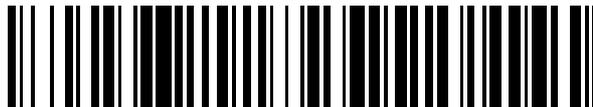


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 450**

51 Int. Cl.:

C07F 9/02 (2006.01)

A61K 31/66 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2005 E 05758938 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 1773352**

54 Título: **Proceso mejorado para la preparación de fosfolípidos oxidados**

30 Prioridad:

09.07.2004 US 586219 P

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

23.01.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HALPERIN, GIDEON y
KOVALEVSKI-ISHAI, ETI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 439 450 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

Proceso mejorado para la preparación de fosfolípidos oxidados

Campo y antecedentes de la invención

La presente invención se refiere al campo de la química sintética, y más particularmente, a nuevos procedimientos sintéticos útiles para la preparación de fosfolípidos oxidados como se define en la presente memoria.

En la técnica de la farmacología, los fosfolípidos modificados son conocidos en muchas aplicaciones. En la patente de EE.UU. No. 5.985.292 se describen composiciones para aplicación transdérmica y transmembrana que incorporan compuestos activos solubles en lípido que llevan fosfolípidos. En las patentes de EE.UU. Nos. 6.261.597, 6.017.513 y 4.614.796 se describen derivados de fosfolípido incorporados en liposomas y biovectores para suministro de fármaco. En las patentes de EE.UU. No. 5.660.855 se describen construcciones de lípido de colesterol derivatizado con aminomanosa apropiadas para marcar células o tejido de músculo liso, formuladas en liposomas. Estas formulaciones tienen como objetivo reducir la restenosis en arterias, usando procedimientos de PTCA.

El uso de liposomas para tratar la aterosclerosis ha sido descrito adicionalmente en la solicitud de patente PCT publicada como WO 95/23592. En ella se describen composiciones farmacéuticas de liposomas unilamelares que pueden contener fosfolípidos. Los liposomas descritos en el documento WO/23592 tienen como objetivo optimizar el eflujo de colesterol de la placa aterosclerótica y son típicamente fosfolípidos no oxidados.

Se sabe que los derivados de fosfolípido modificado que simulan las estructuras del factor de activación de plaquetas (PAF) son farmacéuticamente activos, afectando a tales funciones como permeabilidad vascular, presión sanguínea e inhibición de la función cardíaca. En la patente de EE.UU. No. 4.778.912 se sugiere que un grupo de tales derivados tiene actividad anticáncer.

En la patente de EE.UU. No. 4.329.302 se describen compuestos sintéticos de 1-O-alkil-éter- o 1-O-acilo grasofosfoglicéridos que son derivados de lisolecitina usables para mediar en la activación de plaquetas. En la patente de EE.UU. No. 4.329.302 se describe que la acilación de la cadena pequeña de lisolecitina dio lugar a compuestos con comportamiento de activación de plaquetas al contrario que la acilación de la cadena larga, y que los derivados de O-alkil-éter son biológicamente superiores a los correspondientes derivados de O-acilo graso en simular el PAF.

El efecto estructural de varios fosfolípidos sobre su actividad biológica ha sido investigado por Tokumura et al. (Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, July 1981, vol. 219. No.1) y en la patente de EE.UU. No. 4.827.011, con respecto a la hipertensión.

En la patente suiza CH 642.665 se describen derivados de éter modificado con fosfolípido que pueden tener algún efecto fisiológico.

Davies et al. (J. Biol. Chem. 2001, 276:16015) enseñan el uso de fosfolípidos oxidados como agonistas de receptor activado por proliferador de peroxisoma.

En la patente de EE.UU. No. 6.838.452 y en el documento WO 04/106486 (que se incorporan como referencia como si se describieran en la presente memoria completamente), por el presente cesionario, se describe la preparación de bien definidos fosfolípidos oxidados, así como, otro componente de LDL (lipoproteína de baja densidad) oxidada sintética. Se dice que los compuestos descritos son muy efectivos para tratar la aterosclerosis y enfermedades relacionadas, así como enfermedades autoinmunes y trastornos inflamatorios. Se dice adicionalmente que el fosfolípido oxidado regula la respuesta inmune a LDL oxidada. Se dice adicionalmente que generalmente, los fosfolípidos oxidados esterificados son superiores a los fosfolípidos oxidados esterificados comparables como agentes terapéuticos.

La oxidación de fosfolípidos ocurre *in vivo* por medio de la acción de radicales libres y reacciones enzimáticas abundantes en la placa ateromatosa. La preparación *in vitro* de fosfolípidos oxidados usualmente implica la oxidación química simple de una LDL nativa o componente fosfolípido de LDL. Los investigadores que estudian el papel de la LDL oxidada han 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 de fosfolípido oxidado o suavemente oxidado similares a las asociadas a componentes de la placa. Se ha mostrado que moléculas similarmente preparadas son idénticas a los auto-antígenos asociados a aterogénesis (Watson A.D. et al., J. Biol. Chem. 1997; 272:13597-607) y capaces de inducir tolerancia inmune 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. Similarmente, en la patente de EE.UU. No. 5.561.052, se describe un método para producir lípidos oxidados y fosfolípidos usando sulfato de cobre y superóxidodismutasa para producir ácido araquidónico o linoléico oxidados y LDL oxidada para uso en diagnóstico.

Las técnicas de oxidación descritas anteriormente para preparar fosfolípidos oxidados implican reacciones que no son específicas y dan una mezcla de productos oxidados. La no especificidad de las reacciones reduce el

rendimiento, requiere una etapa de separación adicional y plantea la preocupación por los efectos secundarios no deseados cuando los productos se integran en composiciones farmacéuticas.

La 1-palmitoil-2-(5-oxovaleroil)-*sn*-glicero-3-fosfolina (POVPC) y sus derivados tales como 1-palmitoil-2-glutaroil-*sn*-glicero-3-fosfolina (PGPC) son ejemplos representativos de fosfolípidos esterificados suavemente oxidados que se han estudiado con respecto a la aterogénesis (véase, por ejemplo, Boulier et al., J. Biol. Chem. 2000, 275:9163; Subbanagounder et al., Circulation Research, 1999, págs. 311). El efecto de diferentes análogos estructurales que pertenecen a esta clase de fosfolípidos oxidados ha sido estudiado también (véase, por ejemplo, Subbanagounder et al., Atheroscler. Thromb. Nasc. Biol. 2000, págs. 2248; Leitinger et al., Proc. Nat. Ac. Sci. 1999, 96:12010).

La POVPC se prepara típicamente proporcionando una fosfatidilcolina que lleva un ácido graso insaturado y oxidando el enlace insaturado del ácido graso, por ejemplo, por ozonólisis (escisión oxidativa) o usando un peryodato como agente oxidante. Tal ruta sintética típicamente implica una síntesis multietapa y requiere la separación de la mayoría de los intermedios formados por medio de cromatografía en columna.

Como se describe en la patente de EE.UU. No. 6.838.452 citada anteriormente, los fosfolípidos oxidados esterificados se han preparado similarmente oxidando un enlace insaturado de un ácido graso unido a una estructura de fosfolípido. Más particularmente, los fosfolípidos oxidados esterificados se prepararon, según las enseñanzas de esta patente, introduciendo un ácido graso corto insaturado en un glicerolípido, introduciendo un resto fosfato en el intermedio obtenido y oxidando el enlace insaturado en la cadena de ácido graso por medio de (i) peróxido de hidrógeno y ácido fórmico, para obtener un diol, seguido de peryodato de potasio, para obtener un aldehído; o (ii) ozonólisis. Aunque, la escisión oxidativa del enlace insaturado da como resultado un resto aldehído, se obtuvieron otros restos oxidados (por ejemplo, ácido carboxílico, acetal, etc.) oxidando adicionalmente el resto aldehído. Tal ruta sintética multietapa está caracterizado a veces por relativamente bajos rendimientos generales y de nuevo, requiere la separación de la mayor parte de los intermedios formados por medio de cromatografía en columna.

Se ha encontrado que las aplicaciones in vivo que emplean fosfolípidos oxidados esterificados preparados como anteriormente tienen la desventaja de la susceptibilidad al reconocimiento, unión y metabolismo del componente activo en el cuerpo, haciendo la dosificación y la estabilidad después de la administración un factor importante. Los fosfolípidos oxidados esterificados, tales como aquellos descritos en la patente de EE.UU. No. 6.838.452 y en el documento WO 04/106486, exhiben más alta bioestabilidad y alta actividad terapéutica.

De este modo, los métodos conocidos actualmente para preparar fosfolípidos oxidados esterificados, así como esterificados implican procedimientos complejos multietapa apropiados para la preparación en el laboratorio, que sin embargo vuelven la preparación a escala industrial ineficiente y compleja. En particular, estos procedimientos multietapa requieren técnicas de separación inaplicables industrialmente tales como la cromatografía en columna durante varias etapas del procedimiento sintético.

En vista de la actividad terapéutica beneficiosa de los fosfolípidos oxidados en general y de los fosfolípidos oxidados esterificados en particular, se reconoce generalmente la necesidad, y sería muy ventajoso tener un procedimiento mejorado para la preparación de fosfolípidos oxidados esterificados desprovisto de por lo menos algunas de las desventajas de los procedimientos conocidos en la técnica.

Sumario de la invención

Según un aspecto de la presente invención se proporciona un método para preparar un compuesto que tiene una estructura glicerólica y por lo menos un residuo que contiene un resto oxidado unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter como se define en las reivindicaciones anexas, que comprende: proporcionar un primer compuesto que tiene una estructura glicerólica y por lo menos un grupo hidroxilo libre; proporcionar un segundo compuesto que tiene por lo menos un enlace insaturado y por lo menos un grupo reactivo capaz de formar un enlace éter con el grupo hidroxilo libre; hacer reaccionar el primer compuesto y el segundo compuesto para obtener por ello un tercer compuesto, teniendo el tercer compuesto una estructura glicerólica y un residuo que contiene un enlace insaturado que está unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter; aislar el tercer compuesto, para obtener por ello un tercer compuesto purificado, hacer reaccionar el tercer compuesto purificado con un agente oxidante, para obtener por ello un cuarto compuesto, teniendo el cuarto compuesto una estructura glicerólica y un residuo que contiene un resto oxidado unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter; y aislar el cuarto compuesto para obtener por ello un cuarto compuesto purificado, obteniendo por ello el compuesto que tiene una estructura glicerólica y por lo menos un residuo que contiene un resto oxidado unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter, estando el método desprovisto de cromatografía en columna.

Según características adicionales en las realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, la reacción del primer compuesto y el segundo compuesto se lleva a cabo en presencia de una base.

Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas la base se selecciona del grupo que consiste en hidróxido de sodio, hidróxido de litio, hidróxido de calcio, hidróxido de bario e hidróxido de potasio.

Según otras características adicionales en las realizaciones descritas preferidas el grupo reactivo es un haluro.

- 5 Aislar el tercer compuesto comprende: recoger el tercer compuesto; proporcionar una disolución del tercer compuesto en un disolvente seleccionado de tal modo que el tercer compuesto es soluble en él por lo que las impurezas formadas durante la reacción son insolubles en él, para proporcionar por ello una mezcla que incluye la disolución del tercer compuesto en el disolvente e impurezas insolubles; retirar las impurezas insolubles; y retirar el disolvente, obteniendo por ello el tercer compuesto purificado.
- Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el disolvente se selecciona del grupo que consiste en éter de petróleo, hexano y benceno.
- 10 Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en ácido fórmico, peróxido de hidrógeno, un peryodato, un perclorato, un bismutato, un permanganato, un clorito, ozono, óxido de plata, tetróxido de osmio y cualquiera de sus combinaciones.
- Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el resto oxidado se selecciona del grupo que consiste en un ácido carboxílico, un éster, un aldehído, un acetal, un cetal y un diol.
- 15 Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el resto oxidado es aldehído y hacer reaccionar el tercer compuesto purificado con el agente oxidante comprende: convertir el tercer compuesto purificado en un compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene diol unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter; y oxidar el compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene diol unido a la estructura glicerólica, para obtener por ello el cuarto compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene aldehído unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter.
- 20 Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas la conversión se efectúa haciendo reaccionar el tercer compuesto purificado con un primer agente oxidante seleccionado del grupo que consiste en un peróxido, un bismutato, un peryodato, un permanganato, y cualquiera de sus combinaciones.
- 25 Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas la oxidación se efectúa haciendo reaccionar el compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene diol unido a la estructura glicerólica con un segundo agente oxidante seleccionado del grupo que consiste en un peryodato, un bismutato, un permanganato y un clorito.
- 30 Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas aislar el cuarto compuesto comprende: recoger el cuarto compuesto; proporcionar un aducto soluble en agua del cuarto compuesto; someter el aducto soluble en agua a un sistema bifásico, para proporcionar por ello una fase acuosa que contiene el aducto y una fase orgánica que contiene impurezas insolubles en agua formadas durante la reacción con el agente oxidante; recoger la fase acuosa; descomponer el aducto; y recoger el cuarto compuesto, obteniendo por ello el cuarto compuesto purificado.
- Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas proporcionar el aducto soluble en agua comprende: hacer reaccionar el cuarto compuesto con un reactivo de Girard.
- 35 Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el resto oxidado es un ácido carboxílico y hacer reaccionar el tercer compuesto purificado con el agente oxidante comprende: convertir el tercer compuesto purificado en un compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene aldehído unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter; y oxidar el compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene aldehído unido a la estructura glicerólica, para obtener por ello un compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene ácido carboxílico unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter.
- 40 Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas convertir el tercer compuesto purificado en el compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene aldehído unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter comprende: convertir el tercer compuesto purificado en un compuesto que tiene una estructura glicerólica un residuo que contiene diol unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter; y oxidar el compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene diol unido a la estructura glicerólica, para obtener por ello el compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene aldehído unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter.
- 45 Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el método comprende adicionalmente aislar el compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene aldehído unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter, para obtener por ello un compuesto purificado que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene aldehído unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter.
- 50 Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el aislamiento comprende: recoger el compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene aldehído unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter; proporcionar un aducto soluble en agua del compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene aldehído unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter, como se describe en la presente memoria anteriormente; someter el aducto soluble en agua a un sistema bifásico, para proporcionar por ello una fase acuosa que contiene el complejo y una fase orgánica que contiene impurezas insolubles en agua formadas durante
- 55

la conversión y/o la oxidación; recoger la fase acuosa; descomponer el aducto; y recoger el compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene aldehído unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter, obteniendo por ello un compuesto purificado que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene aldehído unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter.

- 5 Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el resto oxidado es un ácido carboxílico y hacer reaccionar el tercer compuesto purificado con el agente oxidante comprende: convertir el tercer compuesto purificado en un compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene epóxido unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter; y oxidar el compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene epóxido unido a la estructura glicerólica, para obtener por ello un compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene ácido carboxílico unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter.

Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas la conversión comprende hacer reaccionar el tercer compuesto con un peróxido.

- 15 Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el primer compuesto tiene por lo menos dos grupos hidroxilo libres, comprendiendo el método adicionalmente, previamente a la reacción del primer compuesto y el segundo compuesto: proteger por lo menos uno de los por lo menos dos grupos con un grupo protector.

Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el grupo protector es tritilo.

- 20 Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el primer compuesto tiene por lo menos dos grupos hidroxilo libres, comprendiendo el método adicionalmente, previamente a la reacción del primer compuesto y el segundo compuesto: proteger por lo menos uno de los por lo menos dos grupos con un grupo protector, preferiblemente un grupo tritilo.

- 25 Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, cuando los métodos incluyen la formación de un compuesto que contiene epóxido, como se describe en la presente memoria anteriormente, el método comprende adicionalmente, previamente a reaccionar el tercer compuesto y el agente oxidante: reemplazar el tritilo por un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en acetato, pivaloato o benzoato.

- 30 El compuesto que tiene una estructura glicerólica y por lo menos un residuo que contiene un resto oxidado unido a la estructura glicerólica comprende un resto que contiene fósforo unido a la estructura glicerólica, y el método comprende hacer reaccionar el cuarto compuesto purificado con un resto que contiene fósforo, para obtener por ello el compuesto que tiene una estructura glicerólica y por lo menos un residuo que contiene un resto oxidado unido a la estructura glicerólica y que tiene adicionalmente un resto que contiene fósforo unido a la estructura glicerólica.

Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el por lo menos un resto que contiene fósforo es un resto fosfato que está unido a la estructura glicerólica vía un enlace fosfodiéster.

- 35 Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el por lo menos un resto que contiene fósforo se selecciona del grupo que consiste en ácido fosfórico, fosforilcolina, fosforiletanolamina, fosforilserina, fosforilcardiolipina, fosforilinositol, etilfosfocolina, fosforilmetanol, fosforiletanol, fosforilpropanol, fosforilbutanol, fosforiletanolamina-N-lactosa, fosfoetanolamina-N-[metoxi(propilenglicol)], fosfoinositol-4-fosfato, fosfoinositol-4,5-bifosfonato, pirofosfato, fosfoetanolamina-dietilentriamina-pentaacetato, dinitrofenil-fosfoetanolamina y fosfoglicerol.

El resto que contiene fósforo está unido a la posición *sn*-3 de la estructura glicerólica del compuesto.

- 40 Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas hacer reaccionar el cuarto compuesto purificado con el resto que contiene fósforo comprende: proporcionar el cuarto compuesto purificado que tiene un grupo hidroxilo libre; hacer reaccionar el cuarto compuesto purificado con un compuesto reactivo que contiene fósforo que tiene un segundo grupo reactivo y un tercer grupo reactivo, siendo el segundo grupo reactivo capaz de reaccionar con el grupo hidroxilo libre y un segundo grupo reactivo, para proporcionar por ello el cuarto grupo purificado que tiene un grupo reactivo que contiene fósforo unido a la estructura glicerólica; y convertir el grupo reactivo que contiene fósforo en el resto que contiene fósforo.

Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el compuesto reactivo que contiene fósforo es oxiclورو de fósforo (POCl_3).

- 50 Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas la reacción se lleva a cabo en presencia de una base.

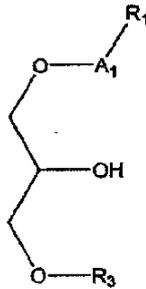
Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el resto que contiene fósforo es ácido fosfórico, y la conversión comprende hidrolizar el grupo reactivo que contiene fósforo.

Según otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el resto que contiene fósforo

comprende un grupo aminoalquilo y la conversión comprende hacer reaccionar el grupo reactivo que contiene fósforo con un derivado del grupo aminoalquilo, siendo seleccionado el derivado capaz de reaccionar con el tercer grupo reactivo.

- 5 El residuo que contiene un resto oxidado está unido a la posición *sn*-2 del compuesto y adicionalmente en la que por lo menos uno de los por lo menos un grupo hidroxilo libre de la estructura glicerólica está en la posición *sn*-2 del primer compuesto.

El primer compuesto tiene la fórmula general I:



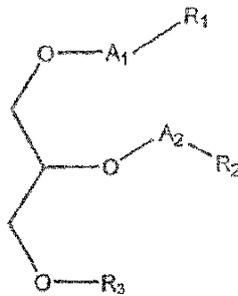
Fórmula I

- 10 en la que:

A₁ se selecciona del grupo que consiste en CH₂, CH=CH y C=O;

R₁ se selecciona del grupo que consiste en H y una cadena hidrocarbonada que tiene de 1 a 30 átomos de carbono; y R₃ es hidrógeno.

- 15 El compuesto que tiene un compuesto glicerólico y por lo menos un resto oxidado unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter tiene la fórmula general II:



Fórmula II

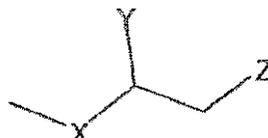
en la que:

A₁ se selecciona del grupo que consiste en CH₂, CH=CH y C=O;

- 20 A₂ es CH₂;

R₁ es un alquilo que tiene 1-30 átomos de carbono;

R₂ es

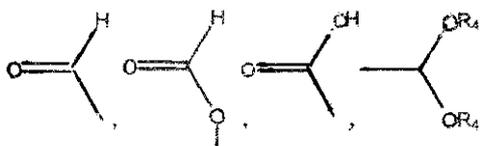


mientras que:

X es una cadena alquílica que tiene 1-24 átomos de carbono;

Y se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, alquilo, alcoxi, haluro, acetoxi y un grupo funcional aromático; y

5 Z se selecciona del grupo que consiste en:



-OH,

siendo R₄ un alquilo o arilo; y

R₃ se selecciona del grupo que consiste en ácido fosfórico, fosforilcolina, fosforiletanolamina, fosforilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcardiolipina, fosfatidilinositol, fosforilcardiolipina, fosforilinositol, etilfosfocolina, fosforilmetanol, fosforiletanol, fosforilpropanol, fosforilbutanol, fosforiletanolamina-N-lactosa, fosfoetanolamina-N-[metoxi(propilenglicol)], fosfoinositol-4-fosfato, fosfoinositol-4,5-bifosfato, pirofosfonato, fosfoetanolamina-dietilentriamina-pentaacetato, dinitrofenil-fosfoetanolamina y fosfoglicerol.

La presente invención aborda con éxito los inconvenientes de las configuraciones actualmente conocidas proporcionando nuevas rutas sintéticas que se pueden usar beneficiosamente en la preparación a mayor escala de fosfolípidos oxidados.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto medio en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales apropiados. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son solo ilustrativos y no se desea que sean limitantes.

Tal como se usa en la presente memoria el término "mezcla" describe una mezcla que incluye más de una sustancia y que puede estar en cualquier forma, por ejemplo, en forma de una disolución homogénea, una suspensión, una dispersión, una disolución bifásica y más.

Tal como se usa en esta solicitud, la forma singular "uno/una" y "el/la" incluye referencias al plural a menos que el contexto claramente diga lo contrario.

En toda esta descripción, se pueden representar varios aspectos de esta invención en un formato de intervalos. Se debe entender que esta descripción en formato de intervalos es meramente por conveniencia y brevedad y no se debe considerar como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, la descripción de un intervalo se debe considerar que tiene especialmente descritos todos los posibles subintervalos así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 se debe considerar que tiene específicamente descritos subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Esto se aplica independientemente del intervalo.

Cuandoquiera que se indique en la presente memoria un intervalo numérico, se quiere decir que incluye cualquier número citado (fraccionario o entero) dentro del intervalo indicado. Las frases "que varía/varía entre" lo primero indica número y lo segundo indica número y "que varía/varía desde" lo primero indica número "hasta" un segundo número indicado se usan en la presente memoria intercambiamente y se desea que incluyan el primer y segundo número indicado y todos los números enteros y fraccionarios entre ellos.

Tal como se usa en la presente memoria en toda su extensión, los términos "que comprende", "que incluye" y "que contiene" quieren decir que se pueden añadir otras etapas e ingredientes que no afectan al resultado final. Estos términos incluyen los términos "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

La frase "que consiste esencialmente en" quiere decir que la composición o método puede incluir ingredientes y/o etapas adicionales, pero solo si los ingredientes y/o etapas adicionales no alteran materialmente las básicas y

nuevas características de la composición o método reivindicado.

El término “método” o “procedimiento” se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para conseguir una tarea dada incluida, pero no limitada a, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos, o fácilmente desarrollados de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por practicantes de las técnicas química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

El término “fosfolípido” se usa en la presente memoria para describir colectivamente compuestos que incluyen un grupo lípido no polar y un grupo fosfato terminal muy polar. Una familia de compuestos fosfolípidos particular y la más prevalente en la naturaleza es la familia de compuestos fosfoglicéridos. El término “fosfolípido” se usa por lo tanto típicamente en la presente memoria en toda su extensión para describir fosfoglicéridos, a menos que se indique lo contrario.

El término “fosfoglicérido” se usa por lo tanto en la presente memoria para describir compuestos que tienen una estructura de glicerol, uno o más restos lípido y uno o más grupos terminales fosfato, que están unidos a la estructura glicerólica. La mayor parte de los glicerolípidos naturales incluyen dos restos lípido unidos a las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 y un resto fosfato unido a la posición *sn*-3 de la estructura de glicerol.

El término “fosfolípido oxidado” se usa por lo tanto en la presente memoria para describir un fosfolípido, así como un fosfoglicérido, que incluye uno o más restos oxidados, como se describe este término en la presente memoria a continuación. Típicamente, en los fosfolípidos oxidados, el resto oxidado está incluido dentro de un resto lípido.

El término “glicerolípido” describe un compuesto que tiene una estructura glicerólica y uno o dos restos lípido unidos a ella. Los restos lípido pueden estar unidos a la estructura de glicerol vía un enlace éster y/o éter.

Tal como se describe en la presente memoria el término “lípido” describe un residuo hidrocarbonado que tiene de 3-30 átomos de carbono. En los compuestos naturales, los lípidos en los fosfolípidos y glicerolípidos se derivan de ácidos grasos y están por lo tanto unidos a la estructura vía un enlace O-acilo (éster). Aquí, el resto lípido puede estar unido a la estructura vía un enlace éter o éster.

Tal como se usan en la presente memoria, los términos “monoesterificado” y “diesterificado” con respecto a fosfolípidos o glicerolípidos, describen fosfolípidos o glicerolípidos, oxidados o no oxidados, en los que uno o dos de los restos lípido, respectivamente, están unidos a la estructura de glicerol vía un enlace éster (por ejemplo, O-acilo graso).

Tal como se usan en la presente memoria, los términos “monoesterificado” y “diesterificado” con respecto a fosfolípidos o glicerolípidos, describen fosfolípidos o glicerolípidos, oxidados o no oxidados, en los que uno o dos de los restos lípidos, respectivamente, están unidos a la estructura de glicerol vía un enlace éter.

El término “fosfoglicerol” describe un compuesto que tiene una estructura glicerólica y un grupo fosfato unido a una de sus posiciones.

El término “fosfoglicéridos” describe un compuesto que tiene una estructura glicerólica, uno o dos restos lípido y un resto fosfato unido a ella.

El término “fosfoglicérido monoeterificado” describe un fosfoglicérido, en el que un resto lípido está unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “resto” describe una sustancia o grupo funcional que forma una parte de un compuesto. El término “residuo”, como es bien sabido en la técnica, se usa para describir una porción principal de una molécula que está unida a otra molécula.

40 Descripción de las realizaciones preferidas

La presente invención es de nuevos métodos para preparar fosfolípidos oxidados que se pueden usar eficientemente para una producción a mayor escala de tales fosfolípidos oxidados. Específicamente, la presente invención es de nuevos métodos para introducir un resto oxidado en un compuesto que tiene una estructura glicerólica y es adicionalmente de nuevos métodos para introducir un resto que contiene fósforo en tal compuesto. Los nuevos métodos descritos en la presente memoria están desprovistos de cromatografía en columna y típicamente usan reactantes comercialmente disponibles y que no dañan el medio ambiente.

Los principios de funcionamiento de los nuevos métodos sintéticos según la presente invención se entenderán mejor con referencia a las descripciones adjuntas.

Antes de explicar por lo menos una realización de la invención con detalle, se debe entender que la invención tal como se define por las reivindicaciones adjuntas no está limitada en su aplicación a los detalles descritos en la siguiente descripción o ejemplificados en los Ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ser practicada o llevada a cabo de varios modos.

Tal como se describe en la presente memoria anteriormente, se ha publicado recientemente que fosfolípidos oxidados preparados sintéticamente bien definidos pueden regular la respuesta inmune a LDL oxidada y son de este modo muy efectivos para tratar aterosclerosis y enfermedades relacionadas, así como enfermedades autoinmunes y trastornos inflamatorios. Se ha publicado adicionalmente que generalmente, los fosfolípidos oxidados esterificados son superiores como agentes terapéuticos a los fosfolípidos oxidados esterificados comparables.

Estos fosfolípidos oxidados altamente beneficiosos típicamente incluyen una estructura glicerólica, a la que están unidos un residuo lípido, un residuo fosfato y un residuo lípido que contiene un resto oxidado, como se describe con detalle, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 6.838.452 y en el documento WO 04/106486.

Como se discute adicionalmente en la presente memoria anteriormente, los métodos actualmente conocidos para preparar fosfolípidos oxidados sintéticos bien definidos implican síntesis multietapa. Aunque se encontró que estas síntesis multietapa eran relativamente eficientes, dando como resultado un rendimiento de moderado a bueno, estos métodos están limitados por la necesidad de realizar procedimientos laboriosos de aislamiento y purificación de los distintos intermedios formados en todas las síntesis. Particularmente, estos procedimientos típicamente implican técnicas tales como cromatografía en columna, que, como es ampliamente reconocido por un profesional experto, es inaplicable industrialmente, o por lo menos ineficiente con respecto al coste, complejidad y uso de cantidades excesivas de disolventes orgánicos, que pueden ser peligrosos y requieren especial cuidado en el desecho de residuos. La necesidad de usar cromatografía en columna en estos métodos se debe al hecho de que los intermedios, así como los productos finales formados durante estas síntesis multietapa, no se pueden aislar y/o purificar por técnicas más convencionales tales como extracción, cristalización y similares.

Dado que tales fosfolípidos oxidados sintéticamente preparados exhiben actividad terapéutica excepcionalmente beneficiosa, es muy deseado preparar estos compuestos con un alto nivel de pureza. Además, dado que la preparación de tales fosfolípidos oxidados implica síntesis multietapa, se requiere la purificación de los intermedios para realizar tal procedimiento con rendimientos razonables y con una mínima cantidad de subproductos.

En una búsqueda de nuevos métodos de preparar fosfolípidos oxidados que se podría utilizar eficientemente en la producción a mayor escala de estos compuestos, eludiendo la necesidad de usar técnicas laboriosas tales como cromatografía en columna, los presentes inventores han diseñado y practicado con éxito nuevas metodologías sintéticas para introducir un resto oxidado y/o un resto fosfato en compuestos que tienen una estructura glicerólica, que elude el desventajoso uso de cromatografía en columna y que dan como resultado relativamente altos rendimientos de compuestos puros. Los métodos descritos en la presente memoria adicionalmente utilizan típicamente, reactivos no peligrosos, que adicionalmente avalan su aplicabilidad industrial.

Las nuevas metodologías sintéticas descritas en la presente memoria se pueden dividir como sigue:

(i) un nuevo método para introducir un resto oxidado en un compuesto que tiene una estructura glicerólica, vía la introducción de un resto insaturado y la oxidación del resto insaturado, por lo que en dicha oxidación el compuesto que contiene el resto oxidado se aísla y purifica por medio de un aducto soluble en agua;

(ii) un nuevo método para introducir un resto oxidado en un compuesto que tiene una estructura glicerólica, vía la introducción de un resto insaturado y la oxidación del resto insaturado, por lo que dicha oxidación se efectúa vía un intermedio epóxido y en presencia de un grupo protector selectivo;

(iii) un nuevo método para introducir un resto fosfato en un glicerólípido que tiene un resto oxidado unido a él, vía la introducción de un grupo reactivo que contiene fósforo.

Debido al superior rendimiento de los fosfolípidos oxidados en los que el residuo que contiene el resto oxidado está unido a la estructura vía un enlace éter, estos métodos están todos ellos dirigidos a la unión del residuo que contiene el resto oxidado a la estructura glicerólica vía un enlace éter.

Como se demuestra en la sección de Ejemplos a continuación, usando estas metodologías, se han preparado con éxito fosfolípidos oxidados bien definidos preparados con rendimiento y pureza relativamente alta.

De este modo, según un aspecto de la presente invención se proporciona un método para preparar un compuesto que tiene una estructura glicerólica y por lo menos un residuo que contiene un resto oxidado unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter como se define en las reivindicaciones adjuntas que está desprovisto de cromatografía en columna. El método, según este aspecto de la presente invención, comprende:

proporcionar un primer compuesto que tiene una estructura glicerólica y por lo menos un grupo hidroxilo libre;

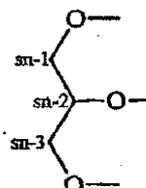
proporcionar un segundo compuesto que tiene por lo menos un enlace insaturado y por lo menos un grupo reactivo capaz de formar un enlace éter con dicho grupo hidroxilo libre;

hacer reaccionar el primer compuesto y el segundo compuesto para obtener por ello un tercer compuesto, que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene un enlace insaturado que está unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter;

aislar el tercer compuesto, para obtener por ello un tercer compuesto purificado;

hacer reaccionar el tercer compuesto purificado con un agente oxidante, para obtener por ello un cuarto compuesto, que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene un resto oxidado unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter.

- 5 Tal como se usa en la presente memoria en toda su extensión, la frase “un compuesto que tiene una estructura glicerólica”, que se denomina también en la presente memoria intercambiamente “un compuesto glicerólico”, o un “compuesto de glicerol” describe un compuesto que incluye la siguiente estructura:



- 10 Tal como se usa en la presente memoria en toda su extensión, las frases “resto oxidado” y “un residuo que contiene un resto oxidado”, que se usan en la presente memoria intercambiamente, describe un resto orgánico en el que por lo menos uno de sus átomos de carbono está substituido con un átomo de oxígeno como se define para el compuesto de fórmula (II). Los Ejemplos, sin limitación, incluyen aldehído, ácido carboxílico, éster carboxílico, diol, acetal, y cetal. Las frases “un compuesto que tiene un residuo que contiene un resto oxidado” y “un compuesto que contiene un resto oxidado” se usan también en la presente memoria intercambiamente.

- 15 El método según este aspecto de la presente invención está basado en introducir un resto insaturado en el compuesto glicerólico y someter el enlace insaturado a escisión oxidativa. Sin embargo, aunque tal ruta sintética ha sido empleada en las síntesis actualmente conocidas de fosfolípidos glicerólicos oxidados, los presentes inventores han diseñado ahora y practicado con éxito tal procedimiento en el que el compuesto glicerólico que tiene un resto oxidado unido a él se puede aislar y purificar sin usar cromatografía en columna.

- 20 La introducción del resto insaturado en el compuesto glicerólico se efectúa típicamente usando métodos conocidos en la técnica, tal como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 6.838.452.

Un primer compuesto que tiene la fórmula general (I), que tiene una estructura glicerólica y por lo menos un grupo hidroxilo libre se selecciona como material de partida.

- 25 Un compuesto que tiene un resto insaturado y un primer grupo reactivo, al que se denomina también en la presente memoria segundo compuesto se obtiene, comercialmente o usando métodos conocidos en la técnica, y se hace reaccionar con el material glicerólico de partida.

- 30 El primer grupo reactivo se selecciona capaz de reaccionar con el grupo hidroxilo libre. La reacción con el grupo hidroxilo libre para formar un enlace éter se efectúa típicamente vía un mecanismo nucleofílico y por lo tanto el primer grupo reactivo se caracteriza preferiblemente como un buen grupo saliente y puede ser, por ejemplo, haluro, sulfonato, y cualquier otro grupo saliente.

Preferiblemente, el grupo reactivo es haluro y más preferiblemente, es bromuro.

- 35 El segundo compuesto se selecciona preferiblemente tal que el resto insaturado está presente en uno de sus extremos, para facilitar la reacción de oxidación que sigue. Por “resto insaturado” se entiende en la presente memoria un resto que incluye por lo menos dos átomos de carbono que están unidos entre ellos por un enlace insaturado, por ejemplo, un doble enlace o un triple enlace, preferiblemente en doble enlace.

Adicional y preferiblemente, el segundo compuesto comprende de 4 a 30 átomos de carbono, más preferiblemente de 4 a 27 átomos de carbono, más preferiblemente de 4 a 16 átomos de carbono, más preferiblemente de 4 a 10 átomos de carbono, más preferiblemente de 4 a 8 átomos de carbono, y lo más preferiblemente el segundo compuesto comprende 6 átomos de carbono.

- 40 Hacer reaccionar el primer compuesto y el segundo compuesto descrito en la presente memoria se efectúa típicamente en presencia de una base. Las bases apropiadas para uso en este contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, bases inorgánicas tales como hidróxido de sodio, hidróxido de litio, hidróxido de calcio, hidróxido de bario e hidróxido de potasio.

- 45 Hacer reaccionar el primer compuesto y el segundo compuesto se efectúa típicamente en presencia de un disolvente. Los disolventes apropiados para uso en este contexto de la presente invención incluye, sin limitación, disolventes no polares tales como éter de petróleo, hexano, benceno y tolueno.

En los casos en los que se desea realizar la reacción selectivamente, a saber, introduciendo el resto insaturado en una cierta posición de la estructura glicerólica, cualquier otro grupo hidroxilo libre distinto del hidroxilo reaccionante, si está presente, se debe proteger previamente a la reacción.

5 De este modo, en tales casos, el método según este aspecto de la presente invención opcional y preferiblemente comprende adicionalmente, previamente a la reacción, el primer compuesto y el segundo compuesto, proteger uno o más grupos hidroxilo libre adicionales que pueden estar presentes dentro del primer compuesto.

Cualquiera de los grupos protectores de hidroxilo conocidos se puede usar en este contexto de la presente invención. Según la realización preferida de este aspecto de la presente invención, el grupo protector es tritilo.

10 El tritilo es un grupo voluminoso, que típicamente sirve como grupo protector selectivo, debido a su impedimento estérico. De este modo, aunque se haga reaccionar un compuesto glicerólico que tiene más de un grupo hidroxilo libre, típicamente, el grupo tritilo se haría reaccionar con el grupo menos impedido.

15 Como se señaló en la presente memoria anteriormente y se discute adicionalmente con detalle en la patente de EE.UU. No. 6.838.452 y en el documento WO 04/106486, la posición de la estructura glicerólica a la que se une el resto oxidado afecta a la actividad del compuesto. Es por lo tanto muy beneficioso efectuar la preparación de los compuestos glicerólicos descritos en la presente memoria selectivamente, tal que el residuo que contiene el resto oxidado se uniría en la posición deseada. Como se demuestra adicionalmente en la patente de EE.UU. No. 6.838.452, los fosfolípidos oxidados que tienen un residuo que contiene un resto oxidado unido a la posición *sn*-2 de la estructura de glicerol exhiben un rendimiento superior.

20 Con ese fin, el uso del grupo tritilo como grupo protector mientras se introduce el anteriormente descrito segundo compuesto en la estructura glicerólica es muy beneficioso, dado que debido a su voluminosidad, se efectuaría la protección de los grupos hidroxilo terminales, en las posiciones *sn*-1 y/o *sn*-3, dejando el grupo hidroxilo en la *sn*-2 disponible para sustituciones adicionales. Una vez que la reacción entre el primer compuesto y el segundo compuesto es completa, se obtiene una mezcla de reacción que contiene un compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene un resto insaturado unido a ella vía un enlace éter. Tal compuesto se denomina también en la presente memoria intercambiabilmente tercer compuesto.

25 Dependiendo del material de partida usado, el tercer compuesto puede incluir adicionalmente uno o más grupos protectores, que protegen grupos hidroxilo libre que pueden estar presentes dentro de la estructura glicerólica.

El tercer compuesto, protegido o sin proteger, se aísla a continuación de la mezcla de reacción y se trata para obtener un compuesto purificado.

30 El aislamiento del tercer compuesto se efectúa recogiendo primero el tercer compuesto formado. La recogida del tercer compuesto se efectúa típicamente usando técnicas convencionales tales como extracción, retirada del disolvente, filtración y similares, incluyendo cualquiera de sus combinaciones. Una vez recogido, el producto en bruto se disuelve en un disolvente, por lo que se selecciona el disolvente tal que el tercer compuesto sea soluble en él por lo que las impurezas formadas durante la reacción entre el primer y segundo compuesto son insolubles en él.

35 El término "impurezas" se usa en la presente memoria para describir cualquier sustancia que está presente en el producto en bruto final y no es el producto mismo e incluyen, por ejemplo, materiales de partida sin reaccionar y subproductos.

40 Usando tal disolvente, se obtiene una mezcla que incluye una disolución del tercer compuesto en tal disolvente y sustancias insolubles. Los disolventes apropiados para uso en este contexto de la presente invención se seleccionan de éter de petróleo, hexano, benceno, heptano y tolueno. Preferiblemente, el disolvente es éter de petróleo.

Las impurezas insolubles se retiran a continuación de la mezcla, preferiblemente por filtración, se retira el disolvente y se obtiene un tercer compuesto purificado evitando la necesidad de usar cromatografía de columna en su procedimiento de purificación.

45 El tercer compuesto purificado se hace reaccionar a continuación con un agente oxidante, para oxidar el resto insaturado y obtener por ello un cuarto compuesto, en el que un residuo que contiene un resto oxidado está unido a la estructura glicerólica vía un enlace éter.

50 El agente oxidante se selecciona dependiendo del resto oxidado deseado, como se detalla en la presente memoria a continuación, y puede ser, por ejemplo, un peróxido, un peryodato, un bismutato, un permanganato, un clorito, ozono, óxido de plata, tetróxido de osmio y cualquiera de sus combinaciones.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "periyodato" describe un compuesto que tiene la fórmula XIO_4 , en la que X puede ser hidrógeno (para ácido peryódico) o un catión monovalente de un metal (por ejemplo, sodio, potasio).

El término “bismutato” describe un compuesto que tiene la fórmula $XBiO_3$, en la que X puede ser hidrógeno o un catión monovalente de un metal (por ejemplo, sodio, potasio)

El término “permanganato” describe un compuesto que tiene la fórmula $XMnO_4$, en la que X puede ser hidrógeno o un catión monovalente de un metal (por ejemplo, sodio, potasio)

5 El término “clorito” describe un compuesto que tiene la fórmula $XClO_2$, en la que X puede ser hidrógeno o un catión monovalente de un metal (por ejemplo, sodio, potasio). Tal como se usa en la presente memoria, el término “peróxido” incluye un compuesto que tiene la fórmula $R-O-O-H$, en la que R puede ser hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, oxialquilo, oxicicloalquilo y oxiarilo, como estos términos son definidos en la presente memoria.

10 Tal como se usa en la presente memoria en toda su extensión, el término “alquilo” se refiere a un hidrocarburo alifático saturado que incluye grupos de cadena lineal y de cadena ramificada. Preferiblemente, el grupo alquilo tiene de 1 a 20 átomos de carbono.

15 Un grupo “cicloalquilo” se refiere a un anillo todo de carbonos monocíclico o condensado (es decir, anillos que comparten un par de átomos de carbono adyacentes), grupo en el que uno o más de los anillos no tiene un sistema de electrones pi completamente conjugados. Los ejemplos, sin limitación, de grupos cicloalquilo son ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclopenteno, ciclohexano, ciclohexadieno, cicloheptano, cicloheptatrieno, y adamantano.

Un grupo “arilo” se refiere a un anillo monocíclico o policíclico condensado todo de carbonos (es decir, anillos que comparten pares de átomos de carbono adyacentes) que tienen un sistema de electrones pi completamente conjugados. Los ejemplos, sin limitación, de grupos arilo son fenilo, naftalenilo y antraceno.

20 Los términos “oxialquilo” “oxicicloalquilo” y “oxiarilo” describen un grupo $R'-C(=O)-$, por lo que R' es alquilo, cicloalquilo o arilo, respectivamente, tal que el peróxido es un ácido peroxicarboxílico.

25 Preferiblemente, el peróxido es peróxido de hidrógeno o un ácido peroxicarboxílico. De este modo, en una realización de este aspecto de la presente invención, el resto oxidado es aldehído y la reacción del tercer compuesto con un agente oxidante se efectúa convirtiendo primero el resto insaturado en el tercer compuesto en un resto diol, preferiblemente por medio de un agente oxidante, que se denomina en la presente memoria primer agente oxidante; y a continuación oxidando adicionalmente el resto diol, por medio de un segundo agente oxidante, al resto aldehído.

El primer y segundo agente oxidante puede ser el mismo o diferente y puede ser, por ejemplo, un peróxido, un peryodato, un bismutato, un permanganato, un clorito, ozono y cualquiera de sus combinaciones.

30 En los casos en los que el primer y el segundo agente oxidante son el mismo, y dependiendo del agente oxidante usado, convertir el resto insaturado en un resto diol y oxidar el resto diol se puede efectuar simultáneamente. Tales agentes oxidantes que se pueden usar en este caso incluyen agentes oxidantes que son capaces de inducir una escisión oxidativa de un resto insaturado tal como, por ejemplo, ozono, tetróxido de osmio, y permanganato de potasio.

35 En los casos en los que el primer y el segundo agente oxidante son diferentes, preferiblemente el primer agente oxidante es un peróxido, tal como peróxido de hidrógeno y el segundo agente oxidante es, por ejemplo, un peryodato o un bismutato.

Las condiciones de reacción en las que se efectúan los procedimientos de conversión y oxidación se determinan según el agente oxidante usado.

40 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el primer y el segundo agente oxidante son diferentes y la conversión del resto insaturado en un resto diol y la oxidación del resto diol se efectúan secuencialmente. Adicionalmente según una realización preferida de este aspecto de la presente invención, una vez que se obtiene el diol, el grupo protector, si está presente, se retira para obtener un compuesto que tiene tres o más grupos hidroxilo libre (en la presente memoria, un triol). Tal compuesto se puede purificar fácilmente previamente a su oxidación a aldehído, por medio de cristalización debido a sus singulares características químicas, como se demuestra en la sección de Ejemplos a continuación (véase, Ejemplo 1). Una vez purificado, se puede efectuar la protección selectiva del grupo hidroxilo libre en las posiciones *sn*-1 y/o *sn*-3, previamente a la siguiente etapa sintética.

45 El compuesto glicerólico que contiene aldehído formado de este modo, se aísla a continuación de la mezcla de reacción y se purifica.

En una realización preferida de este aspecto de la presente invención, el aldehído se purifica por medio de la formación de su aducto soluble en agua.

50 De este modo, una vez que la reacción con el(los) agente(s) oxidante(s) es completa, el cuarto compuesto que contiene aldehído se recoge usando técnicas convencionales como se describe en la presente memoria anteriormente y a continuación el producto en bruto se convierte en su aducto soluble en agua. Efectuando tal conversión en un sistema bifásico, se obtiene una fase acuosa que contiene el aducto soluble en agua y una fase

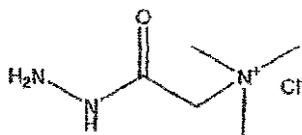
orgánica que contiene impurezas insolubles en agua. Dado que la mayor parte de los subproductos y material sin reaccionar formados durante la reacción de oxidación son sustancias orgánicas, tales sustancias se separan fácilmente del aducto soluble en agua recogiendo la fase acuosa. El compuesto que contiene aldehído se recupera a continuación descomponiendo el aducto soluble en agua.

- 5 Los aductos solubles en agua apropiados que se pueden usar en este contexto de la presente invención se obtienen preferiblemente haciendo reaccionar el compuesto que contiene aldehído con un reactivo de Girard.

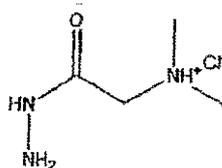
Los reactivos de Girard son una familia de sustancias que son capaces de formar aductos de hidrazona solubles en agua con compuestos que contienen carbonilo, y de este modo permitir la separación de compuestos que contienen carbonilo de otros compuestos orgánicos no carbonílicos. Los reactivos de Girard son derivados iónicos de semicarbazida.

10

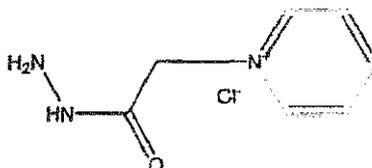
La forma T es hidrazida de cloruro de (carboximetil)trimetilamonio:



La forma D es hidrazida de cloruro de (carboximetil)dimetilamonio:



- 15 Y la forma P es hidrazida de cloruro de 1-(carboximetil)piridinio:



De este modo, convirtiendo el compuesto que contiene aldehído en su aducto soluble en agua con un reactivo de Girard, se obtiene fácil y convenientemente un cuarto compuesto purificado, evitando el uso de cromatografía en columna.

- 20 En los casos en los que el resto oxidado es un ácido carboxílico, la reacción del tercer compuesto con un agente oxidante se puede efectuar proporcionando primero un compuesto que contiene aldehído, opcional y preferiblemente como se describe en la presente memoria anteriormente; y adicionalmente opcional y preferiblemente proporcionando un compuesto que contiene aldehído purificado, usando la metodología descrita en la presente memoria anteriormente, y a continuación oxidando adicionalmente el aldehído a ácido carboxílico.

- 25 La oxidación del aldehído a ácido carboxílico se efectúa preferiblemente haciendo reaccionar el aldehído con un agente oxidante tal como clorito.

Alternativamente, el resto insaturado se puede oxidar a un ácido carboxílico vía un intermedio epóxido.

- 30 De este modo, la reacción del tercer compuesto con un agente oxidante se puede efectuar convirtiendo el resto insaturado en un epóxido, y convirtiendo el epóxido en el ácido carboxílico. Preferiblemente, la conversión del epóxido en un ácido carboxílico se efectúa convirtiendo el epóxido en diol y oxidando el diol para obtener el resto ácido carboxílico.

La conversión del tercer compuesto en un epóxido se efectúa preferiblemente haciendo reaccionar el tercer compuesto con un peróxido, como se define en la presente memoria anteriormente, y más preferiblemente con un ácido peroxicarboxílico.

La conversión del epóxido en diol se efectúa preferiblemente haciendo reaccionar el epóxido con ácido perclórico (HClO₄). Alternativamente, el epóxido se convierte en diol haciéndolo reaccionar con ácido sulfúrico.

5 El diol se convierte a continuación al ácido carboxílico haciéndolo reaccionar con un tercer agente oxidante. El tercer agente oxidante se puede seleccionar de peryodato, bismutato, permanganato, clorito y cualquiera de sus combinaciones. Preferiblemente, el diol se convierte en el ácido carboxílico haciéndolo reaccionar con un peryodato, seguido de un clorito.

El cuarto compuesto obtenido de este modo, que tiene una estructura glicerólica y un resto que contiene ácido carboxílico unido a ella vía un enlace éter, se purifica a continuación para obtener un producto purificado.

10 Los presentes inventores han encontrado ahora sorprendentemente que un cuarto compuesto obtenido vía el intermedio epóxido se puede purificar fácilmente, evitando el uso de cromatografía en columna, si su grupo hidroxilo libre se protege por medio de un grupo protector tal como acetato, pivaloato o benzoato.

15 Como se mencionó en la presente memoria anteriormente, un grupo hidroxilo libre, si está presente en la estructura de glicerol, se protege preferiblemente, por lo que un grupo protector selectivo preferible es tritilo. Sin embargo, dado que el tritilo es un resto grande, voluminoso y apolar, su presencia puede complicar, en algunos casos, los procedimientos de aislamiento y purificación de los distintos intermedios y del producto final.

20 Los presentes inventores han descubierto ahora que las limitaciones asociadas al grupo tritilo se pueden evitar fácilmente: (i) aislando un compuesto que contiene aldehído vía la formación de su aducto soluble en agua, como se describe ampliamente, en la presente memoria anteriormente; o (ii) reemplazando el grupo protector tritilo por un grupo menos voluminoso, después de la introducción del segundo compuesto. Además, como se describe en la presente memoria anteriormente, cuando la oxidación del tercer compuesto comprende la formación de un diol, una vez que se forma el diol, se puede retirar el grupo protector tritilo y el triol resultante se puede aislar por medio de cristalización.

25 De este modo, según una realización preferida de la presente invención, el procedimiento comprende adicionalmente, después de la provisión del tercer compuesto purificado y/o previamente a la reacción del tercer compuesto con un agente oxidante: reemplazar el grupo tritilo por un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en acetato, pivaloato, o benzoato.

La sustitución del grupo protector tritilo se efectúa típicamente retirando el grupo tritilo, para obtener un grupo hidroxilo libre y proteger el grupo hidroxilo con el grupo protector deseado.

30 La protección del grupo hidroxilo con un grupo acetato se efectúa fácilmente haciendo reaccionar el tercer compuesto con, por ejemplo, anhídrido acético. La protección del grupo hidroxilo con un grupo pivaloato se efectúa fácilmente haciendo reaccionar el tercer compuesto con, por ejemplo, cloruro de pivaloilo. La protección del grupo hidroxilo con un grupo benzoato se efectúa fácilmente haciendo reaccionar el tercer compuesto con, por ejemplo, cloruro de benzoilo.

35 La purificación de un cuarto compuesto, como se describe en la presente memoria, que tiene un grupo protector acetato, pivaloato o benzoato se puede llevar a cabo por técnicas de extracción convencionales, preferiblemente usando gel de sílice durante el procedimiento de extracción.

40 Como se demuestra en la sección de Ejemplos a continuación (véase, Ejemplo 2), se encontró que la preparación de un compuesto glicerólico que tiene un grupo que contiene un resto oxidado unido a él vía un enlace éter, vía la formación de un intermedio que contiene epóxido que tiene un grupo protector acetato, dio como resultado un compuesto altamente purificado y alto rendimiento de reacción.

En los casos en los que el cuarto compuesto obtenido tiene un grupo protector, como se describe en la presente memoria anteriormente, una vez que se obtiene y purifica el cuarto compuesto, se retira el grupo protector.

45 En los casos en los que el resto oxidado es un éster, el procedimiento se efectúa proporcionando un compuesto que contiene ácido carboxílico y a continuación convirtiendo el ácido carboxílico en el éster. Esto se puede efectuar fácilmente usando procedimientos bien conocidos en la técnica.

50 Como se discute en la presente memoria anteriormente, los compuestos que tienen una estructura glicerólica y por lo menos un residuo que contiene un resto oxidado, preferiblemente un resto que contiene fosfato, se conocen como fosfolípidos oxidados y son muy beneficiosos para tratar varias enfermedades. De este modo, el procedimiento descrito en la presente memoria comprende adicionalmente la introducción de tal resto que contiene fósforo en la estructura glicerólica.

Tal como se usa en la presente memoria, la frase "resto que contiene fósforo" describe un resto, como se define en la presente memoria, que incluye uno o más átomos de fósforo. Los Ejemplos representativos incluyen, sin limitación, fosfatos, fosfonatos, fosfinas, óxidos de fosfina, fosfitos, pirofosfatos y similares.

Tal como se usa en la presente memoria el término “fosfonato” describe un grupo $-P(=O)(OR')(OR'')$, en la que R' y R'' son cada uno independientemente hidrógeno, o alquilo, cicloalquilo o arilo sustituido o sin substituir, como se define en la presente memoria.

El término “fosfinilo” describe un grupo $-PR'R''$, con R' y R'' como se define anteriormente.

- 5 El término “óxido de fosfina” describe un grupo terminal $-P(=O)(R')(R'')$ o un grupo de unión $-P(=O)(R')-$, como se definen estas frases anteriormente, con R' y R'' como se define en la presente memoria.

El término “pirofosfato” describe un grupo $-O-P(=O)(OR')-O-P(=O)(OR')(OR'')(OR''')$, con R', R'' como se define en la presente memoria, y R''' se define como R' o R''.

El término “fosfito” describe un grupo $-O-PH(=O)(OR')$, con R' como se define en la presente memoria.

- 10 El término “fosfato” describe un grupo $-O-P(=O)_2(OR')$, con R' como se define en la presente memoria.

El término “tiofosfato” describe un grupo $-O-P(=O)(=S)(OR')$, con R' como se define en la presente memoria.

La introducción de un resto que contiene fósforo en el compuesto glicerólico se puede efectuar usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica.

- 15 La introducción de un resto que contiene fósforo en un compuesto, que tiene un compuesto glicerólico se efectúa por lo tanto:

haciendo reaccionar el cuarto compuesto descrito anteriormente, con un resto que contiene fósforo, para obtener un compuesto que tiene una estructura glicerólica y por lo menos un residuo que contiene un resto oxidado unido a la estructura glicerólica y que tiene adicionalmente un resto que contiene fósforo unido a la estructura glicerólica.

- 20 Según una realización preferida de la presente invención, el resto que contiene fósforo es un resto fosfato que está unido a la estructura glicerólica vía un enlace fosfodiéster.

- 25 De este modo, el resto que contiene fósforo puede ser, por ejemplo, ácido fosfórico, fosforilcolina, fosforiletanolamina, fosforilserina, fosforilcardiolipina, fosforilinositol, etilfosfocolina, fosforilmetanol, fosforiletanol, fosforilpropanol, fosforilbutanol, fosforiletanolamina-N-lactosa, fosforiletanolamina-N-[metoxi(propilenglicol)], fosfoinositol-4-fosfato, fosfoinositol-4,5-bifosfonato, pirofosfato, fosfoetanolamina-dietilentriamina-pentaacetato, dinitrofenil-fosfoetanolamina y fosfoglicerol.

Preferiblemente, dado que el resto que contiene fósforo está unido a la posición *sn*-3 de la estructura glicerólica, la introducción de tal resto se efectúa selectivamente, protegiendo selectivamente otros grupos hidroxilo libre que están presentes en el compuesto que reacciona o desprotegiendo un grupo hidroxilo protegido en la posición deseada.

- 30 En los métodos conocidos actualmente para preparar fosfolípidos oxidados, el resto que contiene fósforo se introduce típicamente previamente a la provisión de un compuesto que tiene un resto oxidado.

Además, en los casos en los que el resto que contiene fósforo es fosforilcolina, un resto ampliamente usado y beneficioso en tales compuestos, los métodos actualmente conocidos implican reacciones de N-alquilación, que implican reactivos peligrosos y que dañan el medio ambiente tales como, por ejemplo, trimetilamina.

- 35 Los presentes inventores han descubierto ahora que (i) un resto que contiene fósforo se puede introducir fácilmente después de la provisión de un compuesto que contiene un resto oxidado; y (ii) la introducción del resto que contiene fósforo se puede efectuar eficientemente vía un intermedio reactivo que contiene fósforo.

Basado en lo anterior, los presentes inventores han diseñado y practicado con éxito un nuevo procedimiento para introducir un resto que contiene fósforo en compuestos que tienen una estructura glicerólica y un residuo que contiene un resto oxidado unido a ella vía un enlace éter.

- 40 Este procedimiento, como parte del procedimiento descrito anteriormente para preparar el compuesto que contiene un resto oxidado, se puede usar beneficiosamente para preparar los fosfolípidos oxidados terapéuticamente beneficiosos descritos anteriormente.

La introducción del resto que contiene fósforo se efectúa después de la producción del cuarto compuesto.

- 45 La introducción de un resto que contiene fósforo en un compuesto glicerólico se efectúa preferiblemente por lo tanto, según las presentes realizaciones, haciendo reaccionar un cuarto compuesto purificado como se describe anteriormente, que tiene un grupo hidroxilo libre, con un compuesto reactivo que contiene fósforo, para producir un compuesto que tiene un grupo reactivo que contiene fósforo; y convertir el grupo reactivo que contiene fósforo en el resto que contiene fósforo.

El compuesto reactivo que contiene fósforo se selecciona tal que en dicha reacción, se obtiene un grupo reactivo

que contiene fósforo unido a la estructura glicerólica. El compuesto reactivo que contiene fósforo se selecciona por lo tanto para que tenga un segundo grupo reactivo y un tercer grupo reactivo, por lo que el segundo grupo reactivo se selecciona capaz de reaccionar con el grupo hidroxilo libre y el tercer grupo reactivo se selecciona capaz de ser convertido en el resto que contiene fósforo.

- 5 Los grupos reactivos que son capaces de reaccionar con un grupo hidroxilo libre incluyen, por ejemplo, haluros, cloruros de sulfonilo, haluros de acilo y similares.

Preferiblemente el segundo grupo reactivo es haluro y más preferiblemente es cloruro.

- 10 Aunque como se describe en la presente memoria anteriormente, los restos que contienen fósforo preferibles son restos fosfato, convertir el compuesto que contiene fósforo en el deseado resto que contiene fósforo típicamente implica una formación de un enlace fosfato-éster. Tal enlace se puede obtener, por ejemplo, haciendo reaccionar un derivado fosfórico tal como cloruro de fosforilo con un resto que contiene hidroxilo.

De este modo, según una realización preferida, el compuesto reactivo que contiene fósforo es oxiclورو de fósforo (POCl₃), tal que el tercer y el segundo grupo reactivo son ambos cloruros y el compuesto que tienen un grupo reactivo que contiene fósforo tiene una estructura glicerólica y un residuo cloruro de fosforilo unido a ella.

- 15 La reacción del cuarto compuesto purificado con el oxiclورو de fósforo se lleva a cabo típicamente en presencia de una base. Las bases apropiadas incluyen bases orgánicas e inorgánicas, siendo preferidas las bases orgánicas. De este modo, la reacción se efectúa preferiblemente en presencia de una base tal como, por ejemplo, trietilamina (por ejemplo, trietilamina).

- 20 Esta reacción adicionalmente se lleva a cabo preferiblemente en presencia de un disolvente, preferiblemente un disolvente polar tal como THF.

El compuesto glicerólico que contiene cloruro de fosforilo obtenido por el procedimiento descrito en la presente memoria se puede convertir fácilmente en cualquier resto que contiene fósforo deseado y es por lo tanto un intermedio muy beneficioso.

- 25 De este modo, por ejemplo, se puede convertir en ácido fosfórico por una simple hidrólisis, como se ejemplifica en la sección de Ejemplos a continuación.

Alternativamente, se puede hacer reaccionar con un resto que contiene hidroxilo, y opcional y preferiblemente también con agua, para obtener por ello otros restos fosfato.

Los restos fosfato preferidos que se incorporan en fosfolípidos oxidados terapéuticos (por ejemplo, fosforilcolina, fosforiletanolamina) típicamente incluyen un grupo aminoalquilo, que puede estar adicionalmente N-alquilado.

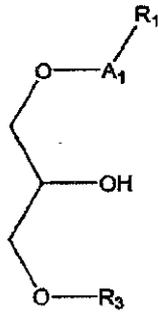
- 30 La conversión del intermedio de cloruro de fosforilo en tales restos fosfato se puede de este modo efectuar fácilmente por reacción de un derivado del grupo aminoalquilo deseado, seleccionado capaz de reaccionar con el tercer grupo reactivo (que es un cloruro).

- 35 De este modo, por ejemplo, se pueden obtener restos aminoalquilo que contienen fosfato haciendo reaccionar el intermedio cloruro de fosforilo con un aminoalcohol. Si se desea, el aminoalcohol a continuación se puede alquilar adicionalmente, para producir un resto aminoalquilfosfato N-alquilado, como en el caso de un resto fosforilcolina.

Obtener tal resto aminoalquilfosfato N-alquilado unido a una estructura glicerólica usando el procedimiento descrito anteriormente es muy beneficioso dado que evita la necesidad de usar materiales peligrosos tales como la trimetilamina típicamente usada para obtener tales compuestos.

- 40 En cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria el residuo que contiene un resto oxidado está unido a la posición *sn*-2 del compuesto. De este modo, seleccionando apropiadamente y/o protegiendo el primer compuesto, se efectúa la unión selectiva del residuo que contiene el resto oxidado.

En la presente invención, el primer compuesto tiene la siguiente fórmula general I:



Fórmula I

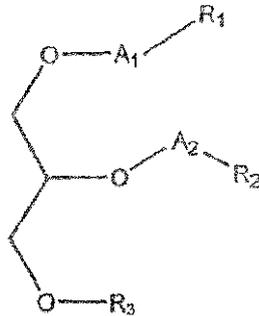
en la que:

A₁ se selecciona del grupo que consiste en CH₂, CH=CH y C=O;

- 5 R₁ se selecciona del grupo que consiste en H y una cadena hidrocarbonada que tiene de 1 a 30 átomos de carbono; y

R₃ es hidrógeno.

Usando cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria anteriormente, se obtiene un compuesto que tiene la fórmula general II:



10

Fórmula II

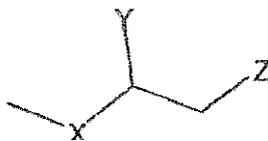
en la que:

A₁ se selecciona del grupo que consiste en CH₂, CH=CH y C=O y es preferiblemente CH₂;

A₂ es CH₂;

- 15 R₁ es un alquilo que tiene 1-30 átomos de carbono;

R₂ es

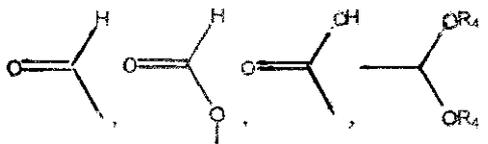


mientras que:

X es una cadena alquílica que tiene 1-24 átomos de carbono;

- 20 Y se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, alquilo, alcoxi, haluro, acetoxi y un grupo funcional aromático; y

Z se selecciona del grupo que consiste en:



-OH,

siendo R₄ un alquilo o arilo; y

- 5 R₃ se selecciona del grupo que consiste en ácido fosfórico, fosforilcolina, fosforiletanolamina, fosforilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcardiolipina, fosfatidilinositol, fosforilcardiolipina, fosforilinositol, etilfosfocolina, fosforilmetanol, fosforiletanol, fosforilpropanol, fosforilbutanol, fosforiletanolamina-N-lactosa, fosfoetanolamina-N-[metoxi(propilenglicol)], fosfoinositol-4-fosfato, fosfoinositol-4,5-bifosfonato, pirofosfato, fosfoetanolamina-dietilentriamina-pentaacetato, dinitrofenil-fosfoetanolamina y fosfoglicerol.

- 10 Los objetivos adicionales, ventajas y nuevas características de la presente invención serán evidentes para uno de experiencia media en la técnica al examinar los siguientes ejemplos, que no se desea que sean limitantes. Adicionalmente, cada una de las distintas realizaciones y aspectos de la presente invención como se define en la presente memoria anteriormente y como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

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

Rtuas sintéticas generales

Según las enseñanzas de la presente invención, se usan varios conceptos sintéticos generales para preparar fosfolípidos oxidados, como sigue:

- 20 (i) la preparación de un compuesto de glicerolípido que tiene por lo menos un residuo que contiene un resto oxidado unido a él vía un enlace éter, por unión de un residuo insaturado a un glicerolípido y oxidación del enlace insaturado, usando un reactivo de Girard y/o la cristalización de un compuesto que contiene triol para aislar el producto oxidado, como se ejemplifica en el Ejemplo 1 y los Esquemas I-V;
- 25 (ii) la preparación de un compuesto de glicerolípido que tiene por lo menos un residuo que contiene un resto oxidado unido a él vía un enlace éter, por unión de un residuo insaturado a un glicerolípido y oxidación del enlace insaturado vía un intermedio epóxido, usando un grupo protector acetoxi, como se ejemplifica en el Ejemplo 2 y Esquemas VI-X;
- 30 (iii) la preparación de un compuesto de glicerolípido que tiene por lo menos un residuo que contiene un resto oxidado unido a él vía un enlace éter, por introducción directa de un compuesto que contiene un resto oxidado, como se ejemplifica en el Ejemplo 3 y Esquema XI; y
- (iv) la introducción de un resto reactivo que contiene fósforo a un compuesto de glicerolípido que tiene uno o dos residuos que contienen un resto oxidado (o pre-oxidado) unido a él vía un enlace éter usando un compuesto reactivo que contiene fósforo (por ejemplo, dicloruro de fósforo) para formar un intermedio reactivo, como se ejemplifica en el Ejemplo 4 y Esquemas XII-XIV para propósitos de referencia, y en el Ejemplo 5.
- 35 De este modo, el Ejemplo 1 ilustra la preparación de un tercer y un cuarto compuesto. El Ejemplo 2 ilustra la preparación de un cuarto compuesto y el Ejemplo 5 ilustra la introducción de un resto que contiene fósforo en un cuarto compuesto.

Ejemplo 1

Preparación de rac-1-hexadecil-2-(éster 5'-metilpentanoico)-glicerol usando peryodato y un reactivo T de Girard

- 40 En este ejemplo, se introduce un resto insaturado en una estructura glicerólica y a continuación se oxida por medio de ácido fórmico, peróxido de hidrógeno y peryodato. A continuación el producto oxidado formado de este modo se purifica por medio de un reactivo de Girard.

Como ejemplo representativo se describe en la presente memoria la preparación de rac-1-hexadecil-2-(éster 5'-metilpentanoico)-glicerol.

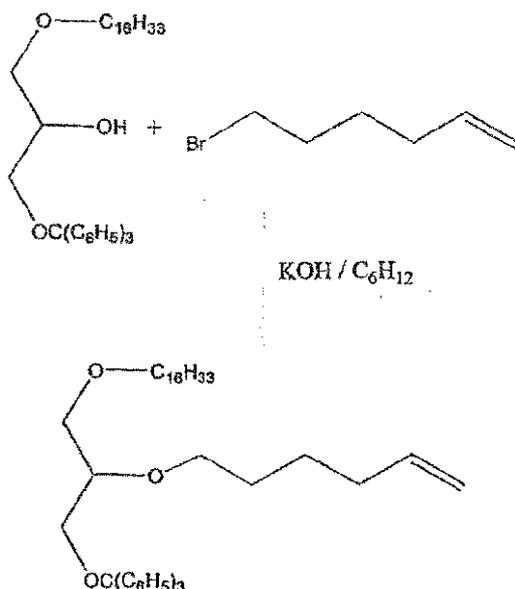
Se prepara rac-1-hexadecil-2-(éster 5'-metilpentanoico)-glicerol según las enseñanzas de la presente invención, como se describe en los Esquemas I a V a continuación.

5 Se preparó 1-hexadecil-3-tritilglicerol como se describe en la patente de EE.UU. No: 6.838.452. En resumen, D-acetona-glicerol (4 gramos), hidróxido de potasio en polvo (aproximadamente 10 gramos) y bromuro de hexadecilo (9,3 gramos) en benceno (100 ml) se agitaron y calentaron a reflujo durante 5 horas, retirando el agua formada por destilación azeotrópica (compare W.J. Baumann and H.K. Mangold, J. Org. Chem. 29:3055, 1964 y F. Paltauf, Monatsh. 99:1277, 1968). El volumen del disolvente se redujo gradualmente a alrededor de 20 ml, y la mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente y se disolvió en éter (100 ml). La disolución resultante se lavó con agua (2 x 50 ml), y el disolvente se retiró a presión reducida. Se añadió una mezcla de 100 ml de metanol:agua:ácido clorhídrico concentrado 90:10:5 al residuo y la mezcla se calentó a reflujo durante 10 minutos. El producto se extrajo 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 que era neutro. El disolvente se retiró a presión reducida y el producto (8,8 gramos) se cristalizó en hexano para dar 7,4 gramos de 1-hexadecil-glicerol puro.

Se calentaron 1-hexadecil-glicerol (7,9 gramos), trifenilclorometano (8,4 gramos) y piridina seca (40 ml) a 100°C durante 12 horas. Después de enfriar, se añadieron 300 ml de éter y 150 ml de agua enfriada con hielo, y la mezcla de reacción se transfirió a un embudo de separación. La fase orgánica se lavó consecutivamente con 50 ml de agua de hielo, disolución de carbonato de potasio al 1% (hasta que era básica) y 50 ml de agua, a continuación se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se evaporó, el residuo se disolvió en 150 ml de éter de petróleo caliente y la disolución resultante se enfrió a 4°C durante la noche. Después de la filtración del precipitado, el filtrado se evaporó y el residuo se recrystalizó en 20 ml de acetato de etilo a -30°C, dando 8,2 gramos de 1-hexadecil-3-tritilglicerol, punto de fusión 49°C.

Como se representa en el Esquema I, 1-hexadecil-3-tritilglicerol (14,78 gramos, 0,0265 moles), 6-bromo-1-hexeno (4,85 gramos) e hidróxido de potasio en polvo (aproximadamente 10 gramos) en hexano (200 ml) se agitaron y calentaron a reflujo durante 6 horas, retirando el agua formada por destilación azeotrópica. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se lavó con agua (3 x 100 ml), y el disolvente se retiró a presión reducida. El residuo se disolvió en cloroformo (50 ml) y se purificó por filtración sobre gel de sílice 60 (1,25 gramos). El cloroformo se retiró a presión reducida y el residuo se disolvió en éter de petróleo (100 ml). La disolución se mantuvo a 4°C durante la noche, durante la cual ocurrió la precipitación de subproductos. La filtración y retirada del disolvente a presión reducida dio 12,15 gramos (0,0190 moles) de 1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-tritilglicerol (72% de rendimiento).

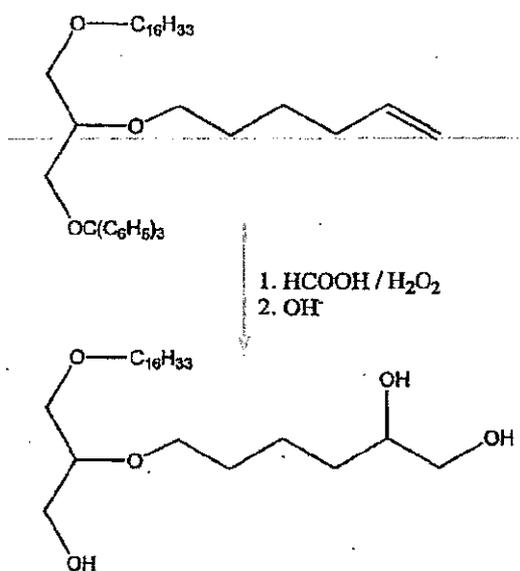
Esquema I



Se disolvió 1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-tritilglicerol (19,80 g) en ácido fórmico (100 ml). La disolución amarilla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se enfrió a continuación en un baño de hielo. Se añadió gota a gota peróxido de hidrógeno al 33% (25 ml) a la disolución enfriada con hielo durante 50 minutos. El color de la mezcla de

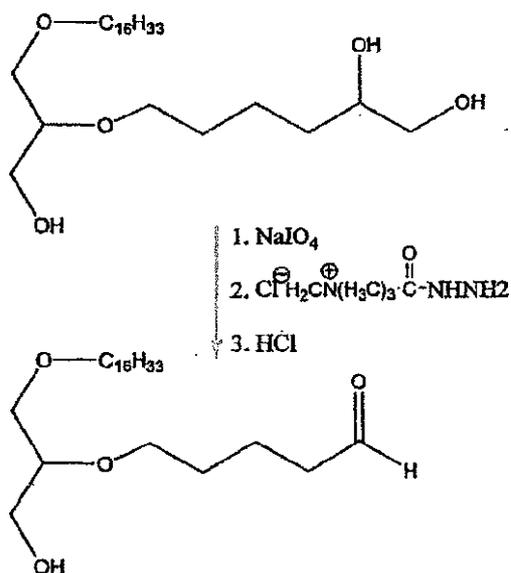
reacción cambió casi inmediatamente de amarillo a blanco. Después de que la adición era completa continuó la agitación en el baño de hielo durante 4 horas adicionales. La mezcla de reacción se vertió a continuación en hielo (150 gramos) y se extrajo con éter (3 x 100 ml). La disolución etérea naranja se lavó con agua (100 ml) y el disolvente se retiró a presión reducida. El residuo se disolvió en diclorometano (150 ml), se lavó con disolución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (100 ml) y el disolvente se retiró a presión reducida. El residuo se disolvió a continuación en hexano caliente (250 ml). Se obtuvo inmediatamente la precipitación de un compuesto blanco. La disolución se mantuvo a 4°C durante la noche. La filtración del precipitado (0,53 gramos), seguido de la retirada del disolvente a presión reducida dio 20,03 gramos de residuo aceitoso amarillo. Este residuo se disolvió en isopropanol (200 ml) y se añadió disolución acuosa de hidróxido de sodio (17 gramos en 50 ml de agua). La disolución resultante se calentó a 90°C durante 2 horas y se enfrió a continuación y vertió en hielo (150 gramos). A continuación la mezcla se extrajo con diclorometano (3 x 100 ml), la fase orgánica se lavó con agua (100 ml) y disolución acuosa saturada de dihidrogenofosfato de sodio y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la retirada del disolvente a presión reducida se obtuvieron 10,77 gramos de producto en bruto. El producto en bruto se disolvió a continuación en metanol al 80% (100 ml) y la disolución se mantuvo a 4°C durante la noche. Filtración del precipitado y retirada de la mayor parte del disolvente a presión reducida. La extracción con diclorometano (3 x 100 ml), el secado sobre Na₂SO₄ anhidro y la retirada del disolvente a presión reducida, y la recristalización en hexano (250 ml) dio 7,44 gramos de 1-hexadecil-2-(5',6'-dihidroxi-hexanil)-glicerol puro.

Esquema II



Como se representa en el Esquema III, se disolvió 1-hexadecil-2-(5',6'-dihidroxi-hexanil)-glicerol (7,84 gramos) en isopropanol (50 ml) y agua (12 ml). Se añadió NaIO₄ (9 gramos) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se añadió agua (50 ml) y la mezcla de reacción se extrajo con cloroformo (3 x 50 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se retiró el disolvente a presión reducida dando 5,56 gramos. El producto en bruto se disolvió en etanol (60 ml) y ácido acético glacial (2,3 gramos). Se añadió reactivo de Girard T (5,6 gramos) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo, se añadió disolución alcalina (2,3 gramos en 45 ml de agua) y se extrajo la mezcla con éter (3 x 25 ml). La fase etérea se lavó con agua y el agua se combinó con la fase alcalina. La fase acuosa se acidificó con HCl concentrado (4,4 ml) y se extrajo con éter (3 x 25 ml). El lavado con agua, bicarbonato de sodio acuoso saturado (3 x 25 ml), agua (2 x 25 ml), el secado sobre Na₂SO₄ anhidro y la retirada del disolvente a presión reducida dio 1,95 gramos (0,0049 mol) de 1-hexadecil-2-(5'-oxo-pentanil)-glicerol (26,9% de rendimiento).

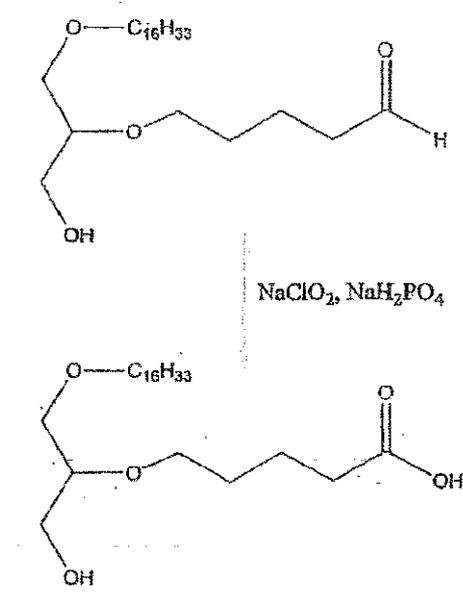
Esquema III



Como se representa en el Esquema IV, 1-hexadecil-2-(5'-oxopentil)-glicerol (4,80 gramos) se disolvió en trietilamina (57 ml) seca. Se añadió anhídrido acético (20 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 horas. La mezcla de reacción se vertió en hielo (100 gramos) y se extrajo con diclorometano (3 x 100 ml). La fase orgánica se lavó consecutivamente con agua (100 ml), ácido clorhídrico diluido (100 ml), agua (100 ml), bicarbonato de sodio acuoso saturado (100 ml) y de nuevo agua (100 ml) y se secó a continuación sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se retiró a presión reducida para dar 4,54 gramos de 1-hexadecil-2-(5'-oxopentil)-3-acetato-glicerol (rendimiento de 86%).

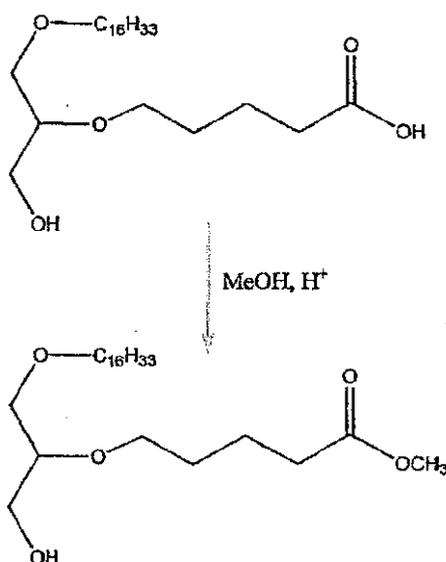
Se disolvió 1-hexadecil-2-(5'-oxopentil)-3-acetato-glicerol (3,94 gramos) en t-butanol (75 ml). Clorito de sodio (6,85 gramos) y dihidrogenofosfato de sodio dihidrato (15,50 gramos) se disolvieron en agua (75 ml). La disolución acuosa se añadió a la disolución alcohólica y la mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se transfirió a continuación a un embudo de separación y se extrajo con diclorometano (3 x 100 ml). La fase orgánica combinada se lavó con agua (2 x 100 ml) y el disolvente se retiró a presión reducida. El residuo se disolvió en una mezcla de metanol (80 ml) y NaOH acuoso al 10% (20 ml) y la disolución se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La disolución metanólica se extrajo con una mezcla de tolueno y hexano (1:1) (2 x 50 ml), se enfrió en un baño de hielo y se añadió HCl concentrado lentamente para llegar a pH 5-6. La disolución se extrajo a continuación con diclorometano (2 x 100 ml). La fase orgánica combinada se lavó con agua (100 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y el disolvente se retiró a presión reducida para dar 2,07 gramos de un producto en bruto. La recristalización en hexano (20 ml) dio 1,30 gramos de 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-glicerol (rendimiento del 35%)

Esquema IV



- 5 Como se representa en el Esquema V, al residuo se añadieron metanol (100 ml) y NaOH acuoso al 10% (20 ml) y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La disolución se extrajo con mezcla de éter de petróleo/tolueno (1:1, v/v) y la fase metanólica se acidificó a pH 0 con HCl concentrado y a continuación se extrajo con cloroformo (3 x 50 ml). La fase de cloroformo combinada se lavó con agua (2 x 0 ml), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se retiró a presión reducida dando 0,77 gramos (0,00179 mol) de rac-1-hexadecil-2-(éster 5'-metilpentanoico)-glicerol (96,7% de rendimiento)

Esquema V



Ejemplo 2

- 10 Preparación de rac-1-hexadecil-2-(éster 5'-metilpentanoico)-glicerol usando peryodato y un grupo protector acetato

En este ejemplo, se introduce un resto insaturado en una estructura glicerólica y se oxida a continuación a un éster vía un epóxido por medio de anhídrido acético, ácido 4-clorobenzoperoxiico, HClO_4 , peryodato y metanol.

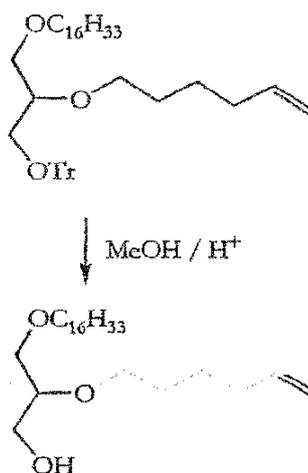
El aislamiento eficiente de los intermedios se efectúa llevando a cabo las reacciones usando un grupo protector acetato.

Como ejemplo representativo, se describe en la presente memoria la preparación de rac-1-hexadecil-2-(éster 5'-metilpentanoico)-glicerol.

- 5 Se prepara rac-1-hexadecil-2-(éster 5'-metilpentanoico)-glicerol según las enseñanzas de la presente invención, como se describe en los Esquemas VI a X a continuación.

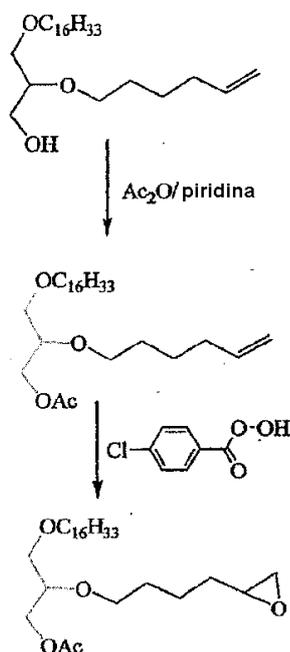
Como se representa en el Esquema VI a continuación, 1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-tritilglicerol, preparado como se describe en el Ejemplo 1 anterior (4,90 gramos) se disolvió en una mezcla de metanol (30 ml) y ácido clorhídrico concentrado (3 ml) y la disolución resultante se calentó a reflujo durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se vertió sobre hielo (100 gramos) y se extrajo con cloroformo (3 x 100 ml). La fase orgánica se lavó con agua (100 ml), bicarbonato de sodio acuoso (100 ml) y de nuevo con agua (100 ml). A continuación la fase acuosa se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se retiró para dar 3,75 gramos de un residuo. El residuo se disolvió en n-hexano y se mantuvo a 4°C durante la noche. La filtración del precipitado y la retirada del disolvente dio 3,17 gramos, que se disolvieron en cloroformo (200 ml) y se añadieron a gel de sílice (45 gramos). Esta disolución se filtró y el gel de sílice se extrajo de nuevo con mezcla de cloroformo:metanol (200 ml, 9:1) y cloroformo:metanol (200 ml, 1:1). Los dos últimos extractos se combinaron y se retiró el disolvente a presión reducida para dar 2,56 gramos de 1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-glicerol (84% de rendimiento)

Esquema VI



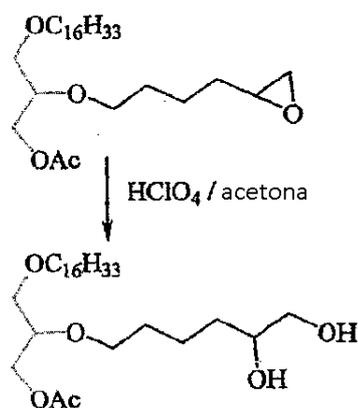
Como se representa en el Esquema VII a continuación, se añadieron piridina (5 ml) seca y anhídrido acético (3 ml) al 1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-glicerol resultante y la mezcla de reacción se calentó a 70°C durante 2 horas. La mezcla de reacción se vertió en hielo (25 gramos) y se extrajo con hexano (3 x 25 ml). El extracto se lavó sucesivamente con agua (25 ml), ácido sulfúrico diluido en agua (25 ml), agua (25 ml), bicarbonato de sodio acuoso (25 ml) y agua. Después de secar sobre Na₂SO₄ anhidro, filtración y retirada del disolvente se obtuvieron 2,60 gramos. El residuo se disolvió en diclorometano (50 ml) y se añadió ácido 3-cloroperbenzónico (3,84 gramos), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se redujo a alrededor de 20 ml a presión reducida y se añadió n-hexano (100 ml). Después de la filtración el disolvente se evaporó hasta sequedad. El residuo se disolvió en n-hexano (100 ml), se añadió disolución alcalina (0,4 gramos de NaOH en 50 ml de agua) y se separaron las fases. El lavado de la fase orgánica sucesivamente con agua (25 ml), bicarbonato de sodio acuoso (25 ml), agua (25 ml), secado sobre Na₂SO₄ anhidro, filtración y retirada del disolvente dio 2,40 gramos de 1-hexadecil-2-(5',6'-epoxihexenil)-3-acetato-glicerol (82% de rendimiento).

Esquema VII



5 Como se representa en el Esquema VIII a continuación, se disolvió 1-hexadecil-2-(5',6'-epoxihexanil)-3-acetato-glicerol en acetona (50 ml), se añadió HClO_4 al 7% (5 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 horas. Se añadió agua (50 ml) y la mezcla de reacción se extrajo con cloroformo (3 x 50 ml). El lavado de la fase orgánica sucesivamente con agua (25 ml), bicarbonato de sodio acuoso (25 ml), agua (25 ml), el secado sobre Na_2SO_4 anhidro, filtración y la retirada del disolvente dio 2,29 gramos de residuo aceitoso. El residuo se disolvió en cloroformo (200 ml) y se añadió a gel de sílice (30 gramos). Esta disolución se filtró y el gel de sílice se extrajo de nuevo con mezcla de cloroformo:metanol (200 ml, 8:2). En el segundo extracto después de la retirada del disolvente a presión reducida se obtuvieron 1,45 gramos de 1-hexadecil-2-(5',6'-dihidroxihexanil)-3-acetato-glicerol.

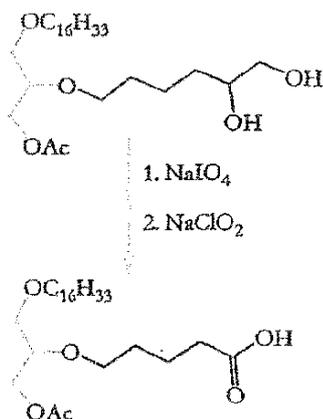
Esquema VIII



10 Como se representa en el esquema IX a continuación, se disolvió 1-hexadecil-2-(5',6'-dihidroxihexanil)-3-acetato-glicerol en isopropanol (50 ml). Se añadió disolución acuosa de peryodato de sodio (1,45 gramos en 50 ml de agua) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se extrajo con cloroformo (3 x 50 ml), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se retiró el disolvente a presión reducida dando 0,96
15 gramos. El residuo se disolvió en n-butanol (50 ml) y se añadió disolución acuosa (50 ml) de clorito de sodio (1,66 gramos) y dihidrogenofosfato de sodio dihidrato (3,76 gramos). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, se extrajo con cloroformo (2 x 50 ml) y se retiró el disolvente a presión reducida. El

residuo se disolvió en mezcla de cloroformo:hexano (200 ml, 1:1) y se añadió a gel de sílice (15 gramos). La disolución se filtró y se extrajo de nuevo el gel de sílice con cloroformo (200 ml) y cloroformo:metanol (200 ml, 9:1). Se retiró el disolvente del último extracto a presión reducida para dar 0,92 gramos de 1-hexadecil-2-(4-carboxibutil)-3-acetato-glicerol.

Esquema IX

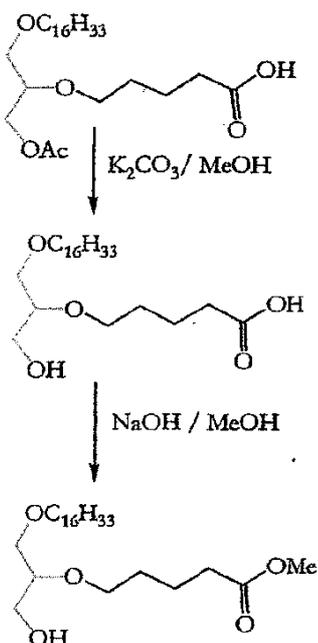


5

Como se representa en el Esquema X a continuación, 1-hexadecil-2-(4'-carboxibutil)-3-acetato-glicerol se disolvió en 50 ml de una mezcla 8:2 de metanol y NaOH acuoso al 10% y la mezcla de reacción se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se extrajo con mezcla de tolueno:éter de petróleo (2 x 25 ml, 1:1). La fase metanólica se acidificó con HCl concentrado hasta llegar a un pH de alrededor de 0, y a continuación se extrajo con cloroformo (2 x 25 ml). Se retiró el disolvente a presión reducida y el residuo se disolvió en metanol (10 ml). Se añade HCl concentrado (2 gotas) y la disolución se agita a temperatura ambiente durante la noche seguido de extracción con cloroformo (2 x 25 ml), lavado sucesivo de la fase orgánica con agua (25 ml), seguido de lavado con bicarbonato de sodio acuoso (25 ml), agua (25 ml), seguido de secado sobre Na₂SO₄ anhidro, filtración y retirada del disolvente para dar 0,86 gramos de rac-1-hexadecil-2-(éster 5'-metilpentanoico)-glicerol.

15

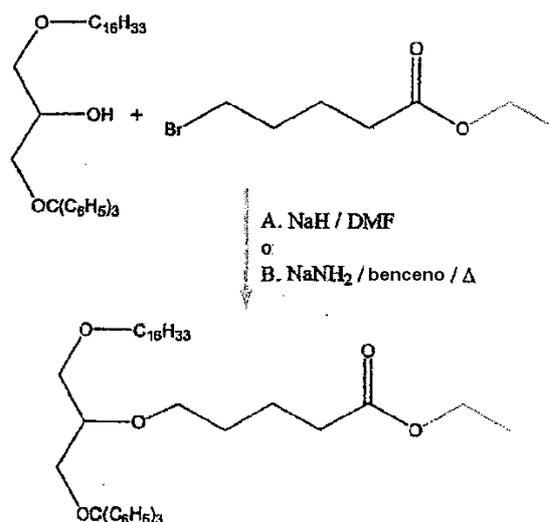
Esquema X



Ejemplo 3 (Ejemplo de referencia)

Preparación de rac-1-hexadecil-2-(éster 5'-etilpentanoico)-glicerol por introducción directa de un resto oxidado.

Se preparó rac-1-hexadecil-2-(éster 5'-etilpentanoico)-glicerol según las enseñanzas de la presente invención, como se describe en el Esquema XI a continuación.

Esquema XI

5

Se prepara 1-hexadecil-3-tritilglicerol como se describe, por ejemplo, en el Ejemplo 1 anterior o como se describe en la patente de EE.UU. No. 6.838.425.

A un matraz de tres bocas equipado con un agitador magnético, se añadieron 1,0 gramos (1,8 mmoles) de 1-hexadecil-3-tritilglicerol, 0,78 gramos (3,6 mmoles) de éster etílico de ácido 5-bromoaléico y 75 ml de dimetilformamida (DMF). A la disolución agitada se añaden gota a gota durante 15 minutos 0,20 gramos (5 mmoles) de NaH (dispersión al 60% en aceite mineral) disueltos en 25 ml de dimetilformamida y se continúa la agitación durante 1 hora adicional hasta que la reacción es completa. Se añadió agua (50 ml) y la mezcla se extrajo con éter (3 x 50 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se retiró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice.

La desprotección de grupo tritilo como se describe en la presente memoria anteriormente dio el producto final

Ejemplo 4 (Ejemplo de referencia)

Introducción de un resto que contiene fósforo en un compuesto de glicerolípido

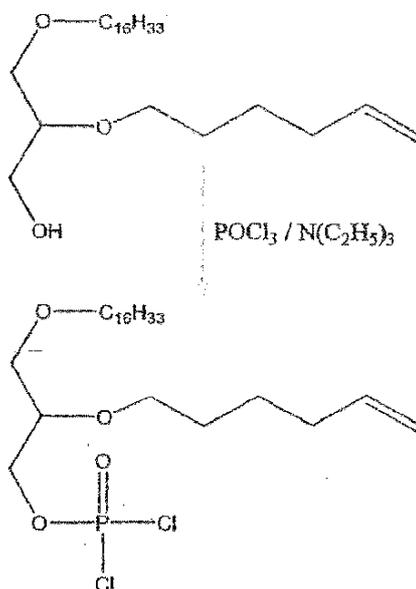
Según las enseñanzas de la presente invención, se introduce un resto reactivo que contiene fósforo en un compuesto de glicerolípido que tiene uno o dos residuos que contienen un resto oxidado (o pre-oxidado) unido a él vía un enlace éter. La introducción del resto reactivo que contiene fósforo se efectúa usando un compuesto que contiene fósforo tal como, por ejemplo, oxiclorigo de fósforo. Opcionalmente, después de la introducción del resto reactivo que contiene fósforo, el resto reactivo que contiene fósforo se convierte en un resto fosfato.

Preparación de rac-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-diclorofosfato:

Como ejemplo representativo, se preparó rac-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-diclorofosfato según las enseñanzas de la presente invención, como se describe en el esquema XII a continuación.

25

Esquema XII



De este modo, 0,24 ml (0,39 gramos, 2,53 mmoles) de POCl_3 y 10 ml de tetrahidrofurano (THF) se colocan en un matraz de tres bocas enfriado con hielo equipado con un agitador magnético. A la disolución agitada se añadió gota a gota, durante 25 minutos, una mezcla de 0,87 gramos (2,2 mmoles) de rac-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-glicerol, 0,34 ml (0,25 gramos, 2,44 mmoles) de trietilamina y 50 ml de tetrahidrofurano y se continúa la agitación durante unos 10 minutos adicionales en un baño de hielo y se continúa adicionalmente durante 45 minutos a 23°C.

El rac-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-diclorofosfato se puede hidrolizar, para producir por ello el correspondiente ácido fosfatídico, como sigue:

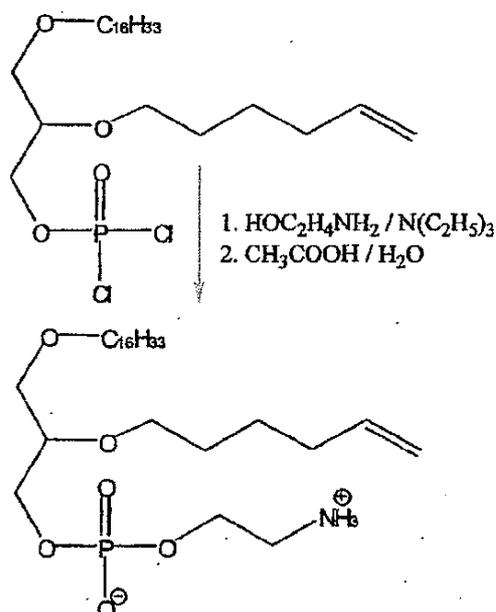
Se añade un gramo de hielo a la mezcla de reacción y se continúa la agitación durante 30 minutos. Se añade a continuación agua (50 ml) y se extrae el producto con mezcla de cloroformo:MeOH (2:1, v/v, 3 x 25 ml). La fase orgánica se lava con agua y el disolvente se retira a presión reducida.

Alternativamente, el rac-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-diclorofosfato se puede hacer reaccionar con varios derivados de alquilamina, para producir por ello un fosfoglicérido, como se ejemplifica a continuación.

Preparación de rac-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-fosfoetanolamina a partir de rac-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-diclorofosfato:

Se preparó rac-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-fosfoetanolamina se preparó según las enseñanzas de la presente invención, como se describe en el Esquema XIII.

Esquema XIII



5 Una disolución de rac-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-diclorofosfato en THF preparada como se describe inmediatamente en la presente memoria anteriormente en el Ejemplo 2 se enfrió en un baño de hielo. A la disolución se añadió gota a gota durante un periodo de 10 minutos una mezcla de 0,16 ml (0,16 gramos, 2,7 mmoles) de etanolamina, 0,34 ml (0,25 gramos, 2,4 mmoles) de trietilamina y 50 ml de THF. Después de que se había añadido toda la disolución, la disolución resultante se agitó durante unos 20 minutos adicionales y a continuación se retiró del baño de hielo y se agitó durante la noche a temperatura ambiente.

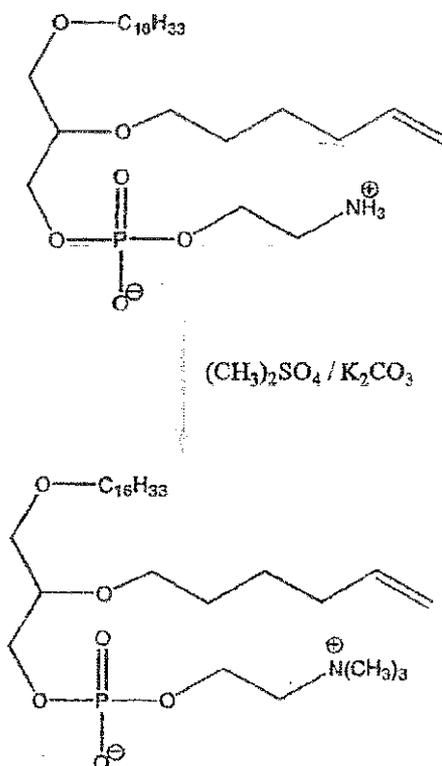
La disolución se filtró usando papel de filtro (Whatman nº 2). El residuo restante sobre el papel de filtro se secó a presión reducida para dar 1,2 gramos de un residuo blancuzco.

10 Los 1,2 gramos de residuo blancuzco se disolvieron en una mezcla de 24 ml de ácido acético glacial y 10 ml de agua, se mantuvieron a 70°C durante 1 hora y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente. El producto se extrajo de la disolución de ácido acético lavando dos veces con 50 ml de una disolución de extracción de cloroformo:metanol 2:1. Los disolventes de la disolución de extracción se evaporaron dejando 0,94 gramos (1,7 mmol) de rac-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-fosfoetanolamina, un rendimiento del 85% con relación al rac-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-glicerol.

15 Preparación de rac-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-fosfocolina a partir de rac-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-fosfoetanolamina.

Se preparó rac-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-fosfocolina según la enseñanzas de la presente invención, como se describe en el Esquema XIV a continuación.

Esquema XIV



5 A un matraz de tres bocas equipado con un agitador magnético, se añadieron 0,50 gramos (0,99 mmoles) de rac-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-fosfoetanolamina, 50 ml de isopropanol y 18 ml de CH₂Cl₂; Mientras se agita, se añadió una mezcla de 5 gramos de K₂CO₃ y 10 ml de agua y la temperatura de la reacción se mantuvo entre alrededor de 35°C y alrededor de 40°C mientras se añadía gota a gota una mezcla de 1,0 ml (1,3 gramos, 11 mmoles) de sulfato de dimetilo y 10 ml de isopropanol durante un periodo de 45 minutos. Después de que se había añadido toda la disolución, se agitó la disolución durante unos 90 minutos adicionales. La disolución se dejó enfriar a temperatura ambiente. El producto resultante se extrajo de la disolución lavando tres veces con 50 ml de una disolución de cloroformo:metanol 2:1. Los disolventes de la disolución se evaporaron dejando 0,50 gramos (0,82 mmoles) de rac-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-fosfocolina, un rendimiento del 92% con relación a rac-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-fosfoetanolamina.

10 Se confirmó la pureza con cromatografía en capa fina sobre alúmina usando un disolvente de elución de cloroformo:metanol:agua (70:26:4). La identidad del rac-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-fosfocolina se confirmó usando ¹³C RMN.

15 **Ejemplo 5**

Preparación de 1-hexadecil-2-(4'-carboximetil)butil-glicero-3-fosfocolina:

Una disolución de 1-hexadecil-2-(4'-carboximetil)butil-glicerol (0,86 gramos), 0,34 gramos (2,6 mmoles) de trietilamina y 50 ml de tetrahidrofurano se añadió gota a gota, durante 25 minutos a una disolución enfriada con hielo de 0,24 ml (0,39 gramos, 2,6 mmoles) de POCl₃ y 10 ml de tetrahidrofurano (THF). La mezcla resultante se agitó durante 10 minutos adicionales en un baño de hielo y durante 45 minutos a temperatura ambiente (23°C). La mezcla de reacción se enfrió a continuación en un baño de hielo y se le añadió gota a gota con agitación vigorosa una disolución de etanolamina (0,16 ml) y trietilamina (0,64 ml) en THF (50 ml). La agitación continuó durante 10 minutos adicionales en un baño de hielo y continuó adicionalmente a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se filtró a continuación y se retiró el disolvente a presión reducida. El residuo se disolvió en una mezcla de ácido acético (24 ml) y agua (10 ml) y la disolución se calentó a 70°C durante 1 hora. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se extrajo con cloroformo (2 x 25 ml) y se retiró el disolvente a presión reducida. El residuo se disolvió en una mezcla de isopropanol (50 ml) y diclorometano (18 ml). Se le añadió carbonato de potasio (5,0 gramos) en agua (10 ml) y la mezcla resultante se calentó a 35-40°C. Se añadió gota a gota durante 45 minutos una disolución de sulfato de dimetilo (1 ml) en 10 ml de isopropanol. Después de 90 minutos adicionales se extrajo la mezcla con cloroformo (3 x 50 ml) y se retiró el disolvente a presión reducida para dar 1,10 gramos de 1-hexadecil-2-

(4'-carboximetil)butil-glicero-3-fosfocolina (rendimiento del 92%).

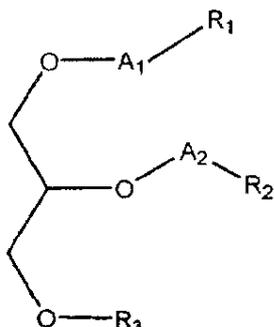
Preparación de 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina:

5 Se disolvió 1-hexadecil-2-(4'-carboximetil)butil-glicero-3-fosfocolina en metanol (25 ml). Se añadió hidróxido de sodio (1,0 gramos) disuelto en metanol al 90% (20 ml) a la disolución metanólica y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Se ajustó el pH de la reacción a 4 añadiendo dihidrogenofosfato de sodio. Se añadió agua (50 ml) y cloroformo (50 ml), la fase orgánica se recogió y se retiró el disolvente a presión reducida. El residuo se disolvió en cloroformo, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se retiró el disolvente a presión reducida. Se obtuvo 1-hexadecil-2-(4'-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (0,71 gramos) (66% de rendimiento).

10 La citación o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no se considerará como una admisión de que tal referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un compuesto de la fórmula general II a continuación que tiene una estructura glicérica y por lo menos un residuo que contiene un resto oxidado unido a la posición *sn*-2 de la estructura glicérica vía un enlace éter, y que tiene adicionalmente un resto que contiene fósforo unido a la posición *sn*-3 de la estructura glicérica,
- 5



Fórmula II

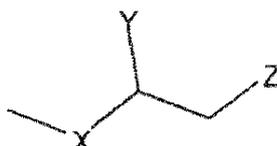
en la que:

A₁ se selecciona del grupo que consiste en CH₂, CH=CH y C=O;

- 10 A₂ es CH₂;

R₁ es un alquilo que tiene 1-30 átomos de carbono;

R₂ es

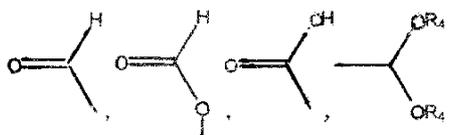


mientras que:

- 15 X es una cadena alquílica que tiene 1-24 átomos de carbono;

Y se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, alquilo, alcoxi, haluro, acetoxi y un grupo funcional aromático; y

Z se selecciona del grupo que consiste en:



-OH,

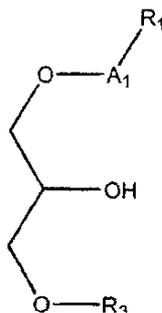
- 20 siendo R₄ un alquilo o arilo; y

R₃ se selecciona del grupo que consiste en ácido fosfórico, fosforilcolina, fosforiletanolamina, fosforilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcardiolipina, fosfatidilinositol, fosforilcardiolipina, fosforilinositol, etilfosfocolina, fosforilmetanol, fosforiletanol, fosforilpropanol, fosforilbutanol, fosforiletanolamina-N-

lactosa, fosfoetanolamina-N-[metoxi(propilenglicol)], fosfoinositol-4-fosfato, fosfoinositol-4,5-bifosfonato, pirofosfato, fosfoetanolamina-dietilentriaminapentaacetato, dinitrofenil-fosfoetanolamina y fosfoglicerol.

comprendiendo el método:

- 5 proporcionar un primer compuesto que tiene una estructura glicerólica y un grupo hidroxilo libre en la posición *sn*-2, teniendo dicho primer compuesto la fórmula general I:



en la que:

A₁ se selecciona del grupo que consiste en CH₂, CH=CH y C=O;

- 10 R₁ se selecciona del grupo que consiste en H y una cadena hidrocarbonada que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, y

R₃ es hidrógeno;

proporcionar un segundo compuesto que tiene por lo menos un enlace insaturado y por lo menos un grupo reactivo capaz de formar un enlace éter con dicho grupo hidroxilo libre;

- 15 hacer reaccionar dicho primer compuesto y dicho segundo compuesto para obtener por ello un tercer compuesto, teniendo dicho tercer compuesto dicha estructura glicerólica y un residuo que comprende un enlace insaturado, estando unido dicho residuo a dicha estructura glicerólica vía un enlace éter en la posición *sn*-2;

aislar dicho tercer compuesto para obtener por ello un tercer compuesto purificado,

en el que el aislamiento de dicho tercer compuesto comprende:

recoger dicho tercer compuesto;

- 20 proporcionar una disolución de dicho tercer compuesto en un disolvente, siendo seleccionado dicho disolvente de éter de petróleo, hexano, heptano, benceno y tolueno, para proporcionar por ello una mezcla que incluye dicha disolución de dicho tercer compuesto en dicho disolvente e impurezas insolubles;

retirar dichas impurezas insolubles; y

retirar dicho disolvente, obteniendo por ello dicho tercer compuesto purificado;

- 25 hacer reaccionar dicho tercer compuesto purificado con un agente oxidante para oxidar dicho enlace insaturado, para obtener por ello un cuarto compuesto que tiene dicha estructura glicerólica y un residuo que contiene un resto oxidado unido a dicha estructura glicerólica vía un enlace éter en la posición *sn*-2,

aislar y purificar dicho cuarto compuesto para obtener por ello un cuarto compuesto purificado,

en el que el método comprende adicionalmente, después de purificar dicho cuarto compuesto;

- 30 hacer reaccionar dicho cuarto compuesto purificado con un resto que contiene fósforo, para obtener por ello dicho compuesto que tiene una estructura glicerólica y por lo menos un residuo que contiene un resto oxidado unido a la estructura glicerólica y que tiene adicionalmente un resto que contiene fósforo unido a la estructura glicerólica, estando el método desprovisto de cromatografía en columna.

- 35 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en ácido fórmico, peróxido de hidrógeno, un peryodato, un perclorato, un bismutato, un permanganato, un clorito, ozono, óxido de plata, tetróxido de osmio y cualquiera de sus combinaciones.

3. El método de la reivindicación 1, en el que dicho resto oxidado es un grupo ácido carboxílico.
4. El método de la reivindicación 1, en el que dicho resto oxidado es un grupo ácido carboxílico y la reacción de dicho tercer compuesto purificado con dicho agente oxidante comprende:
- 5 convertir dicho tercer compuesto purificado en un compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene aldehído unido a dicha estructura glicerólica vía un enlace éter; y
- oxidar dicho compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene aldehído unido a dicha estructura glicerólica, para obtener por ello un compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene ácido carboxílico unido a dicha estructura glicerólica vía un enlace éter.
- 10 5. El método de la reivindicación 1, en el que dicho resto oxidado es un grupo ácido carboxílico y la reacción de dicho tercer compuesto purificado con dicho agente oxidante comprende:
- convertir dicho tercer compuesto purificado en un compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene epóxido unido a dicha estructura glicerólica vía un enlace éter; y
- 15 oxidar dicho compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene epóxido unido a dicha estructura glicerólica, para obtener por ello un compuesto que tiene una estructura glicerólica y un residuo que contiene ácido carboxílico unido a dicha estructura glicerólica vía un enlace éter.
6. El método de la reivindicación 1, en el que el primer compuesto de Fórmula I tiene un grupo hidroxilo libre adicional en la posición *sn*-1 o *sn*-3, el método comprende adicionalmente previamente a la reacción del primer compuesto y el segundo compuesto: proteger dicho grupo hidroxilo libre adicional con un grupo protector.
7. El método de la reivindicación 6, en el que dicho grupo protector es tritilo.
- 20 8. El método de la reivindicación 4, en el que R₃ de la Fórmula I es hidrógeno, y el método comprende adicionalmente, previamente a la reacción de dicho primer compuesto y dicho segundo compuesto:
- proteger un grupo hidroxilo libre en la posición *sn*-3 de dicha estructura glicerólica con un grupo protector.
9. El método de la reivindicación 8, en el que dicho grupo protector es tritilo.
10. El método de la reivindicación 9, que comprende adicionalmente, previamente a la reacción de dicho tercer compuesto y dicho agente oxidante:
- 25 reemplazar dicho tritilo por un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en acetato, pivaloato y benzoato.
11. El método de la reivindicación 1, en el que dicho resto que contiene fósforo es un resto fosfato que está unido a dicha estructura glicerólica vía un enlace fosfodiéster.
12. El método de la reivindicación 1, en el que la reacción de dicho cuarto compuesto purificado y dicho resto que contiene fósforo comprende:
- 30 proporcionar dicho cuarto compuesto purificado que tiene un grupo hidroxilo libre en la posición *sn*-3 de dicha estructura glicerólica;
- 35 hacer reaccionar dicho cuarto compuesto purificado con un compuesto reactivo que contiene fósforo que tiene un segundo grupo reactivo y un tercer grupo reactivo, siendo dicho segundo grupo reactivo capaz de reaccionar con dicho grupo hidroxilo libre, para proporcionar por ello un compuesto que tiene un grupo reactivo que contiene fósforo unido a la estructura glicerólica; y
- convertir dicho grupo reactivo que contiene fósforo en dicho resto que contiene fósforo.
13. El método de la reivindicación 12, en el que dicho compuesto reactivo que contiene fósforo es oxiclورو de fósforo (POCl₃).
- 40 14. El método de la reivindicación 1, en el que cuando dicho resto oxidado es un grupo éster, el método comprende adicionalmente proporcionar un compuesto que contiene ácido carboxílico, y convertir a continuación un grupo ácido carboxílico en un grupo éster.
15. El método de la reivindicación 10, que comprende adicionalmente retirar dicho grupo protector.
16. El método de la reivindicación 1, en el que la oxidación de dicho enlace insaturado comprende convertir el enlace insaturado en un grupo epóxido, y convertir el grupo epóxido en un grupo ácido carboxílico.
- 45 17. El método de la reivindicación 16, en el que la conversión de dicho epóxido en dicho ácido carboxílico se efectúa convirtiendo el epóxido en diol, y oxidando el diol para obtener dicho grupo ácido carboxílico.