, enfermedad o trastorno pulmonar obstructivo crónico, sarcoidosis y bronquitis.

Es un ejemplo de enfermedad o trastorno proliferativo el cáncer.

Se ha reseñado recientemente la implicación de los fosfolípidos y metabolitos de fosfolípidos en el tratamiento o prevención de enfermedades y síndromes tales como, por ejemplo, estrés oxidativo por envejecimiento (Onorato JM, *et al.*, Annal. NY Acad. Sci. 20 de noviembre de 1998; 854: 277-90), artritis reumatoide (AR) (Paimela L, *et al.*, Ann. Rheum. Dis., agosto de 1996; 55(8): 558-9), artritis reumatoide juvenil (Savolainen A, *et al.*, 1995; 24(4): 209-11), enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (Sawai T, *et al.*, Pediatr. Surg. Int., mayo de 2001; 17(4): 269-74) y cáncer renal (Noguchi S, *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 31 de enero de 1992; 182(2): 544-50), que apoya por tanto adicionalmente el uso beneficioso de análogos de LDL oxidada en el tratamiento o la prevención de estas enfermedades o trastornos.

45

50

Según el método de la presente invención, los lípidos oxidados pueden administrarse a un sujeto mediante diversas vías incluyendo, por ejemplo, el suministro oral, rectal, transmucoso, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como por vía intratecal, intraventricular

directa, intravenosa, intraperitoneal, intranasal o intraocular. Sin embargo, como se describe con detalle a lo largo de la presente memoria y se demuestra adicionalmente en la sección de Ejemplos siguiente, las vías de administración preferidas incluyen las vías oral, mucosa, nasal, intradérmica (subcutánea) e intraperitoneal.

5 Por ello, en una realización, se administran por vía intraperitoneal 0,1-100 mg/kg de un lípido oxidado en un portador adecuado tal como, pero sin limitación, PBS o glicerol, de una a tres veces cada semana con un régimen crónico o alternado.

En otra realización, se administran por vía nasal 0,1-100 mg/kg de un lípido oxidado en un portador adecuado tal como, pero sin limitación, PBS o glicerol, de una a tres veces cada semana con un régimen crónico o alternado.

10 En otra realización más, se administran por vía subcutánea 0,1-100 mg/kg de un lípido oxidado en un portador adecuado tal como, pero sin limitación, PBS o glicerol, de una a tres veces cada semana con un régimen crónico o alternado.

En aún otra realización, se administran por vía oral 0,1-100 mg/kg de un lípido oxidado en un portador adecuado tal como, pero sin limitación, PBS o glicerol, de una a tres veces cada semana con un régimen crónico o alternado.

15 Las composiciones farmacéuticas y los compuestos y la composición farmacéutica para uso en el método según la presente invención, descritos anteriormente en la presente memoria, pueden implicar adicionalmente la administración de uno o más compuestos adicionales que sean capaces de tratar o prevenir una inflamación asociada a lípido oxidado endógeno como se concreta anteriormente en la presente memoria.

20 Los métodos descritos en la presente memoria pueden implicar por lo tanto administrar conjuntamente, antes de, junto con o después de la administración de los lípidos oxidados, una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de dichos compuestos adicionales, aunque la composición farmacéutica según la presente invención puede incluir, además de los compuestos de la presente invención, dichos compuesto adicionales.

25 Los ejemplos representativos de compuestos adicionales que pueden tratar o prevenir una inflamación asociada a un lípido oxidado endógeno concretado anteriormente en la presente memoria, y son por lo tanto utilizables en el contexto de esta realización de la presente invención incluyen, sin limitación, inhibidores de HMGCoA reductasa (estatinas), coadyuvantes mucosos, corticosteroides, fármacos antiinflamatorios esteroideos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, analgésicos, factores de crecimiento, toxinas, inhibidores de proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP), agonistas de receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR), fármacos antiateroscleróticos, agentes antiproliferativos, ezetimida, ácido nicotínico, inhibidores de escualeno, ApoE Milano, HSP y  $\beta$ 2-glicoproteína I.

30 Los inhibidores de HMGCoA reductasa (estatinas) son fármacos bien conocidos que reducen eficazmente los niveles de colesterol de LDL al inhibir la enzima que regula la velocidad de producción de colesterol y aumenta el aclaramiento del colesterol de LDL presente en la sangre por el hígado. Los ejemplos no limitantes de estatinas prescritas comúnmente incluyen atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina y simvastatina.

35 La ezetimiba es el primero de una nueva clase de inhibidores de la absorción del colesterol que inhiben potente y selectivamente la absorción de colesterol dietético y biliar en el borde de cepillo del epitelio intestinal, sin afectar a la absorción de triglicéridos ni vitaminas oleosolubles. La ezetimiba reduce por tanto el suministro global de colesterol al hígado, induciendo secundariamente una expresión aumentada de receptores de LDL, y dando como resultado una retirada aumentada del C-LDL del plasma.

40 El peroxisoma es un orgánulo de membrana simple presente en casi todas las células eucarióticas. Uno de los procesos metabólicos más importantes del peroxisoma es la  $\beta$ -oxidación de ácidos largos de cadena larga y muy larga. El peroxisoma está también implicado en la síntesis de ácido biliar, síntesis de colesterol, síntesis de plasmalógeno, metabolismo de aminoácidos y metabolismo de purinas.

45 El ácido nicotínico es un agente conocido que reduce los niveles de colesterol total, colesterol de LDL y triglicéridos, mientras eleva los niveles de colesterol HDL. Existen tres tipos de fármacos de ácido nicotínico: de liberación inmediata, liberación programada y liberación prolongada. El ácido nicotínico o nacía, la vitamina B hidrosoluble, mejora todas las lipoproteínas cuando se administra en dosis bien por encima del requisito vitamínico.

50 El escualeno, un compuesto isoprenoide estructuralmente similar al  $\beta$ -caroteno, es un metabolito intermedio en la síntesis del colesterol. En seres humanos, se absorbe aproximadamente un 60% del escualeno dietético. Se transporta en el suero generalmente asociado con lipoproteínas de muy baja densidad y se distribuye ubicuamente en tejidos humanos, con la mayor concentración en la piel, donde es uno de los componentes principales de los lípidos de la superficie cutánea. Los inhibidores de escualeno (por ejemplo, monooxigenasa y sintasa) sirven como inhibidores de la biosíntesis del colesterol.

55 Los agonistas de receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR), por ejemplo fibratos, son miembros de la superfamilia de receptores nucleares activados por ácidos grasos que desempeñan papeles importantes en el metabolismo de lípidos y glucosa, y se han implicado en enfermedades metabólicas relacionadas con la obesidad tales

como hiperlipidemia, resistencia a insulina y enfermedad arterial coronaria. Los fibratos son generalmente eficaces en la reducción del nivel plasmático elevado de triglicéridos y colesterol y actúan como agonistas de PPAR. El efecto más notable de los fibratos incluye una reducción del nivel plasmático de lipoproteínas ricas en triglicéridos (LRT). Los niveles de colesterol de LDL (C-LDL) se reducen generalmente en individuos con concentraciones plasmáticas de estado basal elevadas, y los niveles de colesterol de HDL (C-HDL) aumentan habitualmente cuando las concentraciones plasmáticas en estado basal son bajas. Los ejemplos no limitantes de fibratos prescritos comúnmente incluyen bezafibrato, gemfibrozilo y fenofibrato.

Los inhibidores de proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP) desempeñan un papel importante en la aterogénesis al reducir la acumulación de éster de colesterol en los macrófagos y la pared arterial, reduciendo por tanto la formación de células espumosas y afectando a la absorción de colesterol. El inhibidor de CETP actualmente conocido más prometedor es la avisimiba.

La ApoA-I Milano se usa típicamente como un complejo recombinante con fosfolípido (ETC-216) y produce una regresión significativa de la aterosclerosis coronaria.

Se ha mostrado que la administración conjunta de coadyuvantes mucosos es esencial para prevenir la invasión de agentes infecciosos a través de superficies mucosas. En las etapas tempranas de inducción de la respuesta inmunitaria mucosa, la captación de antígenos administrados por vía oral o nasal se consigue mediante una única serie de células muestreadoras de antígeno, células M localizadas en el epitelio asociado a folículo (EAF) de sitios inductivos. Después de la captación exitosa, los antígenos se procesan inmediatamente y se presentan por las células dendríticas subyacentes (CD).

Los ejemplos no limitantes de fármacos antiinflamatorios no esteroideos incluyen oxicamos tales como piroxicam, isoxicam, tenoxicam, sudoxicam y CP-14.304; salicilatos tales como aspirina, disalcida, benorilato, trilisato, safaprina, solprina, diflunisal y fendosal; derivados de ácido acético tales como diclofenaco, fenclofenaco, indometacina, sulindaco, tolmetina, isoxepaco, furofenaco, tiopinaco, zidometacina, acetatacina, fentiazaco, zomepiraco, clindanaco, oxepinaco, felbinaco y ketorolaco; fenamatos tales como ácidos mefenámico, meclofenámico, flufenámico, niflúmico y tolfenámico; derivados de ácido propiónico tales como ibuprofeno, naproxeno, benoxaprofeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, fenoprofeno, fenbufeno, indoprofeno, piroprofeno, carprofeno, oxaprozina, pranoprofeno, miroprofeno, tioxaprofeno, suprofeno, alminoprofeno y ácido tiaprofénico; pirazoles tales como fenilbutazona, oxifenbutazona, feprazona, azapropazona y trimetazona.

Los ejemplos no limitantes de fármacos antiinflamatorios esteroideos incluyen, sin limitación, corticosteroides tales como hidrocortisona, hidroxiltriamcinolona,  $\alpha$ -metildexametasona, fosfato de dexametasona, dipropionatos de beclometasona, valerato de clobetasol, desonida, desoximetasona, acetato de desoxicorticosterona, dexametasona, diclorisona, diacetato de diflorasona, valerato de diflucortolona, fludrenolona, acetónido de flucortolona, fludrocortisona, pivalato de flumetasona, acetónido de fluosinolona, fluocinonida, butilésteres de flucortina, flucortolona, acetato de fluprednido (fluprednilideno), flurandrenolona, halcinonida, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, metilprednisolona, acetónido de triamcinolona, cortisona, cortodoxona, flucetónido, fludrocortisona, diacetato de difluorasona, fluradrenolona, fludrocortisona, diacetato de difluorasona, acetónido de fluradrenolona, medrisona, amcinafel, amcinafida, betametasona y el resto de sus ésteres, clorprednisona, acetato de clorprednisona, clocortelona, clescinolona, diclorisona, diflurprednato, flucoronida, flunisolido, fluorometalona, fluperolona, fluprednisolona, valerato de hidrocortisona, ciclopentilpropionato de hidrocortisona, hidrocortamato, meprednisona, parametasona, prednisolona, prednisona, dipropionato de beclometasona, triamcinolona y mezclas de los mismos.

Los ejemplos no limitantes de analgésicos (aliviadores del dolor) incluyen aspirinas y otros salicilatos (tales como salicilato de colina o magnesio), ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno de sodio y acetaminofeno.

Los factores de crecimiento son hormonas que tienen numerosas funciones, incluyendo la regulación de la producción de moléculas de adhesión, la alteración de la proliferación celular, el aumento de la vascularización, la potenciación de la síntesis de colágeno, la regulación del metabolismo óseo y la alteración de la migración de células a una zona dada. Los ejemplos no limitantes de factores de crecimiento incluyen factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), proteína morfogénica ósea (BMP) y similares.

Los ejemplos no limitantes de toxinas incluyen la toxina del cólera, que sirve también como coadyuvante.

Los ejemplos no limitantes de agentes antiproliferativos incluyen un agente alquilante tal como una mostaza nitrogenada, una etilenimina y una metilmelamina, un sulfonato de alquilo, una nitrosourea y un triazeno; un antimetabolito tal como un análogo de ácido fólico, un análogo de pirimidina y un análogo de purina; un producto natural tal como un alcaloide de vinca, una epipodofilotoxina, un antibiótico, una enzima, un taxano y un modificador de la respuesta biológica; agentes misceláneos tales como un complejo de coordinación de platino, una antracenediona, una antraciclina, una urea sustituida, un derivado de metilhidrazina o un supresor corticosuprarrenal; o una hormona o un antagonista tal como un corticosteroide, una progestina, un estrógeno, un antiestrógeno, un andrógeno, un antiandrógeno o un análogo de hormona de liberación de gonadotropina. Los ejemplos específicos de agentes quimioterapéuticos incluyen, por ejemplo, una mostaza nitrogenada, una epipodofilotoxina, un antibiótico, un complejo de coordinación de platino, bleomicina, doxorubicina, paclitaxel, etopósido, 4-OH-ciclofosfamida y cisplatino.

La familia de HSP consiste en aproximadamente 25 proteínas distinguidas por sus pesos moleculares con estructuras altamente conservadas. Casi todos los seres humanos tienen reacciones inmunitarias celulares y humorales contra la proteína de choque térmico 60 (HSP60) bacteriana. Debido a que existe un alto grado de homología antigénica entre la HSP60 microbiana (bacteriana y parasitaria) y la humana, el "coste" de la inmunidad ante microbios podría ser el peligro de reactividad cruzada con HSP60 humana expresada por las células endoteliales de arterias estresadas. La autoinmunidad genuina contra HSP60 autóloga alterada podría desencadenar también este proceso (Wick *et al.* "Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update". *TRENDS in Immunology*. 2001; 22(12): 665-669). La HSP se ha implicado como autoantígeno diana en varias enfermedades autoinmunes experimentales (artritis, diabetes de tipo I). Los anticuerpos anti-HSP65 así como anti-HSP60 se han asociado demostrablemente con lesiones ateromatosas en seres humanos. Los estudios realizados en conejos y ratones muestran que la generación de una respuesta inmunitaria inducida por HSP65 mediante inmunización con la proteína recombinante o con una preparación rica en HSP65 de *Mycobacterium tuberculosis* potencia la aterogénesis. Como procesos autoinmunes que apuntan a HSP65 como posible candidato a antígeno, se ha empleado la creación de un estado de insensibilidad mediante la inducción de "tolerización" mucosa para bloquear estas respuestas y ese grupo ha reseñado que la aterosclerosis temprana se atenúa en ratones alimentados con HSP65, en comparación con ratones alimentados con BSA o PBS (Harats *et al.* "Oral tolerance with heat shock protein 65 attenuates mycobacterium tuberculosis induced and high fat diet driven atherosclerosis lesions". *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; 40: 1333-1338), y esto se apoyaba adicionalmente por Maron, que demostró que la vacunación nasal con HSP reduce el proceso inflamatorio asociado a la aterosclerosis (Maron *et al.*, "Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of low density lipoprotein receptor-deficient mice". *Circulation*. 2002; 106: 1708-1715).

La  $\beta$ 2-glicoproteína I ( $\beta$ 2-GPI) es una proteína de unión a fosfolípido que se ha mostrado que sirve como diana para anticuerpos antifosfolípidos protrombóticos. Se ha demostrado recientemente que genera una reacción inmunomediada y potencia la aterosclerosis en mûrido. Los anticuerpos  $\beta$  contra  $\beta$ 2-GPI tienen la capacidad de activar monocitos y células endoteliales y pueden inducir una respuesta inmunitaria ante  $\beta$ 2-GPI en aterosclerosis acelerada en ratones con tendencia a aterosclerosis. Cuando se transfirieron células de nódulo linfático y bazo reactivas ante  $\beta$ 2-GPI a ratones deficientes en receptor de LDL, promovieron la formación de estrías grasas, probando un papel proaterogénico directo para linfocitos específicos de  $\beta$ 2-GPI. Inducir la tolerancia inmunológica ante  $\beta$ 2-GPI mediante alimentación oral previa con el antígeno dio como resultado una reducción significativa de la extensión de las lesiones ateroescleróticas. Por tanto,  $\beta$ 2-GPI es un candidato a actor en la placa ateroesclerótica, y puede emplearse posiblemente como inmunomodulador de la progresión de la placa. La alimentación oral con  $\beta$ 2-GPI inhibía la reactividad de células de nódulo linfático ante  $\beta$ 2-GPI en ratones inmunizados contra la proteína humana. Se regulaba positivamente la producción de IL-4 e IL-10 en células de nódulo linfático de ratones tolerantes ante  $\beta$ 2-GPI inmunizados contra  $\beta$ 2-GPI, tras cebado con la respectiva proteína. Por tanto, la administración oral de  $\beta$ 2-GPI es un medio eficaz de supresión de la aterogénesis en ratones (George *et al.* "Suppression of early atherosclerosis in LDL-receptor deficient mice by oral tolerance with beta2-glycoprotein I". *Cardiovasc. Res.* 2004; 62(3): 603-9).

Los objetos, ventajas y rasgos novedosos adicionales de la presente invención resultarán evidentes para el especialista en la materia tras el examen de los siguientes ejemplos, que no se pretende que sean limitantes. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención, como se concretan anteriormente en la presente memoria y como se reivindican en la sección de reivindicaciones siguiente encuentra apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

## EJEMPLOS

Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos que, junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de modo no limitante.

Generalmente, la nomenclatura usada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas bioquímicas e inmunológicas. Dichas técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "Cell Biology: A Laboratory Handbook", volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al.* (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen extensamente en la bibliografía de patentes y científica, véanse por ejemplo las patentes de EE.UU. nº 3.791.932, 3.839.153, 3.850.752, 3.850.578, 3.853.987, 3.867.517, 3.879.262, 3.901.654, 3.935.074, 3.984.533, 3.996.345, 4.034.074, 4.098.876, 4.879.219, 5.011.771 y 5.281.521 y "Methods in Enzymology" vol. 1-317, Academic Press; Marshak *et al.* Se proporcionan otras referencias generales a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos de la presente memoria son bien conocidos en la materia y se proporcionan por conveniencia del lector.

## 55 **Materiales y métodos generales**

### **Animales:**

**Ratones con desactivación génica de Apo-E:** Los ratones con desactivación génica de Apo-E (Apo-E KO) usados en estos experimentos son de la estirpe con tendencia a aterosclerosis C57BL/6J-ApoE<sup>tm1unc</sup>. Los ratones homocigóticos de las mutaciones ApoE<sup>tm1unc</sup> muestran un notable aumento de los niveles plasmáticos de colesterol total que no está

afectado por la edad ni el sexo. Se encuentran estrías grasas en la aorta proximal a los 3 meses de edad. Las lesiones aumentan con la edad y evolucionan a lesiones con menos lípido pero más células alargadas, típicas de una etapa más avanzada de lesión preaterosclerótica.

5 **Desarrollo de la estirpe:** La estirpe mutante Apoe<sup>tmlunc</sup> se desarrolló en el laboratorio del Dr. Nobuyo Maeda en la University of North Carolina en Chapel Hill. Se usó la estirpe celular E14Tg2a ES derivada de 129. El plásmido usado se designa como pNMC109 y la estirpe original es T-89. La estirpe C57BL/6J se produjo por retrocruzamiento de la mutación Apoe<sup>tmlunc</sup> 10 veces en ratones C57BL/6J (Plump *et al.*, "Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein-E deficient mice created by homologous recombination in ES cells". *Cell* 1992; 71: 343-353; Zhang *et al.* "Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E". *Science* 1992; 258: 468-471).

10 Se mantuvieron los ratones en la Sheba Hospital Animal Facility (Tel-Hashomer, Israel) en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas a 22-24°C y se alimentaron con una dieta grasa normal de pienso de laboratorio (Purina Rodent Laboratory Chow N° 5001) que contenía un 0,027% de colesterol, aproximadamente un 4,5% de grasa total, y agua a voluntad.

**Ratones LDL-RD:** Los ratones LDL-RD [LDLr<miHer>LDL-/(C57B/6 al 50% JSL al 25% I129 al 25%)], de 8-12 semanas, se suministraron por la Hadassah Hospital Animal Facility (Hadassah Hospital, Israel).

15 **Ratas de Lewis:** Se suministraron ratas Lewis macho de 9-11 semanas por Harlan laboratories (ISRAEL)

#### **Inmunización:**

20 **I. Inmunización intraperitoneal con ALLE:** Se acopló el análogo de éter fosfolipídico (ALLE D+L) con derivado de proteína de tuberculina (PPD) purificado. Se disolvió la disolución madre de ALLE (D+L) en etanol (99 mg/ml). Se diluyeron 5 mg de ALLE (D+L), (50,5 µl de la disolución madre) a 5 mg/ml con tampón fosfato 0,25 M, pH 7,2, agitando a 0°C (en un baño de hielo). Se añadieron 1,5 mg de D- y L-ALLE en 300 µl de tampón fosfato a 0,6 mg de PPD disuelto en 300 µl de tampón fosfato. Se añadió HCl de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (5 mg; Sigma, St. Louis, MO) disuelto en 50 µl de agua con agitación a 4°C durante 20 minutos. Se bloquearon los sitios activos restantes con 100 µl de glicina 1 M. Se dializaron los compuestos acoplados frente a disolución salina tamponada con fosfato (PBS), se ajustaron a 3 ml con PBS y se almacenaron a 4°C. Se efectuó la inmunización con 0,3 ml (150 µg) de antígeno por ratón por vía intraperitoneal 4 veces cada 2 semanas.

30 **II. Inmunización subcutánea con LDL oxidada humana:** Se preparó LDL oxidada humana a partir de un agrupamiento de plasma humano (d-1,019 a 1,063 g/ml por ultracentrifugación) y se oxidó con Cu durante una noche (añadiendo 15 µl de CuSO<sub>4</sub> 1 mM por cada ml de LDL previamente diluida a una concentración de 1 mg/ml). Se dializó la LDL oxidada frente a PBS y se filtró. Para la inmunización, se disolvió la LDL oxidada en PBS y se mezcló con volúmenes iguales de coadyuvante incompleto de Freund. Se efectuaron las inmunizaciones mediante inyección subcutánea sencilla de 50 µg de antígeno/ratón en 0,2 ml de volumen. De 1 a 3 días después de la última administración oral, los ratones recibieron una inmunización, y se sacrificaron 7-10 días después de la inmunización.

35 **Determinación del nivel de colesterol:** Al final del experimento, se obtuvieron 1-1,5 ml de sangre mediante punción cardiaca, se añadió heparina 1000 U/ml a cada muestra y se determinaron los niveles plasmáticos de colesterol total usando una técnica enzimática automatizada (Boehringer Mannheim, Alemania).

40 **Análisis de FPLC:** Se efectuó el análisis de cromatografía líquida de proteína rápida del contenido de colesterol y lípidos de las lipoproteínas usando una columna Superose 6 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, Peapack, NJ) en un sistema FPLC (Pharmacia LKB. FRAC-200, Pharmacia, Peapack, NJ). Se requería un volumen mínimo de muestra de 300 µl (se diluyó 1:2 la sangre agrupada de 3 ratones y se filtró antes de cargar) en el vial de muestreo para que el muestreador automático rellenara completamente el bucle de muestra de 200 µl. Se recogieron las fracciones 10-40, conteniendo cada fracción 0,5 ml. Se mezcló una muestra de 250 µl de cada fracción con reactivo de colesterol o reactivo de triglicérido recién preparado, respectivamente, se incubó durante 5 minutos a 37°C y se ensayó espectrofotométricamente a 500 nm.

45 **Valoración de la aterosclerosis:** Se realizó la cuantificación de las lesiones de estría grasa aterosclerótica calculando el tamaño de lesión en el seno aórtico como se describe anteriormente (Paigen *et al.* "Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice". *Atherosclerosis* 1987; 68: 231-140) y calculando el tamaño de lesión en la aorta. Brevemente, después de perfusión con disolución salina con Tris-EDTA, se retiraron corazón y aorta de los animales y se limpió cuidadosamente la grasa periférica. Se embebió la sección superior del corazón en medio OCT (10,24% p/p de poli(alcohol vinílico); 4,26% p/p de polietilenglicol; 85,50% p/p de ingredientes no reactivos) y se congeló. Se tomó para análisis una de cada dos secciones (de 10 µm de grosor) a lo largo del seno aórtico (400 µm). Se reconoció la porción distal del seno aórtico por las tres valvas de válvula que son las conexiones de la aorta con el corazón. Se evaluaron en las secciones las lesiones de estría grasa después de tinción con rojo aceite O. Se puntuaron las zonas de lesión por sección en una cuadrícula (Rubin *et al.* "Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein A-I". *Nature* 1991; 353: 265-267) por un observador que contó especímenes numerados no identificados. Se disecó la aorta del corazón y se retiró el tejido accesorio circundante. Se efectuaron la fijación de la aorta y la tinción con Sudán de los vasos como se describe anteriormente (Bauman y Mangold, *J. Org. Chem.* 31: 498, 1966).

**Medidas plasmáticas y cuantificación de lesiones ateroscleróticas:** Se midieron los niveles plasmáticos de colesterol total y triglicéridos totales mediante COBAS MIRA. Se recogieron los corazones tras el sacrificio y se tiñeron las criosecciones de raíz aórtica usando tinción con rojo aceite O. Se evaluó el área de lesión aterosclerótica mediante análisis informático (Image Pro Plus) y también se confirmó por evaluación microscópica.

- 5 **Ensayos de proliferación:** Se alimentaron ratones con ALLE, POVPC o PBS como se describe para la valoración de la aterosclerosis y se inmunizaron entonces un día después de la última alimentación con LDL oxidada preparada a partir de LDL humana purificada como se describe anteriormente.

Se ensayó la proliferación 8 días después de la inmunización con la LDL oxidada como sigue: Se prepararon los bazos o nódulos linfáticos tamizando los tejidos por tamices de malla 100. (Nódulos linfáticos donde se efectuó inmunización y bazos donde no se efectuó inmunización). Se lisaron los eritrocitos con agua doblemente destilada estéril fría (6 ml) durante 30 segundos y se añadieron 2 ml de NaCl al 3,5%. Se añadió medio incompleto (10 ml), se centrifugaron las células durante 7 minutos a 1.700 rpm, se resuspendieron en medio RPMI y se contaron en un hematocitómetro a dilución 1:20 (10  $\mu$ l de células + 190  $\mu$ l de azul de tripano). Se midió la proliferación mediante la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina al ADN en muestras por triplicado de 100  $\mu$ l de las células empaquetadas (2,5 x 10<sup>6</sup> células/ml) en una placa de microvaloración de 96 pocillos. Se añadieron muestras por triplicado de LDL oxidada (0-10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ l/pocillo), se incubaron las células durante 72 horas (37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y aproximadamente 98% de humedad) y se añadieron 10  $\mu$ l de [<sup>3</sup>H]-timidina (0,5  $\mu$ Ci/pocillo). Después de 1 día adicional de incubación, se recogieron las células, se transfirieron a filtros de fibra de vidrio usando un recolector celular (Brandel) y se contaron usando un contador  $\beta$  (Lumitron). Para el ensayo de citocinas, se recogió el sobrendante sin añadir [<sup>3</sup>H]-timidina y se ensayó por ELISA.

- 20 Se alimentó un grupo separado de ratones con ALLE o PBS y se inmunizó con LDL oxidada como se describe anteriormente, un día después de la última dosis alimentada. Se recogieron nódulos linfáticos inguinales drenantes (tomados 8 días después de la inmunización) de 3 ratones de cada uno de los grupos para los estudios de proliferación. Se incubaron 1 x 10<sup>6</sup> células por ml por triplicado durante 72 horas en 0,2 ml de medio de cultivo en pocillos de microvaloración en presencia de LDL oxidada 10  $\mu$ g/ml. Se midió la proliferación mediante la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina al ADN durante las 12 horas finales de la incubación. Los resultados se expresan como el índice de estimulación (IE): la relación de la radiactividad media (cpm) del antígeno al fondo medio (cpm) obtenido en ausencia del antígeno. La desviación estándar era siempre <10% de las cpm medias.

**Evaluación de los marcadores inflamatorios en suero:** Se separó el suero por centrifugación y se almacenó a -70°C. Se efectuó el análisis de los marcadores inflamatorios por ELISA (IL-10; R&D y SAA; BIOSOURCE).

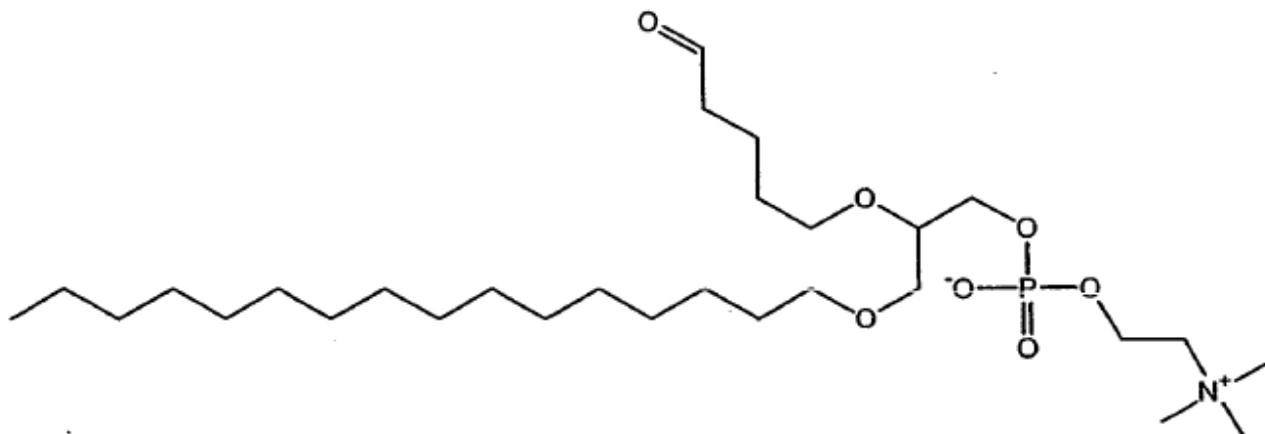
- 30 **Análisis de PCR-TI:** Se retiraron aortas, bazos e intestino delgado de ratones tratados y no tratados (de manera estéril) y se congelaron en nitrógeno líquido. Se trituraron los órganos en una cubeta de tamizado y se efectuó la producción de ARN usando el kit Rneasy kit (QIAGEN). Se examinaron las muestras de ARN en espectrofotómetro y se normalizaron respecto a  $\beta$ -actina. Se efectuó la transcripción inversa de ARN a ADNc con PCR y cebadores con el kit "Titan one tube RT-PCR" (ROCHE). Se detectaron los resultados sobre gel de agarosa al 1% y se documentaron en película.

- 35 **Análisis estadístico:** Se usó una prueba ANOVA unidireccional para comparar valores independientes. Se aceptó p < 0,05 como estadísticamente significativo.

### Ejemplo I

#### Síntesis de los antígenos inmunomoduladores 2,5'-aldehidolecitinéter (ALLE) y POVPC

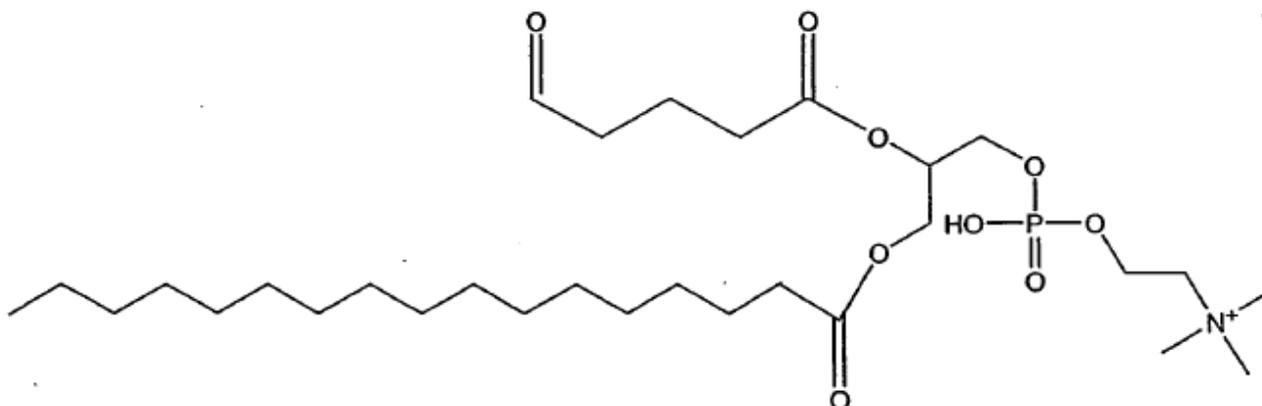
#### ALLE



40

1-Hexadecil-2-(5'-oxopentanyl)-sn-glicero-3-fosfocolina

## POVPC

**1-Hexadecanoil-2-(5'-oxovaleroil)-sn-3-fosfocolina****Síntesis de 2,5'-aldehidolecitinéter (ALLE):**

5 Se sintetizó 2,5'-aldehidolecitinéter (ALLE) según una modificación de los métodos generales de síntesis de análogos de éter de lecitinas comunicados por Eibl H. *et al.* Ann. Chem. 709: 226-230, (1967), W. J. Baumann y H. K. Mangold, J. Org. Chem. 31, 498 (1996), E. Baer y Buchnea JBC. 230, 447 (1958), Halperin G *et al.* Methods in Enzymology 129, 838-846 (1986). El siguiente protocolo hace referencia a compuestos y procesos representados en forma bidimensional en la Figura 1.

10 **Hexadecilgliceroléter:** Se agitaron D-acetonaglicerol (4 g) para la síntesis de L-ALLE o L-acetonaglicerol para la síntesis de D-ALLE, hidróxido de potasio en polvo (aproximadamente 10 g) y bromuro de hexadecilo (9,3 g) en benceno (100 ml) y se calentaron a reflujo durante 5 horas con retirada del agua formada por destilación azeotrópica (comparar con W. J. Baumann y H. K. Mangold, J. Org. Chem. 29: 3055, 1964 y F. Paltauf, Monatsh. 99: 1277, 1968). Se redujo gradualmente el volumen de disolvente a aproximadamente 20 ml, se enfrió la mezcla resultante a temperatura ambiente y se disolvió en éter (100 ml). Se lavó la disolución resultante con agua (2 x 50 ml) y se retiró el disolvente a presión reducida. Se añadió una mezcla de 100 ml de metanol:agua:ácido clorhídrico concentrado 90:10:5 al residuo y se calentó la mezcla a reflujo durante 10 minutos. Se extrajo el producto con éter (200 ml) y se lavó consecutivamente con agua (50 ml), hidróxido de sodio al 10% (20 ml) y de nuevo con agua (volúmenes de 20 ml) hasta neutralidad. Se retiró el disolvente a presión reducida y se cristalizó el producto (8,8 g) con hexano, dando 7,4 g de 1-hexadecilgliceriléter puro (compuesto I, Figura 1) para la síntesis de D-ALLE o 3-hexadecilgliceriléter para la síntesis de L-ALLE.

25 **Metanosulfonato de 5-hexenilo:** Se enfrió a entre -4 y -10°C una mezcla de 5-hexen-1-ol (12 ml) y piridina seca (25 ml) en un baño de hielo con sal. Se añadió gota a gota cloruro de metanosulfonilo (10 ml) durante un periodo de 60 minutos y se mantuvo la mezcla a 4°C durante 48 horas. Se añadió hielo (20 g), se dejó reposar la mezcla durante 30 minutos y se extrajo el producto con éter (200 ml). Se lavó la fase orgánica con agua (20 ml), ácido clorhídrico al 10%, bicarbonato de sodio al 10% (20 ml) y de nuevo con agua (20 ml). Se evaporó el disolvente y se sometió a cromatografía el producto bruto sobre gel de sílice 60 (100 g) usando una mezcla de CHCl<sub>3</sub>:AcOEt 80:20 como eluyente, dando 14 g de metanosulfonato de 5-hexenilo.

30 **1-Hexadeciloxi-3-tritiloxi-2-propanol (para D-ALLE) o 3-hexadeciloxi-1-tritiloxi-2-propanol (para L-ALLE) (compuesto II):** Se calentaron a 100°C durante 12 horas 1-hexadeciloxiglicerol (para D-ALLE) o 3-hexadeciloxiglicerol (para L-ALLE) (7,9 g), trifenilclorometano (8,4 g) y piridina seca (40 ml). Después de enfriar, se añadieron 300 ml de éter y 150 ml de agua enfriada con hielo y se transfirió la mezcla de reacción a un embudo separador. Se lavó consecutivamente la fase orgánica con 50 ml de agua con hielo, disolución de carbonato de potasio al 1% (hasta basicidad) y 50 ml de agua, y se secó entonces sobre sulfato de sodio anhidro. Se evaporó el disolvente, se disolvió el residuo en 150 ml de éter de petróleo caliente y se enfrió a 4°C la disolución resultante durante una noche. Después de filtrar el precipitado, se evaporó el filtrado y se recristalizó el residuo con 20 ml de acetato de etilo a -30°C, proporcionando 8,2 g de 1-hexadeciloxi-3-tritiloxi-2-propanol (para D-ALLE) o 3-hexadeciloxi-1-tritiloxi-2-propanol (para L-ALLE) (compuesto II, Figura 1), punto de fusión 49°C.

40 **1-Hexadecil-2-(5'-hexenil)gliceriléter (para D-ALLE) o 3-hexadecil-2-(5'-hexenil)gliceriléter (para L-ALLE) (compuesto IV):** Se eterificó 1-hexadeciloxi-3-tritiloxi-2-propanol (para D-ALLE) o 3-hexadeciloxi-1-tritiloxi-2-propanol (para L-ALLE) (compuesto II, Figura 1) (5,5 g) con metanosulfonato de 5-hexenilo, usando hidróxido de potasio en polvo en disolución de benceno como se describe anteriormente. Se disolvió el producto bruto 1-hexadeciloxi-2-(5'-hexeniloxi)-sn-3-tritiloxipropano (para D-ALLE) o 3-hexadeciloxi-2-(5'-hexeniloxi)-sn-3-tritiloxipropano (para L-ALLE) (compuesto III, Figura 1) en 100 ml de metanol:agua:ácido clorhídrico concentrado 90:10:5 y se calentó a reflujo la mezcla durante 6 horas. Se extrajo el producto con éter, se lavó con agua y se retiró el disolvente. Se disolvió el residuo en éter de

petróleo (100 ml) y se mantuvo a 4°C durante una noche, causando la deposición de la mayoría de trifenilcarbonilo. Después de filtrar y retirar el disolvente del filtrado, se sometió a cromatografía el producto bruto sobre gel de sílice 60 (40 g), usando una mezcla de cloroformo:éter de petróleo 1:1 como eluyente, dando 1,8 g de 1-hexadecil-2-(5'-hexenil)gliceriléter (para D-ALLE) o 3-hexadecil-2-(5'-hexenil)gliceriléter (para L-ALLE) (compuesto IV, Figura 1) puros.

- 5 **1-Hexadecil-2-(5'-hexenil)-sn-glicero-3-fosfocolina (para D-ALLE) o 3-hexadecil-2-(5'-hexenil)-sn-glicero-1-fosfocolina (para L-ALLE) (compuesto V):** El siguiente procedimiento es una modificación del método comunicado por Eibl H. *et al. Ann. Chem.*, 709: 226-230, 1967.

Se añadió gota a gota una disolución de 1-hexadecil-2-hexenilgliceriléter (para D-ALLE) o 3-hexadecil-2-hexenilgliceriléter (para L-ALLE) (compuesto IV, Figura 1) (2 g) en cloroformo seco (15 ml) a una disolución agitada enfriada (de -4 a -10°C) de trietilamina seca (3 ml) y diclorofosfato de 2-bromoetilo (1,25 ml, preparado como se describe a continuación en la presente memoria) en cloroformo seco (15 ml) durante un periodo de 1 hora. Se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente durante 6 horas y se calentó entonces a 40°C durante 12 horas. Se enfrió a 0°C la disolución marrón oscura resultante y se añadió cloruro de potasio 0,1 M (15 ml). Se dejó alcanzar la mezcla la temperatura ambiente y se agitó durante 60 minutos. Se añadieron metanol (25 ml) y cloroformo (50 ml) y se lavó la fase orgánica con ácido clorhídrico 0,1 M (20 ml) y agua (20 ml). Se evaporó el disolvente y se disolvió el producto bruto en metanol (15 ml), se transfirió la disolución a un tubo de cultivo y se enfrió en un baño de hielo con sal. Se añadió trimetilamina fría (3 ml, -20°C) y se selló el tubo. Se calentó la mezcla a 55°C durante 12 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó el disolvente usando una corriente de nitrógeno. Se extrajo el residuo con una mezcla de cloroformo:metanol 2:1 (25 ml) y se lavó con carbonato de potasio 1 M (10 ml) y agua (2 x 10 ml). Se retiró el disolvente a presión reducida y se sometieron a cromatografía los productos brutos sobre gel de sílice 60 (20 g) usando una mezcla de cloroformo:metanol 60:40, dando 1,5 g de 1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-sn-glicero-3-fosfocolina (para D-ALLE) o 3-hexadecil-2-(5'-hexenil)-sn-glicero-1-fosfocolina (para L-ALLE) (compuesto V, Figura 1). Se confirmó la estructura del compuesto V por RMN y espectrometría de masas.

- 25 **1-Hexadecil-2-(5'-oxopentanol)-sn-glicero-3-fosfocolina (para D-ALLE) o 3-hexadecil-2-(5'-oxopentanol)-sn-glicero-1-fosfocolina (para L-ALLE) (compuesto VI):**

Se agitó a temperatura ambiente durante una noche una disolución de compuesto V (0,5 g) en ácido fórmico (15 ml) y peróxido de hidrógeno al 30% (3,5 ml). Se diluyó la mezcla de reacción con agua (50 ml) y se extrajo con una mezcla de cloroformo:metanol 2:1 (5 x 50 ml). Se evaporó el disolvente a presión reducida y se mezcló el residuo con metanol (10 ml) y agua (4 ml), se agitó entonces a temperatura ambiente durante 60 minutos y se añadieron entonces ácido fosfórico al 80% (2 ml) y meta-peryodato de potasio (0,8 g). Se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente durante una noche, se diluyó con agua (50 ml) y se extrajo con cloroformo:metanol 2:1 (50 ml). Se lavó la fase orgánica con bisulfito de sodio al 10% (10 ml) y agua (10 ml). Se retiró el disolvente a presión reducida y se sometió a cromatografía el producto bruto sobre gel de sílice 60 (10 g), usando una mezcla de cloroformo:metanol 1:1 como eluyente, dando 249 mg de 1-hexadecil-2-(5'-oxopentanol)-sn-glicero-3-fosfocolina (para D-ALLE) o 3-hexadecil-2-(5'-oxopentanol)-sn-glicero-1-fosfocolina (para L-ALLE) (compuesto VI, Figura 1), que exhibía un  $R_f$  de 0,15 (sistema de TLC, cloroformo:metanol:agua 60:40:8) y una reacción positiva con dinitrofenilhidrazina. Se confirmó la estructura química del compuesto VI por RMN y espectrometría de masas.

En un proceso alternativo, se convirtió el grupo etilénico en un grupo aldehído mediante ozonización e hidrogenación catalítica con carbonato de paladio y calcio.

- 40 **Preparación de diclorofosfato de 2-bromoetilo:** Se preparó diclorofosfato de 2-bromoetilo mediante la adición gota a gota de 2-bromoetanol recién destilado (0,5 M, preparado como se describe en Gilman *Org. Synth.* 12: 117, 1926) a una disolución enfriada con hielo de oxocloruro de fósforo recién destilado (0,5 M) en cloroformo seco durante un periodo de 1 hora, seguido de 5 horas de reflujo y destilación a vacío (pe 66-68°C a 53,3-66,6 Pa (0,4-0,5 mm Hg)). Se almacenó el reactivo (-20°C) en atmósfera de nitrógeno en ampollas selladas antes del uso (Hansen W.H *et al. Lipids* 17(6): 453-459, 1982).

**Síntesis de 1-hexadecil-2-(4'-carboxibutil)-sn-glicero-3-fosfocolina (CI-201):**

Se disolvió 1-hexadecil-2-(5'-oxopentanol)-sn-glicero-3-fosfocolina (compuesto VI, preparado como se describe anteriormente), 0,55 g (0,001 mol), en *tert*-BuOH (30 ml). Se añadió gota a gota una disolución de NaClO<sub>2</sub> (0,9 g, 0,01 mol) y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,96 g, 0,07 mol) en 25 ml de agua durante un periodo de 30 minutos y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 3 horas. Se acidificó la mezcla de reacción a pH= 3 con ácido clorhídrico concentrado y se extrajo con una mezcla de cloroformo:metanol 2:1. Se separó la fase orgánica y se evaporó el disolvente. Se purificó el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice usando una mezcla de cloroformo:metanol: agua (70:27:3), dando 1-hexadecil-2-(4'-carboxibutil)-sn-glicero-3-fosfocolina (0,42 g, 72% de rendimiento). RMN y espectrometría de masas confirmaron la estructura química (compuesto VII, Figura 10).

- 55 **Síntesis de 1-hexadecil-2-(5',5'-dimetoxipentiloxi)-sn-glicero-3-fosfocolina:**

Se disolvió 1-hexadecil-2-(5'-oxopentanol)-sn-glicero-3-fosfocolina (compuesto VI, preparado como se describe anteriormente), 0,50 g (0,89 mmol), en ácido fórmico (15 ml) y se añadió peróxido de hidrógeno al 30% (3,5 ml). Se agitó la mezcla de reacción durante una noche a temperatura ambiente. Después de añadir agua (50 ml), se extrajo el

producto con una mezcla de cloroformo:agua 2:1 (2 x 50 ml). Se lavó la fase orgánica con bicarbonato de sodio acuoso al 10% (10 ml) y agua (10 ml) y se retiró el disolvente a presión reducida. Se disolvió el residuo (0,4 g) en metanol (10 ml), se añadió entonces hidróxido de sodio acuoso al 10% (4 ml) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadieron después de ello ácido fosfórico al 80% (2 ml) y meta-peryodato de potasio (0,8 g) y se continuó la agitación durante una noche. Se añadió entonces una mezcla 2:1 de cloroformo:metanol (50 ml), se lavó la fase orgánica con bisulfito de sodio acuoso al 10% (10 ml) y agua (10 ml) y se retiró el disolvente a vacío. Se purificó el residuo (0,3 g) por cromatografía sobre gel de sílice (10 g) usando una mezcla de cloroformo:metanol (60:40 a 40:60) como eluyente graduado, dando 1-hexadecil-2-(5',5'-dietoxipentiloxi)-sn-glicero-3-fosfocolina (0,25 g, 46% de rendimiento). RMN y espectrometrías de masas confirmaron la estructura química (compuesto VIIIa, Figura 10).

#### 10 **Síntesis de 1-hexadecil-2-(5',5'-dietoxipentiloxi)-sn-glicero-3-fosfocolina:**

Se disolvió 1-hexadecil-2-(5'-oxopentanol)-sn-glicero-3-fosfocolina bruta (compuesto VI, preparado como se describe anteriormente), 50 mg (0,088 mmol), en etanol (10 ml) en atmósfera de nitrógeno. Se añadieron ortoformiato de trietilo (0,053 ml, 0,0476 g, 0,32 mmol) y 3 gotas de ácido sulfúrico conc. y se agitó la mezcla de reacción durante una noche a temperatura ambiente. Se añadió entonces diclorometano (75 ml) y se transfirió la mezcla de reacción a un embudo separador, se lavó sucesivamente con agua (75 ml), disolución acuosa de bicarbonato de sodio al 2,5% (75 ml) y agua (75 ml), y se secó entonces sobre sulfato de sodio anhidro. Después de filtrar, se retiró el disolvente a vacío, dando 50 mg de 1-hexadecil-2-(5',5'-dietoxipentiloxi)-sn-glicero-3-fosfocolina bruta. Se confirmó la estructura por RMN y espectroscopia EM (compuesto VIIIb, Figura 10).

#### **Síntesis de 1-hexadecanoil-2-(5'-oxovaleroil)-sn-3-glicerofosfocolina (POVPC):**

20 Se agitó concienzudamente durante 4 días a temperatura ambiente una mezcla de 1-hexadecanoil-sn-3-glicerofosfocolina (compuesto I, Figura 2) (3 g), ácido 5-hexenoico (1,2 ml), 1,3-diciclohexilcarbodiámid (DCC, 4,05 g) y N,N-dimetilaminopiridina (DMP, 1,6 g) en diclorometano (100 ml, recién destilado de pentóxido de fósforo). Se sometió entonces a cromatografía la mezcla sobre gel de sílice 60 (40 g) y se eluyó el producto 1-hexadecanoil-2-(5'-hexenoil)-sn-3-glicerofosfocolina (2,8 g, compuesto II, Figura 2) con una mezcla de cloroformo:metanol 25:75. Se disolvió el eluyente en peróxido de hidrógeno al 30%:ácido fórmico (4:15) y se agitó la disolución durante una noche a temperatura ambiente. Se añadió agua (50 ml), se extrajo el producto con cloroformo:metanol 2:1 (100 ml) y se lavó la fase orgánica con agua. Se evaporó el disolvente a presión reducida, se disolvió el residuo en metanol (15 ml), se añadió una disolución de amoniaco al 10% (5 ml) y se agitó la disolución resultante a temperatura ambiente durante 6 horas. Se hizo reaccionar adicionalmente la 1-hexadecanoil-2-(5',6'-dihidroxi)hexanoil-sn-3-glicerofosfocolina bruta (compuesto III, Figura 2) (estructura confirmada por RMN y espectrometría de masas) sin purificación. Se añadieron ácido fosfórico al 80% (3 ml) y meta-peryodato de sodio (1 g) a la disolución, se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante una noche y después de ello se extrajo con una mezcla de cloroformo:metanol 2:1. Se purificó el producto mediante cromatografía sobre gel de sílice 60 (20 g), usando una mezcla de cloroformo:metanol 25:75 como eluyente. Se obtuvieron 850 mg de 1-hexadecanoil-2-(5'-oxovaleroil)-sn-3-glicerofosfocolina (POVPC, compuesto IV, Figura 2), exhibiendo una movilidad cromatográfica de lecitina en TLC y una reacción positiva con dinitrofenilhidrazina. Se valoró la estructura por RMN y espectrometría de masas.

Como alternativa se convirtió el grupo etilénico en un aldehído mediante ozonización e hidrogenación catalítica con carbonato de paladio y calcio.

#### **Ejemplo II (de referencia)**

#### 40 **La inmunización contra L-ALLE + D-ALLE inhibe específicamente la aterogénesis en ratones genéticamente dispuestos (Apo-E KO)**

Los presentes inventores han demostrado que la inmunización con el componente de LDL sintético eterificado estable ALLE puede reducir la extensión de la formación de placa aterosclerótica en ratones predispuestos. Se dividieron en 3 grupos 19 ratones hembra Apo E/C 57 de 5-7 semanas. En el grupo A (n= 6), se inmunizaron los ratones por vía intraperitoneal, como se describe en la sección de Materiales y Métodos anterior, con 150 µg/ratón de L-ALLE + D-ALLE una vez cada 2 semanas (0,3 ml/ratón) x 4. En el grupo B (n= 6), se inmunizaron los ratones con la toxina tuberculina derivado de proteína purificado (PPD) una vez cada 2 semanas (0,3 ml/ratón). En el grupo C (n= 7), los ratones no recibieron inmunización. Se tomaron muestras de sangre de ratones de los tres grupos antes de la inmunización (tiempo 0) y una semana después de la segunda inmunización para la determinación de los anticuerpos anti-LDL ox, anticuerpos anti-ALLE y perfil lipídico. Se efectuó la valoración de la aterosclerosis como se describe anteriormente, 4,5 semanas después de la 4ª inmunización. Se pesaron los ratones de todos los grupos a intervalos de 2 semanas a lo largo del experimento. Todos los ratones se alimentaron con dieta de pienso normal que contenía un 4,5% de grasa (0,02% de colesterol) y agua a voluntad.

**Tabla I: La inmunización de ratones Apo-E KO con ALLE inhibe la aterogénesis**

Grupos		Inmunización con 150 µg/ratón de L-ALLE + D-ALLE N= 6	PPD N= 5	Control inmunización sin N= 7	Estadísticas
Tiempo 0	Peso	17,3 ± 0,5	17,3 ± 0,7	17,8 ± 0,4	P= 0,780
	Col.	435 ± 47	436 ± 49	413 ± 44	P= 0,919
	TG	118 ± 9	112 ± 10	120 ± 14	P= 0,865
Final	Peso	20,5 ± 0,5	21,6 ± 0,2	20,3 ± 0,5	P= 0,123
	Col.	299 ± 18	294 ± 15	3044 ± 22	P= 0,937
	TG	57 ± 3	53 ± 4	66 ± 4	P= 0,075
	Tamaño de lesión (µm <sup>2</sup> )	101000 ± 8276	179500 ± 13449	210833 ± 26714	P= 0,005
	TGF-β (pmol/ml)	12032 ± 2308	13963 ± 944	12825 ± 2340	P= 0,831

Nota: "Peso" es peso en gramos; "col" es colesterol plasmático y "TG" es triglicéridos plasmáticos, expresados en mg/dl

Como puede observarse en la Figura 3, los resultados representados en la Tabla I demuestran la reducción significativa de las lesiones ateromatosas medidas en tejidos cardiacos de ratones inmunizados con ALLE, en comparación tanto con ratones con PPD como de control no inmunizados. No es evidente un efecto significativo sobre los demás parámetros medidos, tales como ganancia de peso, niveles plasmáticos de triglicéridos o colesterol o inmunocompetencia, medida por los niveles de la citocina inmunosupresora TGF-β. Por tanto, la inmunización con el componente de LDL oxidada sintético ALLE (una mezcla de formas racémicas D y L) confiere una protección significativa (>50%) ante la formación de lesión aterosclerótica en estos ratones genéticamente predispuestos Apo-E KO. Se observó una reducción significativa, pero menos drástica, de la formación de placas en ratones inmunizados con PPD.

### **Ejemplo III (de referencia)**

#### **Inhibición de la aterogénesis en ratones genéticamente predispuestos (Apo-E KO) por administración oral de L-ALLE y D-ALLE**

La inmunización intraperitoneal con los análogos de éster de los componentes de lesión de placa fue eficaz para inhibir la aterogénesis en ratones Apo-E KO (Figura 1). Por tanto, se investigó la capacidad de la administración oral de L- y D-ALLE de suprimir la aterogénesis. Se dividieron en 3 grupos 34 ratones macho Apo-E KO de 8-10 semanas. En el grupo A (n= 11), se administraron por vía oral a los ratones por sonda nasogástrica L-ALLE + D-ALLE suspendidos en 5% de PBS en etanol (1 mg/ratón) durante 5 días cada 2 días. En el grupo B (n= 11), se alimentaron los ratones con 10 µg/ratón de L-ALLE + D-ALLE suspendidos en 5% de PBS en etanol durante 5 días cada 2 días (0,2 ml/ratón). Los ratones del grupo C (n= 12) recibieron PBS (que contenía el mismo volumen de etanol que en los grupos A+B). Se tomaron muestras de sangre a los ratones antes de la alimentación (tiempo 0) y a la conclusión del experimento (fin) para la determinación del perfil lipídico. Se valoró la aterosclerosis en el seno aórtico, como se describe anteriormente, 8 semanas después de la última alimentación. Se pesaron los ratones cada 2 semanas durante el experimento. Se alimentaron todos los ratones con dieta de pienso normal que contenía un 4,5% en peso de grasa (0,02% de colesterol) y agua a voluntad.

**Tabla 2: Inhibición de la aterogénesis en ratones Apo-E KO por administración oral de L-ALLE y D-ALLE**

Grupos		PBS N= 12	1 mg de ALLE N= 11	10 µg de ALLE N= 11	Estadísticas
Tiempo 0	Peso	20,7 ± 0,6	21,5 ± 0,8	21,1 ± 0,8	P= 0,794
	Col.	373 ± 25	379 ± 23	378 ± 31	P= 0,983
	TG	128	98	90	P= 0,829

Final	Peso	27,3 ± 0,4	27,4 ± 0,5	24,1 ± 0,8	P < 0,001
	Col.	303 ± 17	249 ± 24	321 ± 15	P = 0,031
	TG	81 ± 4	78 ± 8	93 ± 6	P = 0,146
	Tamaño de lesión (µm <sup>2</sup> )	176000 ± 13735	85278 ± 11633	103889 ± 14320	P < 0,001
	TGF-β (pmol/ml)	14696 ± 1352	13388 ± 1489	18010 ± 1373	P = 0,07
Nota: "Peso" es peso en gramos; "col" es colesterol plasmático y "TG" es triglicéridos plasmáticos, expresados en mg/dl					

5 Como puede observarse en la Figura 4, los resultados representados en la Tabla 2 demuestran una notable atenuación de la progresión aterosclerótica medida en los tejidos de ratones alimentados con dosis bajas (10 µg-1 mg/ratón) de ALLE, en comparación con ratones de control no expuestos. No resulta evidente un efecto significativo sobre los demás parámetros medidos, tales como ganancia de peso, niveles sanguíneos de triglicéridos o colesterol o inmunocompetencia, medida por los niveles de la citocina inmunosupresora TGF-β. Por tanto, la administración oral del componente de LDL oxidada sintético ALLE proporciona una protección significativa (>50%) ante la aterosclerosis en estos ratones genéticamente predispuestos Apo-E KO, similar a la protección conseguida con inmunización peritoneal (véase la Figura 1).

#### 10 **Ejemplo IV (referencia)**

##### ***Inhibición de la aterogénesis en ratones genéticamente predispuestos (Apo-E KO) por inducción de inmunomodulación mediada por vía oral y nasal con L-ALLE***

15 Los mecanismos de inmunomodulación mediada por vía mucosa son activos en la mucosa nasal así como el intestino. Por tanto, se comparó la eficacia de la exposición nasal y la exposición oral a L- y D-ALLE en la supresión de la aterogénesis en ratones Apo-E KO. Se dividieron en 3 grupos 34 ratones macho Apo-E KO de 7-10 semanas. En el grupo A (n= 11) se administró por vía oral a los ratones L-ALLE suspendido en 5% de PBS en etanol (1 mg/ratón/0,2 ml) durante 5 días cada dos días. En el grupo B (n= 11), se administraron los ratones por vía intranasal como se describe anteriormente en Materiales y Métodos 10 µg/ratón/10 µl de L-ALLE suspendido en PBS cada dos días durante 3 días. 20 Los ratones del grupo C (n= 12) recibieron PBS administrado por vía oral y nasal (que contenía el mismo volumen de etanol que en los grupos A+B). Se extrajo sangre a los ratones antes de la alimentación (tiempo 0) y a la conclusión del experimento (fin) para la determinación del perfil lipídico. Se valoró la aterosclerosis en el seno aórtico como se describe anteriormente, 8 semanas después de la última alimentación. Se pesaron los ratones cada 2 semanas durante el experimento. Todos los ratones se alimentaron con dieta de pienso normal que contenía un 4,5% en peso de grasa (0,02% de colesterol) y agua a voluntad.

25 **Tabla 3: Efecto de la administración oral y nasal de L-ALLE sobre los parámetros metabólicos y la aterogénesis en ratones Apo-E KO**

Grupos		1 mg de ALLE oral (N= 11)	10 µg de ALLE nasal (N= 11)	PBS oral/nasal (N= 12)	Estadísticas
Tiempo 0	Peso	21,1 ± 0,8	21,1 ± 0,7	22,1 ± 0,9	P = 0,624
	Col.	362 ± 27	353 ± 31	351 ± 27	P = 0,952
	TG	144	143	138	P = 0,977
Final	Peso	23,3 ± 1,1	24,2 ± 0,2	24,0 ± 0,5	P = 0,558
	Col.	418 ± 43	328 ± 18	343 ± 25	P = 0,084
	TG	82 ± 7	74 ± 6	79 ± 5	P = 0,630
	Tamaño de lesión (µm <sup>2</sup> )	76944 ± 17072	82708 ± 10986	135455 ± 12472	P = 0,007
Nota: "Peso" es peso en gramos; "col" es colesterol plasmático y "TG" es triglicéridos plasmáticos, expresados en mg/dl					

30 Como puede observarse en la Figura 5, los resultados representados en la Tabla 3 demuestran la inhibición eficaz de la aterogénesis medida en los tejidos de ratones que reciben exposición nasal a dosis bajas (10 µg/ratón) de ALLE, en comparación con ratones de control no expuestos. La administración nasal, como la administración oral, no tenía un

efecto significativo sobre los demás parámetros medidos, tales como ganancia de peso o niveles plasmáticos de triglicéridos o colesterol. Por tanto, el componente de LDL oxidada sintético ALLE proporciona una protección significativa (aproximadamente de 50%) ante la aterogénesis en estos ratones genéticamente predispuestos Apo-E KO por administraciones tanto oral como nasal.

#### 5 **Ejemplo V (referencia)**

##### **Supresión de la inmunorreactividad específica y de LDL ox en ratones genéticamente predispuestos (Apo-E KO) por administración oral de L-ALLE o POVPC**

La inmunomodulación inducida por exposición por vía mucosa a análogos oxidados de LDL puede mediarse por la supresión de respuestas inmunitarias específicas a antígenos relacionados con placa. La POVPC (1-hexadecanoil-2-(5'-oxovaleroil)-sn-glicerofosfolina) es un análogo de LDL oxidado no eterificado que, al contrario que ALLE, está predispuesto a la degradación en hígado e intestino. Se midió la proliferación de linfocitos en respuesta a la exposición oral tanto a POVPC como al análogo más estable ALLE en ratones Apo-E KO. Se dividieron en 3 grupos 8 ratones macho Apo-E KO de 6 semanas. En el grupo A (n=2), se alimentó a los ratones 1 mg/ratón de L-ALLE suspendido en 0,2 ml de PBS, administrado por sonda nasogástrica como se describe anteriormente, cada dos días durante 5 días. En el grupo B (n= 3), se alimentó a los ratones 1 mg/ratón de POVPC suspendida en 0,2 ml de PBS, administrada por vía oral como se describe anteriormente cada dos días durante 5 días. Se alimentaron los ratones del grupo C (n= 3, control) con 200 µl de PBS cada dos días durante 5 días. Se estimuló la inmunorreactividad mediante inmunización con LDL oxidada humana como se describe anteriormente en la sección de Materiales y Métodos, un día después de la última alimentación. Una semana después de la inmunización, se recogieron nódulos linfáticos para el ensayo de proliferación. Todos los ratones se alimentaron con dieta de pienso normal que contenía un 4,5% en peso de grasa (0,02% de colesterol) y agua a voluntad.

**Tabla 4: El pretratamiento oral con LDL oxidada sintética (ALLE y POVPC) suprime la respuesta inmunitaria ante LDL ox humana en ratones Apo-E KO**

Indice de estimulación (IE)			
PBS	POVPC	L-ALLE	Estadísticas
33,1 ± 6,1	10,6 ± 2,3	7,3 ± 2,3	P<0,01
N= 3	N= 3	N= 2	
	-68%	-78%	

Como puede observarse en la Figura 6, los resultados representados en la Tabla 4 demuestran una supresión significativa de la inmunorreactividad ante antígeno anti-LDL oxidada humana, medida mediante la inhibición de la proliferación en los nódulos linfáticos de ratones Apo-E KO. Los linfocitos de ratones que reciben una exposición oral a dosis inhibitoras de la aterogénesis (1 mg/ratón) de ALLE o POVPC mostraron un índice de estimulación reducido después de inmunización con LDL ox, en comparación con ratones de control (PBS). Puesto que la inducción de inmunomodulación mediada por vía oral, como mediada por vía nasal, no tenía un efecto significativo sobre los demás parámetros medidos, tales como ganancia de peso, niveles plasmáticos de triglicéridos o colesterol o inmunocompetencia (véanse las Tablas 1, 2 y 3), estos resultados indican una supresión específica de la inmunorreactividad anti-LDL ox. Por tanto, la administración oral del componente de LDL oxidada sintético L-ALLE es un método eficaz de atenuación de la respuesta inmunitaria celular ante componentes de placa inmunogénicos y aterogénicos en estos ratones genéticamente predispuestos Apo-E KO. La Figura 4 demuestra también una inhibición similar, aunque menos eficaz, de la proliferación con administración oral del componente de LDL oxidada sintético menos estable POVPC.

#### **Ejemplo VI (referencia)**

##### **Inhibición de la aterogénesis en ratones genéticamente predispuestos (Apo-E KO) por administración oral de isómero D y L de ALLE y POVPC**

Puesto que la alimentación de ALLE y POVPC se ha mostrado que inhibe la aterogénesis temprana y la inmunorreactividad ante antígeno de LDL humana relacionada con plaquetas, se comparó la capacidad de ambos isómeros D y L del análogo de LDL etérico y el análogo no etérico POVPC de suprimir la progresión de la aterogénesis en ratones mayores. Se monitorizó también su efecto sobre las fracciones de triglicéridos y colesterol de VLDL por FPLC. Se dividieron en 5 grupos 57 ratones macho Apo-E KO de 24,5 semanas. En el grupo A (n= 11), se alimentó a los ratones 1 mg/ratón de L-ALLE suspendido en 0,2 ml de PBS, administrado por sonda nasogástrica como se describe anteriormente, cada dos días durante 5 días. En el grupo B (n= 9), se alimentó a los ratones 1 mg/ratón de D-ALLE suspendido en 0,2 ml de PBS, administrado por vía oral como se describe anteriormente, cada dos días durante 5 días. En el grupo C (n= 10), se alimentó a los ratones 1 mg/ratón de POVPC suspendida en 0,2 ml de PBS, administrada por

sonda nasogástrica como se describe anteriormente, cada dos días durante 5 días. El grupo de control D (n= 10) recibió la administración oral de PBS (que contenía el mismo volumen de etanol que en los grupos A, B, C). Se sacrificó el grupo de estado basal a tiempo= 0. La administración oral de los antígenos ensayados tuvo lugar cada 4 semanas (5 alimentaciones orales, cada dos días) partiendo de las 24,5 semanas de edad, durante 12 semanas (3 series de alimentaciones).

Se tomaron muestras de sangre de los ratones antes de la alimentación (tiempo 0), después de la 2º serie de alimentaciones y a la conclusión del experimento (fin) para la determinación del perfil lipídico, fraccionamiento lipídico y recogida de plasma. Se valoró la aterosclerosis como se describe anteriormente en el seno aórtico y la aorta. Se recogieron los bazo para el ensayo de proliferación 12 semanas después de la primera alimentación. Se registró el peso cada 2 semanas a lo largo del experimento. Se alimentaron todos los ratones con dieta de pienso normal que contenía un 4,5% en peso de grasa (0,02% de colesterol) y agua a voluntad.

**Tabla 5: Inhibición de la aterogénesis en ratones Apo-E KO por administración oral de L-ALLE, D-ALLE y POVPC**

Punto temporal	Parámetro ensayado	PBS (n= 10)	1 mg de L-ALLE (n= 11)	1 mg de D-ALLE (n= 11)	1 mg de POVPC (n= 10)	Estado basal (t= 0) (n= 8)	Estadísticas
0	Peso	28,1 ± 0,5	29 ± 0,6	29,8 ± 0,7	29,6 ± 0,7	29,8 ± 1,1	P= 0,445
	Colesterol	413 ± 27	413 ± 23	409 ± 28	401 ± 21	393 ± 16	P= 0,976
	Triglicéridos	67 ± 5	63 ± 8	63 ± 4	67 ± 7	71 ± 8	P= 0,946
Final	Peso	28,5 ± 0,6	29,7 ± 0,5	30,4 ± 0,8	29,9 ± 0,5	-	P= 0,177
	Colesterol	365 ± 15	391 ± 18	394 ± 15	358 ± 28	-	P= 0,481
	Triglicéridos	84 ± 4	83 ± 4	94 ± 4	85 ± 3	-	P= 0,207
	Lesión de seno $\mu\text{m}^2$	369688 ± 32570	233056 ± 12746	245938 ± 20474	245750 ± 20423	225,714 ± 5,869	P< 0,001
	Lesión aórtica (% del área total)	4,5	5,4	4,5	8,3	1,4	P= 0,002

Nota: "Peso" es peso en gramos; "col" es colesterol plasmático y "TG" es triglicéridos plasmáticos, expresados en mg/dl

Como puede observarse en la Figura 7, los resultados representados en la Tabla 5 demuestran la inhibición eficaz de la aterogénesis de etapa tardía medida en los tejidos de ratones mayores después de exposición oral prolongada a 1 mg/ratón de dosis de los isómeros D y L de ALLE y POVPC, en comparación con ratones de control alimentados con PBS. La administración oral de estos compuestos no tuvo efectos significativos sobre los demás parámetros medidos, tales como ganancia de peso, niveles plasmáticos de triglicéridos totales o colesterol. Por tanto, los componentes de LDL oxidada sintéticos D-, L-ALLE y POVPC ejercen cada uno individualmente actividad antiaterogénica que confiere una protección casi completa ante la progresión ateromatosa (en comparación con las puntuaciones de lesión a las 24,5 semanas) en estos ratones genéticamente predispuestos Apo-E KO. Sorprendentemente, se observó que la inhibición de la aterogénesis por estos análogos de LDL oxidada está acompañada por una reducción significativa de los niveles de colesterol de VLDL y triglicéridos, medida por FPLC (Figuras 8 y 9).

#### **Ejemplo VII**

#### **Inhibición de la aterogénesis en ratones genéticamente predispuestos (Apo-E KO) por administración oral de CI-201**

Se investigó la capacidad de una forma estable de un fosfolípido eterificado, el derivado ácido de ALLE CI-201, de suprimir la aterogénesis. Se dividieron en 2 grupos ratones macho Apo-E KO de 12 semanas. En el grupo A (n= 14), se administró por vía oral a los ratones por sonda nasogástrica CI-201 (0,025 mg/dosis) suspendido en PBS durante 8 semanas cada día (5 veces por semana). Los ratones del grupo B (n= 15) recibieron PBS (control). Se valoró la aterosclerosis como se describe anteriormente. Se alimentaron todos los ratones con dieta de pienso normal que contenía un 4,5% en peso de grasa (0,02% de colesterol) y agua a voluntad.

Como puede observarse en la Figura 11, los resultados demuestran una notable atenuación de la progresión aterosclerótica medida en los tejidos de ratones alimentados con dosis bajas de CI-201, en comparación con ratones de control no expuestos (PBS). La lesión de seno aórtico en el grupo tratado con CI-201 era de  $125.192 \pm 19.824 \mu\text{m}^2$  y en

5 el grupo de control (tratado con PBS) era de  $185.400 \pm 20.947 \mu\text{m}^2$ , demostrando una reducción del 33% ( $P= 0,051$ ) de la lesión de seno aórtico por administración oral de CI-201 a baja dosis. La expresión de IL-10 (determinada por PCR-TI) en la aorta era de más de un 40% en el grupo tratado con CI-201, en comparación con el grupo de control. Los niveles de expresión elevados de IL-10 en el órgano diana, la aorta, apoyan un efecto antiinflamatorio inducido por la administración oral de CI-201. Por tanto, el derivado de LDL oxidada sintético estable CI-201 ejerce tanto inmunomodulación mediada por vía oral como efecto antiinflamatorio.

**Ejemplo VIII**

**Expresión de citocinas en la aorta de ratones Apo-E KO tratados con fosfolípidos oxidados (ALLE, CI-201, Et-acetal, Me-acetal y LDL ox)**

10 Se evaluó el efecto de ALLE, CI-201, sus correspondientes derivados de acetal Et-acetal y Me-acetal (compuestos VIIIa y VIIIb, Figura 10) y LDL ox sobre la expresión de citocina en el órgano diana, la aorta, usando PCR-TI como se describe anteriormente en la presente memoria. Se administraron a los ratones Apo-E KO 1 mg/ratón de ALLE, 1 mg/ratón de CI-201, 1 mg/ratón de Et-acetal, 1 mg/ratón de Me-acetal, 0,1 mg/ratón de LDL ox o 0,2 ml/ratón de PBS. Las administraciones orales tuvieron lugar 5 veces cada dos días. Se determinó la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10 y las citocinas proinflamatorias IFN- $\gamma$  e IL-12 8 semanas después de la administración oral final.

15 Como puede observarse en las Figuras 12a y 12b, los ratones tratados con ALLE, CI-201, Et-acetal, Me-acetal y LDL ox mostraron niveles elevados de expresión de IL-10 en comparación con el grupo de control tratado con PBS. Como puede observarse en las Figuras 12c y 12d, se mostró un efecto opuesto en el nivel de expresión de IFN- $\gamma$  e IL-12. Fueron detectables niveles reducidos de expresión de IFN- $\gamma$  en ratones tratados con ALLE, CI-201, Me-acetal y LDL ox, y fueron detectables niveles reducidos de IL-12 en ratones tratados con ALLE, CI-201, Et-acetal y LDL ox.

**Ejemplo IX (referencia)**

**Inhibición de la aterogénesis en ratones LDL-RD por inducción de inmunomodulación mediada por vía oral con LDL ox**

25 Para mostrar que los fosfolípidos oxidados sintéticos descritos anteriormente inducen un efecto similar a la LDL oxidada humana, se diseñó un modelo para evaluar el efecto de LDL ox sobre la progresión de la aterosclerosis en ratones.

30 Se estratificaron ratones LDL-RD de 8-12 semanas por edad, peso y perfil lipídico (colesterol y triglicéridos) en diferentes grupos. Se trató cada grupo con LDL ox a dosis crecientes (10, 100 o 1.000  $\mu\text{g/dosis}$  disuelta en PBS en un volumen total de 0,2 ml de PBS), albúmina (100  $\mu\text{g/dosis}$  disuelta en PBS en un volumen total de 0,2 ml de PBS) o PBS (0,2 ml), 5 veces cada dos días. El día siguiente a la última administración oral, se aplicó a los ratones una dieta aterogénica (“dieta Western”) a voluntad y ser mantuvieron en un ciclo de oscuridad/luz de 12 horas durante 5 semanas.

Se sacrificaron los ratones 6,5 semanas después de la primera administración oral y se evaluó la extensión del área de placa ateromatosa en el seno aórtico, como se describe anteriormente en la presente memoria.

35 Se concreta el efecto del tratamiento con LDL ox sobre los parámetros metabólicos en la Tabla 6 siguiente. Como se muestra en la Tabla 6, aunque la LDL ox no afectaba al peso corporal ni a los niveles de colesterol, la LDL ox a una dosis de 100  $\mu\text{g/dosis}$  reducía significativamente ( $P < 0,05$ ) los niveles de triglicéridos en comparación con los grupos de control con PBS y albúmina.

**Tabla 6: Efecto del tratamiento con LDL ox sobre los parámetros metabólicos en ratones LDL-RD**

Punto temporal	Parámetro	Grupo A LDL ox 1.000 $\mu\text{g/dosis}$	Grupo B LDL ox 100 $\mu\text{g/dosis}$	Grupo C LDL ox 10 $\mu\text{g/dosis}$	Grupo D Seroalbúmina humana	Grupo E PBS	Estadísticas
T= 0	Peso (g)	28,1 $\pm$ 0,6	27,3 $\pm$ 0,6	26,9 $\pm$ 0,5	28,5 $\pm$ 0,6	27,9 $\pm$ 0,5	NS*
	Colesterol (mg/dl)	161 $\pm$ 10	160 $\pm$ 8	156 $\pm$ 9	163 $\pm$ 10	162 $\pm$ 7	NS*
	Triglicéridos (mg/dl)	154 $\pm$ 12	145 $\pm$ 11	152 $\pm$ 10	140 $\pm$ 14	155 $\pm$ 12	NS*
Final	Peso (g)	29,0 $\pm$ 0,7	26,8 $\pm$ 0,4	27,6 $\pm$ 0,7	29,4 $\pm$ 1,8	29,1 $\pm$ 0,6	NS*

	Colesterol (mg/dl)	1.541 ± 175	1.372 ± 122	1.458 ± 101	1.589 ± 76	1.554 ± 12,1	NS*
	Triglicéridos (mg/dl)	344	120	250	303	306	P< 0,001**

\*: no significativo

\*\*.: Se efectuó un ensayo de análisis de varianza de rangos unidireccional de Kruskal-Wallis, datos expuestos como valores medianos.

Nota: "Peso" es peso en gramos, "colesterol" es colesterol plasmático y "triglicéridos" es triglicéridos plasmáticos, expresados en mg/dl

5

Se demuestra la atenuación de la aterogénesis por administración oral de LDL ox en la Figura 13 y en la Tabla 7 siguiente. Como se muestra en la Figura 13, el tratamiento tanto con 100 µg/dosis como con 1.000 µg/dosis de LDL ox reducía significativamente (P< 0,001) el área de lesión en el seno aórtico un 45% en comparación con los grupos de control (tratado con PBS o tratado con seroalbúmina humana (HAS)).

**Tabla 7: Efecto del tratamiento con LDL ox sobre el área aterosclerótica en el seno aórtico**

Punto temporal	Grupo A LDL ox 1.000 µg/dosis	Grupo B LDL ox 100 µg/dosis	Grupo C LDL ox 10 µg/dosis	Grupo D Seroalbúmina humana	Grupo E PBS	Estadísticas
Lesión del seno aórtico (µm <sup>2</sup> )	37.750 ± 4.890	38.304 ± 4.443	45.568 ± 3.309	77.604 ± 5.039	69.712 ± 6.797	P< 0,001

**Ejemplo X**

10

**Inhibición de la aterogénesis en ratones genéticamente predispuestos (Apo-E KO) por administración oral de CI-201**

15

Se usaron ratones Apo-E KO de 26-28 semanas (APO-E -/-(tm1Unc>[C57B/6J]) como prevención del modelo de progresión. Se estratificaron los ratones por edad, peso y perfil lipídico (colesterol y triglicéridos) en diferentes grupos. Se sacrificó un grupo al inicio del experimento y sirvió como grupo "de estado basal". Cada uno de los demás grupos se trató con CI-201 a dosis crecientes (0,1, 1 o 10 µg/dosis disuelto en PBS, 0,05% de etanol, en un volumen total de 0,2 ml de PBS). El grupo de control recibió PBS (0,05% de etanol, 0,2 ml).

20

Se trataron los ratones con CI-201 o PBS en tres series al inicio de cada mes, consistiendo cada serie en 5 administraciones orales cada dos días. Se alimentaron todos los ratones con dieta de pienso normal que contenía un 4,5% en peso de grasa (0,02% de colesterol) y agua a voluntad y se mantuvieron en un ciclo de oscuridad/luz de 12 horas.

Después de 12 semanas, se sacrificaron los ratones y se evaluó la extensión del área de placa ateromatosa en el seno aórtico, como se describe anteriormente en la presente memoria.

Se presenta en la Tabla 8 siguiente el efecto del tratamiento con CI-201 sobre los parámetros metabólicos. Los resultados muestran que CI-201 no afecta ni al peso corporal ni al perfil lipídico de los ratones ensayados.

**Tabla 8: Efecto del tratamiento con CI-201 sobre los parámetros metabólicos en ratones Apo-E KO**

Punto temporal	Parámetro	Grupo A CI-201 10 µg/dosis	Grupo B CI-201 1 µg/dosis	Grupo C CI-201 0,1 µg/dosis	Grupo D PBS	Grupo E Estado basal	Estadísticas
T= 0	Peso (g)	26,6 ± 0,5	26,4 ± 0,4	26,6 ± 0,4	26,5 ± 0,4	26,7 ± 0,5	NS*
	Colesterol (mg/dl)	321 ± 23	323 ± 20	313 ± 14	316 ± 12	315 ± 20	NS*

	Triglicéridos (mg/dl)	88 ± 4	87 ± 4	87 ± 6	80 ± 4	84 ± 8	NS*
Final	Peso (g)	29,6 ± 0,5	29,0 ± 0,4	28,8 ± 0,7	28,1 ± 1,8	-	NS*
	Colesterol (mg/dl)	344 ± 25	382 ± 24	406 ± 39	354 ± 24	-	NS*
	Triglicéridos (mg/dl)	76 ± 4	96 ± 8	107 ± 13	91 ± 7	-	NS*

\*: no significativo

Nota: "Peso" es peso en gramos, "colesterol" es colesterol plasmático y "triglicéridos" es triglicéridos plasmáticos, expresados en mg/dl

Se demuestra la atenuación de la aterogénesis por administración oral de CI-201 en las Figuras 14a-b y en la Tabla 9 siguiente.

**Tabla 9: Efecto de CI-201 sobre el área aterosclerótica en el seno aórtico**

Parámetro	Grupo A CI-201 10 µg/dosis	Grupo B CI-201 1 µg/dosis	Grupo C CI-201 0,1 µg/dosis	Grupo D PBS	Grupo E Estado basal	Estadísticas
Lesión del seno aórtico (µm <sup>2</sup> )	272.483 ± 20.505	295.729 ± 20.909	228.000 ± 25.772	328.491 ± 21.920	218.602 ± 29.248	P < 0,05

5

Los resultados presentados en la Tabla 9 muestran que el tratamiento con CI-201 inhibía completamente la progresión de la enfermedad, de tal modo que las áreas de lesión en el seno aórtico de ratones tratados con dosis diferentes de CI-201 eran similares a las del grupo de estado basal.

10 Contrariamente a esto, se observó un aumento altamente significativo de un 50% ( $p < 0,01$ ) en la lesión aterosclerótica en el seno aórtico en los ratones tratados con PBS en comparación con el grupo de estado basal ( $328.491 \pm 21.920 \mu\text{m}^2$  en el grupo de PBS frente a  $218.602 \pm 29.248 \mu\text{m}^2$  en el grupo de estado basal).

15 Como se demuestra en la Figura 14a, todas las dosis de CI-201 inhibían la progresión de la enfermedad, aunque la dosis más eficaz fue la dosis mínima de 0,1 µg/dosis. Como se demuestra en la Figura 14b, el grupo tratado con 0,1 µg/dosis de CI-201 exhibía una reducción significativa de un 92% ( $P < 0,05$ ) de la lesión aterosclerótica en el seno aórtico en comparación con el grupo tratado con PBS ( $328.491 \pm 21.920 \mu\text{m}^2$  en el grupo de PBS frente a  $228.000 \pm 25.772 \mu\text{m}^2$  en el grupo tratado con CI-201).

### Ejemplo XI

#### Elevación de los marcadores de inflamación en el suero de ratones Apo-E KO tratados con CI-201

20 A la vista de la drástica inhibición de la progresión de la aterosclerosis por administración oral de CI-201, que como se describe anteriormente en la presente memoria no se atribuye a una alteración del peso corporal ni perfil lipídico inducido por el mismo, se evaluó el efecto de la administración oral de CI-201 sobre el nivel de marcadores de inflamación en el suero, para investigar su mecanismo de acción.

25 Como se muestra en los estudios experimentales y clínicos, IL-10 es una citocina protectora importante en el crecimiento y estabilidad de placa. Por ejemplo, Caligiuri *et al.* ("Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice". *Mol. Med.* 2003; 9(1-2): 10-17) han reseñado recientemente que el tamaño de lesión aumentaba drásticamente en ratones con doble desactivación génica de Apo-E e IL-10, en comparación con los controles, y que la actividad proteolítica y procoagulante eran elevadas, mostrando que IL-10 puede reducir la aterosclerosis y mejorar la estabilidad de placas.

30 Es otro marcador del estado inflamatorio agudo el amiloide sérico A (SAA), un marcador inflamatorio altamente sensible que puede aumentar hasta 1.000 veces durante la inflamación. El SAA, como la CPR (proteína C reactiva), se sintetiza por el hígado en respuesta ante IL-1, IL-6 y TNF (Balke y Ridker, "Novel clinical markers of vascular wall inflammation", *Circ. Res.* 2001; 89: 763-771). Se ha encontrado que el SAA se expresa por varios tipos celulares en lesión aterosclerótica (Meek *et al.* "Expression of apolipoprotein serum amyloid A mRNA in human atherosclerotic lesions and

cultured vascular cells: implications for serum amyloid A function". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 3186-3190; Uhlar y Whitehead. "Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant". *Eur. J. Biochem.* 1999; 265: 501-523).

5 La iniciación de la cascada inflamatoria aparece principalmente por monocitos sanguíneos activados y macrófagos de tejido en el sitio del estímulo inflamatorio. Tras la activación, los macrófagos liberan una serie de mediadores inflamatorios primarios, los más importantes de los cuales son miembros de las familias de citocinas IL-1 y TNF, que desencadenan la liberación de una serie de citocinas y quimiocinas secundarias (IL-6, IL-8 y MCP). Las actividades quimiotácticas de estas moléculas atraen a leucocitos al sitio inflamatorio, donde a su vez liberan citocinas proinflamatorias adicionales.

10 Por tanto, se administraron a ratones Apo-E KO por vía oral 0,1 µg/ratón de CI-201 o 0,2 ml/ratón de PBS, 5 veces cada dos días. Se recogió el suero de ratón antes del tratamiento (día 0), al final del tratamiento (dos semanas) y dos semanas después de ello (4 semanas), y se evaluaron los niveles de los marcadores de inflamación IL-10 y amiloide sérico A (SAA).

Los datos obtenidos se presentan en la Figura 15a (para los niveles IL-10) y la Figure 15b (para los niveles de SAA).

15 Como puede verse en la Figura 15a, al final del tratamiento (2 semanas), se observó un aumento sustancial del nivel sérico de IL-10, mientras que 2 semanas después de ello (4 semanas), se notó una reducción. En el grupo de control tratado con PBS, no se notó cambio en los niveles séricos de IL-10 a lo largo del experimento.

Como puede verse en la Figura 15b, aunque los niveles séricos de SAA aumentaron drásticamente en el grupo de control, no se observaron alteraciones en los niveles séricos de SAA en el grupo tratado con CI-201.

20 Estos resultados indican claramente que al elevar los niveles de IL-10 en el suero, CI-201 induce una respuesta antiinflamatoria que puede cancelar una respuesta proinflamatoria, demostrado por niveles elevados de SAA. La inflamación sistémica manifestada por SAA alto puede promover la desestabilización de placa aterosclerótica además de ejercer un posible efecto directo sobre la aterogénesis. Estos resultados sugieren adicionalmente un efecto directo de CI-201 sobre los procesos inflamatorios.

## 25 **Ejemplo XII**

### **Expresión de citocinas en diversos órganos de ratones Apo-E KO tratados con CI-201**

Se evaluaron los efectos del tratamiento con CI-201 sobre la expresión de citocinas en el órgano diana, la aorta, así como en bazo, hígado, riñones e intestino delgado, usando PCR-TI como se describe anteriormente en la presente memoria. Se administró por vía oral a ratones Apo-E KO 1 mg/dosis de CI-201 o 0,2 ml/ratón de PBS 5 veces cada dos días. Se determinó la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10 y la citocina proinflamatoria IFN-γ 8 semanas después de la administración oral final. Los datos obtenidos se presentan en las Figuras 16a-b y la Figura 17.

30 Como puede verse en las Figuras 16a y 16b, los ratones tratados con CI-201 mostraron niveles elevados de la citocina antiinflamatoria IL-10 en comparación con el grupo tratado con PBS de control, mientras que se mostró un efecto opuesto, a saber, un nivel de expresión reducido, en el nivel de expresión de la citocina proinflamatoria IFN-γ en el grupo tratado con CI-201.

El aumento de la respuesta antiinflamatoria, como se demuestra por niveles elevados de IL-10, acompañado por una respuesta proinflamatoria reducida, como se demuestra por niveles reducidos de IFN-γ, subraya adicionalmente la inmunomodulación inducida por CI-201, que se efectúa cambiando de Th1 a Th2 la respuesta en la aorta, así como el efecto antiinflamatorio del mismo.

40 Aunque en el órgano diana, la aorta, CI-201 aumenta la respuesta antiinflamatoria, dicho efecto no se observó en otros órganos. Como puede verse en la Figura 17, no se observaron diferencias en la expresión de citocinas en bazo e intestino delgado entre el grupo tratado con CI-201 y el grupo de control tratado con PBS. Se sugiere que las placas de Peyers localizadas en los mismos se encontraron con el antígeno administrado por vía oral. No se observó cambio de la expresión de de citocinas en el hígado y riñón tampoco (datos no mostrados).

45 Los resultados anteriores sugieren que los análogos fosfolípidicos oxidados dados a conocer en la presente memoria, incluyendo los compuestos de la presente invención como se definen en las reivindicaciones, inhiben la aterosclerosis mediante una ruta que afecta tanto al sistema inmunitario como a la inflamación. Sin embargo, es posible que estén implicados también otros mecanismos en el efecto inhibitor más potente de los mismos.

## **Ejemplo XIII**

### **Inhibición de artritis reumatoide en ratas con artritis inducida por coadyuvante por administración oral de CI-201**

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmunitaria grave que implica inflamación crónica y destrucción de las articulaciones. La artritis inducida por coadyuvante (AIC) es el primer modelo de artritis experimental (Pearson.

“Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvant” *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1956; 91: 95-101; Pearson y Wood. “Studies of polyarthritis and other lesions induced in rats by injection of mycobacterial adjuvant. I. general clinical and pathologic characteristics and some modifying factors”. *Arthritis Rheum.* 1959; 2: 440-459).

5 El carácter morfológico de las lesiones de AIC tempranas está basado en la inmunidad mediada por célula (IMC). La infiltración de linfocitos es seguida de edema, deposición de fibrina y necrosis, acompañados de proliferación de sinoviocitos y fibroblastos y activación de osteoblastos y osteoclastos. El infiltrado inflamatorio en las lesiones de articulación de AIC contiene linfocitos T activados por antígenos específicos. Las citocinas Th1, tales como IL-17, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , se expresan en AIC temprana junto con las citocinas características de la activación de macrófagos. En una fase tardía de la enfermedad, los niveles de IL-4, IL-6 y JE (homólogo murino de la proteína quimioattractora de monocitos 1) y TGF- $\beta$  son elevados. Existe una liberación local de enzimas proteolíticas y/o radicales libres de oxígeno que da como resultado una descomposición progresiva del colágeno de tipo II y IX, daño de matriz y, con el tiempo, degradación del hueso (Van Eden y Waksman. “Immune regulation in adjuvant-induced arthritis. Possible implications for innovative therapeutic strategies in arthritis”. *Arthritis Rheum.* 2003; 48(7): 1788-1796).

15 Varios intentos de inmunoterapia de enfermedades autoinmunes humanas tales como artritis reumatoide (AR), diabetes de tipo I y esclerosis múltiple, basados en la modulación de rutas inmunitarias individuales implicadas en la inflamación o tolerización por diversos antígenos, han mostrado que este enfoque puede ser viable (Bielekova *et al.* “Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: Results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand”. *Nat. Med.* 2000; 6: 1167-1175; Kappos *et al.* “Induction of a non-encephalitogenic type 2 T helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in a placebo controlled, randomized phase II trial”. *Nat. Med.* 2000; 6: 1176-1182).

20 En muchos pacientes, la evolución de la artritis reumatoide se complica por enfermedad cardiovascular, siendo esta última la causa principal de la mortalidad aumentada en este trastorno. Se ha sugerido que los autoanticuerpos contra cardiolipina (CL) y lipoproteínas de baja densidad modificadas oxidativamente (LDL oxidada con cobre), incluyendo LDL modificada con malondialdehído (MDA-LDL), tienen un valor predictivo para enfermedad cardiovascular. Se ha demostrado que hay niveles aumentados de autoanticuerpos contra lipoproteínas de baja densidad oxidadas con cobre, lipoproteínas de baja densidad modificadas con malondialdehído y cardiolipina en pacientes con artritis reumatoide (Cvetkovic *et al.* “Increased levels of autoantibodies against copper-oxidized low density lipoprotein, malondialdehyde-modified low density lipoprotein and cardiolipin in patients with rheumatoid arthritis”. *Rheumatology.* 2002; 41: 988-995). Además, hay evidencias de lipoproteína de baja densidad oxidada en el fluido sinovial de pacientes de artritis reumatoide (Dai *et al.* “Evidence for oxidized low density lipoprotein in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients”. *Free Radic. Res.* 2000; 32(6): 479-486).

Puesto que se ha encontrado que CI-201 era eficaz tanto en la inducción de la inmunomodulación de LDL ox como en el aumento de una respuesta antiinflamatoria, se ensayó su efecto sobre el desarrollo de la artritis.

35 Se administraron por vía oral a ratones macho Lewis de 9 semanas diferentes dosis de CI-201 (4 mg/kg o 0,4 mg/kg) o PBS, 5 veces cada dos días. Se indujo entonces la artritis por coadyuvante mediante la inyección intradérmica de 0,1 ml de suspensión de tuberculosis. Se monitorizó la intensidad de la artritis midiendo el hinchamiento de pata mientras se monitorizaba también la movilidad de los animales. Se presenta el diseño de estudio en la Figura 18. Se presentan los resultados en la Figura 19.

40 Como puede verse en la Figura 19, el pretratamiento con la dosis mayor (4,0 mg/kg) de CI-201 daba como resultado una reducción significativa del hinchamiento de pata en ratas, en comparación con las ratas de control pretratadas con PBS.

Aunque las ratas tratadas con PBS apenas se movían, usando solo sus patas traseras, la movilidad de las ratas pretratadas con la dosis mayor de CI-201 era casi la de las ratas normales.

45 Para evaluar el efecto del tratamiento continuo con CI-201 sobre ratas Lewis inducidas con AIC, después de la inducción de AIC, se alimentaron ratas Lewis macho de 9 semanas, 5 veces cada dos días, antes de la inducción de AIC por inyección intradérmica de 0,1 ml de suspensión de tuberculosis, y después de ello se alimentaron continuamente tres veces por semana durante aproximadamente 30 días. El diseño de estudio se presenta en la Figura 20. Los resultados se presentan en las Figuras 21-23.

50 Como puede verse en las Figuras 21-23 de CI-201, un tratamiento continuo con la dosis alta de CI-201 atenuaba sustancialmente el desarrollo de artritis en todos los parámetros ensayados.

Estos resultados indican claramente que las propiedades antiinflamatorias de CI-201 pueden influir adicionalmente en una enfermedad inflamatoria clásica, AR, además de su efecto sobre la aterosclerosis.

55 Los linfocitos T auxiliares CD4+ y macrófagos infiltran la membrana sinovial (MS) en artritis reumatoide crónica destructiva, y probablemente desempeñan un papel clave en la promoción y el mantenimiento del proceso patológico. Los linfocitos T CD4+ pueden diferenciarse en la subpoblación de Th1, caracterizada por la producción predominante de IFN- $\gamma$ . La predominancia de células del tipo Th1 proinflamatorio se ha postulado en AR (Schmidt-Weber *et al.* “Cytokine gene activation in synovial membrane, regional lymph nodes, and spleen during the course of rat adjuvant arthritis”. *Cell.*

*Immunol.* 1999; 195: 53-65). Los macrófagos están también muy activados en el proceso inflamatorio de AR, tanto local como sistémicamente.

Los parecidos en la respuesta inflamatoria implicada tanto en aterosclerosis como artritis apoyan la sugerencia de que CI-201 induce una respuesta antiinflamatoria en AIC de forma similar a la demostrada anteriormente en aterosclerosis.

5 Por lo tanto, puede postularse que el tratamiento con CI-201 induce la elevación de IL-10 en el modelo de AIC y que IL-10 puede suprimir las citocinas proinflamatorias, reduciendo por tanto el evolución de la enfermedad, como se demostró por un hinchamiento de pata reducido y mejor movilidad. Por lo tanto, estos resultados implican que los análogos fosfolipídicos oxidados dados a conocer en la presente memoria, incluyendo los compuestos de la presente invención como se definen en las reivindicaciones, pueden servir como una nueva familia de fármacos terapéuticos para tratar artritis reumatoide así como otras enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias.

**Ejemplo XIV**

**Administración oral del compuesto V preoxidado a ratones genéticamente predispuestos (Apo-E KO)- efecto del grupo oxidado sobre la inhibición de la aterogénesis**

15 Se ensayó el efecto del grupo oxidado en ALLE y CI-201 comparando el efecto de la administración oral de ALLE y CI-201 sobre la aterogénesis temprana y la progresión de placas ateroscleróticas avanzadas, mostrados anteriormente, con el efecto del derivado preoxidado del mismo compuesto V (1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-sn-glicero-3-fosfocolina, Ejemplo I).

20 Se dividieron en 4 grupos 25 ratones hembra Apo-E KO de 8-10 semanas. Se alimentó cada grupo con 5 mg/ratón de compuesto V suspendido en 0,2 ml de PBS (grupo A, n= 6), 1 mg/ratón de compuesto V suspendido en 0,2 ml de PBS (grupo B, n= 6), 0,2 mg/ratón de compuesto V suspendido en 0,2 ml de PBS (grupo C, n= 6) y PBS (grupo D, control, n= 7), cada dos días durante 5 días. Se sacrificaron los ratones 8 semanas después de la última administración oral. Se tomaron muestras de sangre a los ratones antes de la alimentación (tiempo 0) y a la conclusión del experimento (fin) para la determinación del perfil lipídico. Se valoró la aterosclerosis en el corazón como se describe anteriormente en la presente memoria. Se alimentaron todos los ratones con dieta normal que contenía un 4,5% en peso de grasa (0,02% de colesterol) y agua a voluntad.

El efecto del tratamiento del compuesto V sobre los parámetros metabólicos y sobre la aterogénesis se concreta en la Tabla 10 siguiente. El efecto del compuesto V sobre la aterogénesis se presenta adicionalmente en la Figura 24.

**Tabla 10: Efecto del derivado preoxidado compuesto V sobre los parámetros metabólicos y área aterosclerótica en el seno aórtico de ratones Apo-E KO**

Punto temporal	Parámetro ensayado	PBS (n= 7)	5 mg de comp. V (n= 6)	1 mg de comp. V (n= 6)	0,2 mg de comp. V (n= 6)	Estadísticas (valor de p)
0	Peso	18,4 ± 0,4	18,0 ± 0,3	18,3 ± 0,3	18,5 ± 0,3	0,826
	Colesterol	197 ± 19	210 ± 18	198 ± 23	214 ± 21	0,902
	Triglicéridos	53 ± 10	52 ± 4	52 ± 5	50 ± 7	0,993
Final	Peso	20,7 ± 0,4	19,8 ± 0,3	19,8 ± 0,2	20,1 ± 0,3	0,161
	Colesterol	387 ± 20	431 ± 23	398 ± 23	409 ± 8	0,455
	Triglicéridos	70 ± 3	80 ± 8	91 ± 4**	102 ± 5*	0,001
	Lesión de seno $\mu\text{m}^2$	314764 ± 14458	307291 ± 22689	361166 ± 24068	334622 ± 26100	0,352

Nota: "Peso" es peso en gramos, "colesterol" es colesterol plasmático y "triglicéridos" es triglicéridos plasmáticos, expresados en mg/dl

\*P < 0,001 frente al grupo de PBS

\*\*P < 0,05 frente al grupo de PBS

30

Como puede verse claramente en la Figura 24, aunque la administración oral de los compuestos oxidados CI-201 y ALLE inhibía sustancialmente la aterogénesis en ratones Apo-E KO, no se observó efecto sobre la aterogénesis

después del tratamiento con el derivado preoxidado compuesto V, indicando por tanto la importancia de la presencia del grupo oxidado en el tratamiento de la aterogénesis.

#### Ejemplo XV

#### Administración oral del compuesto V preoxidado a ratones genéticamente predispuestos (ratones Apo-E KO)- efecto del grupo oxidado sobre la progresión de la aterogénesis

5

10

Se ensayó adicionalmente el compuesto V preoxidado en un modelo de prevención de la progresión en ratones Apo-E KO, descrito anteriormente en la presente memoria. Se estratificaron ratones Apo-E KO de 23-26 semanas (APO-E -/- <tm1Unc>[C57B/6J]) por edad, peso y perfil lipídico (colesterol y triglicéridos) en diferentes grupos. Un grupo se sacrificó al inicio del experimento y sirvió como grupo de "estado basal" (EB, n= 10). El segundo grupo se trató con el compuesto V (0,1 µg/dosis, n= 10) disuelto en PBS, 0,05% de etanol, en un volumen total de 0,2 ml de PBS. El grupo de control recibió PBS (0,05% de etanol, 0,2 ml) (n= 11).

15

Se trataron los ratones con compuesto V o PBS en tres series al inicio de cada mes, consistiendo cada serie en 5 administraciones orales cada dos días. Se alimentaron todos los ratones con dieta de pienso normal que contenía un 4,5% en peso de grasa (0,02% de colesterol) y agua a voluntad, y se mantuvieron en un ciclo de oscuridad/luz de 12 horas.

Después de 12 semanas, se sacrificaron los ratones y se evaluaron el perfil lipídico y la extensión del área de placa ateromatosa en el seno aórtico, como se describe anteriormente en la presente memoria. Los resultados se presentan en la Tabla 11 siguiente y en la Figura 25, e indican claramente que la administración oral de compuesto V no afectaba a la progresión de la aterogénesis.

20

**Tabla 11: Efecto del derivado preoxidado compuesto V sobre los parámetros metabólicos y el área aterosclerótica en el seno aórtico de ratones Apo-E KO**

Punto temporal	Parámetro	Comp. V 0,1 µg/dosis	PBS	Estado basal	Estadísticas (valor de p)
T= 0	Peso (g)	26,1 ± 0,7	26,2 ± 0,6	26,2 ± 0,7	0,710
	Colesterol (mg/dl)	401 ± 27	393 ± 32	406 ± 19	0,936
	Triglicéridos (mg/dl)	128 ± 8	129 ± 6	125 ± 7	0,926
Final	Peso (g)	28,1 ± 0,5	28,0 ± 0,5	-	0,967
	Colesterol (mg/dl)	292 ± 16	277 ± 37	-	0,717
	Triglicéridos (mg/dl)	81 ± 3	90 ± 4	-	0,094
Lesión de seno µm <sup>2</sup>		238156 ± 32206	206647 ± 15293	137451 ± 18975	0,011*

\* No hay diferencia estadística entre los ratones tratados con compuesto V y los ratones de control tratados con PBS

#### REFERENCIAS ADICIONALES DE INTERÉS (NO CITADAS EN EL TEXTO)

25

Wick G, Schett G, Amberger A, Kleindienst R, Xu Q. "Is atherosclerosis an immunologically mediated disease?" Immunol. Today 1995; 16: 27-33.

Libby P, Hansson GK. "Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions". Lab. Invest. 1991; 64: 5-15.

Steinberg D, Parathasarathy S, Carew TE, Khoo J C, Witztum JL. "Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity". N. Engl. J. Med. 1989; 320: 915-924.

30

Witztum J. "The oxidation hypothesis of atherosclerosis". Lancet 1994; 344: 793-795.

Palinski W, Miller E, Witztum JL. "Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995; 92: 821-825.

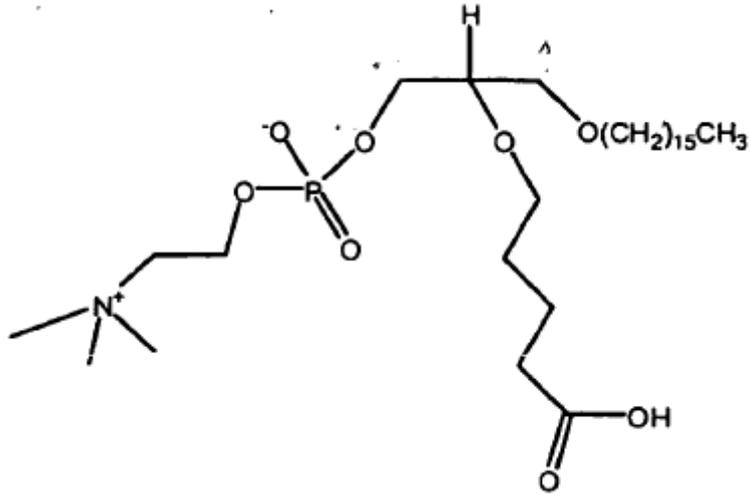
35

George J, Afek A, Gilburd B, Levy Y, Levkovitz H, Shaish A, Goldberg I, Kopolovic Y, Wick G, Shoenfeld Y, Hartas D. "Hyperimmunization of ApoE deficient mice with homologous oxLDL suppresses early atherogenesis". Atherosclerosis. 1998; 138: 147-152.

- Weiner H, Freidman A, Miller A. "Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens". Annu. Rev. Immunol. 1994; 12: 809-837.
- 5 Palinski W, Ord VA, Plump AS, Breslow JL, Steinberg D, Witztum JL. "Apo-E-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum". Arterioscler. Thromb. 1994; 14: 605-616.
- Roselaar SE, Kakkanathu PX, Daugherty A. "Lymphocyte populations in atherosclerotic lesions of apo-E -/- and LDL receptor -/- mice; Decreasing density with disease progression". Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1996; 16: 1013-1018.
- 10 Palinski W, Yla-Herttuala S, Rosenfeld ME, Butler SW, Socher SA, Parthasarathy S, Curtiss LK, Witztum JL. "Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during oxidative modification of low density lipoprotein". Arteriosclerosis 1990; 10: 325-335.
- Ou Z., Ogamo A., Guo L., Konda Y., Harigaya Y. y Nakagawa Y. Anal. Biochem. 227: 289-294, 1995.
- E. Baer y Buchnea JBC. 230, 447, 1958.
- Quintana FJ, Carmi P, Mor F y Cohen R. "Inhibition of adjuvant arthritis by a DNA vaccine encoding human heat shock protein 60". J. Immunol. 2002; 169: 3422-3428.
- 15 Cobelens PM, Heijnen CJ, Nieuwenhois EES *et al.* "Treatment of adjuvant induced arthritis by oral administration of mycobacterial Hsp65 during disease". Arthritis Rheum. 2000; 43(12): 2694-2702.
- Cobelens PM, Kavelaars A, Van Der Zee R *et al.* "Dynamics of mycobacterial HSP65-induced T-cell cytokine expression during oral tolerance induction in adjuvant arthritis". Rheumatology. 2002; 41: 775-779.

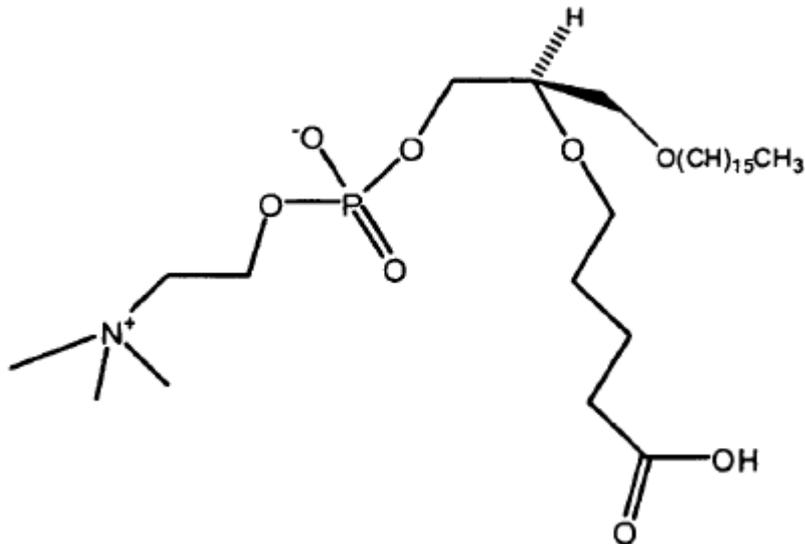
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula:

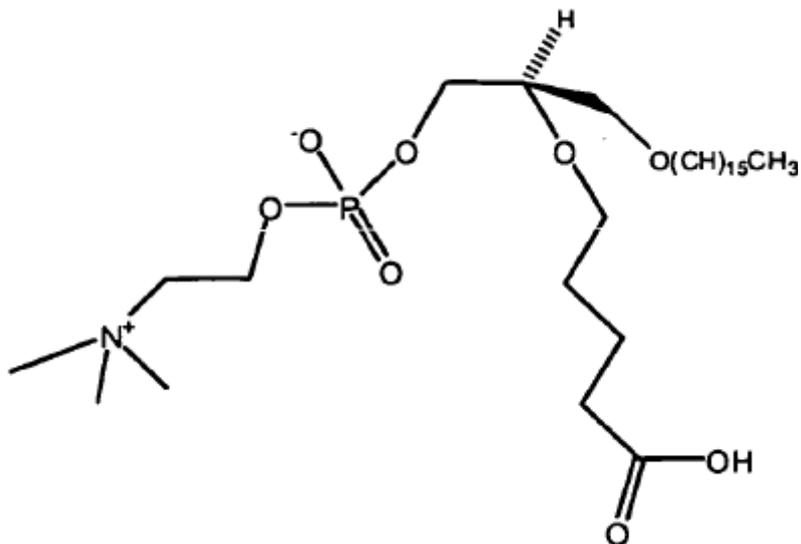


o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 2. El compuesto de la reivindicación 1, que se selecciona del grupo consistente en 1-hexadecil-2-(4'-carboxibutil)-sn-glicero-3-fosfocolina y 3-hexadecil-2-(4'-carboxibutil)-sn-glicero-1-fosfocolina.
3. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



4. Una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un portador farmacéuticamente aceptable.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, en la que dicho compuesto tiene la fórmula:



6. La composición farmacéutica de la reivindicación 4 o 5 para uso en el tratamiento o la prevención de una inflamación asociada a un lípido oxidado endógeno, en la que dicha inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo consistente en psoriasis, artritis reumatoide, síndrome inflamatorio intestinal, esclerosis múltiple y aterosclerosis.

7. La composición farmacéutica de la reivindicación 4 o 5 para uso en el tratamiento o la prevención de una inflamación asociada a un lípido oxidado endógeno, en la que dicha inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo consistente en una enfermedad o trastorno inflamatorio idiopático, una enfermedad o trastorno inflamatorio crónico, una enfermedad o trastorno inflamatorio agudo, una enfermedad o trastorno autoinmune, una enfermedad o trastorno infeccioso, una enfermedad o trastorno inflamatorio maligno, una enfermedad o trastorno inflamatorio relacionado con transplantes, una enfermedad o trastorno inflamatorio degenerativo, una enfermedad o trastorno asociado a hipersensibilidad, una enfermedad o trastorno inflamatorio cardiovascular, una enfermedad o trastorno inflamatorio cerebrovascular, una enfermedad o trastorno vascular periférico, una enfermedad o trastorno inflamatorio glandular, una enfermedad o trastorno inflamatorio gastrointestinal, una enfermedad o trastorno inflamatorio cutáneo, una enfermedad o trastorno inflamatorio hepático, una enfermedad o trastorno inflamatorio neurológico, una enfermedad o trastorno inflamatorio musculoesquelético, una enfermedad o trastorno inflamatorio renal, una enfermedad o trastorno inflamatorio reproductivo, una enfermedad o trastorno inflamatorio sistémico, una enfermedad o trastorno inflamatorio del tejido conectivo, un tumor inflamatorio, necrosis, una enfermedad o trastorno inflamatorio relacionado con implantes, un proceso inflamatorio de envejecimiento, una enfermedad o trastorno por inmunodeficiencia, una enfermedad o trastorno proliferativo y una enfermedad o trastorno inflamatorio pulmonar.

8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno asociado a hipersensibilidad, en la que la hipersensibilidad se selecciona del grupo consistente en hipersensibilidad de tipo I, hipersensibilidad de tipo II, hipersensibilidad de tipo III, hipersensibilidad de tipo IV, hipersensibilidad inmediata, hipersensibilidad mediada por anticuerpos, hipersensibilidad mediada por complejos inmunitarios, hipersensibilidad mediada por linfocitos T, hipersensibilidad de tipo retardado, hipersensibilidad mediada por linfocitos T auxiliares, hipersensibilidad mediada por linfocitos T citotóxicos, hipersensibilidad mediada por linfocitos TH1 e hipersensibilidad mediada por linfocitos TH2.

9. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno cardiovascular inflamatorio, en la que la enfermedad o trastorno cardiovascular inflamatorio se selecciona del grupo consistente en una enfermedad o trastorno oclusivo, aterosclerosis, una enfermedad valvular cardíaca, estenosis, reestenosis, estenosis en prótesis endovascular, infarto de miocardio, enfermedad arterial coronaria, síndromes coronarios agudos, insuficiencia cardíaca congestiva, angina de pecho, isquemia de miocardio, trombosis, granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu, síndrome de Kawasaki, enfermedad o trastorno autoinmune anti-factor VIII, vasculitis necrosante de vasos pequeños, poliangiitis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis necrosante focal pauciinmunitaria, glomerulonefritis semilunar, síndrome antifosfolípido, insuficiencia cardíaca inducida por anticuerpos, púrpura trombocitopénica, anemia hemolítica autoinmune, autoinmunidad cardíaca, enfermedad o trastorno de Chagas y autoinmunidad anti-linfocitos T auxiliares.

10. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio cerebrovascular, en la que la enfermedad o trastorno cerebrovascular se selecciona del grupo consistente en apoplejía, inflamación cerebrovascular, hemorragia cerebral e insuficiencia arterial vertebral.

11. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno vascular periférico, en la que la enfermedad o trastorno vascular periférico se selecciona del grupo consistente en gangrena, vasculopatía diabética, enfermedad isquémica intestinal, trombosis, retinopatía diabética y nefropatía diabética.
- 5 12. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno autoinmune, en la que la enfermedad o trastorno autoinmune se selecciona del grupo consistente en artritis reumatoide crónica, artritis reumatoide juvenil, lupus sistémico eritematoso, esclerodermia, enfermedad del tejido conectivo mixto, poliarteritis nodular, polimiositis/dermatomiositis, síndrome de Sjögren, enfermedad de Behçet, esclerosis múltiple, diabetes autoinmune, enfermedad de Hashimoto, psoriasis, mixedema primario, anemia perniciosa, miastenia grave, hepatitis crónica activa, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, uveítis, vasculitis y trombocitopenia inducida por heparina.
- 10 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio glandular, en la que la enfermedad o trastorno inflamatorio glandular se selecciona del grupo consistente en enfermedades o trastornos pancreáticos, diabetes de tipo I, enfermedades o trastornos del tiroides, enfermedad o trastorno de Graves, tiroiditis, tiroiditis autoinmune espontánea, tiroiditis de Hashimoto, mixedema idiopático, autoinmunidad ovárica, infertilidad autoinmune antiespermática, prostatitis autoinmune y síndrome poliglandular autoinmune de tipo I.
- 15 14. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio gastrointestinal, en la que la enfermedad o trastorno gastrointestinal se selecciona del grupo consistente en colitis, ileitis, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal crónica, síndrome inflamatorio intestinal, enfermedad inflamatoria crónica del intestino, enfermedad celíaca, colitis ulcerosa, úlcera, úlcera cutánea, escara de decúbito, úlcera gástrica, úlcera péptica, úlcera bucal, úlcera nasofaríngea, úlcera esofágica, úlcera duodenal y úlcera gastrointestinal.
- 20 15. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio cutáneo, en la que la enfermedad o trastorno inflamatorio cutáneo se selecciona del grupo consistente en acné, enfermedad o trastorno cutáneo ampolloso autoinmune, pénfigo vulgar, penfigoide ampolloso, pénfigo foliáceo, dermatitis de contacto y erupción cutánea.
- 25 16. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio hepático, en la que la enfermedad o trastorno inflamatorio hepático se selecciona del grupo consistente en hepatitis autoinmune, cirrosis hepática y cirrosis biliar.
- 30 17. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio neurológico, en la que la enfermedad o trastorno inflamatorio neurológico se selecciona del grupo consistente en esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, miastenia grave, neuropatía motora, síndrome de Guillain-Barre, neuropatía autoinmune, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, enfermedad o trastorno neurológico paraneoplásico, atrofia cerebelar paraneoplásica, síndrome de la persona rígida no paraneoplásico, atrofia cerebelar progresiva, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydeham, síndrome de Gilles de la Tourette, poliendocrinopatía autoinmune, neuropatía disimmunitaria, neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple, enfermedad de Huntington, demencia asociada a SIDA, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple, apoplejía, enfermedad o trastorno inflamatorio retiniano, enfermedad o trastorno inflamatorio ocular, neuritis óptica, encefalopatía esponjiforme, migraña, cefalea, cefalea en brotes y síndrome de la persona rígida.
- 35 40 18. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio del tejido conectivo, en la que la enfermedad o trastorno inflamatorio del tejido conectivo se selecciona del grupo consistente en miositis autoinmune, síndrome de Sjögren primario, enfermedad o trastorno autoinmune de músculo liso, miositis, tendinitis, inflamación de ligamento, condritis, inflamación de articulación, inflamación sinovial, síndrome del túnel carpiano, artritis, artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, inflamación esquelética, enfermedad o trastorno autoinmune del oído y enfermedad o trastorno autoinmune del oído interno.
- 45 19. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio renal, en la que la enfermedad o trastorno inflamatorio renal es nefritis intersticial autoinmune y/o cáncer renal.
- 50 20. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio reproductivo, en la que la enfermedad o trastorno inflamatorio reproductivo es pérdida fetal recurrente, quiste ovárico o enfermedad o trastorno asociado a la menstruación.
- 55 21. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio sistémico, en la que la enfermedad o trastorno inflamatorio sistémico se selecciona del grupo consistente en lupus sistémico eritematoso, esclerosis sistémica, choque séptico, síndrome del choque tóxico y caquexia.

22. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno infeccioso, en la que la enfermedad o trastorno infeccioso se selecciona del grupo consistente en una enfermedad o trastorno infeccioso crónico, una enfermedad o trastorno infeccioso subagudo, una enfermedad o trastorno infeccioso agudo, una enfermedad o trastorno vírico, una enfermedad o trastorno bacteriano, una enfermedad o trastorno protozoario, una enfermedad o trastorno parasitario, una enfermedad o trastorno fúngico, una enfermedad o trastorno por micoplasma, gangrena, sepsis, una enfermedad o trastorno priónico, gripe, tuberculosis, malaria, síndrome de inmunodeficiencia adquirida y síndrome respiratorio agudo grave.
23. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio relacionado con trasplantes, en la que la enfermedad o trastorno inflamatorio relacionado con trasplantes se selecciona del grupo consistente en rechazo de injerto, rechazo de injerto crónico, rechazo de injerto subagudo, rechazo de injerto agudo, rechazo de injerto hiperagudo y enfermedad o trastorno del injerto contra el hospedador.
24. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio relacionado con implantes, en la que el implante se selecciona del grupo consistente en implante protésico, implante de mama, implante de silicona, implante dental, implante de pene, implante cardiaco, articulación artificial, dispositivo de reparación de fractura ósea, implante de reemplazo óseo, implante de suministro de fármaco, catéter, marcapasos, corazón artificial, válvula cardiaca artificial, implante de liberación de fármaco y tubo respirador.
25. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la inflamación está asociada a un tumor inflamatorio, en la que el tumor inflamatorio se selecciona del grupo consistente en tumor maligno, tumor benigno, tumor sólido, tumor metastásico y tumor no sólido.
26. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio pulmonar, en la que la enfermedad o trastorno inflamatorio pulmonar se selecciona del grupo consistente en asma, asma alérgica, enfisema, enfermedad o trastorno pulmonar obstructivo crónico, sarcoidosis y bronquitis.
27. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 26, que comprende adicionalmente al menos un compuesto adicional capaz de tratar o prevenir una inflamación asociada a un lípido oxidado.
28. La composición farmacéutica de la reivindicación 27, en la que dicho al menos un compuesto adicional se selecciona del grupo consistente en un inhibidor de HMGC<sub>o</sub>A reductasa (una estatina), un coadyuvante mucoso, un corticosteroide, un fármaco antiinflamatorio esteroideo, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, un analgésico, un factor de crecimiento, una toxina, una HSP, una  $\beta$ -2-glucoproteína I, un inhibidor de proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP), un agonista de receptor activado por proliferador de peroxisoma (PPAR), un fármaco antiaterosclerótico, un agente antiproliferativo, ezetimida, ácido nicotínico, un inhibidor de escualeno y una ApoE Milano.
29. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en el tratamiento o la prevención de una inflamación asociada a un lípido oxidado endógeno, en el que dicha inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo consistente en psoriasis, artritis reumatoide, síndrome inflamatorio intestinal, esclerosis múltiple y aterosclerosis.
30. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en el tratamiento o la prevención de una inflamación asociada a un lípido oxidado endógeno, en el que dicha inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo consistente en una enfermedad o trastorno inflamatorio idiopático, una enfermedad o trastorno inflamatorio crónico, una enfermedad o trastorno inflamatorio agudo, una enfermedad o trastorno autoinmune, una enfermedad o trastorno infeccioso, una enfermedad o trastorno inflamatorio maligno, una enfermedad o trastorno inflamatorio relacionado con trasplantes, una enfermedad o trastorno inflamatorio degenerativo, una enfermedad o trastorno asociado a hipersensibilidad, una enfermedad o trastorno inflamatorio cardiovascular, una enfermedad o trastorno inflamatorio cerebrovascular, una enfermedad o trastorno vascular periférico, una enfermedad o trastorno inflamatorio glandular, una enfermedad o trastorno inflamatorio gastrointestinal, una enfermedad o trastorno inflamatorio cutáneo, una enfermedad o trastorno inflamatorio hepático, una enfermedad o trastorno inflamatorio neurológico, una enfermedad o trastorno inflamatorio musculoesquelético, una enfermedad o trastorno inflamatorio renal, una enfermedad o trastorno inflamatorio reproductivo, una enfermedad o trastorno inflamatorio sistémico, una enfermedad o trastorno inflamatorio del tejido conectivo, un tumor inflamatorio, necrosis, una enfermedad o trastorno inflamatorio relacionado con implantes, un proceso inflamatorio de envejecimiento, una enfermedad o trastorno por inmunodeficiencia, una enfermedad o trastorno proliferativo y una enfermedad o trastorno inflamatorio pulmonar.
31. El compuesto de la reivindicación 30, en el que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno asociado a hipersensibilidad, en el que la hipersensibilidad se selecciona del grupo consistente en hipersensibilidad de tipo I, hipersensibilidad de tipo II, hipersensibilidad de tipo III, hipersensibilidad de tipo IV, hipersensibilidad inmediata, hipersensibilidad mediada por anticuerpos, hipersensibilidad mediada por complejos inmunitarios, hipersensibilidad mediada por linfocitos T, hipersensibilidad de tipo retardado, hipersensibilidad mediada por linfocitos T auxiliares, hipersensibilidad mediada por linfocitos T citotóxicos, hipersensibilidad mediada por linfocitos TH1 e hipersensibilidad mediada por linfocitos TH2.

32. El compuesto de la reivindicación 30, en el que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno cardiovascular inflamatorio, en el que la enfermedad o trastorno cardiovascular inflamatorio se selecciona del grupo consistente en una enfermedad o trastorno oclusivo, aterosclerosis, una enfermedad valvular cardiaca, estenosis, reestenosis, estenosis en prótesis endovascular, infarto de miocardio, enfermedad arterial coronaria, síndromes coronarios agudos, insuficiencia cardiaca congestiva, angina de pecho, isquemia de miocardio, trombosis, granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu, síndrome de Kawasaki, enfermedad o trastorno autoinmune anti-factor VIII, vasculitis necrosante de vasos pequeños, poliangiitis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis necrosante focal pauciinmunitaria, glomerulonefritis semilunar, síndrome antifosfolípido, insuficiencia cardiaca inducida por anticuerpos, púrpura trombocitopénica, anemia hemolítica autoinmune, autoinmunidad cardiaca, enfermedad o trastorno de Chagas y autoinmunidad anti-linfocitos T auxiliares.
33. El compuesto de la reivindicación 30, en el que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio cerebrovascular, en el que la enfermedad o trastorno cerebrovascular se selecciona del grupo consistente en apoplejía, inflamación cerebrovascular, hemorragia cerebral e insuficiencia arterial vertebral.
34. El compuesto de la reivindicación 30, en el que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno vascular periférico, en el que la enfermedad o trastorno vascular periférico se selecciona del grupo consistente en gangrena, vasculopatía diabética, enfermedad isquémica intestinal, trombosis, retinopatía diabética y nefropatía diabética.
35. El compuesto de la reivindicación 30, en el que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno autoinmune, en el que la enfermedad o trastorno autoinmune se selecciona del grupo consistente en artritis reumatoide crónica, artritis reumatoide juvenil, lupus sistémico eritematoso, esclerodermia, enfermedad del tejido conectivo mixto, poliarteritis nodular, polimiositis/dermatomiositis, síndrome de Sjögren, enfermedad de Behçet, esclerosis múltiple, diabetes autoinmune, enfermedad de Hashimoto, psoriasis, mixedema primario, anemia perniciosa, miastenia grave, hepatitis crónica activa, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, uveítis, vasculitis y trombocitopenia inducida por heparina.
36. El compuesto de la reivindicación 30, en el que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio glandular, en el que la enfermedad o trastorno inflamatorio glandular se selecciona del grupo consistente en enfermedades o trastornos pancreáticos, diabetes de tipo I, enfermedades o trastornos de tiroides, enfermedad o trastorno de Graves, tiroiditis, tiroiditis autoinmune espontánea, tiroiditis de Hashimoto, mixedema idiopático, autoinmunidad ovárica, infertilidad autoinmune antispermática, prostatitis autoinmune y síndrome poliglandular autoinmune de tipo I.
37. El compuesto de la reivindicación 30, en el que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio gastrointestinal, en el que la enfermedad o trastorno gastrointestinal se selecciona del grupo consistente en colitis, ileitis, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal crónica, síndrome inflamatorio intestinal, enfermedad inflamatoria crónica del intestino, enfermedad celíaca, colitis ulcerosa, úlcera, úlcera cutánea, escara de decúbito, úlcera gástrica, úlcera péptica, úlcera bucal, úlcera nasofaríngea, úlcera esofágica, úlcera duodenal y úlcera gastrointestinal.
38. El compuesto de la reivindicación 30, en el que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio cutáneo, en el que la enfermedad o trastorno inflamatorio cutáneo se selecciona del grupo consistente en acné, enfermedad o trastorno cutáneo ampolloso autoinmune, pénfigo vulgar, penfigoide ampolloso, pénfigo foliáceo, dermatitis de contacto y erupción cutánea.
39. El compuesto de la reivindicación 30, en el que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio hepático, en el que la enfermedad o trastorno inflamatorio hepático se selecciona del grupo consistente en hepatitis autoinmune, cirrosis hepática y cirrosis biliar.
40. El compuesto de la reivindicación 30, en el que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio neurológico, en el que la enfermedad o trastorno inflamatorio neurológico se selecciona del grupo consistente en esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, miastenia grave, neuropatía motora, síndrome de Guillain-Barre, neuropatía autoinmune, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, enfermedad o trastorno neurológico paraneoplásico, atrofia cerebelar paraneoplásica, síndrome de la persona rígida no paraneoplásico, atrofia cerebelar progresiva, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydeham, síndrome de Gilles de la Tourette, poliendocrinopatía autoinmune, neuropatía disimunitaria, neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple, enfermedad de Huntington, demencia asociada a SIDA, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple, apoplejía, enfermedad o trastorno inflamatorio retiniano, enfermedad o trastorno inflamatorio ocular, neuritis óptica, encefalopatía esponjiforme, migraña, cefalea, cefalea en brotes y síndrome de la persona rígida.
41. El compuesto de la reivindicación 30, en el que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio del tejido conectivo, en ea que la enfermedad o trastorno inflamatorio del tejido conectivo se selecciona del grupo consistente en miositis autoinmune, síndrome de Sjögren primario, enfermedad o trastorno autoinmune de músculo liso, miositis, tendinitis, inflamación de ligamento, condritis, inflamación de articulación, inflamación sinovial,

síndrome del túnel carpiano, artritis, artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, inflamación esquelética, enfermedad o trastorno autoinmune del oído y enfermedad o trastorno autoinmune del oído interno.

42. El compuesto de la reivindicación 30, en el que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio renal, en el que la enfermedad o trastorno inflamatorio renal es nefritis intersticial autoinmune y/o cáncer renal.

43. El compuesto de la reivindicación 30, en el que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio reproductivo, en el que la enfermedad o trastorno inflamatorio reproductivo es pérdida fetal recurrente, quiste ovárico o enfermedad o trastorno asociado a la menstruación.

44. El compuesto de la reivindicación 30, en el que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio sistémico, en el que la enfermedad o trastorno inflamatorio sistémico se selecciona del grupo consistente en lupus sistémico eritematoso, esclerosis sistémica, choque séptico, síndrome del choque tóxico y caquexia.

45. El compuesto de la reivindicación 30, en el que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno infeccioso, en el que la enfermedad o trastorno infeccioso se selecciona del grupo consistente en una enfermedad o trastorno infeccioso crónico, una enfermedad o trastorno infeccioso subagudo, una enfermedad o trastorno infeccioso agudo, una enfermedad o trastorno vírico, una enfermedad o trastorno bacteriano, una enfermedad o trastorno protozoario, una enfermedad o trastorno parasitario, una enfermedad o trastorno fúngico, una enfermedad o trastorno por micoplasma, gangrena, sepsis, una enfermedad o trastorno priónico, gripe, tuberculosis, malaria, síndrome de inmunodeficiencia adquirida y síndrome respiratorio agudo grave.

46. El compuesto de la reivindicación 30, en el que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio relacionado con transplantes, en el que la enfermedad o trastorno inflamatorio relacionado con transplantes se selecciona del grupo consistente en rechazo de injerto, rechazo de injerto crónico, rechazo de injerto subagudo, rechazo de injerto agudo, rechazo de injerto hiperagudo y enfermedad o trastorno del injerto contra el hospedador.

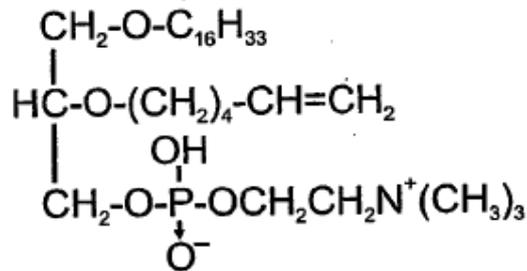
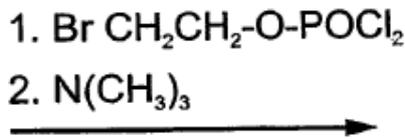
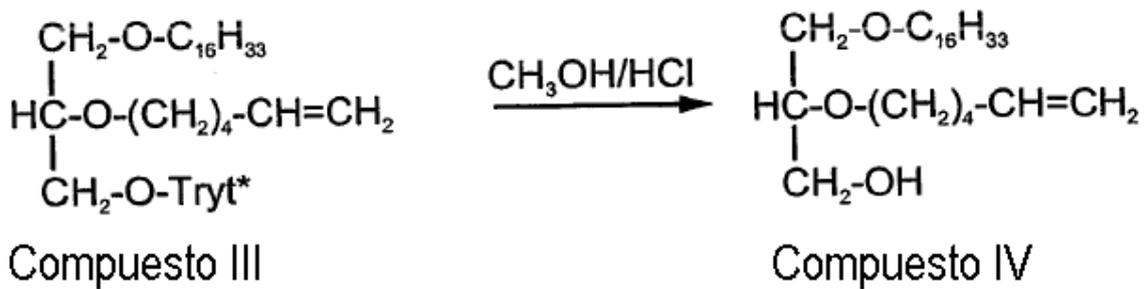
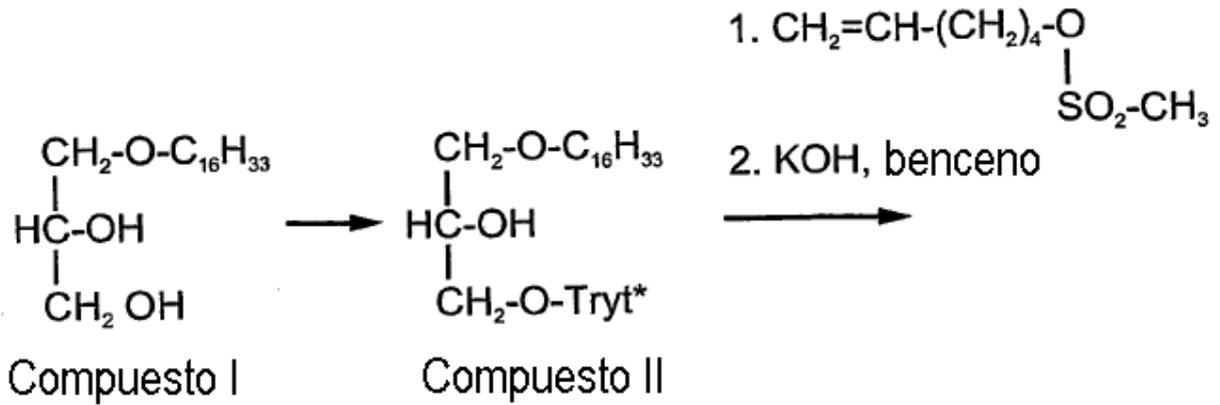
47. El compuesto de la reivindicación 30, en el que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio relacionado con implantes, en el que el implante se selecciona del grupo consistente en implante protésico, implante de mama, implante de silicona, implante dental, implante de pene, implante cardiaco, articulación artificial, dispositivo de reparación de fractura ósea, implante de reemplazo óseo, implante de suministro de fármaco, catéter, marcapasos, corazón artificial, válvula cardiaca artificial, implante de liberación de fármaco y tubo respirador.

48. El compuesto de la reivindicación 30, en el que la inflamación está asociada a un tumor inflamatorio, en el que el tumor inflamatorio se selecciona del grupo consistente en tumor maligno, tumor benigno, tumor sólido, tumor metastásico y tumor no sólido.

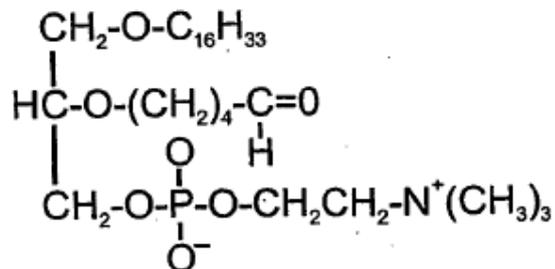
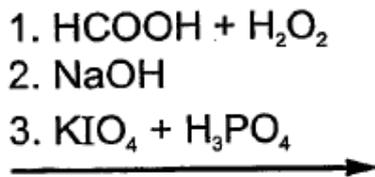
49. El compuesto de la reivindicación 30, en el que la inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno inflamatorio pulmonar, en el que la enfermedad o trastorno inflamatorio pulmonar se selecciona del grupo consistente en asma, asma alérgica, enfisema, enfermedad o trastorno pulmonar obstructivo crónico, sarcoidosis y bronquitis.

50. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y al menos un compuesto adicional capaz de tratar o prevenir una inflamación asociada a un lípido oxidado, para uso en el tratamiento o la prevención de una inflamación asociada a un lípido oxidado, en el que dicha inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo consistente en psoriasis, artritis reumatoide, síndrome inflamatorio intestinal, esclerosis múltiple y aterosclerosis, o dicha inflamación está asociada a una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo consistente en una enfermedad o trastorno inflamatorio idiopático, una enfermedad o trastorno inflamatorio crónico, una enfermedad o trastorno inflamatorio agudo, una enfermedad o trastorno autoinmune, una enfermedad o trastorno infeccioso, una enfermedad o trastorno inflamatorio maligno, una enfermedad o trastorno inflamatorio relacionado con transplantes, una enfermedad o trastorno inflamatorio degenerativo, una enfermedad o trastorno asociado a hipersensibilidad, una enfermedad o trastorno inflamatorio cardiovascular, una enfermedad o trastorno inflamatorio cerebrovascular, una enfermedad o trastorno vascular periférico, una enfermedad o trastorno inflamatorio glandular, una enfermedad o trastorno inflamatorio gastrointestinal, una enfermedad o trastorno inflamatorio cutáneo, una enfermedad o trastorno inflamatorio hepático, una enfermedad o trastorno inflamatorio neurológico, una enfermedad o trastorno inflamatorio musculoesquelético, una enfermedad o trastorno inflamatorio renal, una enfermedad o trastorno inflamatorio reproductivo, una enfermedad o trastorno inflamatorio sistémico, una enfermedad o trastorno inflamatorio del tejido conectivo, un tumor inflamatorio, necrosis, una enfermedad o trastorno inflamatorio relacionado con implantes, un proceso inflamatorio de envejecimiento, una enfermedad o trastorno por inmunodeficiencia, una enfermedad o trastorno proliferativo y una enfermedad o trastorno inflamatorio pulmonar.

51. Los compuestos de la reivindicación 50, en los que dicho al menos un compuesto adicional se selecciona del grupo consistente en un inhibidor de HMGCoA reductasa (una estatina), un coadyuvante mucoso, un corticosteroide, un fármaco antiinflamatorio esteroideo, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, un analgésico, un factor de crecimiento, una toxina, una HSP, una  $\beta$ 2-glucoproteína I, un inhibidor de proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP), un agonista de receptor activado por proliferador de peroxisoma (PPAR), un fármaco antiaterosclerótico, un agente antiproliferativo, ezetimida, ácido nicotínico, un inhibidor de escualeno y una ApoE Milano.



Compuesto V



Compuesto VI  
ALLE

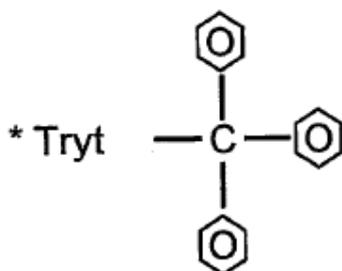


Fig. 1

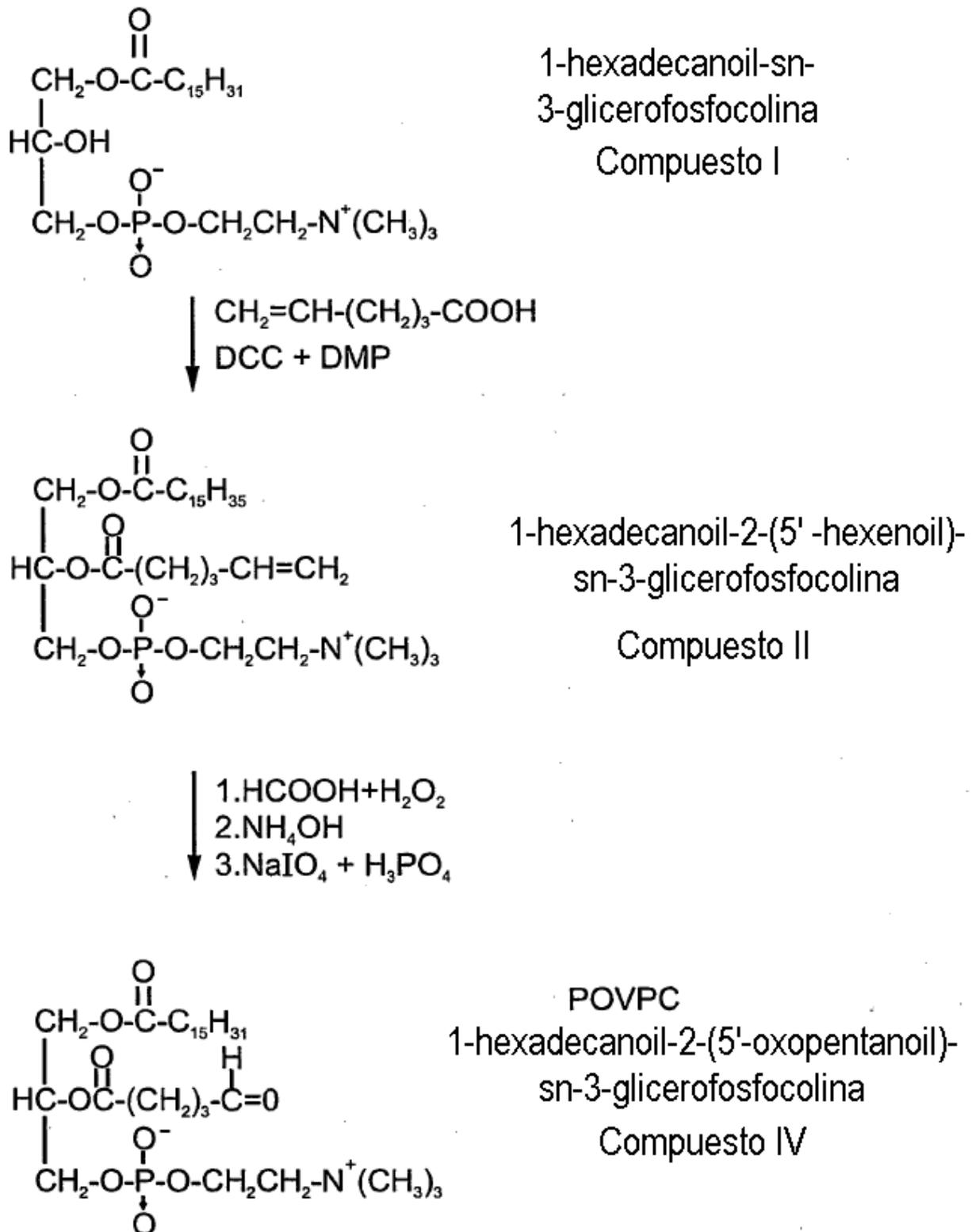


Fig. 2

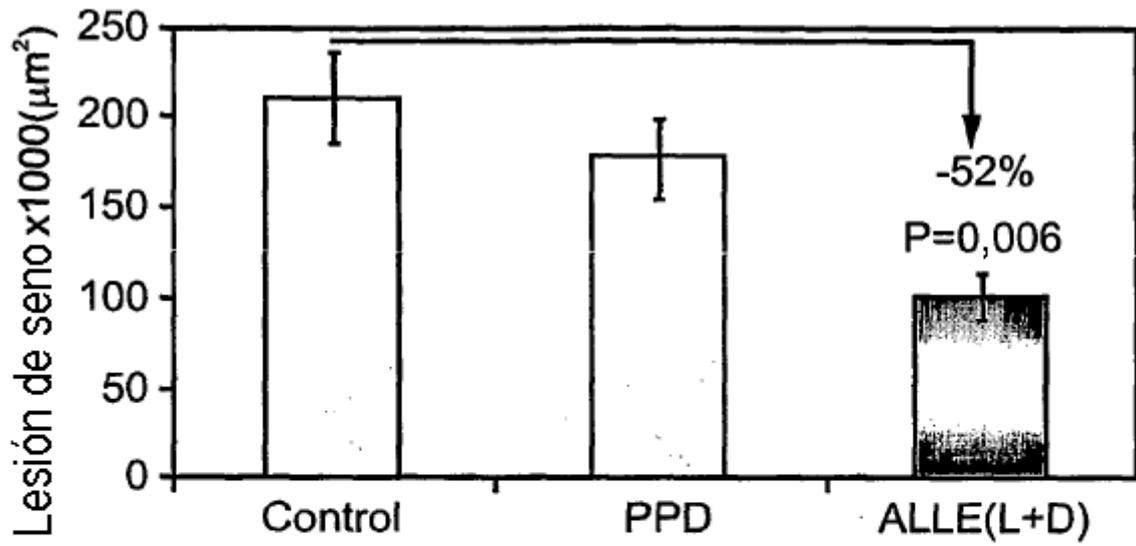


Fig. 3

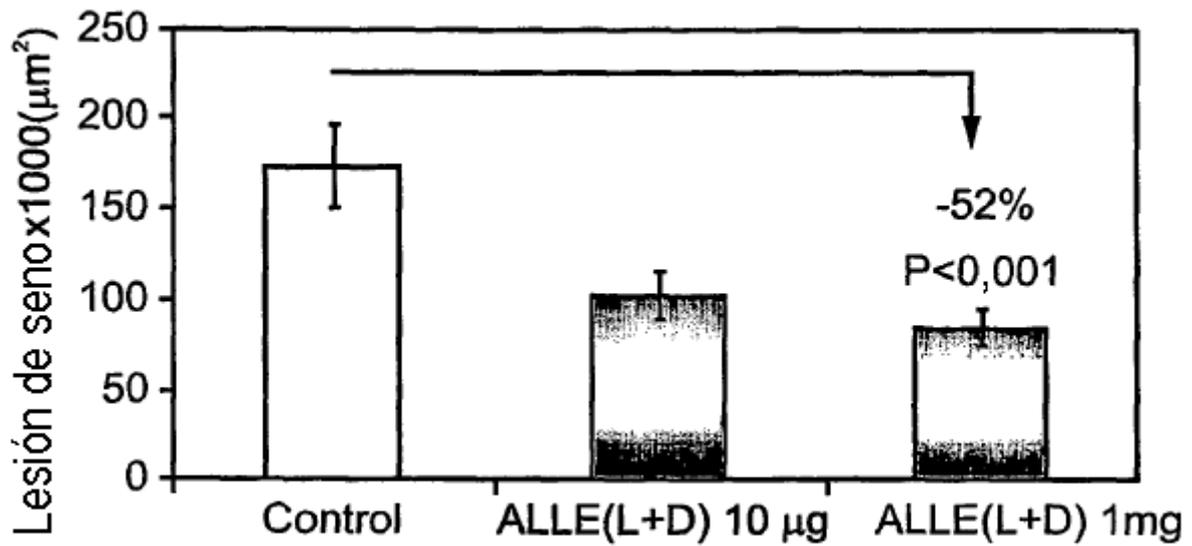


Fig. 4

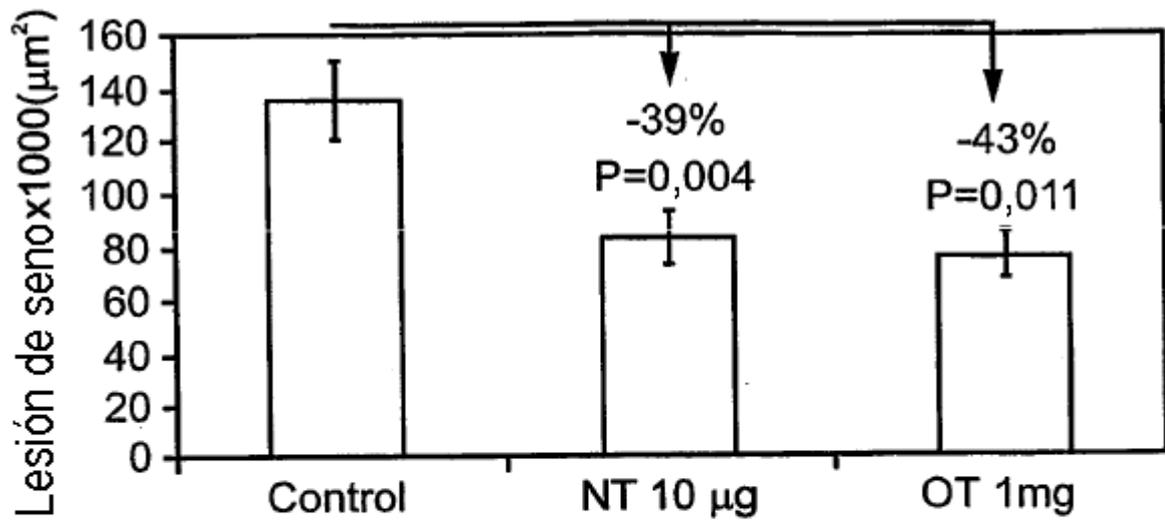


Fig. 5

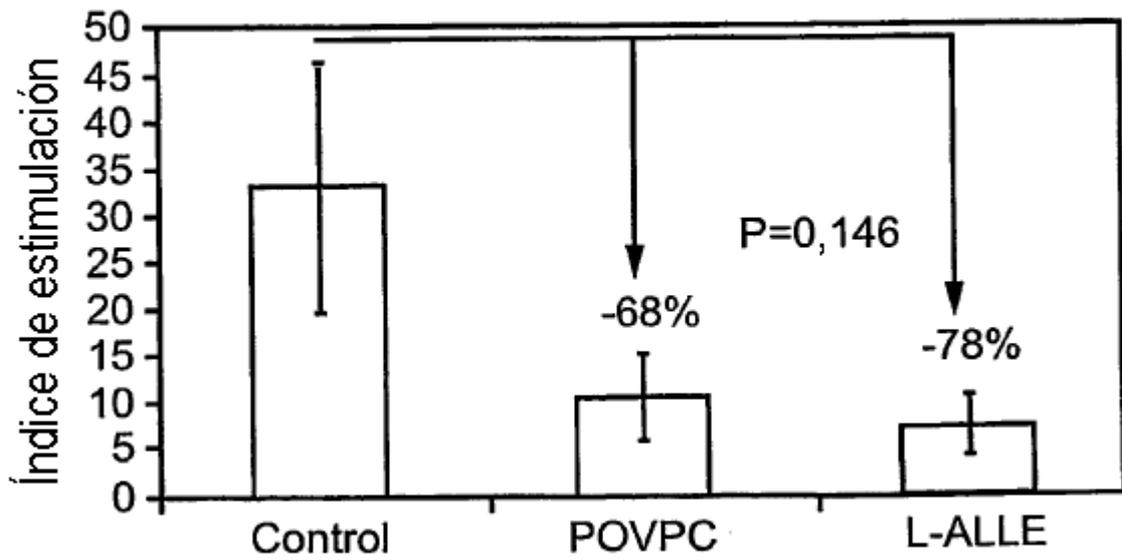


Fig. 6

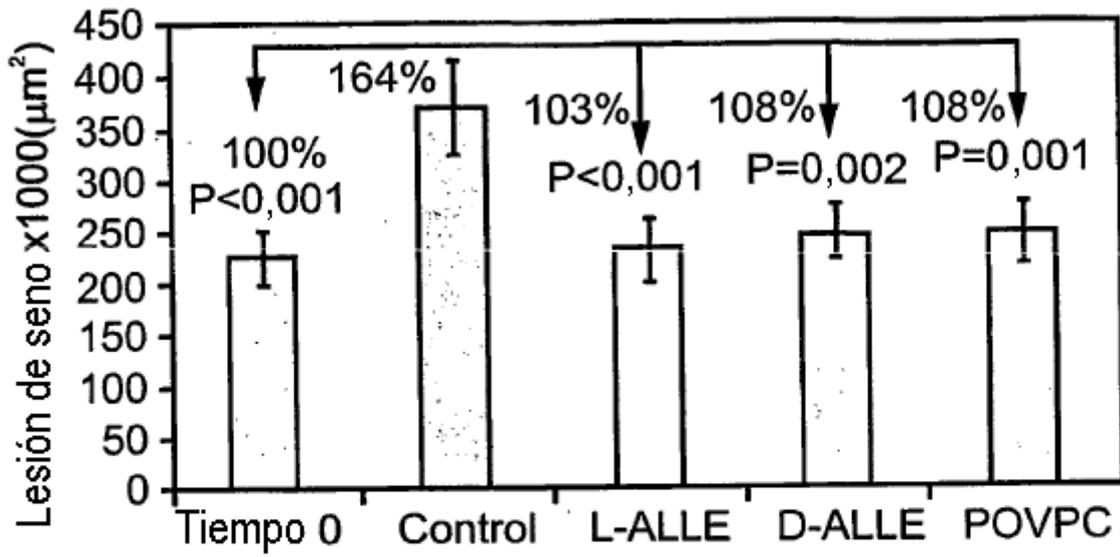


Fig. 7

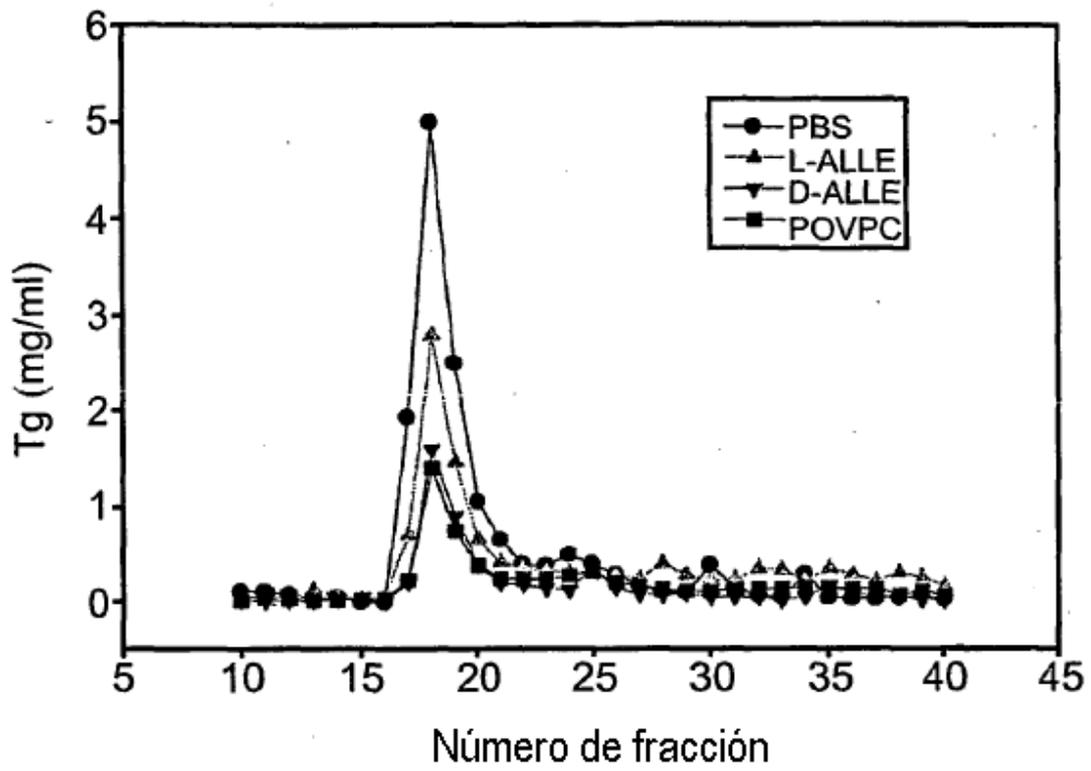


Fig. 8

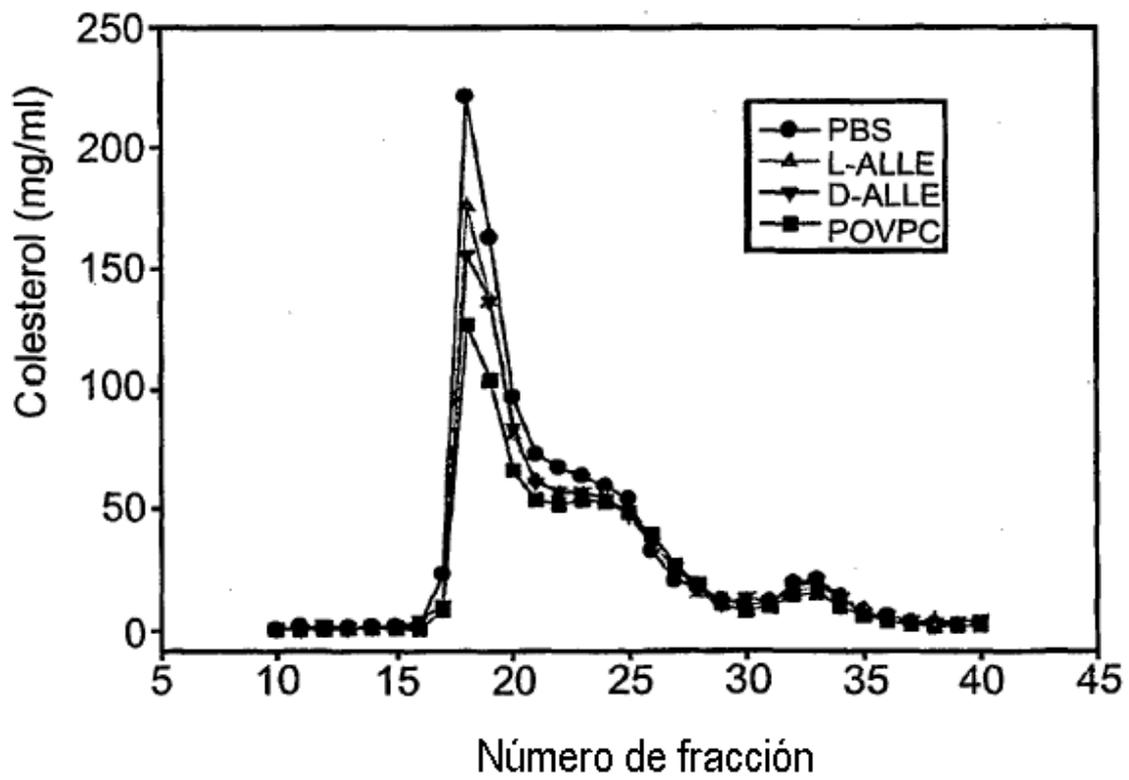
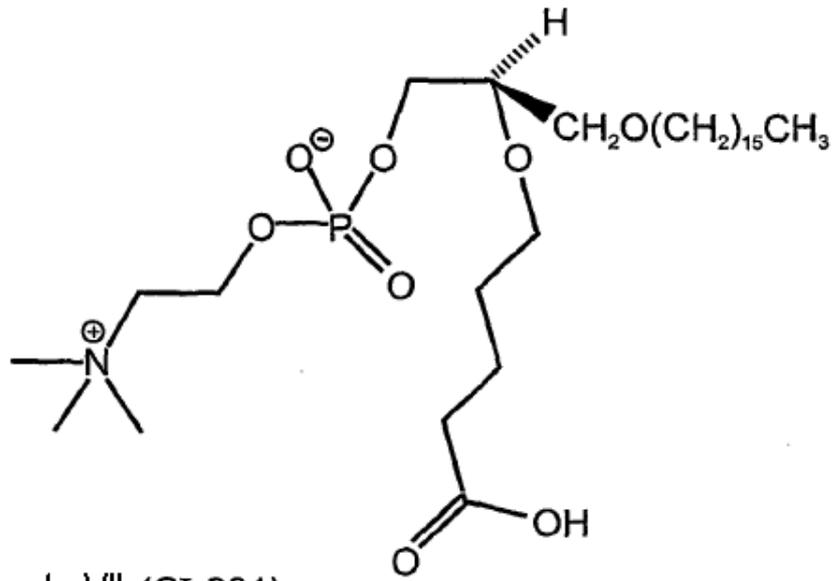
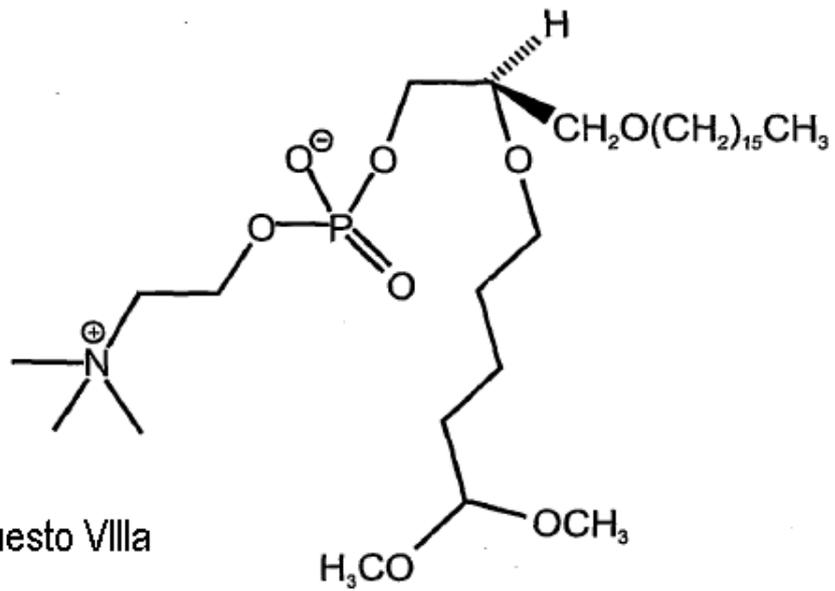


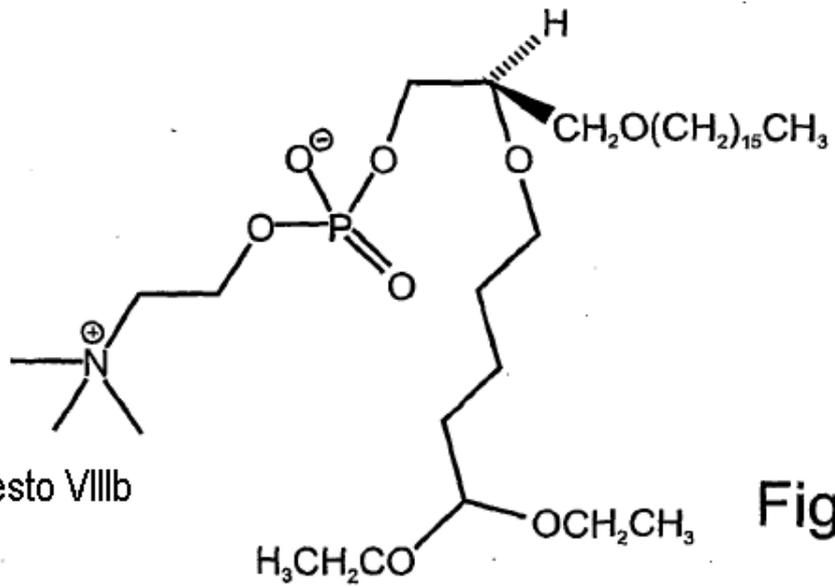
Fig. 9



Compuesto VII (CI-201)



Compuesto VIIIa



Compuesto VIIIb

Fig. 10

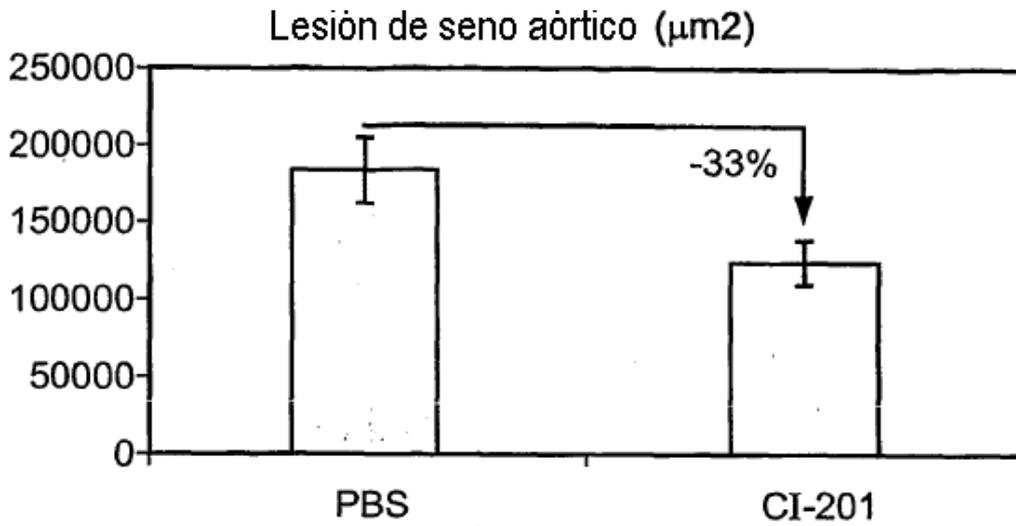


Fig. 11

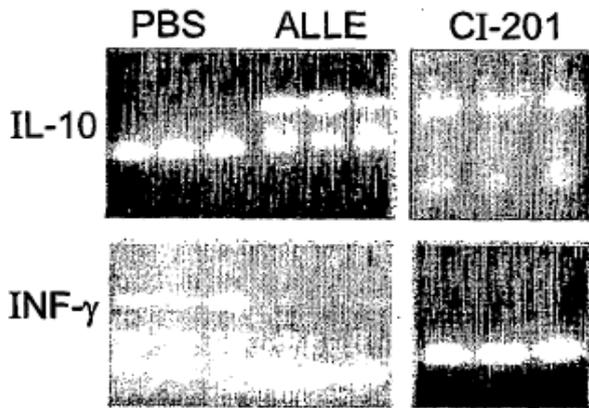


Fig. 12a

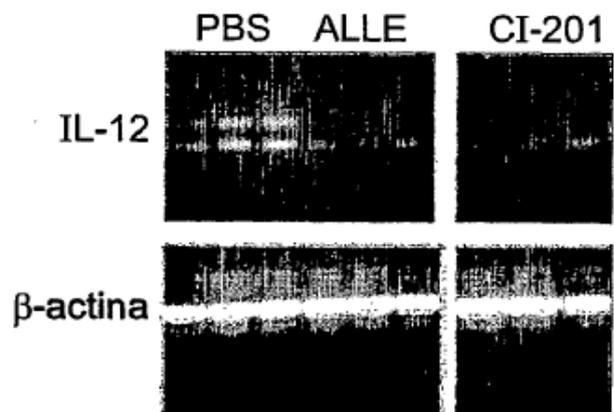


Fig. 12c

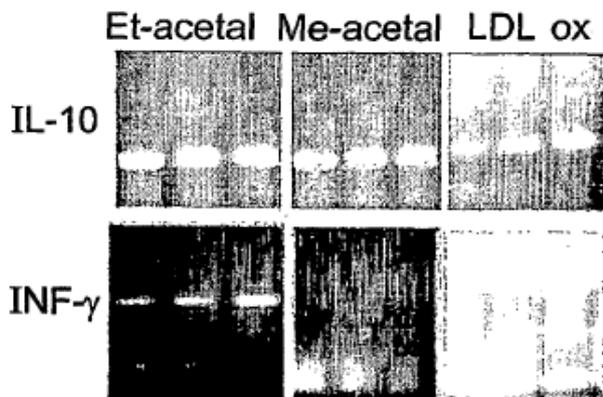


Fig. 12b

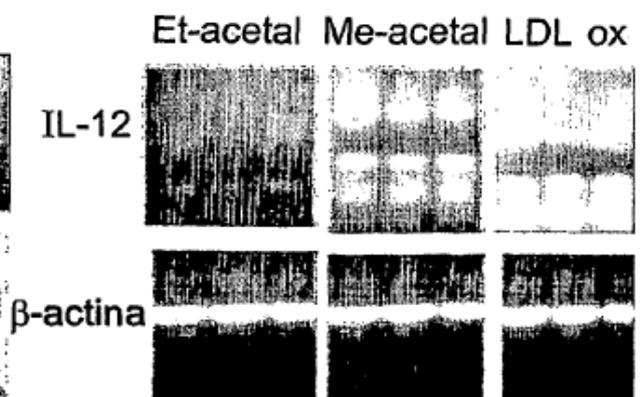


Fig. 12d

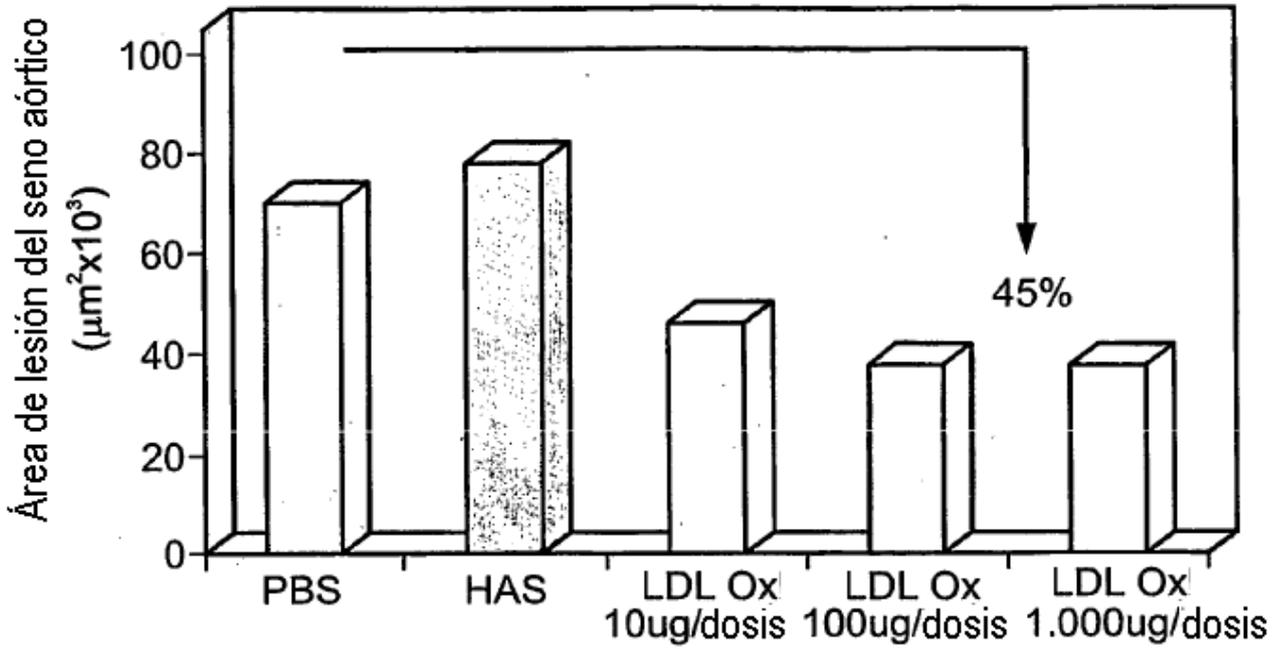


Fig. 13

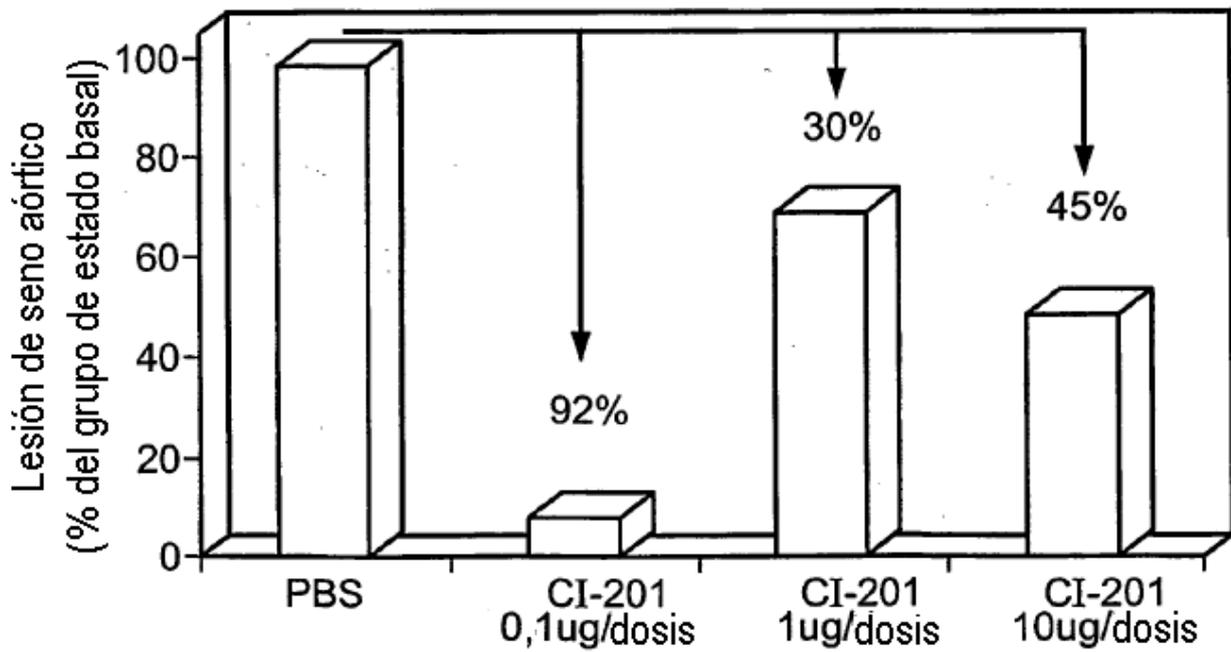


Fig. 14a

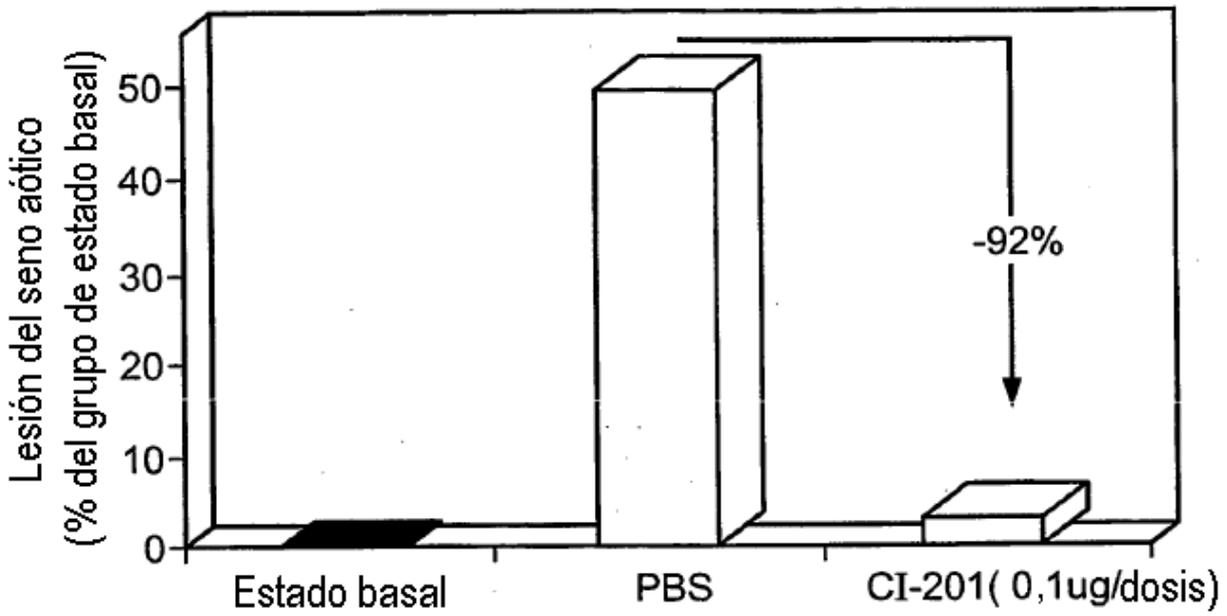


Fig. 14b

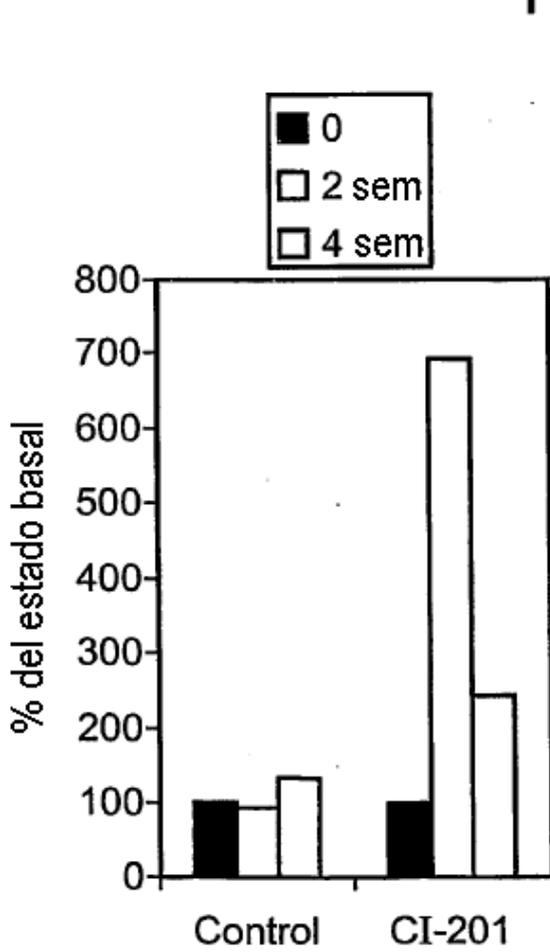


Fig. 15a

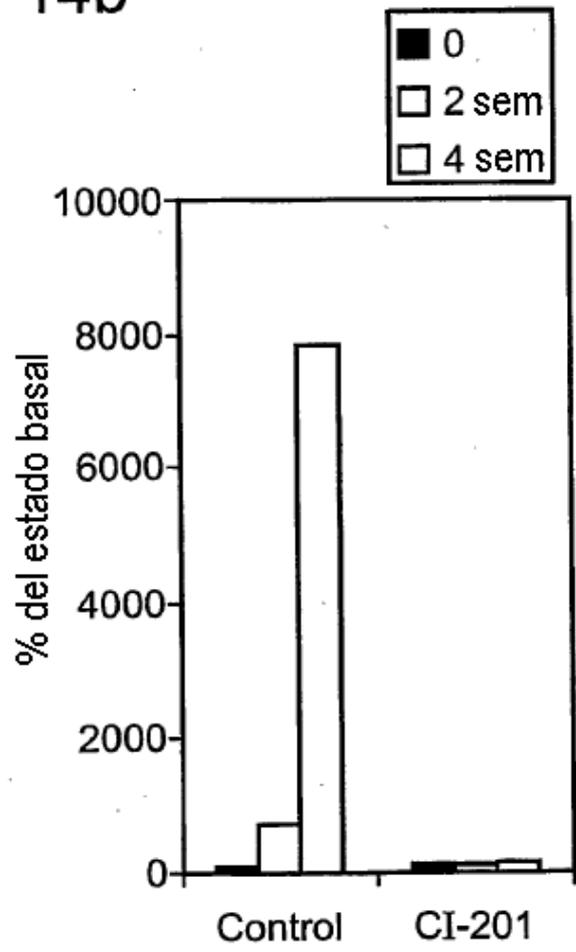


Fig. 15b

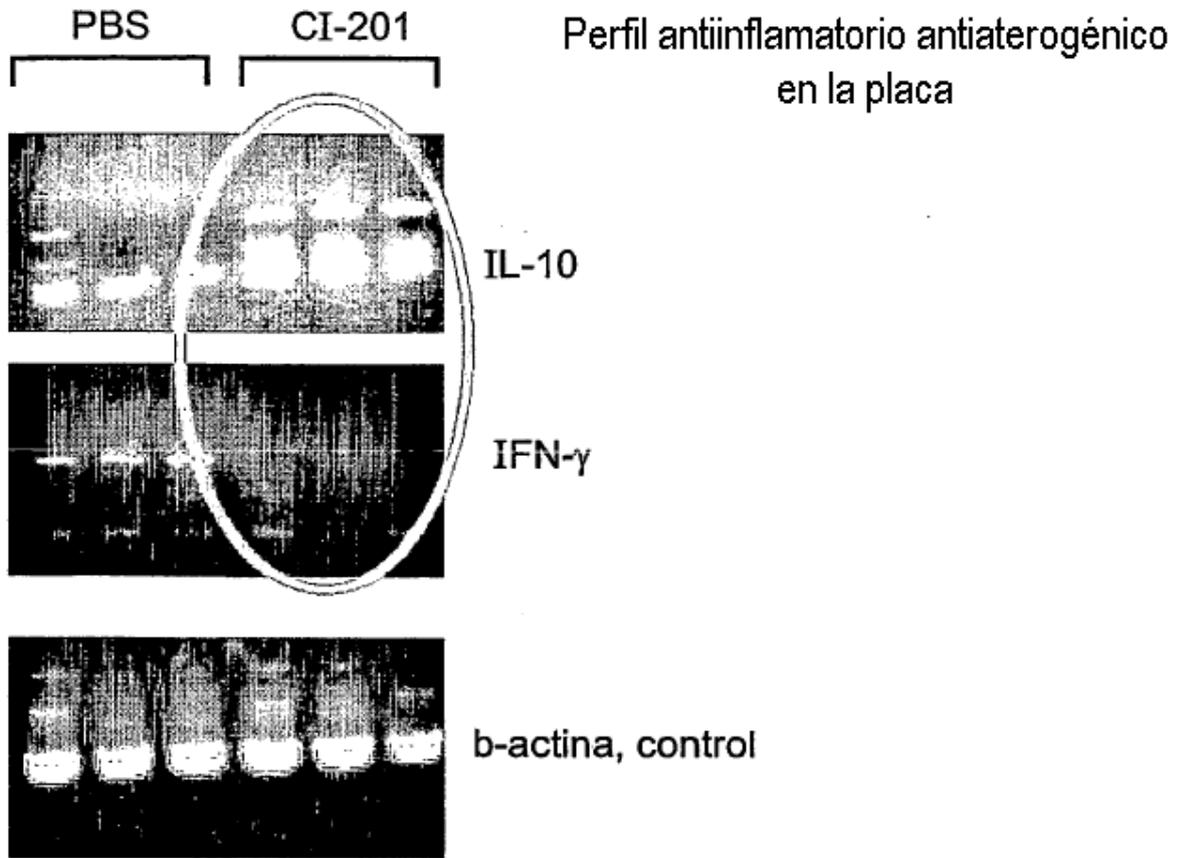


Fig. 16a

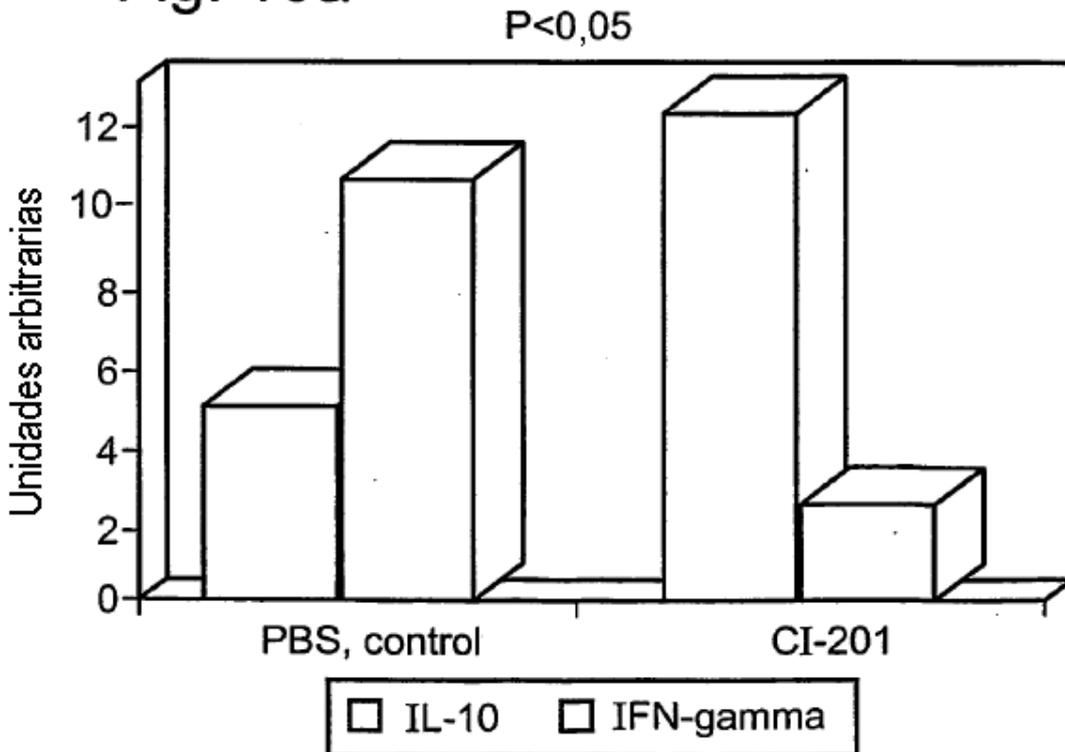


Fig. 16b

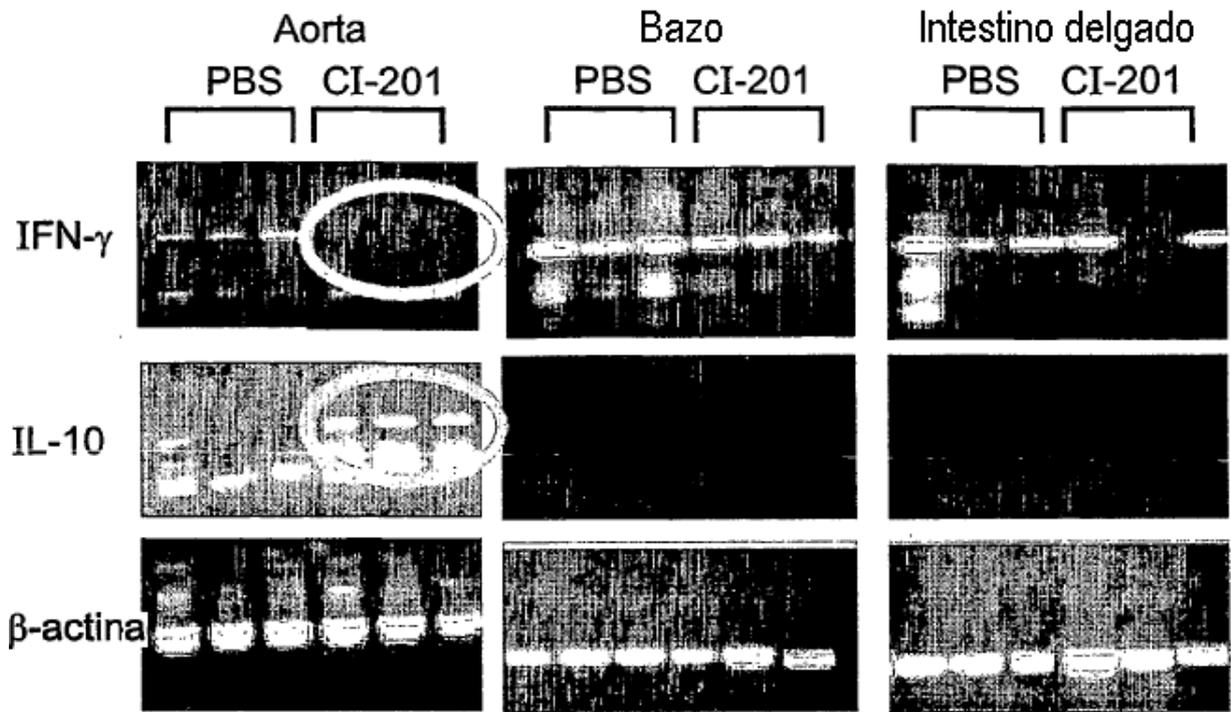


Fig. 17

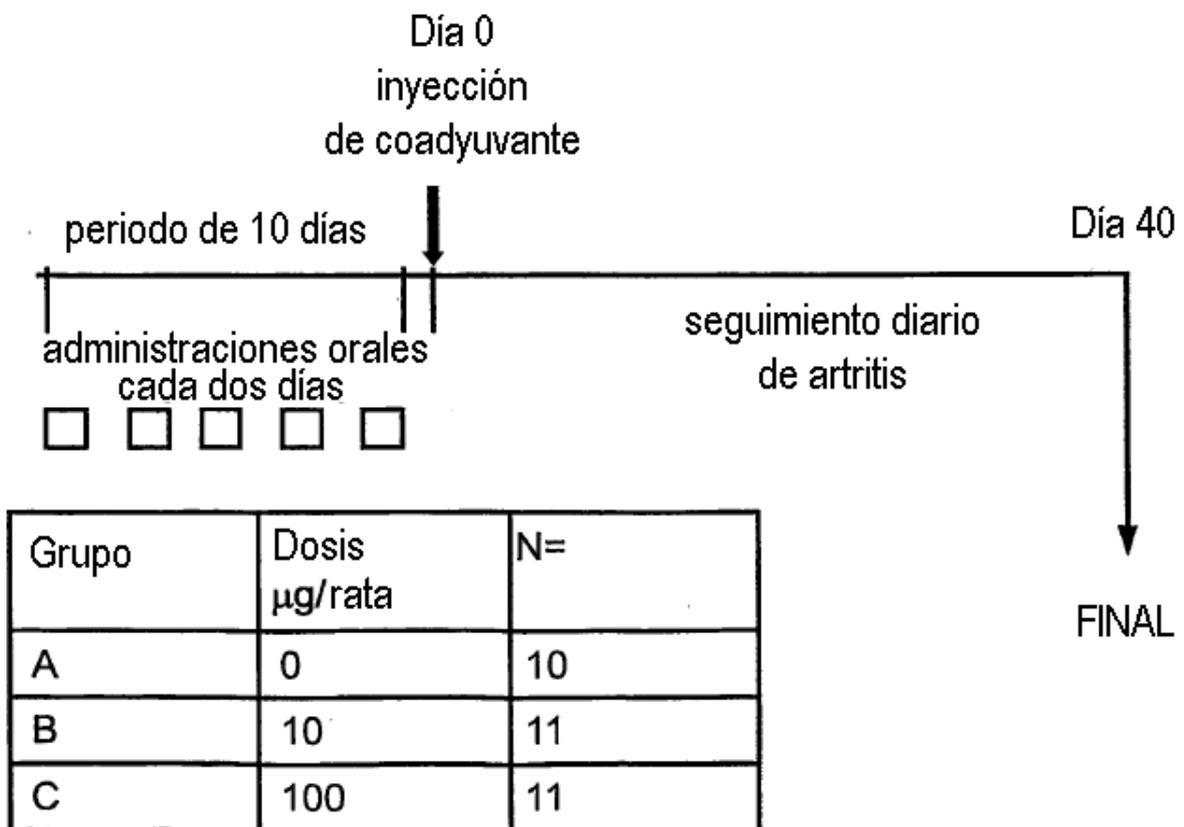


Fig. 18

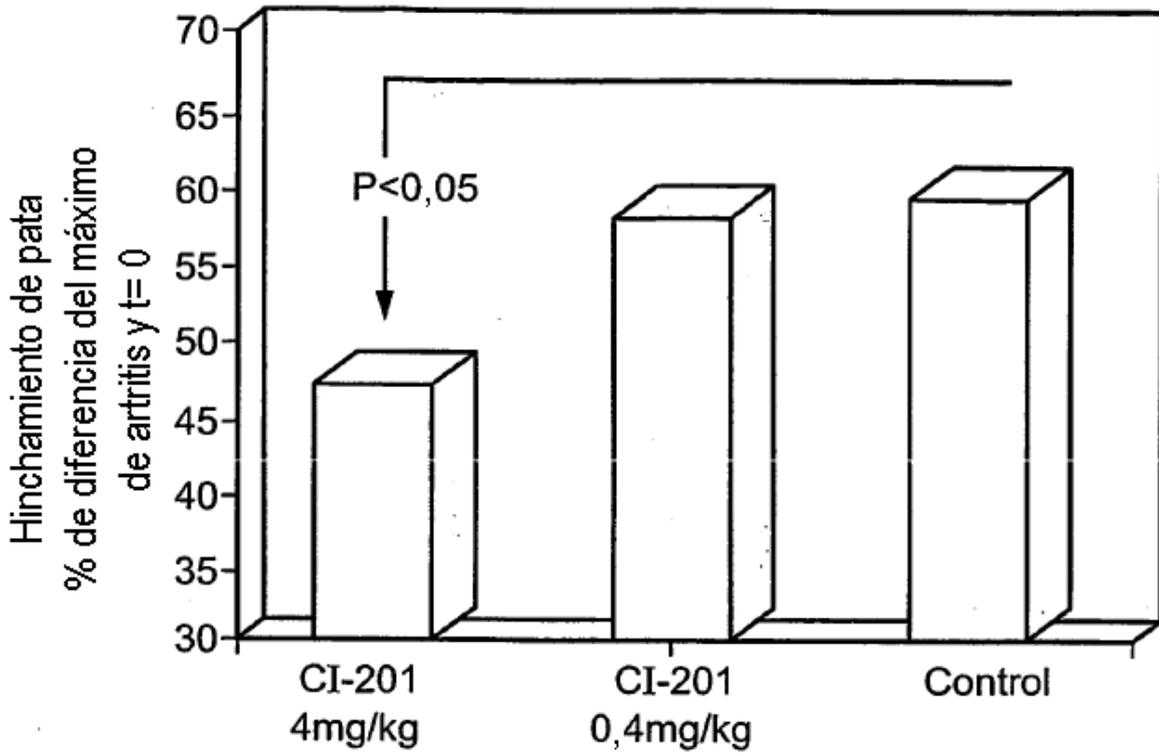


Fig. 19

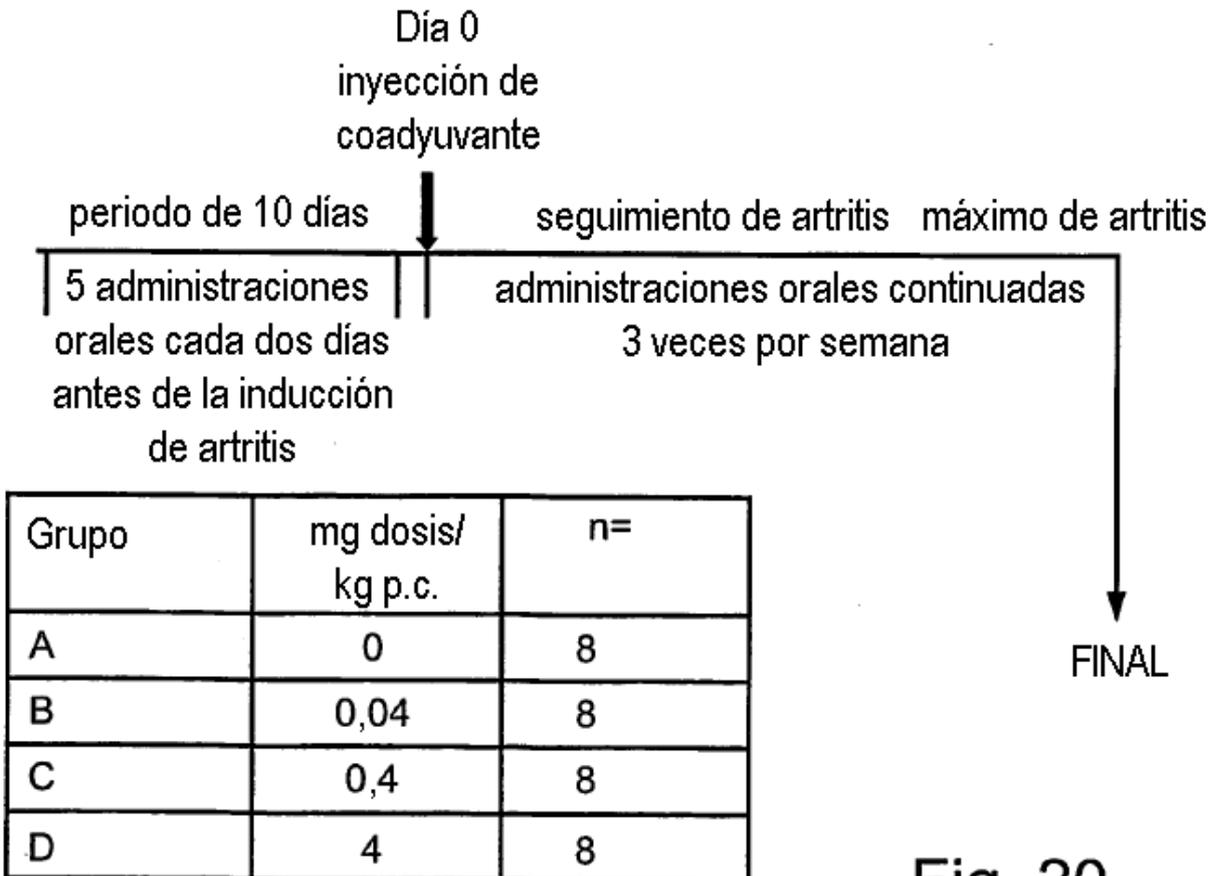


Fig. 20

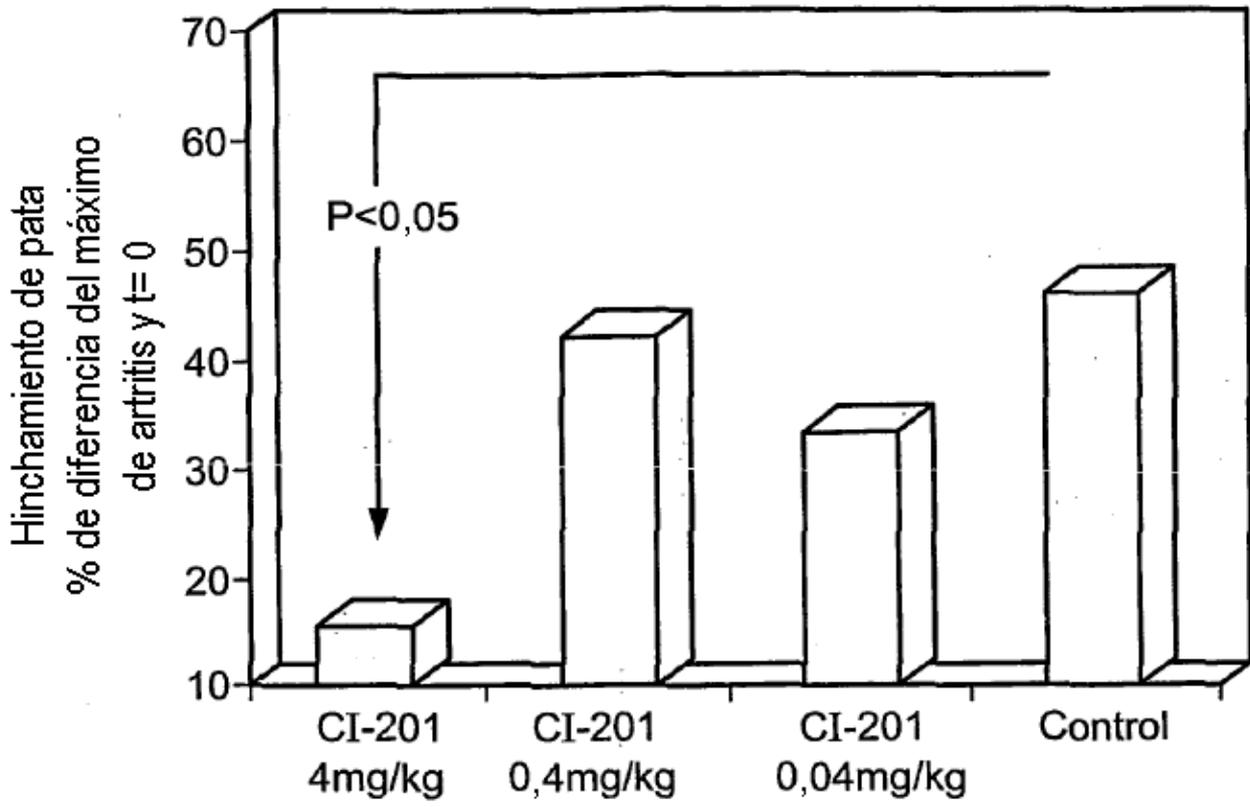
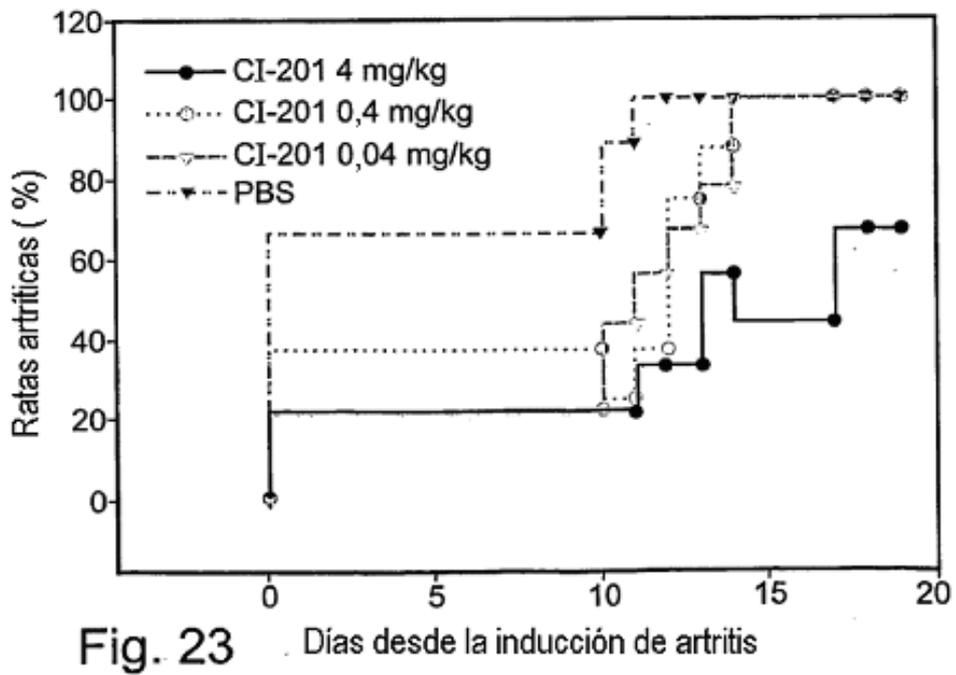
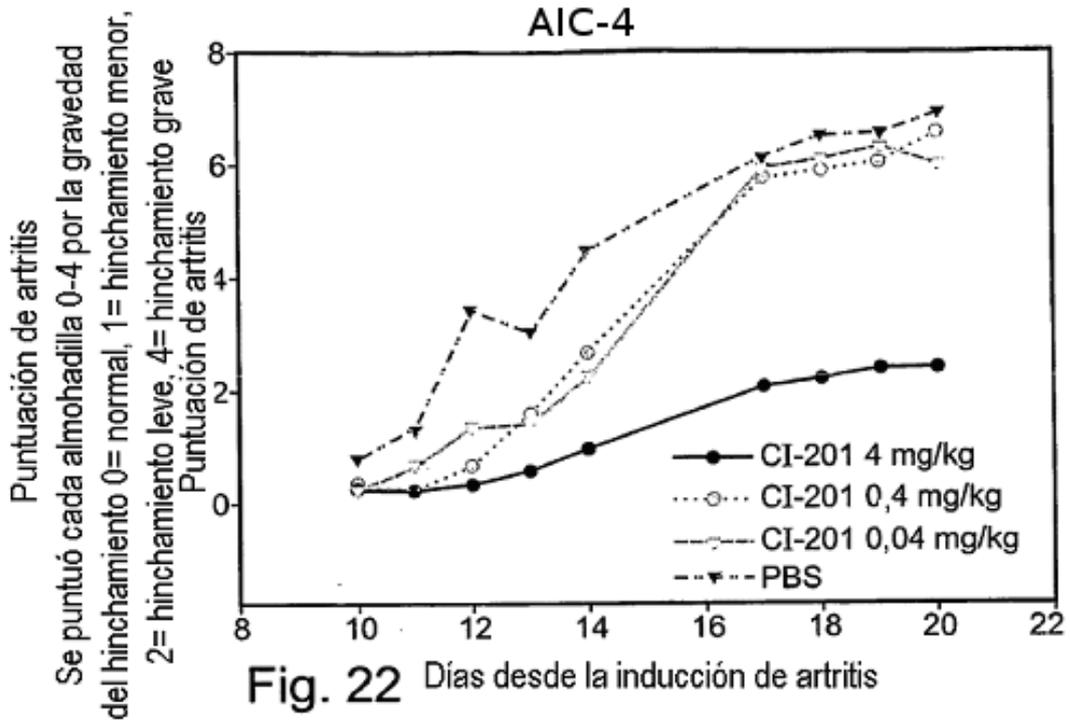


Fig. 21



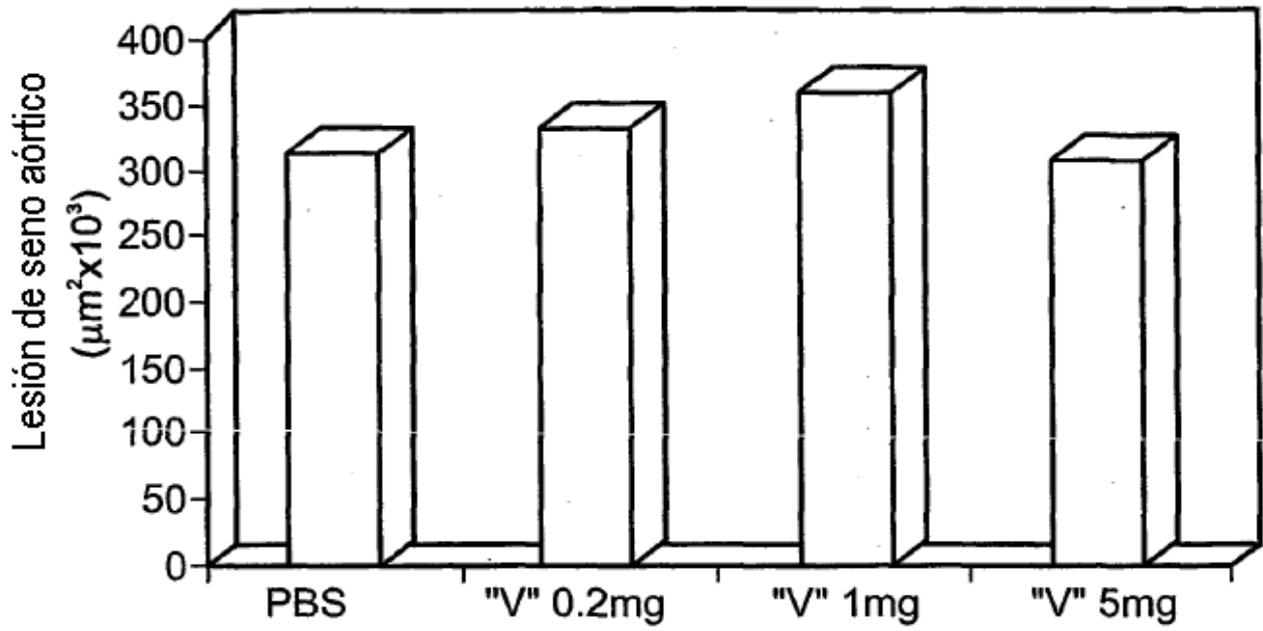


Fig. 24

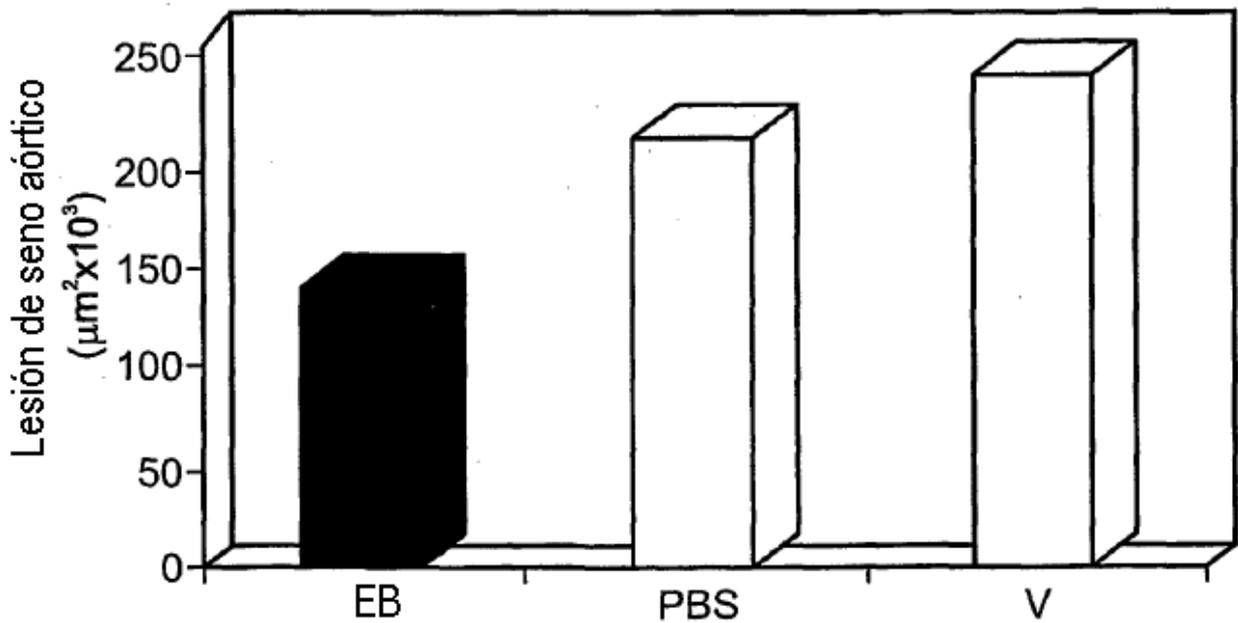


Fig. 25