

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 044**

51 Int. Cl.:

A01N 57/26 (2006.01)

C07F 9/10 (2006.01)

C07F 9/09 (2006.01)

C07C 59/125 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2009 E 09824498 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2348866**

54 Título: **Compuestos de lípidos oxidados y usos de los mismos**

30 Prioridad:

06.11.2008 US 193220 P

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

16.04.2015

73 Titular/es:

**VASCULAR BIOGENICS LTD. (100.0%)
6 Jonathan Netanyahu Street
60376 Or Yehuda, IL**

72 Inventor/es:

**KOVALEVSKI-ISHAI, ETI;
ZINIUK, ZEEV;
HALPERIN, GIDEON;
MENDEL, ITZHAK;
FEIGE, EREZ;
YACOV, NIVA y
BREITBART, EYAL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 534 044 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

Compuestos de lípidos oxidados y usos de los mismos

Campo y antecedentes de la invención

5 La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a nuevos lípidos oxidados y a procedimientos que emplean lípidos oxidados para tratar o prevenir una inflamación asociada con lípidos oxidados endógenos. Los procedimientos de las presentes realizaciones se pueden usar en el tratamiento o prevención de enfermedades y trastornos asociados con inflamación tales como, por ejemplo, aterosclerosis y trastornos relacionados, enfermedades o trastornos autoinmunitarios y enfermedades o trastornos proliferativos.

10 Los fosfolípidos oxidados se han descrito anteriormente como útiles en el tratamiento de afecciones médicas tales como, por ejemplo, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cerebrovasculares y enfermedades y trastornos inflamatorios.

15 La solicitud de patente internacional nº PCT/IL2004/000453 (nº de publicación WO 04/106486), del presente beneficiario, describe lípidos oxidados para la prevención y el tratamiento de la inflamación asociada con lípidos oxidados endógenos. Un compuesto de este tipo de ejemplo se describe y se conoce como CI-201 (también denominado en la técnica VB-201).

La solicitud de patente internacional nº PCT/IL01/01080 (nº de publicación WO 02/41827), del presente beneficiario, describe lípidos oxidados para la prevención y el tratamiento de la aterosclerosis y enfermedades relacionadas.

20 La solicitud de patente internacional nº PCT/IL05/000735 (nº de publicación WO 06/006161), del presente beneficiario, describe rutas sintéticas aplicables a la preparación industrial de fosfolípidos oxidados terapéuticamente beneficiosos sin el uso de cromatografía en columna.

Otras técnicas anteriores incluyen las solicitudes de patente internacional nº PCT/IL02/00005 (nº de publicación WO 02/053092) y PCT/IL08/000013 (nº de publicación WO 08/084472), siendo ambas también del presente beneficiario.

La publicación US 2007/0112211 también del presente beneficiario describe un procedimiento para la preparación de fosfolípidos oxidados.

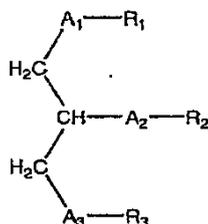
25 Todas las publicaciones PCT citadas anteriormente describen lípidos oxidados eterificados que comprenden una cadena armazón de carbono a la que se unen una cadena alquilo, una cadena alquilo sustituida por un resto oxidado y un grupo que contiene fosfato. La cadena alquilo que está sustituida por un resto oxidado se une, preferentemente, al armazón de carbono a través de un enlace éter (por tanto, los compuestos se denominan "lípidos oxidados eterificados"), como tal, un enlace imparte a los compuestos las propiedades farmacológicas deseadas que se describen con detalle en las publicaciones mencionadas anteriormente.

Sumario de la invención

Ahora, los presentes inventores han diseñado y preparado y analizado con éxito nuevos fosfolípidos oxidados.

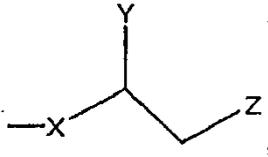
De acuerdo con un aspecto (no reivindicado) de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un compuesto de fórmula:

35



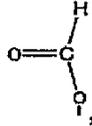
o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que:

- 40 (i) A₁, A₂ y A₃ se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en O y S;
- (ii) R₁ se selecciona del grupo que consiste en una cadena alquilo de 2 - 28 carbonos de longitud y



en la que X es una cadena C₁₋₂₅, Y se selecciona del grupo que consiste en:

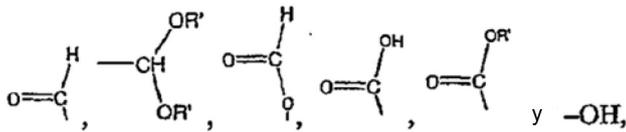
5



-OH, -H, alquilo, alcoxi, halógeno, acetoxi y grupos funcionales aromáticos; y

Z se selecciona del grupo que consiste en:

10



mientras que R' es alquilo C₁₋₄; y

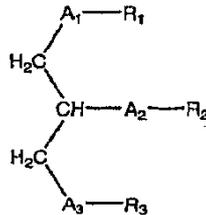
(iii) R₂ se selecciona del grupo que consiste en (4-metilcarboxi)butilo, (3-carboxi)propilo, (6-carboxi)hexanilo, (2-carboxi)etilo, 5,6-dihidroxihexanilo, 5,5-dietoxipentilo y 5,5-dimetoxipentilo; y

15

(iv) R₃ se selecciona del grupo que consiste en H, acilo, alquilo, fosfato, fosfocolina, fosfoetanolamina, ácido fosfoetanolamina-N-glutárico, fosfoserina y fosfoinositol.

De acuerdo con un aspecto (no reivindicado) de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un compuesto de fórmula:

20

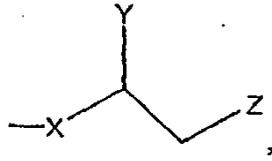


o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que:

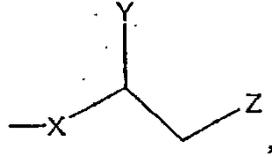
(i) A₁, A₂ y A₃ se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en O y S;

(ii) R₁ y R₂ se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en una cadena alquilo de 2 - 28 carbonos de longitud y

25

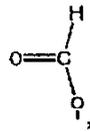


con la condición de que al menos uno de R_1 y R_2 sea



5

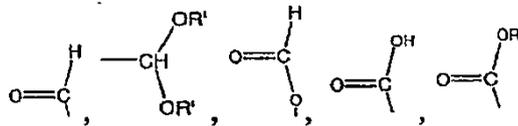
en la que X es una cadena C_{1-25} , Y se selecciona del grupo que consiste en:



10

-OH, -H, alquilo, alcoxi, halógeno, acetoxi y grupos funcionales aromáticos; y

Z se selecciona del grupo que consiste en:



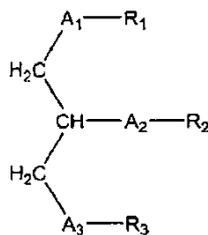
15

y -OH,

mientras que R' es alquilo C_{1-4} ; y

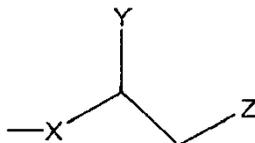
(iii) R_3 se selecciona del grupo que consiste en H, fosfato, fosfoetanolamina, ácido fosfoetanolamina-N-glutámico y fosfoserina.

20 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un compuesto de fórmula:

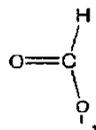


o un estereoisómero, un isómero óptico, un enantiómero, una mezcla racémica o una mezcla estereoisomérica del mismo, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que

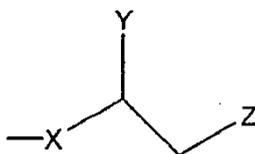
- 5 (i) A_1 , A_2 y A_3 se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en O y S;
- (ii) R_1 se selecciona del grupo que consiste en dodecilo, octadecilo, octilo, eicosanilo, cis-9-hexadecenilo, (2-octilo)dodecilo y (15-carboxi)pentadecilo;
- (iii) R_2 se selecciona del grupo que consiste en una cadena alquilo de 2 - 28 carbonos de longitud y



10 en la que X es un alquilo C_{1-25} , Y se selecciona del grupo que consiste en:

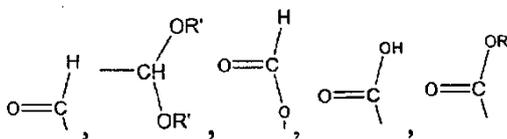


15 -OH, -H, alquilo, alcoxi, halógeno, acetoxi y grupos funcionales aromáticos; con la condición de que si R_1 es distinto a (15-carboxi)pentadecilo, R_2 es



como se ha definido anteriormente; y

20 Z se selecciona del grupo que consiste en:



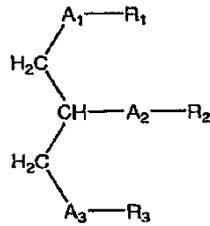
y -OH,

25 en la que R' es alquilo C_{1-4} ; y

(iv) R_3 se selecciona del grupo que consiste en H, acilo, alquilo, fosfate, fosfocolina, fosfoetanolamina, ácido fosfoetanolamina-N-glutárico, fosfoserina y fosfoinositol.

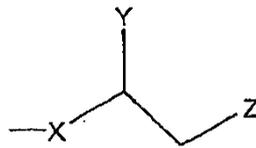
De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un compuesto de fórmula:

30



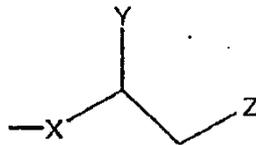
o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que:

- 5 (i) A_1 , A_2 y A_3 se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en O y S;
 (ii) R_1 se selecciona del grupo que consiste en dodecilo, octadecilo, octilo, eicosanilo, cis-9-hexadecenilo, (2-octilo)dodecilo y (15-carboxi)pentadecilo;
 (iii) R_2 se selecciona del grupo que consiste en una cadena alquilo de 2 - 28 carbonos de longitud y



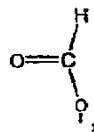
10

Siempre que si R_1 es distinto a (15-carboxi)pentadecilo, R_2 es



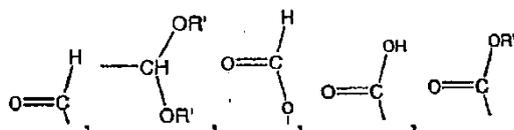
15

en la que X es una cadena C_{1-25} , Y se selecciona del grupo que consiste en:



20

-OH, -H, alquilo, alcoxi, halógeno, acetoxi y grupos funcionales aromáticos; y
 Z se selecciona del grupo que consiste en:



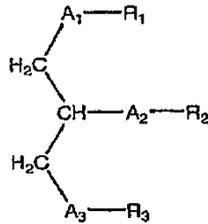
25

y -OH,
 mientras que R' es alquilo C_{1-4} ; y

(iv) R₃ se selecciona del grupo que consiste en H, acilo, alquilo, fosfate, fosfocolina, fosfoetanolamina, ácido fosfoetanolamina-N-glutárico, fosfoserina y fosfoinositol.

De acuerdo con un aspecto (no reivindicado) de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un compuesto de fórmula:

5

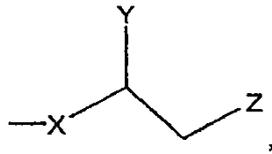


o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que:

(i) A₁ es S y A₂ y A₃ son cada uno O;

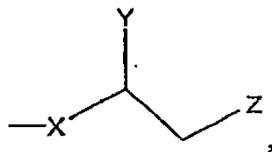
10

(ii) R₁ y R₂ se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en una cadena alquilo de 2 - 28 carbonos de longitud y



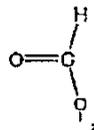
15

con la condición de que al menos uno de R₁ y R₂ sea



en la que X es una cadena C₁₋₂₅, Y se selecciona del grupo que consiste en:

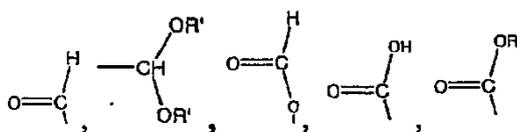
20



-OH, -H, alquilo, alcoxi, halógeno, acetoxi y grupos funcionales aromáticos; y

Z se selecciona del grupo que consiste en:

25



y $-\text{OH}$,

mientras que R' es alquilo C_{1-4} ; y

- 5 (iii) R_3 se selecciona del grupo que consiste en H, acilo, alquilo, fosfato, fosfocolina, fosfoetanolamina, ácido fosfoetanolamina-N-glutárico, fosfoserina y fosfoinositol.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

- 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfato (CI-201-PA) (no de acuerdo con la invención);
- 10 1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (no de acuerdo con la invención);
- 1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (CI-208) (no de acuerdo con la invención);
- 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-202) (no de acuerdo con la invención);
- 1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-206) (no de acuerdo con la invención);
- 1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicero-3-fosfocolina (CI-205) (no de acuerdo con la invención);
- 15 1-hexadecil-2-(6-carboxi)hexanil-glicero-3-fosfocolina (CI-203) (no de acuerdo con la invención);
- 1-dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (CI-209);
- Ácido 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina-N-glutárico (CI-210) (no de acuerdo con la invención);
- 1-((15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (CI-213);
- 20 1-((15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-214);
- 1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (CI-215);
- 1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-216);
- 1-hexadecil-2-(2-carboxi)etil-glicero-3-fosfocolina (CI-217) (no de acuerdo con la invención);
- 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (1-S-CI-201) (no de acuerdo con la invención);
- 25 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (1-S-CI-202) (no de acuerdo con la invención);
- 1-hexadecil-2-(5,6-dihidroxi)hexanil-glicero-3-fosfocolina (di-OH) (no de acuerdo con la invención);
- 1-((-cis-9-hexadecenil)-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina;
- 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicerol (no de acuerdo con la invención);
- 1-hexadecil-2-(5',5'-dietoxipentil)-glicero-3-fosfocolina (diEtAc) (no de acuerdo con la invención);
- 30 1-hexadecil-2-(5',5'-dimetoxipentil)-glicero-3-fosfocolina (diMetAc) (no de acuerdo con la invención);
- 1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (CI-207);
- 1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina;
- 1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (CI-219);
- 1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-220);
- 35 1-((2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (VB-221);
- 1-((2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (VB-222); y
- 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoserina (VB-223).

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, un compuesto en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona el compuesto descrito en el presente documento para su uso en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una inflamación asociada con un lípido oxidado endógeno.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona el compuesto descrito en el presente documento para su uso en la fabricación de un medicamento para disminuir un nivel de una citocina seleccionada del grupo que consiste en interleucina-12 e interleucina-23 en un sujeto.

10 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona el compuesto descrito en el presente documento para su uso en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno en el que disminuir un nivel de una citocina seleccionada del grupo que consiste en interleucina-12 e interleucina-23 es beneficioso.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, R₁ es como se define en la reivindicación 1.

15 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el compuesto descrito en el presente documento se identifica para su uso en el tratamiento o prevención de una inflamación asociada con un lípido oxidado endógeno.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el compuesto descrito en el presente documento para su uso en un procedimiento para disminuir un nivel de una citocina seleccionada del grupo que consiste en interleucina-12 e interleucina-23.

20 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el compuesto descrito en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en el que disminuir un nivel de una citocina seleccionada del grupo que consiste en interleucina-12 e interleucina-23 es beneficioso.

25 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica se envasa en un material de envasado y se identifica en impresión, en o sobre el material de envasado, para su uso en el tratamiento o prevención de una inflamación asociada con un lípido oxidado endógeno.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica se envasa en un material de envasado y se identifica en impresión, en o sobre el material de envasado, para disminuir un nivel de una citocina seleccionada del grupo que consiste en interleucina-12 e interleucina-23.

30 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica se envasa en un material de envasado y se identifica en impresión, en o sobre el material de envasado, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en el que disminuir un nivel de una citocina seleccionada del grupo que consiste en interleucina-12 e interleucina-23 es beneficioso.

35 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la inflamación se asocia con una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en una enfermedad o trastorno inflamatorio idiopático, una enfermedad o trastorno inflamatorio crónico, una enfermedad o trastorno inflamatorio agudo, una enfermedad o trastorno autoinmunitario, enfermedad o trastorno infeccioso, una enfermedad o trastorno maligno inflamatorio, una enfermedad o trastorno inflamatorio relacionado con trasplante, una enfermedad o trastorno inflamatorio degenerativo, una enfermedad o trastorno asociado con hipersensibilidad, una enfermedad o trastorno cardiovascular inflamatorio, una enfermedad o trastorno cerebrovascular inflamatorio, una enfermedad o trastorno vascular periférico, una enfermedad o trastorno glandular inflamatorio, una enfermedad o trastorno gastrointestinal inflamatorio, una enfermedad o trastorno cutáneo inflamatorio, una enfermedad o trastorno hepático inflamatorio, una enfermedad o trastorno neurológico inflamatorio, una enfermedad o trastorno musculoesquelético inflamatorio, una enfermedad o trastorno renal inflamatorio, una enfermedad o trastorno reproductor inflamatorio, una enfermedad o trastorno sistémico inflamatorio, una enfermedad o trastorno del tejido conjuntivo inflamatorio, un tumor inflamatorio, necrosis, una enfermedad o trastorno inflamatorio relacionado con implantes, un proceso de envejecimiento inflamatorio, una enfermedad o trastorno de inmunodeficiencia y una enfermedad o trastorno pulmonar inflamatorio.

50 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y/o científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que la invención pertenece entiende habitualmente. Aunque en la práctica o análisis de las realizaciones de la invención se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen procedimientos y/o materiales de ejemplo. En caso de conflicto, la memoria de la patente, incluidas las definiciones, tendrá prioridad. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no están destinados a ser necesariamente limitantes.

55 **Breve descripción de las figuras**

Algunas realizaciones de la invención se describen en el presente documento únicamente a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas. Con referencia específica a continuación a las figuras con detalle, cabe destacar que los datos mostrados son a modo de ejemplo y con fines ilustrativos de las realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con las figuras pone de manifiesto para los expertos en la técnica cómo se pueden poner en práctica las realizaciones de la invención:

En las figuras:

La FIG. 1 es un gráfico que muestra la producción de IL12/23 p40 en células tratadas con varias dosis de CI-202 (cada barra representa 3 muestras); $P < 0,004$ para cada dosis en comparación con el control (0 $\mu\text{g/ml}$);

La FIG. 2 es un gráfico que muestra la expresión del ARNm de IL12/23 p40 en células tratadas con CI-201, CI-202 y fosfatidilcolina (PC) 2, 3 y 4 horas después del tratamiento;

La FIG. 3 presenta una fotografía de una transferencia de tipo Western que muestra fosfotirosina (p-tirosina) en muestras tratadas con 10 o 20 $\mu\text{g/ml}$ (18,5 o 37 μM) de CI-202, 10 o 20 $\mu\text{g/ml}$ (17 o 34 μM) de CI-201, fosfatidilcolina (PC) y PBS/1 % de etanol (sol); ERK1/2 se muestra como control para la carga de proteínas;

Las FIG. 4A y 4B son cada una gráficos que muestran los resultados de un experimento individual de análisis de la toxicidad de varias dosis de CI-202;

La FIG. 5 es un gráfico que muestra el desarrollo de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental inducida por MOG en ratones tratados con PBS o 4 mg/kg de CI-202;

La FIG. 6 es un gráfico que muestra el desarrollo de artritis inducida con colágeno en ratones tratados con CI-202 (análogo etanolamina de CI-201) y en ratones control.

La FIG. 7 es un gráfico que muestra la producción de IL12/23 p40 en células tratadas con varias dosis de CI-203 (cada barra representa 6 muestras) y los valores P en comparación con el control (0 $\mu\text{g/ml}$);

La FIG. 8 presenta una fotografía de una transferencia de tipo Western que muestra fosfotirosina (p-tirosina) en muestras tratadas con 1 o 20 $\mu\text{g/ml}$ (1,6 o 33 μM) de (R)-CI-203 (R-CI-203), y CI-203 racémico (rac-CI-203), 1 o 20 $\mu\text{g/ml}$ (1,7 o 34 μM) de (R)-CI-201 (R-CI-201) y (S)-CI-201 (S-CI-201), y 1 o 20 $\mu\text{g/ml}$ (1,3 o 26 μM) de fosfatidilcolina (Ph.Ch.); ERK1/2 se muestra como un control para la carga de proteínas;

Las FIG. 9A y 9B son cada una gráficos que muestran los resultados de un experimento individual de análisis de la toxicidad de varias dosis de CI-203;

La FIG. 10 es un gráfico que muestra la producción de IL12/23 p40 en células tratadas con varias dosis de CI-209 (cada barra representa 5 muestras) y los valores P ($P < 0,008$ para dosis de 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$, y $P < 0,016$ para dosis de 1, 2,5 y 5 $\mu\text{g/ml}$) en comparación con el control (0 $\mu\text{g/ml}$);

La FIG. 11 presenta una fotografía de una transferencia de tipo Western que muestra fosfotirosina (p-tirosina) en muestras tratadas con 20 $\mu\text{g/ml}$ (38 μM) de CI-209, CI-201 o fosfatidilcolina (PC) o con PBS/1 % de etanol (sol); ERK1/2 se muestra como control para la carga de proteínas;

Las FIG. 12A y 12B son cada una gráficos que muestran los resultados de un experimento individual de análisis de la toxicidad de varias dosis de CI-209;

La FIG. 13 es un gráfico que muestra la producción de IL12/23 p40 en células tratadas con varias dosis de CI-210 (cada barra representa 4 muestras) y los valores P ($P < 0,029$ para dosis de 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$, y $P < 0,057$ para dosis de 2,5 y 5 $\mu\text{g/ml}$) en comparación con el control (0 $\mu\text{g/ml}$);

La FIG. 14 presenta una fotografía de una transferencia de tipo Western que muestra fosfotirosina (p-tirosina) en muestras tratadas con 20 $\mu\text{g/ml}$ (31 μM) de CI-210, CI-201 o fosfatidilcolina (PC) o con PBS/1 % de etanol (sol); ERK1/2 se muestra como control para la carga de proteínas;

Las FIG. 15A y 15B son cada una gráficos que muestran los resultados de un experimento individual de análisis de la toxicidad de varias dosis de CI-210;

La FIG. 16 es un gráfico que muestra la producción de IL12/23 p40 en células tratadas con varias dosis de CI-216 (cada barra representa 4 muestras) y los valores P en comparación con el control (0 $\mu\text{g/ml}$);

La FIG. 17 presenta una fotografía de una transferencia de tipo Western que muestra fosfotirosina (p-tirosina) en muestras tratadas con 10 o 20 $\mu\text{g/ml}$ (17 o 34 μM) de CI-215, o con fosfatidilcolina (PC) o con PBS/1 % de etanol (sol); ERK1/2 se muestra como control para la carga de proteínas;

La FIG. 18 presenta una fotografía de una transferencia de tipo Western que muestra fosfotirosina (p-tirosina) en muestras tratadas con 10 o 20 $\mu\text{g/ml}$ (15 o 30 μM) de CI-216, 10 o 20 $\mu\text{g/ml}$ (17 o 34 μM) de CI-201, fosfatidilcolina (PC) o PBS/1 % de etanol (sol); ERK1/2 se muestra como control para la carga de proteínas;

- La FIG. 19 presenta una fotografía de una transferencia de tipo Western que muestra fosfotirosina (p-tirosina) en muestras tratadas con 20 µg/ml (38 µM) de CI-206 o fosfatidilcolina (PC) o con PBS/1 % de etanol (sol); ERK1/2 se muestra como control para la carga de proteínas;
- 5 La FIG. 20 presenta una fotografía de una transferencia de tipo Western que muestra fosfotirosina (p-tirosina) en muestras tratadas con 20 µg/ml (35 µM) de CI-205, CI-201 o fosfatidilcolina (PC) o con PBS/1 % de etanol (sol); ERK1/2 se muestra como control para la carga de proteínas;
- Las FIG. 21A y 21B son cada una gráficos que muestran los resultados de un experimento individual de análisis de la toxicidad de varias dosis de CI-206;
- 10 Las FIG. 22A y 22B son cada una gráficos que muestran los resultados de un experimento individual de análisis de la toxicidad de varias dosis de CI-205;
- La FIG. 23 presenta una fotografía de una transferencia de tipo Western que muestra fosfotirosina (p-tirosina) en muestras tratadas con 20 µg/ml (34 µM) de CI-208, CI-201 o fosfatidilcolina (PC); α-tubulina (α-Tub) se muestra como control para la carga de proteínas;
- 15 Las FIG. 24A y 24B son cada una gráficos que muestran los resultados de un experimento individual de análisis de la toxicidad de varias dosis de CI-208;
- Las FIG. 25A y 25B son cada una gráficos que muestran los resultados de un experimento individual de análisis de la toxicidad de varias dosis de CI-213;
- Las FIG. 26A y 26B son cada una gráficos que muestran los resultados de un experimento individual de análisis de la toxicidad de varias dosis de CI-214;
- 20 La FIG. 27 presenta una fotografía de una transferencia de tipo Western que muestra fosfotirosina (p-tirosina) en muestras tratadas con 10 o 20 µg/ml (18 o 36 µM) de CI-217, 10 o 20 µg/ml (17 o 34 µM) de CI-201, fosfatidilcolina (PC) o PBS/1 % de etanol (sol); ERK1/2 se muestra como control para la carga de proteínas;
- La FIG. 28 presenta una fotografía de una transferencia de tipo Western que muestra fosfotirosina (p-tirosina) en muestras tratadas con 10 o 20 µg/ml (31 µM) de CI-219 y 20 µg/ml (34 µM) de CI-201 o fosfatidilcolina (PC) o con PBS/1 % de etanol (sol); ERK1/2 se muestra como control para la carga de proteínas;
- 25 La FIG. 29 presenta una fotografía de una transferencia de tipo Western que muestra fosfotirosina (p-tirosina) en muestras tratadas con 10 o 20 µg/ml (34 µM) de CI-220 y 20 µg/ml (34 µM) de CI-201 o fosfatidilcolina (PC) o con PBS/1 % de etanol (sol); ERK1/2 se muestra como control para la carga de proteínas;
- Las FIG. 30A y 30B son cada una gráficos que muestran los resultados de un experimento individual de análisis de la toxicidad de varias dosis de CI-201-PA;
- 30 La FIG. 31 presenta una fotografía de una transferencia de tipo Western que muestra fosfotirosina (p-tirosina) en muestras tratadas con 10 o 20 µg/ml (17 o 34 µM) de 1-S-CI-201 (CI-S-201), 10 o 20 µg/ml (17 o 34 µM) de CI-201, fosfatidilcolina (PC) o PBS/1 % de etanol (sol); ERK1/2 se muestra como control para la carga de proteínas;
- 35 La FIG. 32 presenta una fotografía de una transferencia de tipo Western que muestra fosfotirosina (p-tirosina) en muestras tratadas con 10 o 20 µg/ml (18 o 36 µM) de 1-S-CI-202 (CI-S-202), 10 o 20 µg/ml (18,5 o 37 µM) de CI-202, 10 o 20 µg/ml (17 o 34 µM) de CI-201, fosfatidilcolina (PC) o PBS/1 % de etanol (sol); ERK1/2 se muestra como control para la carga de proteínas;
- 40 Las FIG. 33A y 33B son cada una gráficos que muestran los resultados de un experimento individual de análisis de la toxicidad de varias dosis de di-OH.
- La FIG. 34 es un gráfico que muestra el área de lesiones ateroscleróticas en ratones tratados con di-OH y en ratones control.
- La FIG. 35 es un gráfico que muestra el área de lesiones ateroscleróticas en ratones tratados con diMeAc y en ratones control.
- 45 Las FIG. 36A y 36B son cada una gráficos que muestran los resultados de un experimento individual de análisis de la toxicidad de varias dosis de diEtAc;
- La FIG. 37 presenta una fotografía de una transferencia de tipo Western que muestra fosfotirosina (p-tirosina) en muestras tratadas con 1, 5, 10 o 20 µg/ml (1,7, 8,3, 16,7 o 33,3 µM) de VB-223 o PBS/1 % de etanol (sol); ERK1/2 se muestra como control para la carga de proteínas;
- 50 La FIG. 38 presenta una fotografía de una transferencia de tipo Western que muestra fosfotirosina (p-tirosina) en muestras tratadas con 1, 5, 10 o 20 µg/ml (1,6, 8, 16 o 32 µM) de VB-221 o PBS/1 % de etanol (sol);

ERK1/2 se muestra como control para la carga de proteínas; y

La FIG. 39 presenta una fotografía de una transferencia de tipo Western que muestra fosfotirosina (p-tirosina) en muestras tratadas con 1, 5, 10 o 20 µg/ml (1,7, 8,4, 16,8 o 33,6 µM) de VB-222 o PBS/1 % de etanol (sol); ERK1/2 se muestra como control para la carga de proteínas.

5 **Descripción de realizaciones específicas de la invención**

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a nuevos lípidos oxidados y a procedimientos que usan lípidos oxidados para tratar o prevenir una inflamación asociada con lípidos oxidados endógenos. Los lípidos oxidados descritos en el presente documento se pueden usar en el tratamiento o prevención de enfermedades y trastornos asociados con inflamación tales como, por ejemplo, aterosclerosis y trastornos relacionados, enfermedades o trastornos autoinmunitarios y enfermedades o trastornos proliferativos.

Los principios y operación de la presente invención se pueden entender mejor con referencia a las figuras y descripciones adjuntas.

Antes de explicar al menos una realización de la invención con detalle, debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ilustrados mediante los Ejemplos. La invención puede abarcar otras realizaciones o se puede practicar o llevar a cabo de varias formas. Asimismo, debe entenderse que las expresiones y la terminología empleadas en el presente documento se usan con una finalidad descriptiva y no deben considerarse limitantes.

Las pruebas experimentales y clínicas indican un papel causante de los componentes LDL oxidados (LDL ox) y LDL en la etiología de una respuesta inflamatoria excesiva en la aterosclerosis. Se ha demostrado que la reactividad inmunitaria celular y humoral a las placas relacionadas con las LDL oxidadas, lo que sugiere un importante componente autoinmunitario anti-LDL oxidada en la aterogénesis. Por tanto, las LDL, LDL oxidadas y componentes de las mismas han sido las dianas de numerosas terapias para la prevención y tratamiento de cardiopatías, enfermedades cerebrovasculares y enfermedades vasculares periféricas.

Un papel de los fosfolípidos oxidados en el tratamiento de la inflamación se divulga en, por ejemplo, la solicitud de patente internacional n° PCT/IL2004/000453 (n° de publicación WO 04/106486) y la solicitud de patente de EE.UU. N° 11/528.657 (n° de publicación 2007 - 0099868) del presente beneficiario.

CI-201 (también denominado en el presente documento y en la técnica VB-201) es un prometedor fosfolípido oxidado que actualmente se encuentra en ensayos clínicos avanzados para el tratamiento de afecciones inflamatorias tales como la aterosclerosis.

En un intento de mejorar el tratamiento de la inflamación y las enfermedades y trastornos asociados con lípidos oxidados, los presentes inventores han preparado nuevos fosfolípidos oxidados y compuestos estructuralmente relacionados, que se han diseñado para exhibir un efecto antiinflamatorio mejorado y/o un funcionamiento farmacológico mejorado.

El efecto antiinflamatorio mejorado puede determinarse fácilmente mediante modelos *in vitro* e *in vivo* conocidos para procesos inflamatorios y se puede exhibir mediante un efecto terapéutico mejorado para una enfermedad a tratar, como se detalla adicionalmente más adelante en el presente documento. El funcionamiento farmacológico mejorado incluye bioestabilidad mejorada, biodisponibilidad, toxicidad reducida y, además, estabilidad mejorada en la producción, formulación y/o almacenamiento. Estas características también se pueden determinar mediante experimentos fácilmente reconocidos por los expertos en la técnica y como se detalla adicionalmente más adelante en el presente documento.

Como se demuestra en la sección Ejemplos siguiente, mientras que se reduce la presente invención a práctica, de hecho se confirmó que los lípidos oxidados recién diseñados descritos en el presente documento modulan una producción de citocinas asociada con la respuesta inmunitaria y/o inflamatoria a LDL oxidadas endógenas, de modo que exhiben una capacidad para reducir una respuesta inflamatoria en enfermedades inflamatorias tales como, entre otros, aterosclerosis y artritis reumatoide.

Como se demuestra adicionalmente en la sección Ejemplos siguiente, los lípidos oxidados recién diseñados descritos en el presente documento modulan la fosforilación de la tirosina, similar al CI-201, de modo que se indica que estos lípidos oxidados recién diseñados comparten efectos biológicos (por ejemplo, efectos antiinflamatorios) que previamente se ha demostrado que exhibe CI-201.

Como se demuestra adicionalmente en la sección de Ejemplos siguiente, los compuestos descritos en el presente documento exhiben menos toxicidad y exhiben efectos biológicos a las dosis a las que los compuestos son sustancialmente no tóxicos.

Las FIG. 1 y 2 muestran inhibición por el compuesto de ejemplo CI-202 de producción de la subunidad p40 de las citocinas proinflamatorias interleucina-12 e interleucina-23. La FIG. 3 muestra la modulación de la fosforilación de la tirosina por CI-202 similar a la exhibida por CI-201. Las FIG. 4A y 4B muestran perfiles de toxicidad de CI-202. La

FIG. 5 muestra que CI-202 es terapéuticamente eficaz en un modelo de encefalomiélitis autoinmunitaria en ratón (un modelo experimental de esclerosis múltiple humano y encefalomiélitis diseminada aguda). La FIG. 6 muestra que CI-202 es terapéuticamente eficaz en un modelo de artritis de ratón.

5 La FIG. 7 muestra inhibición por el compuesto de ejemplo CI-203 de producción de la subunidad p40 de las citocinas proinflamatorias interleucina-12 e interleucina-23. La FIG. 8 muestra la modulación de la fosforilación de la tirosina por CI-202 similar a la exhibida por CI-203. Las FIG. 9A y 9B muestran los perfiles de toxicidad de CI-203.

La FIG. 10 muestra inhibición por el compuesto de ejemplo CI-209 de producción de la subunidad p40 de las citocinas proinflamatorias interleucina-12 e interleucina-23. La FIG. 11 muestra la modulación de la fosforilación de la tirosina por CI-209. Las FIG. 12A y 12B muestran los perfiles de toxicidad de CI-209.

10 La FIG. 13 muestra inhibición por el compuesto de ejemplo CI-210 de producción de la subunidad p40 de las citocinas proinflamatorias interleucina-12 e interleucina-23. La FIG. 14 muestra la modulación de la fosforilación de la tirosina por CI-210. Las FIG. 15A y 15B muestran los perfiles de toxicidad de CI-210.

15 La FIG. 16 muestra inhibición por el compuesto de ejemplo CI-216 de producción de la subunidad p40 de las citocinas proinflamatorias interleucina-12 e interleucina-23. La FIG. 18 muestra la modulación de la fosforilación de la tirosina por CI-216 similar a la exhibida por CI-203.

La FIG. 17 muestra la modulación de la fosforilación de la tirosina por CI-215.

La FIG. 19 modulación de la fosforilación de la tirosina por el compuesto de ejemplo CI-206. Las FIG. 21A y 21B muestran los perfiles de toxicidad de CI-206.

20 La FIG. 20 muestra la modulación de la fosforilación de la tirosina por el compuesto de ejemplo CI-205 similar a la exhibida por CI-201. Las FIG. 22A y 22B muestran los perfiles de toxicidad de CI-205.

La FIG. 23 muestra la modulación de la fosforilación de la tirosina por el compuesto de ejemplo CI-208 similar a la exhibida por CI-201. Las FIG. 24A y 24B muestran los perfiles de toxicidad de CI-208.

Las FIG. 25A y 25B, y 26A y 26B, muestran los perfiles de toxicidad de los compuestos de ejemplo CI-213 y CI-214, respectivamente.

25 La FIG. 27 muestra la modulación de la fosforilación de la tirosina por el compuesto de ejemplo CI-217 similar a la exhibida por CI-201.

La FIG. 28 muestra la modulación de la fosforilación de la tirosina por el compuesto de ejemplo CI-219 similar a la exhibida por CI-201.

30 La FIG. 29 muestra la modulación de la fosforilación de la tirosina por el compuesto de ejemplo CI-220 similar a la exhibida por CI-201.

Las FIG. 30A y 30B muestran los perfiles de toxicidad del compuesto de ejemplo CI-201-PA. La FIG. 31 muestra la modulación de la fosforilación de la tirosina por el compuesto de ejemplo -S-CI-201 similar a la exhibida por CI-201.

La FIG. 32 muestra la modulación de la fosforilación de la tirosina por el compuesto de ejemplo 1-S-CI-20 similar a la exhibida por CI-201.

35 La FIG. 34 muestra que el compuesto de ejemplo di-OH es un modelo de aterosclerosis de ratón terapéuticamente eficaz. Las FIG. 33A y 33B muestran los perfiles de toxicidad de di-OH.

La FIG. 35 muestra que el compuesto de ejemplo diMeAc es un modelo de aterosclerosis en ratón terapéuticamente eficaz. Las FIG. 36A y 36B muestran los perfiles de toxicidad de diEtAc, un compuesto estrechamente relacionado con diMeAc.

40 Las FIG. 37 - 39 muestra la modulación de la fosforilación de tirosina por los compuestos de ejemplo VB-223, VB-221 y VB-222, respectivamente.

Por tanto, mediante ensayos *in vitro* se ha demostrado que los compuestos de ejemplo descritos en el presente documento son biológicamente activos y se ha confirmado que algunos de los compuestos son terapéuticamente eficaces *in vivo*. El funcionamiento del lípido oxidado que todavía no se ha analizado *in vivo* puede analizarse además en modelos animales adecuados tales como, por ejemplo, los descritos en la sección Ejemplos más adelante en el presente documento, en la solicitud de patente internacional nº PCT/IL2004/000453 (nº de publicación WO 04/106486) y la solicitud de patente de EE.UU. Nº 11/528.657 (nº de publicación 2007 - 0099868), y en modelos diseñados como se describe en, por ejemplo, Singh y col., *Clinical Chemistry* 51:12, 2252 - 2256 (2005).

50 La bioestabilidad de los lípidos oxidados descritos en el presente documento se mejora debido a la presencia de enlaces éter y/o de sulfuro en lugar de los enlaces éster presentes en la mayoría de los lípidos. La bioestabilidad normalmente mejora el efecto terapéutico de un compuesto. La bioestabilidad de los lípidos oxidados se puede

determinar mediante, por ejemplo, análisis de su degradación enzimática mediante la fosfolipasa C usando ELISA o mediciones de la absorbancia.

5 Ventajosamente se puede reconocer que los lípidos oxidados descritos en el presente documento exhiben un efecto mejorado en el tratamiento o la prevención de la inflamación asociada con lípidos oxidados endógenos en términos de parámetros terapéuticos y/o farmacocinéticos mejorados.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto de las realizaciones de la presente invención se proporcionan nuevos lípidos oxidados (por ejemplo, fosfolípidos oxidados) como se describe en el presente documento.

De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfato (también denominado en el presente documento "CI-201-PA"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina. De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (también denominada en el presente documento "CI-208"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (también denominada en el presente documento "CI-202"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicero-3-fosfoetanolamina (también denominada en el presente documento "CI-206"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicero-3-fosfocolina (también denominada en el presente documento "CI-205"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-hexadecil-2-(6-carboxi)hexanil-glicero-3-fosfocolina (también denominada en el presente documento "CI-203"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (también denominada en el presente documento "CI-209"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es ácido 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina-N-glutárico (también denominada en el presente documento "CI-210"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (también denominada en el presente documento "CI-213"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (también denominada en el presente documento "CI-214"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (también denominada en el presente documento "CI-215"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (también denominada en el presente documento "CI-216"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-hexadecil-2-(2-carboxi)etil-glicero-3-fosfocolina (también denominada en el presente documento "CI-217"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (también denominada en el presente documento "1-S-CI-201"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (también denominada en el presente documento "1-S-CI-202"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-hexadecil-2-(5,6-carboxi)hexanil-glicero-3-fosfocolina (también denominada en el presente documento "di-OH"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-(cis-9-hexadecenil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina. De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicerol. De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-hexadecil-2-(5',5'-dietoxipentil)-glicero-3-fosfocolina (también denominada en el presente documento "diEtAc"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-hexadecil-2-(5',5'-dimetoxipentil)-glicero-3-fosfocolina (también denominada en el presente documento "diMeAc"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (también denominada en el presente documento "CI-207"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-octil-2-(4-carboxi)butilglicero-3-fosfoetanolamina. De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (también denominada en el presente documento "CI-219"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (también denominada en el presente documento "CI-220"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (también denominada en el presente documento "VB-221"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (también denominada en el presente documento "VB-222"). De acuerdo con una realización de ejemplo, el lípido oxidado es 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoserina (también denominada en el presente documento "VB-223").

Como se usa en el presente documento, el prefijo "1-S-" hace referencia a un compuesto en el que el átomo de oxígeno en la posición 1 del armazón de glicerol (*sn*-1) está sustituido por un átomo de azufre, de forma que el compuesto es un derivado de 1-tioglicerol en lugar de un derivado de glicerol.

Los prefijos "CI-" y "VB-" se usan en el presente documento de forma intercambiable.

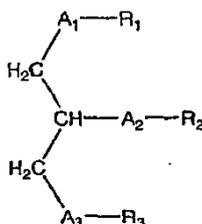
55 Dependiendo de los sustituyentes, algunos átomos de carbono en cada uno de los compuestos descritos en el presente documento, pueden ser quirales o no quirales. Por tanto, en los compuestos de ejemplo descritos anteriormente en el presente documento, el átomo de carbono en la posición 2 del armazón de glicerol es quiral. Cualquier átomo de carbono quiral que está presente en los compuestos descritos en el presente documento pueden estar en una configuración R y una configuración S o como un racemato. Por tanto, las presentes realizaciones abarcan cualquier combinación de átomos de carbono quirales y racémicos, incluyendo todos los posibles estereoisómeros, isómeros ópticos y enantiómeros.

5 Como se demuestra en la sección Ejemplos siguientes, los compuestos de realizaciones de la presente invención se pueden sintetizar reteniendo una configuración del material de partida. Los compuestos de las presentes realizaciones pueden sintetizarse de forma selectiva en términos de la estereoquímica del grupo oxidado. Por tanto, seleccionando los materiales de partida adecuados y las condiciones de síntesis adecuadas, se pueden determinar la pureza óptica (por ejemplo, la inclusión de carbonos quirales y/o racémicos) y los estereoisómeros obtenidos de los compuestos resultantes. En los casos en los que se obtienen mezclas racémicas se pueden usar técnicas conocidas para separar los estereoisómeros y los isómeros ópticos. Dichas técnicas se describen en, por ejemplo, "Organic chemistry, cuarta edición por Paula Yurkanis Bruice, página 180 - 185 y página 214, Prentice Hall, Upper Sadde River, NJ 07458".

10 Los compuestos anteriores se pueden caracterizar de acuerdo con determinados nuevos elementos estructurales de los mismos.

15 Por tanto, algunos de los lípidos oxidados anteriores comprenden un armazón de glicerol al que está unida una cadena lateral oxidada en la posición 2 del mismo, en el que la cadena lateral oxidada se selecciona del grupo que consiste en (4-metilcarboxi)butilo, (3-carboxi)propilo, (6-carboxi)hexanilo, (2-carboxi)etilo, 5,6-dihidroxihexanilo, 5,5-dietoxipentilo y 5,5-dimetoxipentilo.

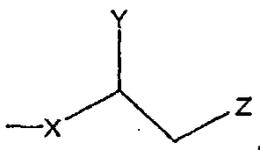
Por tanto, de acuerdo con algunas realizaciones (no reivindicadas) de la presente invención se proporciona compuestos representados de forma colectiva por una fórmula:



20

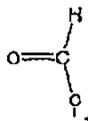
o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que:

- (i) A_1 , A_2 y A_3 se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en O y S;
- (ii) R_1 se selecciona del grupo que consiste en una cadena alquilo de 2 - 28 carbonos de longitud y



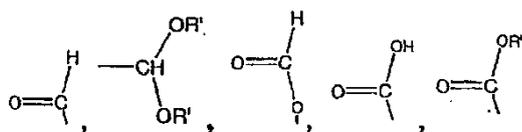
25

en la que X es una cadena C_{1-25} , Y se selecciona del grupo que consiste en:



30

-OH, -H, alquilo, alcoxi, halógeno, acetoxi y grupos funcionales aromáticos; y Z se selecciona del grupo que consiste en:



y -OH,

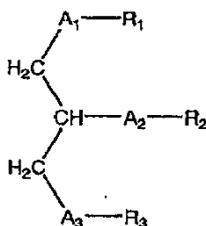
mientras que R' es alquilo C₁₋₄; y

- 5 (iii) R₂ se selecciona del grupo que consiste en (4-metilcarboxi)butilo, (3-carboxi)propilo, (6-carboxi)hexanilo, (2-carboxi)etilo, 5,6-dihidroxihexanilo, 5,5-dietoxipentilo y 5,5-dimetoxipentilo; y
- (iv) R₃ se selecciona del grupo que consiste en H, acilo, alquilo, fosfate, fosfocolina, fosfoetanolamina, ácido fosfoetanolamina-N-glutárico, fosfoserina y fosfoinositol.

De acuerdo con algunas realizaciones, R₁ es una cadena alquilo de 2 - 28 carbonos de longitud.

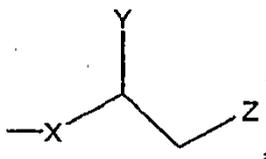
- 10 Algunos de los lípidos oxidados descritos en el presente documento anteriormente se pueden caracterizar porque comprenden un resto fosforilo en la posición 3 del mismo seleccionado del grupo que consiste en fosfato, fosfoetanolamina, ácido fosfoetanolamina-N-glutárico y fosfoserina o estando no fosforilado y no sustituido en la posición 3 (es decir, un átomo de hidrógeno está presente en la posición 3).

- 15 Por tanto, de acuerdo con algunas realizaciones (no reivindicadas) de la presente invención se proporciona compuestos representados de forma colectiva por una fórmula:



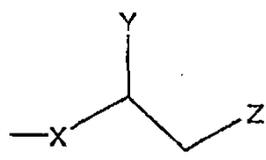
o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que:

- 20 (i) A₁, A₂ y A₃ se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en O y S;
- (ii) R₁ y R₂ se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en una cadena alquilo de 2 - 28 carbonos de longitud y

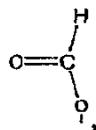


25

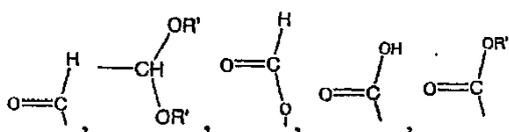
con la condición de que al menos uno de R₁ y R₂ sea



en la que X es una cadena C₁₋₂₅, Y se selecciona del grupo que consiste en:



5 -OH, -H, alquilo, alcoxi, halógeno, acetoxi y grupos funcionales aromáticos; y
Z se selecciona del grupo que consiste en:

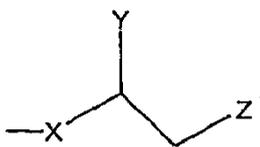


10 y -OH,

mientras que R' es alquilo C₁₋₄; y

(iii) R₃ se selecciona del grupo que consiste en H, fosfato, fosfoetanolamina, ácido fosfoetanolamina-N-glutárico y fosfoserina.

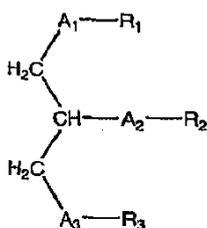
15 De acuerdo con algunas realizaciones, R₁ es una cadena alquilo de 2 - 28 carbonos de longitud. Debe apreciarse que en dichas realizaciones, R₂ es



20 Algunos de los lípidos oxidados descritos anteriormente en el presente documento se pueden caracterizar por que comprenden una cadena lateral en la posición 1 de los mismos seleccionados del grupo que consiste en dodecilo, octadecilo, octilo, eicosanilo, cis-9-hexadecenilo, (2-octilo)dodecilo y (15-carboxi)pentadecilo.

Por tanto, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención se proporciona compuestos representados de forma colectiva por una fórmula:

25



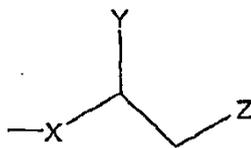
o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que:

(i) A₁, A₂ y A₃ se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en O y S;

(ii) R₁ se selecciona del grupo que consiste en dodecilo, octadecilo, octilo, eicosanilo, cis-9-hexadecenilo, (2-octilo)dodecilo y (15-carboxi)pentadecilo;

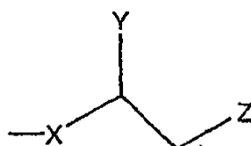
(iii) R₂ se selecciona del grupo que consiste en una cadena alquilo de 2 - 28 carbonos de longitud y

5

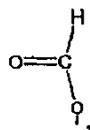


Siempre que si R₁ es distinto a (15-carboxi)pentadecilo, R₂ es

10



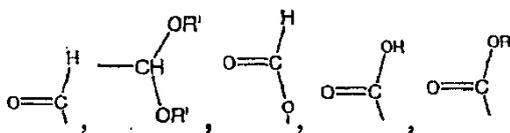
en la que X es una cadena C₁₋₂₅, Y se selecciona del grupo que consiste en:



15

-OH, -H, alquilo, alcoxi, halógeno, acetoxi y grupos funcionales aromáticos; y

Z se selecciona del grupo que consiste en:



20

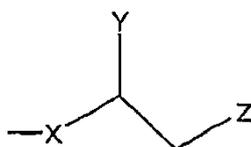
y -OH,

mientras que R' es alquilo C₁₋₄; y

(iv) R₃ se selecciona del grupo que consiste en H, acilo, alquilo, fosfate, fosfocolina, fosfoetanolamina, ácido fosfoetanolamina-N-glutárico, fosfoserina y fosfoinositol.

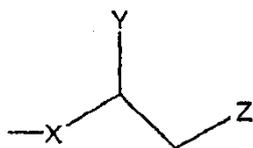
Debe apreciarse que un grupo (15-carboxi)pentadecilo descrito en el presente documento corresponde al resto

25



descrito en el presente documento, en el que X es una cadena alquilo de 13 carbonos, Y es hidrógeno y Z es -C(=O)OH.

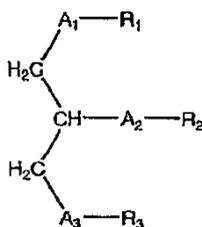
De un modo similar, (4-metilcarboxi)butilo, (3-carboxi)propilo, (6-carboxi)hexanilo, (2-carboxi)etilo, 5,6-dihidroxihexanilo, 5,5-dietoxipentilo y 5,5-dimetoxipentilo corresponde al resto



- 5 en el que Z es $-C(=O)OH$ (como para (3-carboxi)propilo, (6-carboxi)hexanilo y (2-carboxi)etilo), en el que Z es $-CH(OR')_2$ (como para 5,5-dietoxipentilo y 5,5-dimetoxipentilo), o en el que Z es $-OH$ (como para 5,6-dihidroxihexanilo).

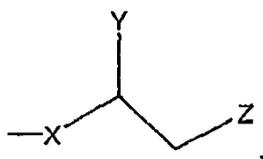
Algunos de los lípidos oxidados descritos anteriormente en el presente documento se pueden caracterizar por que comprenden un átomo de azufre en la posición 1 de los mismos y átomos de oxígeno en las posiciones 2 y 3 de los mismos.

- 10 Por tanto, de acuerdo con algunas realizaciones (no reivindicadas) de la presente invención se proporciona compuestos representados por una fórmula:

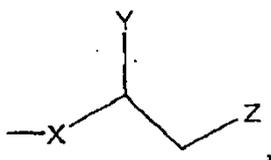


o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que:

- (i) A_1 es S y A_2 y A_3 son cada uno O;
- 15 (ii) R_1 y R_2 se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en una cadena alquilo de 2 - 28 carbonos de longitud y

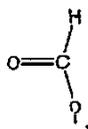


- 20 con la condición de que al menos uno de R_1 y R_2 sea



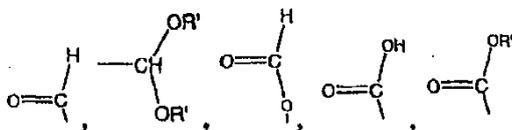
en la que X es una cadena C_{1-25} , Y se selecciona del grupo que consiste en:

- 25



-OH, -H, alquilo, alcoxi, halógeno, acetoxi y grupos funcionales aromáticos; y

Z se selecciona del grupo que consiste en:



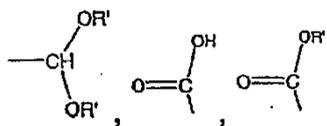
y -OH,

5 mientras que R' es alquilo C₁₋₄; y

(iii) R₃ se selecciona del grupo que consiste en H, acilo, alquilo, fosfato, fosfocolina, fosfoetanolamina, ácido fosfoetanolamina-N-glutárico, fosfoserina y fosfoinositol.

De acuerdo con algunas realizaciones, R₁ es una cadena alquilo de 2 - 28 carbonos de longitud.

10 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la variable Z descrita anteriormente en el presente documento se selecciona del grupo que consiste en:



y -OH.

15 De acuerdo con realizaciones óptimas de la presente invención, la variable Y se selecciona del grupo que consiste en H y -OH. En algunas realizaciones, Y es -OH cuando Z es -OH y/o -O-C(=O)H. En algunas realizaciones, Y es H cuando Z es -C(=O)H, -CH(OR')₂, -C(=O)OH y/o -C(=O)OR'.

De acuerdo con realizaciones de ejemplo, R' es un alquilo C₁₋₄ saturado no sustituido. Opcionalmente, R' se selecciona del grupo que consiste en etilo y metilo.

20 De acuerdo con realizaciones opcionales, la cadena alquilo de 2 - 28 carbonos de longitud descrita en el presente documento está saturada, a menos que se indique específicamente lo contrario. Opcionalmente, la cadena alquilo es no sustituida, a menos que se indique específicamente lo contrario.

25 De acuerdo con realizaciones opcionales, la variable X descrita en el presente documento es una cadena de alquilo saturada de 1 a 25 átomos de carbono de longitud, a menos que se indique específicamente lo contrario. Opcionalmente, la cadena alquilo es no sustituida, a menos que se indique específicamente lo contrario.

30 Como se usa a lo largo del presente documento, el término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo alifático saturado que incluye grupos de cadena lineal y de cadena ramificada. Preferentemente, el grupo alquilo tiene de 1 a 20 átomos de carbonos. Siempre que en el presente documento se indica un intervalo numérico, por ejemplo "1 - 20", implica que el grupo, en este caso el grupo alquilo, puede contener 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc., hasta e incluyendo 20 átomos de carbono. Más preferentemente, el alquilo es un alquilo de tamaño medio que tiene de 1 a 10 átomos de de carbono. Lo más preferentemente, a menos que se indique lo contrario, el alquilo es un alquilo inferior que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. El grupo alquilo puede estar sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido, el grupo sustituyente puede ser, por ejemplo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroalíclicico, halo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, tiohidroxilo, tioalcoxi, tioariloxi, ciano, nitro, azida, sulfinilo, sulfonilo, sulfonamida, fosfonilo, fosfinilo, oxo, carbonilo, tiocarbonilo, urea, tiourea, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, C-carboxi, O-carboxi, y amino, como estos términos se definen en el presente documento. En algunas realizaciones el alquilo está no sustituido.

40 Un grupo "cicloalquilo" se refiere a un grupo todo carbono de anillo monocíclico o condensado (es decir, anillos que comparten un par adyacente de átomos de carbono) en el que uno o más de los anillos no tienen un sistema de electrones pi completamente conjugado. Ejemplos, sin limitaciones, de grupos cicloalquilo son ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclopenteno, ciclohexano, ciclohexadieno, cicloheptano, cicloheptatrieno y adamantano. Un grupo cicloalquilo puede estar sustituido o insustituido. Cuando está sustituido, el grupo sustituyente puede ser, por ejemplo, alquilo, arilo, heteroarilo, heteroalíclicico, halo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, tiohidroxilo, tioalcoxi, tioariloxi, ciano, nitro, azida, sulfinilo, sulfonilo, sulfonamida, fosfonilo, fosfinilo, oxo, carbonilo, tiocarbonilo, urea, tiourea, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, C-carboxi, O-carboxi, y amino, como

estos términos se definen en el presente documento.

5 Un grupo "arilo", también denominado en el presente documento "grupo funcional aromático", se refiere a todos los grupos de carbono monocíclicos o policíclicos de anillo condensado (es decir, anillos que comparten pares adyacentes de átomos de carbono) que tienen un sistema de electrones pi completamente conjugados. Ejemplos, sin limitaciones, de grupos arilo son fenilo, naftalenilo y antracenilo. El grupo arilo puede estar sustituido o insustituido. Cuando está sustituido, el grupo sustituyente puede ser, por ejemplo, alquilo, cicloalquilo, heteroarilo, heteroalíclico, halo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, tiohidroxilo, tioalcoxi, tioariloxi, ciano, nitro, azida, sulfonilo, sulfinilo, sulfonamida, fosfonilo, fosfinilo, oxo, carbonilo, tiocarbonilo, urea, tiourea, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, C-carboxi, O-carboxi, y amino, como estos términos se definen en el presente documento.

15 Un grupo "heteroarilo" se refiere a un grupo de anillo monocíclico o condensado (e decir, anillos que comparten un par adyacente de átomos) que tiene en el(los) anillo(s) uno o más átomos, tales como, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y azufre y, además, que tiene un sistema de electrones pi completamente conjugado. Ejemplos, sin limitaciones, de grupos heteroarilo incluyen pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, piridina, pirimidina, quinolina, isoquinolina y purina. El grupo heteroarilo puede estar sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido, el grupo sustituyente puede ser, por ejemplo, alquilo, cicloalquilo, heteroarilo, heteroalíclico, halo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, tiohidroxilo, tioalcoxi, tioariloxi, ciano, nitro, azida, sulfonilo, sulfinilo, sulfonamida, fosfonilo, fosfinilo, oxo, carbonilo, tiocarbonilo, urea, tiourea, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, C-carboxi, O-carboxi, y amino, como estos términos se definen en el presente documento.

20 Un grupo "heteroalíclico" se refiere a un grupo anular monocíclico o condensado que tiene en el o los anillos uno o más átomos tales como nitrógeno, oxígeno y azufre. Los anillos pueden tener también uno o más dobles enlaces. No obstante, los anillos no tienen un sistema de electrones pi completamente conjugado. El grupo heteroalíclico puede estar sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido, el grupo sustituido puede ser, por ejemplo, un par de electrones, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, halo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, tiohidroxilo, tioalcoxi, tioariloxi, ciano, nitro, azida, sulfonilo, sulfinilo, sulfonamida, fosfonilo, fosfinilo, oxo, carbonilo, tiocarbonilo, urea, tiourea, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, C-carboxi, O-carboxi, y amino, como estos términos se definen en el presente documento. Ejemplos representativos son piperidina, piperazina, tetrahidrofurano, tetrahidropirano, morfina y similares.

Un grupo "hidroxilo" se refiere a un grupo -OH.

30 Un grupo "azida" se refiere a un grupo -N=N.

Un grupo "alcoxi" se refiere tanto a un grupo -O-alquilo como a un grupo -O-cicloalquilo tal como se define en el presente documento.

Un grupo "ariloxi" se refiere tanto a un grupo -O-arilo como a un grupo -O-heteroarilo, tal como se define en el presente documento.

35 Un grupo "tiohidroxilo" se refiere a un grupo -SH.

Un grupo "tioalcoxi" se refiere tanto a un grupo -S-alquilo como a un grupo -S-cicloalquilo tal como se define en el presente documento.

Un grupo "tioariloxi" se refiere tanto a un grupo -S-arilo como a un grupo -S-heteroarilo, tal como se define en el presente documento.

40 Un grupo "carbonilo" o "acilo" se refiere a un grupo -C(=O)-R, en el que R es hidrógeno, alquilo, alqueno, cicloalquilo, arilo, heteroarilo (unido a través de un carbono del anillo) y heteroalíclico (unido a través de un carbono del anillo), como se define en el presente documento.

Un grupo "aldehído" se refiere a un grupo carbonilo en el que R es hidrógeno.

Un grupo "tiocarbonilo" se refiere a un grupo -C(=S)-R, en el que R es como se define en el presente documento.

45 Un grupo "C-carboxi" se refiere a un grupo -C(=O)-O-R, en el que R es como se define en el presente documento.

Un grupo "O-carboxi" se refiere a un grupo RC(=O)-O-, en el que R es como se define en el presente documento.

Un grupo "acetoxi" se refiere a CH₃C(=O)-O-.

Un grupo "oxo" se refiere a un grupo =O.

Un grupo "ácido carboxílico" se refiere a un grupo C-carboxilo en el que R es hidrógeno.

50 Un "halo" o "halógeno" se refiere flúor, cloro, bromo o yodo.

Un grupo "sulfínilo" se refiere a un grupo $-S(=O)-R$ en el que R es como se define en el presente documento.

Un grupo "sulfonilo" se refiere a un grupo $-S(=O)_2-R$ en el que R es como se define en el presente documento.

Un grupo "sulfonamida" se refiere a un grupo $-S(=O)_2-NR_2$ o un grupo $RS(=O)_2-NR-$, siendo cada uno de los R como se define en el presente documento.

5 Un grupo "O-carbamilo" se refiere a un grupo $-OC(=O)-NR_2$, en el que cada R es como se define en el presente documento.

Un grupo "N-carbamilo" se refiere a un grupo $ROC(=O)-NR-$, en el que cada R es como se define en el presente documento.

10 Un grupo "O-tiocarbamilo" se refiere a un grupo $-OC(=S)-NR_2$, en el que cada R es como se define en el presente documento.

Un grupo "N-tiocarbamilo" se refiere a un grupo $ROC(=S)NR-$, en el que cada R es como se define en el presente documento.

Un grupo "amino" se refiere a un grupo NR_2 , en el que cada R es como se define en el presente documento.

15 Un grupo "C-amido" se refiere a un grupo $-C(=O)-NR_2$, en el que cada R es como se define en el presente documento.

Un grupo "N-amido" se refiere a un grupo $RC(=O)-NR-$, en el que cada R es como se define en el presente documento.

Un grupo "urea" se refiere a un grupo $-NRC(=O)-NR_2$, en el que cada R es como se define en el presente documento.

20 Un grupo "nitro" se refiere a un grupo $-NO_2$.

Un grupo "ciano" se refiere a un grupo $-C=N$.

El término "fosfonilo" o "fosfonato" describe un grupo $-P(=O)(OR)_2$, con R como se ha definido anteriormente en el presente documento.

25 El término "fosfinilo" describe un grupo $-PR_2$, siendo cada R como se ha definido anteriormente en el presente documento.

El término "tiourea" describe un grupo $-NR-C(=S)-NR-$, siendo cada R como se ha definido anteriormente en el presente documento.

30 Las presentes realizaciones abarcan adicionalmente cualquier sal, hidrato y solvato farmacéuticamente aceptable de los compuestos descritos anteriormente en el presente documento. En general, el término "profármaco" hace referencia a un agente que se convierte en el compuesto activo (el fármaco parental activo) *in vivo*. Los profármacos (no reivindicados) normalmente son útiles para facilitar la administración del fármaco parental. Por ejemplo, pueden estar biodisponibles mediante administración oral, mientras que el fármaco parental no. El profármaco puede también tener mejor solubilidad en las composiciones farmacéuticas en comparación con el fármaco parental. Asimismo, los profármacos a menudo se usan para alcanzar una liberación sostenida del compuesto activo *in vivo*.

35 Un ejemplo (no reivindicado), sin limitaciones, de un profármaco sería un compuesto como se describe en el presente documento que tiene uno o más restos de ácido carboxílico, que se administra como un éster (el "profármaco"). Dicho profármaco se hidroliza *in vivo* para proporcionar de este modo el compuesto libre (el fármaco parental). El éster seleccionado puede afectar a las características de solubilidad y a la tasa de hidrólisis del profármaco.

40 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una especie cargada del compuesto parental y su contraion, que normalmente se usa para modificar las características de solubilidad del compuesto parental y/o reducir cualquier irritación significativa en un organismo por el compuesto parental, mientras no se anulan la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Un ejemplo, sin limitaciones, de una sal farmacéuticamente aceptable sería un anión carboxilato y un catión tal como, entre otros, amonio, sodio, potasio y similares.

El término "solvato" se refiere a un complejo de estequiometría variable (por ejemplo, di-, tri-, tetra-, penta-, hexa-, etc.), que se forma con un soluto (el compuesto de las presentes realizaciones) y un disolvente, de modo que el disolvente no interfiere en la actividad biológica del soluto. Disolventes adecuados incluyen, por ejemplo, etanol, ácido acético y similares.

50 El término "hidrato" hace referencia a un solvato, como se ha definido anteriormente en el presente documento, en el que el disolvente es agua.

- 5 Como se detalla más adelante en el presente documento, los compuestos recién diseñados de las presentes realizaciones ejercen una actividad de inmunomodulación muy beneficiosa y, por tanto, se pueden usar en varias aplicaciones terapéuticas. Usando estos compuestos en aplicaciones terapéuticas implica la administración de los mismos *per se* o como parte de una composición farmacéutica en la que se mezcla con vehículos o excipientes adecuados.
- Por tanto, de acuerdo con otro aspecto de realizaciones de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, cualquiera de los compuestos descritos en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 Como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en el presente documento con otros componentes químicos, tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. La finalidad de una composición farmacéutica es facilitar la administración/dirigir de un compuesto a un organismo.
- En el presente documento, la expresión "ingrediente activo" se refiere a los compuestos (lípidos oxidados) descritos anteriormente en el presente documento responsables del efecto biológico.
- 15 En lo sucesivo en el presente documento, las frases "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable", que pueden usarse de forma intercambiable, hacen referencia a un vehículo o un diluyente que no produce una irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. En estas expresiones se incluye un adyuvante.
- 20 En el presente documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un ingrediente activo. Ejemplos, sin limitaciones, de excipientes incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, varios azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.
- Las técnicas de formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.
- 25 Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosa, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, incluidas inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas , intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.
- Como alternativa, se puede administrar la composición farmacéutica de un modo local más que sistémico, por ejemplo mediante inyección de la composición farmacéutica directamente en una región tisular de un paciente.
- 30 En una realización opcional de la presente invención, las composiciones farmacéuticas se diseñan para modular una respuesta inmunitaria y/o inflamatoria mediante administración mucosa.
- En otra realización opcional de la presente invención, las composiciones farmacéuticas se diseñan para modular una respuesta inmunitaria y/o inflamatoria mediante administración oral.
- 35 Opcionalmente, las composiciones farmacéuticas de realizaciones de la presente invención se diseñan para administración nasal o intraperitoneal, como se detalla a continuación en el presente documento.
- Las composiciones farmacéuticas de realizaciones la presente invención pueden fabricarse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo por medio de procedimientos convencionales de mezclado, disolución, granulación, formación de grageas, trituración, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización.
- 40 Por tanto, las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con las presentes realizaciones se pueden formular de un modo convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables, que comprenden excipientes y adyuvantes que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración escogida.
- 45 Para inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica invención se pueden formular en soluciones acuosas, por ejemplo en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o solución salina tamponada fisiológicamente. Para la administración transmucosa, en la formulación se usan penetrantes adecuados para atravesar la barrera. Tales penetrantes se conocen generalmente en la técnica.
- Para administración oral, la composición farmacéutica se puede formular fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten formular la composición farmacéutica como comprimidos, píldoras, pastillas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral se pueden fabricar usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, tras añadir las sustancias auxiliares adecuadas, si se desea, para obtener núcleos de
- 50

comprimidos o núcleos de grageas. Excipientes adecuados son, en concreto, cargas, tales como azúcares, incluidas lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa, tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal de los mismos, tal como alginato de sodio.

Los núcleos de pastillas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar soluciones de azúcar concentradas, que opcionalmente pueden contener goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis del compuesto activo.

Las composiciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas duras fabricadas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas fabricadas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener ingredientes activos mezclados con una carga, tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los ingredientes activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deberán estar en dosis adecuadas para la vía de administración específica.

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

Para la administración mediante inhalación nasal, los ingredientes activos para uso de acuerdo con realizaciones de la presente invención se liberan de forma conveniente en forma de presentación en pulverizador en aerosol a partir de un envase o un nebulizador presurizado con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula la cual administra una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina, para usar en un dispensador de modo que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

La composición farmacéutica descrita en el presente documento se pueden formular para administración parenteral, por ejemplo mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en monodosis en, por ejemplo, ampollas o en envases multidosis con, opcionalmente, un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma hidrosoluble. Adicionalmente se pueden preparar suspensiones de los ingredientes activos como suspensiones oleosas o a base de agua para inyección adecuadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo, triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones inyectables acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados para aumentar la solubilidad de los ingredientes activos y permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para reconstituir con un vehículo adecuado, por ejemplo una solución a base de agua apirógena estéril, antes de usar.

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

Composiciones farmacéuticas adecuadas para usar en el contexto de las presentes realizaciones incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para alcanzar el propósito previsto. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de ingredientes activos eficaces para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de un trastorno (por ejemplo, aterosclerosis) o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz entra bien en de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Para cualquier preparación usada en los procedimientos de realizaciones de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos *in vitro* con cultivos celulares. Por ejemplo, una dosis se puede formular en modelos animales para conseguir una concentración o título deseado. Tal información se puede usar después para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos.

- La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en el presente documento se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales *in vitro*, en cultivos celulares o en animales experimentales (por ejemplo, como se ilustra a continuación en el presente documento en la sección de Ejemplos). Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivos celulares e *in vitro* y estudios animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración usada. El médico individual escogerá la formulación exacta, la vía de administración y la dosis según la afección del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl y col., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1 pág. 1).
- La cantidad e intervalo de la dosis se puede ajustar individualmente para proporcionar niveles plasmáticos o cerebrales del ingrediente activo (concentración mínima eficaz, CME) que son suficientes para inducir o suprimir una inflamación (por ejemplo, angiogénesis). La CME variará para cada preparación, pero se puede estimar a partir de datos *in vitro*. Las dosis necesarias para alcanzar la CME dependerán de las características individuales y la vía de administración. Se pueden usar ensayos de detección para determinar las concentraciones plasmáticas.
- Dependiendo de la gravedad y la capacidad de respuesta de la afección a tratar, la administración puede ser una o una pluralidad de administraciones, durando el curso del tratamiento de varios días a varias semanas o hasta efectuar la cura o conseguir la disminución del estado de enfermedad.
- La cantidad de una composición a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se esté tratando, la gravedad de la afección, la manera de administración, el juicio del médico prescriptor etc.
- Las composiciones de realizaciones de la presente invención pueden presentarse, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador que, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contiene el ingrediente activo. El envase puede comprender, por ejemplo, papel de aluminio de metal o plástico, tal como un envase de tipo blíster. El envase o dispositivo dispensador puede estar acompañado de instrucciones para administración. El envase o dispositivo dispensador también puede acomodarse con una nota asociada con el recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, en la que se refleja la aprobación de la agencia de la forma de las composiciones o administración veterinaria o humana. Dicha nota puede ser, por ejemplo, el etiquetado aprobado por la Food and Drug Administration de EE.UU. para fármacos de prescripción médica o el prospecto aprobado. Las composiciones que comprenden una preparación descrita en el presente documento formuladas en un vehículo farmacéutico compatible también se pueden preparar, introducir en un contenedor adecuado y etiquetarse para el tratamiento de una afección para la que están indicadas, como se detalla adicionalmente más adelante en el presente documento.
- Por tanto, en una realización opcional de la presente invención, la composición farmacéutica se envasa en un material de envasado y se identifica en impresión, en o sobre el material de envasado, para su uso en el tratamiento o prevención de una inflamación asociada con un lípido oxidado endógeno. Una lista de ejemplos representativos de enfermedades y trastornos asociados con dicha inflamación se proporciona a continuación en el presente documento.
- Como alternativa o adicionalmente, la composición farmacéutica se envasa en un material de envasado y se identifica en impresión, sobre o en el material de envasado, para su uso en la disminución de un nivel de una citocina seleccionada del grupo que consiste en interleucina-12 e interleucina-23 y/o para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en el que disminuir un nivel de una citocina seleccionada del grupo que consiste en interleucina-12 e interleucina-23 es beneficioso.
- Como se describe adicionalmente con detalle más adelante en el presente documento, la composición farmacéutica de las presentes realizaciones puede incluir además un compuesto adicional, que es útil en el tratamiento o prevención de la inflamación descrita en el presente documento.
- Como se describe con detalle en la sección de Ejemplos a continuación, se ha encontrado que los ejemplos representativos de los compuestos recién diseñados de realizaciones de la presente invención son eficaces en la modulación de un nivel de citocinas asociadas con una respuesta inmunitaria y con inflamación. Estos resultados indican que estos compuestos son eficaces para inhibir una respuesta inmunitaria y la inflamación asociada con un lípido oxidado endógeno.
- Por tanto, de acuerdo con otro aspecto de realizaciones divulgadas en el presente documento se proporciona un procedimiento de tratamiento o prevención de una inflamación asociada con un lípido oxidado endógeno. El procedimiento de acuerdo con este aspecto de las presentes realizaciones se efectúa administrando a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más lípidos oxidados como se describe en el presente documento.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "un lípido oxidado endógeno" se refiere a uno o más lípidos oxidados que están presentes o se forman *in vivo*, como resultado de procedimientos inflamatorios y otros mediados por células o humorales.

El término “procedimiento” se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para realizar una tarea dada incluyendo, entre otros, las maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos o desarrollados a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los practicantes de las técnicas química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

- 5 Como se usa en el presente documento, la expresión “tratar o prevenir” incluye anular, *Ibíd.* Sustancialmente, ralentizar o invertir la progresión de una enfermedad, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos de una enfermedad o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos de una enfermedad.

10 Ejemplos de sujetos adecuados para dicho tratamiento incluyen sujetos que sufren una enfermedad o trastorno asociado con una inflamación, como se detalla más adelante en el presente documento. Sujetos individuales adecuados de acuerdo con las presentes realizaciones incluyen mamíferos, tales como caninos, felinos, ovinos, porcinos, equinos y bovinos. Opcionalmente, los sujetos individuales de acuerdo con las presentes realizaciones son seres humanos.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión “inflamación asociada con un lípido oxidado endógeno” describe una inflamación que se asocia con la formación o presencia *in vivo* de uno o más lípidos oxidados (por ejemplo, LDL oxidadas, lípidos de membrana oxidados etc.).

20 La inflamación es una respuesta protectora del cuerpo a una lesión. Varias citocinas desempeñan papeles clave en la mediación de reacciones inflamatorias entre las cuales están las interleucinas 12 y 23 (IL-12 y IL-23). A menudo, una inflamación excesiva es perjudicial, implica o conduce a una miríada de enfermedades y trastornos. Como se ha explicado con detalle anteriormente en el presente documento, una respuesta inflamatoria excesiva normalmente se asocia con epítomos de lípidos oxidados.

Por tanto, de acuerdo con realizaciones óptimas divulgadas en el presente documento, se proporciona un procedimiento de disminuir un nivel de una citocina seleccionada del grupo que consiste en interleucina-12 e interleucina-23 en un sujeto.

25 De acuerdo con realizaciones opcionales adicionales divulgadas en el presente documento se proporciona un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno en el que disminuir un nivel de una citocina seleccionada del grupo que consiste en interleucina-12 e interleucina-23 es beneficioso.

Los procedimientos anteriores se efectúan administrando a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más lípidos oxidados como se describe en el presente documento.

30 De acuerdo con otro aspecto de realizaciones divulgadas en el presente documento se proporciona un uso de al menos un lípido oxidado descrito en el presente documento en la fabricación de un medicamento. En el presente documento se describen formulaciones opcionales para un medicamento.

En algunas realizaciones, el medicamento es para tratar o prevenir una inflamación asociada con un lípido oxidado endógeno, como se describe con mayor detalle en el presente documento.

35 En algunas realizaciones, el medicamento es para disminuir un nivel de una citocina seleccionada del grupo que consiste en interleucina-12 e interleucina-23 en un sujeto.

En algunas realizaciones, el medicamento es para tratar una enfermedad o trastorno en el que disminuir un nivel de una citocina seleccionada del grupo que consiste en interleucina-12 e interleucina-23 es beneficioso.

40 El efecto antiinflamatorio de los lípidos oxidados descritos en el presente documento se puede usar en el tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos asociados con inflamación en los que están implicados las LDL oxidadas endógenas o cualquier otro lípido oxidado endógeno. Dichas enfermedades y trastornos incluyen, por ejemplo, enfermedades o trastornos asociados con la formación de placas, incluyendo, entre otras, aterosclerosis, enfermedad cardiovascular aterosclerótica, enfermedad cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, estenosis, reestenosis y estenosis en endoprótesis, así como enfermedades o trastornos autoinmunitarios, enfermedades o trastornos neurodegenerativos, enfermedades o trastornos proliferativos y procesos de envejecimiento.

45 Por tanto, ejemplos representativos de enfermedades o trastornos asociados con una inflamación que a su vez está asociada con lípidos oxidados endógenos y, por tanto, se pueden tratar mediante el procedimiento de realizaciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, enfermedades o trastornos idiopáticos, enfermedades o trastornos crónicos, enfermedades o trastornos inflamatorios agudos, enfermedades o trastornos autoinmunitarios, enfermedades o trastornos infecciosos, enfermedades o trastornos malignos inflamatorios, enfermedades o trastornos inflamatorios relacionados con trasplantes, enfermedades o trastornos degenerativos inflamatorios, enfermedades o trastornos asociados con una hipersensibilidad, enfermedades o trastornos cardiovasculares inflamatorios, enfermedades o trastornos cerebrovasculares inflamatorios, enfermedades o trastornos vasculares periféricos, enfermedades o trastornos glandulares inflamatorios, enfermedades o trastornos gastrointestinales inflamatorios, enfermedades o trastornos cutáneos inflamatorios, enfermedades o trastornos hepáticos inflamatorios, enfermedades o trastornos neurológicos inflamatorios, enfermedades o trastornos musculoesqueléticos inflamatorios, enfermedades o trastornos renales inflamatorios, enfermedades o trastornos reproductores

5 inflamatorios, enfermedades o trastornos sistémicos inflamatorios, enfermedades o trastornos del tejido conjuntivo inflamatorios, tumores inflamatorios, necrosis, enfermedades o trastornos inflamatorios relacionados con implantes, procesos inflamatorios de envejecimiento, enfermedades o trastornos de inmunodeficiencia, enfermedades o trastornos proliferativos y enfermedades o trastornos pulmonares inflamatorios, como se detalla más adelante en el presente documento.

10 Ejemplos no limitantes de hipersensibilidades incluyen hipersensibilidad de tipo I, hipersensibilidad de tipo II, hipersensibilidad de tipo III, hipersensibilidad de tipo IV, hipersensibilidad inmediata, hipersensibilidad mediada por anticuerpos, hipersensibilidad mediada por complejo inmune, hipersensibilidad mediada por linfocitos T, hipersensibilidad de tipo retardado, hipersensibilidad mediada por linfocitos T colaboradores, hipersensibilidad mediada por linfocitos T citotóxicos, hipersensibilidad mediada por linfocitos TH1 e hipersensibilidad mediada por linfocitos TH2.

15 Ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos cardiovasculares inflamatorias incluyen enfermedades o trastornos oclusivos, aterosclerosis, una enfermedad valvular cardíaca, estenosis, reestenosis, estenosis en la endoprótesis vascular, infarto de miocardio, enfermedad arterial coronaria, síndromes coronarios agudos, insuficiencia cardíaca congestiva, angina de pecho, isquemia del miocardio, trombosis, granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu, síndrome de Kawasaki, enfermedad o trastorno autoinmunitario anti-factor VIII, vasculitis necrotizante de vasos pequeños, poliangiitis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis necrotizante focal pauci-inmune, glomerulonefritis creciente, síndrome antifosfolípidos, insuficiencia cardíaca inducida por anticuerpos, púrpura trombocitopénica, anemia hemolítica autoinmune, autoinmunidad cardíaca, enfermedad o trastorno de Chagas y autoinmunidad anti-linfocitos T colaboradores.

20 La estenosis es una enfermedad oclusiva de la vasculatura causada habitualmente por placas ateromatosas y mayor actividad de las plaquetas que afecta de forma más crítica a la vasculatura coronaria.

25 La reestenosis es la reclusión progresiva que a menudo sigue a la reducción de las oclusiones en la vasculatura estenótica. En los casos en los que la permeabilidad de la vasculatura requiere el soporte mecánico de una endoprótesis vascular, se puede producir estenosis en la endoprótesis vascular, lo que vuelve a ocluir el vaso tratado.

Ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos cerebrovasculares incluyen ictus, inflamación cerebrovascular, hemorragia cerebral e insuficiencia arterial vertebral.

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

35 Ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos autoinmunitarios incluyen todas las enfermedades causadas por una respuesta inmunitaria, tal como una inmunidad mediada por células o por autoanticuerpos frente a un autoantígeno y similares. Ejemplos representativos son artritis reumatoide crónica, artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, enfermedades mixtas del tejido conjuntivo, poliarteritis nodosa, polimiositis/dermatomiositis, síndrome de Sjogren, enfermedad de Bechet, esclerosis múltiple, diabetes autoinmune, enfermedad de Hashimoto, psoriasis, mixedema primario, anemia perniciosa, miastenia gravis, hepatitis activa crónica, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, uveítis, vasculitides y trombocitopenia inducida por heparina.

40 Ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos glandulares inflamatorios incluyen enfermedades o trastornos pancreáticos, diabetes de tipo I, enfermedades o trastornos tiroideos, enfermedad de Graves, tiroiditis, tiroiditis autoinmune espontánea, tiroiditis de Hashimoto, mixedema idiopático, autoinmunidad ovárica, infertilidad anti-esperma autoinmune, prostatitis autoinmune y síndrome poliglandular autoinmune de tipo I.

45 Ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos gastrointestinales inflamatorios incluyen colitis, ileítis, enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal inflamatoria crónica, síndrome del intestino inflamatorio, enfermedad intestinal inflamatoria crónica, enfermedad celíaca, colitis ulcerosa, una úlcera, una úlcera cutánea, una escara de decúbito, una úlcera gástrica, una úlcera péptica, una úlcera bucal, una úlcera nasofaríngea, una úlcera esofágica, una úlcera duodenal y una úlcera gastrointestinal.

50 Ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos cutáneos inflamatorios incluyen acné, una enfermedad cutánea ampollosa autoinmune, pénfigo vulgar, penfigoide ampolloso, pénfigo foliáceo, dermatitis de contacto y erupción por fármacos.

Ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos hepáticos inflamatorios incluyen hepatitis autoinmune, cirrosis hepática y cirrosis biliar.

55 Ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos neurológicos inflamatorios incluyen esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, miastenia gravis, neuropatía motora, síndrome de Guillain-Barre, neuropatía autoinmune, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, enfermedad o trastorno neurológico paraneoplásico, atrofia cerebelosa paraneoplásica, síndrome del hombre rígido no paraneoplásico, atrofia cerebelosa progresiva, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydeham, síndrome de

Gilles de la Tourette, poliendocrinopatía autoinmune, neuropatía disimmune, neuromiotonía adquirida, artrogriposis multiplex, enfermedad de Huntington, demencia asociada con SIDA, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple, ictus, una enfermedad o trastorno retiniano inflamatorio, una enfermedad o trastorno ocular inflamatorio, neuritis óptica, encefalopatía espongiiforme, migraña, cefalea, cefalea en racimos y síndrome del hombre rígido.

5 Ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos inflamatorios del tejido conjuntivo incluyen miositis autoinmune, síndrome primario de Sjogren, enfermedad o trastorno autoinmune de músculo liso, miositis, tendinitis, una inflamación del ligamento, condritis, una inflamación articular, una inflamación sinovial, síndrome del túnel carpiano, artritis, artritis reumatoide, artrosis, espondilitis anquilosante, una inflamación esquelética, una enfermedad o trastorno auditivo autoinmune y una enfermedad o trastorno autoinmune del oído interno.

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

Ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos reproductores inflamatorios incluyen pérdida fetal repetida, quistes ováricos o una enfermedad o trastorno asociado con la menstruación.

15 Ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos sistémicos inflamatorios incluyen lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, shock séptico, síndrome del shock tóxico y caquexia.

20 Ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos infecciosos incluyen enfermedades o trastornos infecciosos crónicos, una enfermedad o trastorno infeccioso subagudo, una enfermedad o trastorno infeccioso agudo, una enfermedad o trastorno viral, una enfermedad o trastorno bacteriano, una enfermedad o trastorno de protozoos, una enfermedad o trastorno parasitaria, una enfermedad o trastorno fúngica, una enfermedad o trastorno por micoplasma, gangrena, septicemia, una enfermedad o trastorno por priones, gripe, tuberculosis, paludismo, síndrome de la inmunodeficiencia adquirida y síndrome respiratorio agudo grave.

25 Ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos inflamatorios relacionados con trasplantes incluyen rechazo de injertos, rechazo crónico de injertos, rechazo subagudo de injertos, rechazo agudo de injertos, rechazo subagudo de injertos y enfermedad o trastorno del injerto contra el huésped. Ejemplos de implantes incluyen un implante protésico, un implante mamario, un implante de silicona, un implante dental, un implante de pene, un implante cardiaco, una articulación artificial, un dispositivo de reparación de fractura ósea, un implante de reemplazo de hueso, un implante de administración de fármaco, un catéter, un marcapasos, un corazón artificial, una válvula de corazón artificial, un implante de liberación de fármacos, un electrodo, y un tubo respirador.

30 Ejemplos no limitantes de tumores inflamatorios incluyen un tumor maligno, un tumor benigno, un tumor sólido, un tumor metastásico y un tumor no sólido.

Ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos pulmonares inflamatorios incluyen asma, asma alérgica, enfisema, enfermedad o trastorno pulmonar obstructiva crónica, sarcoidosis y bronquitis.

Un ejemplo de una enfermedad o trastorno proliferativo es cáncer.

35 Se ha notificado la implicación de los fosfolípidos y metabolitos de fosfolípidos en el tratamiento de la prevención de enfermedades y síndromes tales como, por ejemplo, el estrés oxidativo del envejecimiento (Onorato JM, y col., Annal N Y Acad Sci 1998 Nov 20;854:277 - 90), artritis reumatoide (AR) (Paimela L, y col., Ann Rheum Dis 1996 Aug;55(8):558 - 9), artritis reumatoide juvenil (Savolainen A, y col., 1995;24(4):209 - 11), enfermedad intestinal inflamatoria (EII) ((Sawai T, y col., Pediatr Surg Int 2001 May;17(4):269 - 74) y cáncer renal (Noguchi S, y col., Biochem Biophys Res Commun 1992 Jan 31;182(2):544 - 50), y, por tanto, adicionalmente respalda el uso beneficioso de los análogos de lípidos oxidados de fosfolípidos oxidados en el tratamiento o prevención de estas enfermedades o trastornos.

45 De acuerdo con el procedimiento de las realizaciones divulgadas en el presente documento, los lípidos oxidados se pueden administrar a un sujeto mediante diversas vías, incluyendo, por ejemplo, las vías oral, rectal, transmucosa, especialmente transnasal, liberación intestinal o parenteral, incluyendo intramuscular, subcutánea e inyecciones intramedulares así como las vías intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intraperitoneal, intranasal o intraoculares. Sin embargo, como se describe en detalle a lo largo del presente documento y se demuestra con más detalle en la sección de Ejemplos siguiente, las vías de administración preferidas incluyen las vías oral, mucosa, nasal, intradérmica (subcutánea) e intraperitoneal.

50 Por lo tanto, en una realización se administran 0,1-100 mg / kg de un lípido oxidado como se describe en el presente documento por vía intraperitoneal, en un vehículo adecuado tal como, entre otros, PBS o glicerol, de una a tres veces, cada semana, siguiendo un régimen crónico o alternante.

En otra realización se administran 0,1-100 mg / kg de un lípido oxidado como se describe en el presente documento por vía nasal, en un vehículo adecuado tal como, entre otros, PBS o glicerol, de una a tres veces, cada semana, siguiendo un régimen crónico o alternante.

55 En otra realización más se administran 0,1-100 mg / kg de un lípido oxidado como se describe en el presente

documento por vía subcutánea, en un vehículo adecuado tal como, entre otros, PBS o glicerol, de una a tres veces, cada semana, siguiendo un régimen crónico o alternante.

5 En todavía otra realización se administran 0,1-100 mg / kg de un lípido oxidado como se describe en el presente documento por vía oral, en un vehículo adecuado tal como, entre otros, PBS o glicerol, de una a tres veces, cada semana, siguiendo un régimen crónico o alternante.

Las composiciones farmacéuticas y los procedimientos descritos en el presente documento pueden implicar además la administración de uno o más compuestos adicionales que son capaces de tratar o prevenir una inflamación asociada con lípidos oxidados endógenos como se ha indicado anteriormente en el presente documento.

10 Los procedimientos de acuerdo con realizaciones de la presente invención pueden implicar, por tanto, coadministrar, antes de, concomitante con o después de la administración de los lípidos oxidados, una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de estos compuestos adicionales, aunque la composición farmacéutica de acuerdo con las presentes realizaciones pueden incluir, además de los compuestos como se describe en el presente documento, dichos compuestos adicionales.

15 Ejemplos representativos de compuestos adicionales que son capaces de tratar o prevenir una inflamación asociada con lípidos oxidados endógenos delineados anteriormente y, por lo tanto, se pueden utilizar en el contexto de esta realización de la presente invención incluyen, entre otros, inhibidores de la HMGCoA reductasa (estatinas), adyuvantes de la mucosa, corticosteroides, fármacos antiinflamatorios esteroideos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, analgésicos, factores de crecimiento, toxinas, inhibidores de la proteína de transferencia de ésteres de colesterilo (CETP), peroxisomas, agonistas del receptor activado proliferativo (PPAR), fármacos antiaterosclerosis, 20 agentes antiproliferativos, ezetimida, ácido nicotínico, inhibidores de escualeno, un ApoE Milano, HSP, Beta-2-glicoproteína I y cualquier derivado y análogo de los mismos.

25 Los inhibidores de la HMGCoA reductasa (estatinas) son fármacos bien conocidos que reducen eficazmente los niveles de LDL-colesterol mediante la inhibición de la enzima que regula la tasa de la producción de colesterol y aumentando el aclaramiento de LDL-colesterol presente en la sangre por el hígado. Ejemplos no limitantes de estatinas prescritas habitualmente incluyen atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina y simvastatina.

30 La ezetimiba es el primero de una nueva clase de inhibidores de la absorción del colesterol que inhibe de forma potente y selectiva la absorción de colesterol de la dieta y biliar en el borde en cepillo del epitelio intestinal, sin que ello afecte a la absorción de triglicéridos o de las vitaminas liposolubles. Por lo tanto, la ezetimiba reduce la liberación total de colesterol en el hígado, en segundo lugar, induce el aumento de la expresión de receptores de LDL, lo que tiene como resultado un aumento de la eliminación de LDL-C del plasma.

El peroxisoma es un orgánulo de una membrana presente en casi todas las células eucariotas. Uno de los procesos metabólicos más importantes del peroxisoma es la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga y muy larga. El peroxisoma también está implicado en la síntesis de ácidos biliares, la síntesis del colesterol, la síntesis de plasmalógeno, el metabolismo de aminoácidos, y el metabolismo de las purinas.

35 El ácido nicotínico es un agente conocido que reduce los niveles de colesterol total, LDL-colesterol y de triglicéridos, mientras que aumenta los niveles de HDL-colesterol. Hay tres tipos de fármacos de ácido nicotínico: liberación inmediata, liberación programada y liberación extendida. El ácido nicotínico o niacina, la vitamina B hidrosoluble mejora todas las lipoproteínas cuando se administra en dosis muy por encima del requisito de la vitamina.

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

45 Agonistas del receptor activado proliferativo (PPAR), por ejemplo, fibratos, son miembros activados de ácidos grasos del la superfamilia de receptores nucleares que desempeñan papeles importantes en el metabolismo de los lípidos y la glucosa, y se han implicado en enfermedades metabólicas relacionadas con la obesidad tales como la hiperlipidemia, resistencia a la insulina, y enfermedad de las arterias coronarias. Los fibratos son generalmente eficaces en la reducción de los niveles elevados de triglicéridos plasmáticos y de colesterol, y actúan como 50 agonistas de PPAR. El efecto más pronunciado de los fibratos incluye una disminución en los niveles en plasma de lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL). Los niveles de colesterol LDL (LDL-C) disminuyen generalmente en individuos con concentraciones plasmáticas basales elevadas, y los niveles de colesterol HDL (HDL-C) se incrementan por lo general cuando las concentraciones plasmáticas basales son bajas. Ejemplos no limitantes de fibratos que se prescriben habitualmente incluyen bezafibrato, gemfibrozilo y fenofibrato.

55 Los inhibidores de la proteína de transferencia de inhibidores (CETP) juegan un papel importante en la aterogénesis, mediante la reducción de la acumulación de ésteres de colesterilo dentro de los macrófagos y la pared arterial, y reducir así la formación de células espumosas y que afecta a la absorción de colesterol. El inhibidor de la CETP

actualmente conocido más prometedor es avisimibe.

ApoA-I Milano se utiliza normalmente como un complejo recombinante con fosfolípidos (ETC-216) y produce una regresión significativa de la aterosclerosis coronaria.

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

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

20 Ejemplos no limitantes de fármacos antiinflamatorios esteroideos incluyen, sin limitaciones, corticosteroides tales como hidrocortisona, hidroxiltriamcinolona, α -metildexametasona, fosfato de dexametasona, dipropionatos de beclometasona, valerato de clobetasol, desonida, desoximetasona, acetato de desoxicorticosterona, dexametasona, diclorisona, diacetato de diflorasona, valerato de diflucortolona, fluadrenolona, acetónido de flucorolona, fludrocortisona, pivalato de flumetasona, acetónido de fluosinolona, fluocinonida, butilésteres de flucortina, flucortolona, acetato de fluprednido (fluprednilideno), flurandrenolona, halcinonida, acetato de hidrocortisona, 25 butirato de hidrocortisona, metilprednisolona, acetónido de triamcinolona, cortisona, cortodoxona, flucetónido, fludrocortisona, diacetato de difluorasona, fluradrenolona, fludrocortisona, diacetato de difluorasona, acetónido de fluradrenolona, medrisona, amcinafel, amcinafida, betametasona y el resto de sus ésteres, cloroprednisona, acetato de cloroprednisona, clocortelona, clescincolona, diclorisona, diflurprednato, flucoronida, flunisolida, fluorometalona, fluperolona, fluprednisolona, valerato de hidrocortisona, ciclopentilpropionato de hidrocortisona, hidrocortamato, 30 meprednisona, parametasona, prednisolona, prednisona, dipropionato de beclometasona, triamcinolona y mezclas de los mismos.

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

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

Ejemplos no limitantes de toxinas incluyen la toxina del cólera, que sirve también como adyuvante.

40 Ejemplos no limitantes de agentes antiproliferativos incluyen un agente alquilante tal como una mostaza nitrogenada, una etilenimina y una metilmelamina, un sulfonato de alquilo, una nitrosourea y un triazeno; un antimetabolito tal como un análogo de ácido fólico, un análogo de pirimidina y un análogo de purina; un producto natural tal como un alcaloide de vinca, una epipodofilotoxina, un antibiótico, una enzima, un taxano y un modificador de la respuesta biológica; agentes varios tales como un complejo de coordinación de platino, una antracenodiona, una antraciclina, 45 una urea sustituida, un derivado de metilhidrazina o un supresor corticosuprarrenal; o una hormona o un antagonista tal como un adrenocorticosteroide, una progestina, un estrógeno, un antiestrógeno, un andrógeno, un antiandrógeno o un análogo de la hormona de liberación de gonadotropina. Ejemplos específicos de agentes quimioterapéuticos incluyen, por ejemplo, una mostaza nitrogenada, una epipodofilotoxina, un antibiótico, un complejo de coordinación de platino, bleomicina, doxorubicina, paclitaxel, etopósido, 4-OH-ciclofosfamida y cisplatino.

50 La familia de HSP consiste en aproximadamente 25 proteínas distinguidas por sus pesos moleculares con estructuras altamente conservadas. Casi todos los seres humanos tienen reacciones inmunitarias celulares y humorales contra la proteína de choque térmico 60 (HSP60) bacteriana. Debido a que existe un alto grado de homología antigénica entre la HSP60 microbiana (bacteriana y parasitaria) y la humana, el "coste" de la inmunidad ante microbios podría ser el peligro de reactividad cruzada con HSP60 humana expresada por las células 55 endoteliales de arterias estresadas. La autoinmunidad genuina contra HSP60 autóloga alterada podría desencadenar también este proceso (Wick y col., Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. TRENDS in Immunology. 2001;22(12):665 - 669). La HSP se ha implicado como autoantígeno diana en varias enfermedades autoinmunes experimentales (artritis, diabetes de tipo I). Los anticuerpos anti-HSP65 así como anti-HSP60 se han asociado demostrablemente con lesiones ateromatosas en seres humanos. Los estudios realizados en conejos y

ratones muestran que la generación de una respuesta inmunitaria inducida por HSP65 mediante inmunización con la proteína recombinante o con una preparación rica en HSP65 de *Mycobacterium tuberculosis* potencia la aterogénesis. Como procesos autoinmunes que apuntan a HSP65 como posible candidato a antígeno, se ha empleado la creación de un estado de falta de respuesta mediante la inducción de "tolerización" mucosa para bloquear estas respuestas y el grupo de los inventores ha notificado que la aterosclerosis temprana se atenúa en ratones alimentados con HSP65, en comparación con ratones alimentados con BSA o PBS (Harats y col., Oral tolerance with heat shock protein 65 attenuates mycobacterium tuberculosis induced and high fat diet driven atherosclerosis lesions. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:1333 - 1338), y esto lo respaldó adicionalmente Maron, que demostró que la vacunación nasal con HSP reduce el proceso inflamatorio asociado a la aterosclerosis (Maron y col., Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation.* 2002;106:1708 - 1715).

La β 2-glicoproteína I (β 2-GPI) es una proteína de unión a fosfolípido que se ha mostrado que sirve como diana para anticuerpos antifosfolípidos protrombóticos. Recientemente se ha demostrado que genera una reacción inmunomediada y potencia la aterosclerosis murina. Los anticuerpos β contra β 2-GPI tienen la capacidad de activar monocitos y células endoteliales y pueden inducir una respuesta inmunitaria frente a β 2-GPI en aterosclerosis acelerada en ratones con tendencia a aterosclerosis. Cuando se transfirieron células de ganglio linfático y bazo reactivas ante β 2-GPI a ratones deficientes en receptor de LDL, estimularon formación de estrías grasas, probando un papel proaterogénico directo para linfocitos específicos de β 2-GPI. Inducir tolerancia inmunológica a β 2-GPI mediante alimentación oral previa con el antígeno dio como resultado una reducción significativa de la extensión de las lesiones ateroscleróticas. Por tanto, β 2-GPI es un candidato a participante en la placa aterosclerótica y posiblemente y puede emplearse como inmunomodulador de la progresión de la placa. La alimentación oral con β 2-GPI inhibió la reactividad de las células de ganglio linfático a β 2-GPI en ratones inmunizados contra la proteína humana. La producción de IL-4 e IL-10 estaba regulado por aumento en células de ganglio linfático de ratones tolerantes a β 2-GPI inmunizados contra β 2-GPI, después de sensibilizar con la respectiva proteína. Por tanto, la administración oral de β 2-GPI es un medio eficaz de supresión de la aterogénesis en ratones (George y col., Suppression of early atherosclerosis in LDL-receptor deficient mice by oral tolerance with beta2-glycoprotein I. *Cardiovasc Res.* 2004;62(3):603 - 9).

Los lípidos oxidados descritos en el presente documento se pueden preparar de acuerdo con cualquier procedimiento conocido en las técnicas químicas. Por ejemplo, los fosfolípidos descritos en el presente documento se pueden preparar de acuerdo con procedimientos descritos en la solicitud de patente internacional nº PCT/IL05/000735 (nº de publicación WO 06/006161) o la solicitud de patente de EE.UU. Nº 11/650.973 (nº de publicación 2007 - 0112211).

Debe apreciarse que ciertas características de la invención que, por motivos de claridad, se describen en el contexto de distintas formas de realización, pueden también combinarse para formar una única realización. Por el contrario, varias características de la invención que se describen, por motivos de brevedad, en el contexto de una única realización, pueden también proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como adecuadas en cualquier otra realización descrita de la invención. Determinadas características descritas en el contexto de varias realizaciones no deben considerarse características esenciales de las realizaciones, a menos que la realización sea inoperativa son dichos elementos.

Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención que se han indicado anteriormente en el presente documento y según se reivindica en la sección Reivindicaciones más adelante encuentra respaldo experimental en los ejemplos siguientes.

Ejemplos

A continuación se hace referencia a los ejemplos siguientes, que, junto con las descripciones anteriores, ilustran algunas realizaciones de la invención de un modo no limitante.

Materiales y procedimientos

Materiales:

Ácido acético (glacial) se obtuvo de Bio-Lab;

El cristal violeta se obtuvo de Sigma;

Ditiotreitol (DTT) se obtuvo de Bio-Lab;

El suero bovino fetal (inactivado por calor) se obtuvo de Biological Industries (Israel);

El metanol (absoluto) se obtuvo de Bio-Lab;

El MOG péptido 35-55 se obtuvo de Sigma-Aldrich;

El GM-CSF de ratón (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) se obtuvo de Peprotech

(Israel);

La solución de penicilina / estreptomina se obtuvo de Biological Industries (Israel);

El tampón de lisis de glóbulos rojos se obtuvo de Biological Industries (Israel); y

El medio RPMI-1640 con L-glutamina se obtuvo de Biological Industries (Israel).

5 Las placas tratadas de cultivo tisular de 24 pocillos estériles COSTAR® se obtuvieron de Corning.

La solución salina tamponada con fosfato (PBS) se preparó diluyendo el concentrado de la solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin calcio ni magnesio (Biological Industries, Israel) con agua bidestilada.

Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂.

10 Las mediciones espectrométricas se realizaron utilizando un lector de placas Tecan SUNRISE y el software de adquisición de datos versión 6.3. La absorción a 595 nm se determinó usando un filtro de paso de banda de 595 nm Tecan SpectraFluor.

Para los estudios *in vitro*, los compuestos analizados se disolvieron en etanol a una concentración de 100 mg/ml y después se diluyeron en PBS a una concentración de 1 mg/ml.

Ensayo de fosforilación de tirosina:

15 Se analizó la fosforilación de la tirosina en macrófagos o células derivadas de la médula ósea (BMDC) de ratones.

Se aislaron macrófagos primarios de ratón del peritoneo de ratones hembra C57BL/6 de 7-8 semanas de edad tras estimulación con tioglicolato. Previamente se administró a las células suero bovino fetal (FBS) al 0,5 % en medio RPMI-1640 durante la noche. Las células derivadas de la médula ósea primarias de ratón se aislaron mediante el lavado de la médula ósea del fémur y la tibia de ratones SJL hembra utilizando medio RPMI-1640 frío. Se preparó una suspensión de células y los eritrocitos se eliminaron usando tampón de lisis de glóbulos rojos y se incubó a 4 °C durante 15 minutos en un tampón que contenía solución salina tamponada con fosfato (PBS) y 0,5 % de seroalbúmina bovina (BSA) con microesferas B220 y CD90 (Miltenyi Biotech). Después, las células se lavaron, se resuspendieron en el mismo tampón y se eliminaron los linfocitos B y T en una unidad de separación de Midi-Macs través de una columna LD o LS (Miltenyi Biotech). Las células de médula ósea deplecionadas se contaron, se lavaron y se sembraron a una concentración de 10⁶ células por ml en medio RPMI-1640 con L-glutamina, β-mercaptoetanol, 10% de suero bovino fetal, antibióticos (penicilina / estreptomina) y 2 ng/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos de ratón (GM-CSF). El medio fue reemplazado cada dos días. Los días 5-6 después del cultivo, las células se recogieron, se contaron y se sembraron las células (10⁶ células / ml) en el medio durante 24 horas, seguido por inanición con suero bovino fetal (FBS) al 0,5 % en medio RPMI-1640 durante la noche.

30 Los macrófagos o las BMDC se trataron a continuación durante 10 minutos con 1, 10 o 20 µg/ml del compuesto analizado en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con 1% de etanol. El tratamiento con 1 o 20 µg/ml de fosfatidilcolina o disolvente (PBS con 1 % de etanol) se usó como control negativo. El tratamiento con 1, 10 o 20 µg/ml de CI-201 (1-hexadecil-2-(4-carboxi) butil-sn-glicero-3-fosfolina) se utilizó como control positivo.

35 Las proteínas con tirosina fosforilada se observaron a continuación mediante transferencia de tipo Western, utilizando un anticuerpo monoclonal antifosfotirosina. La transferencia de tipo Western para ERK1/2 o α-tubulina se realizó como control para la carga de proteínas.

Ensayos de toxicidad in vitro:

40 Los macrófagos peritoneales de ratón reducido con tioglicolato se lavaron, se contaron y se sembraron (de 2x10⁵ a 3x10⁵ células por pocillo en placas de 24 pocillos) en pocillos por triplicado en medio que contiene RPMI-1640, L-glutamina, 10 % de FBS y antibióticos (penicilina / estreptomina). Después de un periodo de recuperación de 24 horas, el compuesto analizado (o los controles) se añadió al medio celular a dosis de 2, 10, 20, 50, 100 o 150 µg/ml, manteniendo el volumen añadido igual en todos los tratamientos complementando el volumen con disolvente.

45 Después de la adición de los compuestos, las células se incubaron durante 24 horas adicionales, después de lo cual las células se lavaron, se fijaron con una solución de metanol al 10 %/ ácido acético al 10 % y se tñeron con cristal violeta (0,4 % en etanol al 20 %). El número de células se midió mediante la determinación de la densidad óptica a 595 nm. Las células incubadas con vehículo (PBS con 1 % de etanol) se utilizaron como control, al que el número de células en las muestras tratadas se normalizaron.

50 Los datos se presentan como la media ± la desviación estándar. La significación estadística relativa a las células tratadas con vehículo se calculó utilizando la prueba t de Student, considerándose los valores de p inferior a 0,05 como indicativos de la significación estadística.

Ensayo de producción in vitro de IL12/23p40:

Las células derivadas de médula ósea (BMDC) se obtuvieron del fémur y la tibia de ratones C57BL hembra, se cultivaron y se sembraron a una concentración de 110^6 células / ml 5-6 días después del cultivo, tal como se ha descrito anteriormente para el ensayo de fosforilación de la tirosina.

5 A continuación, el compuesto analizado se añadió a las células durante 1 hora a una concentración de 1, 2,5, 5, 10 o 20 $\mu\text{g/ml}$. Las células se activan para la producción de IL12 / 23p40 mediante incubación durante 24 horas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de peptidoglicano (PGN). La producción de citocinas a partir del sobrenadante se midió mediante ELISA. Las células activadas sin el compuesto analizado se utilizaron como control.

Ensayo in vitro de expresión de ARNm de IL12/23 p40:

10 Se prepararon cultivos de células derivadas de médula ósea como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Los días 5-6 después del cultivo, los cultivos celulares se enriquecieron para las células dendríticas CD11c+ (> 90%) con microesferas de CD11c ratón sobre columnas de MS o LS (Miltenyi Biotec). Las células dendríticas CD11c+ se estimularon durante 1, 2 y 3 horas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de peptidoglicano solo o en presencia de 20 $\mu\text{g/ml}$ del compuesto analizado añadido 1 hora antes de la activación. El ARN se extrajo de las células usando el kit RNeasy Mini (Qiagen, Valencia, CA). Para la preparación de ADNc, 1 μg de ARN se combinó con Oligo dT durante 15 10 minutos a 70 °C, tampón de la 1ª hebra. Se añadieron ditioneitol y dNTP y transcriptasa inversa super-script (SS-II) (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 50 minutos a 42 °C y la reacción se terminó mediante incubación durante 15 minutos adicionales a 70 °C. Todas las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron usando LightCycler TaqMan maestro (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y se ejecutaron en la máquina LightCycler (Roche). Se usaron conjuntos preparados de sondas con cebadores para IL12 / 23 p40 y ensayos de GAPDH (Applied Biosystems, 20 ensayos #Mm01288992_m1 y Mm99999915_g1, respectivamente), sirviendo el último para normalizar los niveles de ARN. Se utilizaron 20 $\mu\text{g/ml}$ de CI-201 y fosfatidilcolina (PC) como controles positivos y negativos, respectivamente.

Ensayo in vivo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) inducida con glicoproteínas de la mielina de oligodendrocitos:

25 A ratones C57BL/6 se les administró por vía oral la cantidad indicada del compuesto analizado en un volumen final de 200 μl durante 5 días consecutivos comenzando 5 días antes de la inmunización.

30 Para la inducción de EAE, se inmunizó a los ratones por vía subcutánea con una emulsión que contiene 1,5 mg / ml de péptido MOG 35-55 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) y 2,5 mg / ml de CFA (adyuvante completo de Freund), 100 μl de la emulsión que se inyecta en cada flanco. Después de la inmunización se administró por vía intraperitoneal la toxina Pertussis (500 ng en 500 μl de PBS) inmediatamente y 48 horas después de la inmunización.

El inicio de la EAE se evaluó por medio de una puntuación clínica media.

Ensayo in vivo de artritis inducida (EAI) con colágeno:

35 Se inmunizó a los ratones DBA / 1 macho para inducir artritis mediante una inyección de colágeno que contiene adyuvante completo de Freund (CFA) en la base de la cola (día 0) y una inyección de refuerzo en el flanco (día 21). Se siguió el desarrollo de la artritis en los ratones hasta el día 36. La administración mediante sonda del compuesto de ensayo y las sustancias control comenzó el día 22 y se llevó a cabo a diaria (6 veces a la semana).

El inicio de la artritis se evaluó por medio de una puntuación clínica de la artritis.

Ensayo de lesión aterosclerótica in vivo:

40 Se administró por vía oral a ratones LDL-RD macho de 12-16 semanas de edad 0,2 ml de PBS o PBS con una cantidad indicada de compuesto analizado, una vez al día, cada dos días, durante 5 tratamientos. Se expuso a los ratones a una dieta occidental durante 5 semanas y después se les sacrificó.

Como alternativa, se administró por vía oral a ratones ApoE KO de 14-16 semanas de edad 0,2 ml de PBS o PBS con una cantidad indicada de compuesto analizado, una vez al día, cada dos días, durante 5 tratamientos, y fueron sacrificados después de 8 semanas.

45 La cuantificación de las lesiones ateroscleróticas se realizó mediante el cálculo del tamaño de la lesión en el seno aórtico como se ha descrito anteriormente [Paigen y col., Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. Atherosclerosis 1987; 68:231 - 240] con algunas modificaciones. Brevemente, se extrajeron el corazón y la aorta de los animales, y la grasa periférica se limpió cuidadosamente. Los corazones se incluyeron en gel de temperatura óptima de corte (OCT) y se congelaron. La lesión en el seno aórtico se determinó a partir de 3-8 secciones en serie teñidas con O con rojo aceite (10 μm de espesor), en todo el seno aórtico (400 μm). El área de la lesión se calculó utilizando un método de análisis informático (software Image-Pro Plus [versión 4.5.1.29], Medical Cybernetics Corporation).

Ejemplo 1

1-hexadecil-2-(4-carboxi) butil-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-202) y 1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina

(R)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina y (R)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina se sintetizaron como se describe a continuación en el presente documento usando (R)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida. (S)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina y (S)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina se sintetizan usando los mismos procedimientos pero con (S)-(+)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida.

Síntesis de (S)-1-hexadecil-glicerol 11 gramos de (R)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol, 20 gramos de hidróxido potásico en polvo y 27,96 gramos de bromuro de hexadecilo se agitaron en 150 ml de tolueno y se sometieron a reflujo durante 6 horas al tiempo que se retiraba el agua formada mediante destilación azeotrópica. El volumen del disolvente se redujo gradualmente hasta aproximadamente 40 ml. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se añadieron 100 ml de agua y la mezcla de reacción se extrajo tres veces con 75 ml de diclorometano. La fase orgánica combinada se lavó con 50 ml de agua y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió en 200 ml de una mezcla de 90:10:5 (volumen / volumen) de metanol: agua: ácido clorhídrico concentrado, y la solución resultante se sometió a reflujo durante 2 horas. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente se añadieron 100 ml de agua. El producto se extrajo tres veces con 100 ml de diclorometano, se lavó consecutivamente con 100 ml de agua, 100 ml de solución acuosa saturada de carbonato sódico y de nuevo con 100 ml de agua. Después, el disolvente se eliminó a presión reducida y el producto se cristalizó en hexano (200 ml) para dar 21,69 gramos de (S)-1-hexadecil-glicerol puro, que se secó en un desecador a presión reducida. En rendimiento fue del 82 %.

Síntesis de (R)-1-hexadecil-3-tritil-glicerol 20 gramos de (S)-1-hexadecil-glicerol y 21,29 gramos de trifetilclorometano se disolvieron en 369 ml de tetrahidrofurano seco (THF) y 93 ml de acetonitrilo seco. Se añadieron 17,75 ml de trietilamina y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 17 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se vertió en hielo (100 gramos), se transfirió a un embudo de separación y se extrajo con éter metil-terc-butílico. La fase orgánica se lavó consecutivamente con 200 ml de agua, dos veces con 200 ml (1,5 %) de ácido sulfúrico diluido, 200 ml de agua, 200 ml de bicarbonato sódico acuoso saturado y de nuevo con 200 ml de agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 36,86 gramos del producto crudo como un residuo. Este residuo se disolvió en hexano caliente (200 ml) y la solución resultante se enfrió a 4 °C durante la noche. El producto precipitado se filtró, produciendo 30,71 gramos de (R)-1-hexadecil-3-tritil-glicerol.

Síntesis de (R)-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-tritil-glicerol 19,94 gramos de 1-hexadecil-3-tritil-glicerol, 6,98 gramos de 6-bromo-1-hexeno y 15 gramos de hidróxido potásico en polvo se agitaron en 350 ml de hexano y se calentó a reflujo durante 8 horas, mientras se eliminó el agua formada mediante destilación azeotrópica. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se transfirió a un embudo de separación, se lavó dos veces con 200 ml de agua y el disolvente se eliminó después a presión reducida. El residuo se disolvió en 150 ml de hexano y se lavó de nuevo dos veces con 200 ml de agua. La solución orgánica se mantuvo a 4 °C durante la noche, durante la cual se produjo la precipitación de subproductos. La filtración y la eliminación del disolvente a presión reducida dio 19,86 gramos de (R)-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-tritil-glicerol. En rendimiento fue del 86,6 %.

Síntesis de (S)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicerol 150,16 gramos (702 mmol) de peryodato sódico se suspendió en 500 ml de agua en un matraz de fondo redondo de tres bocas equipado con un termómetro y un embudo de goteo. Se añadieron 7,21 gramos (85,8 mmol) de bicarbonato sódico y 2,47 gramos (15,6 mmol) de permanganato potásico y la suspensión se calentó hasta una temperatura de 40 °C. Se disolvieron 50 gramos (78 mmol) de (S)-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-tritil-glicerol en 500 ml de *terc*-butanol y esta solución se añadió a la mezcla de peryodato sódico y permanganato potásico durante el curso de 1 hora. Después de añadir (R)-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-tritil-glicerol a peryodato sódico y permanganato potásico, la mezcla de reacción se calentó a una temperatura de 40 °C durante 3 horas. Después de 1,5 horas, se añadieron 0,62 gramos adicionales (3,9 mmol) de permanganato potásico para mantener el color rosa de la mezcla de reacción. Al final del período de 3 horas, la mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se transfirió a un embudo de separación y se extrajo con 200 ml de hexano. La fase orgánica se lavó con una solución de 15 gramos de Na₂S₂O₅ en 100 ml de agua. Se añadió ácido clorhídrico (0,65 ml de HCl concentrado en 13 ml de agua) diluido a la fase orgánica y 200 ml del disolvente se destilaron a presión reducida. La solución transparente restante se calentó hasta una temperatura de 80 °C durante 6 horas, y un volumen adicional de 250 ml de disolvente se eliminó mediante destilación. El residuo se trató con 100 ml de agua y 10 ml de una solución de NaOH al 30 %, dando un pH de 12. El trifenilmetanol precipitado se filtró y se lavó 4 veces con 10 ml de agua. El filtrado se extrajo con una mezcla de 50 ml de hexano y 50 ml de acetato de etilo para eliminar el trifenilmetanol restante y otras impurezas. En la fase acuosa, la sal sódico de 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicerol se protonó con 8,45 ml (101,4 mmol) de ácido clorhídrico concentrado. El ácido carboxílico libre resultante se extrajo con 100 ml de hexano. La evaporación hasta sequedad y la coevaporación con 100 ml de hexano dieron 27,00 gramos de (S)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicerol bruto. El producto bruto se cristalizó mediante disolución en una mezcla de 7 ml de acetona y 68 ml de hexano, y enfriamiento a 0 °C. El precipitado se filtró, se lavó dos veces con 7 ml de hexano frío y se secó. Se obtuvieron 20,90 gramos de (S)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicerol como un sólido blanquecino. En rendimiento fue del 64,3 %.

Síntesis de (S)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicerol 15,0 gramos (36,0 mmol) de (S)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-sn-glicerol se disolvieron en 100 ml de metanol y se añadieron 3 ml de ácido clorhídrico concentrado. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió trietilamina hasta que el pH de la mezcla de reacción alcanzó 7. La solución se transfirió a un embudo de separación y se extrajo dos veces con 200 ml de hexano. La fase orgánica se lavó con agua. La evaporación hasta sequedad y la coevaporación con 100 ml de hexano dieron 14,92 gramos de (S)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicerol. En rendimiento fue del 96,2 %.

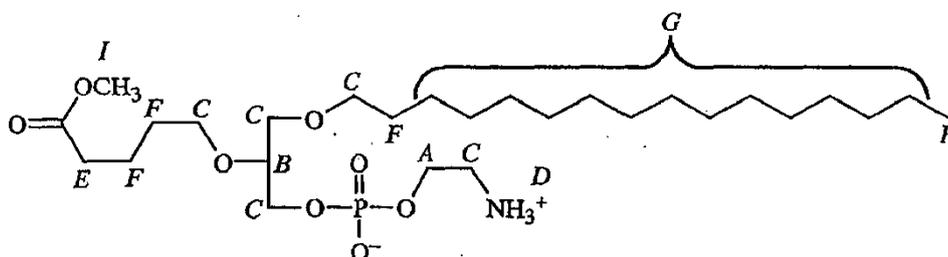
Síntesis de (R)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina 2,88 gramos de (S)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicerol y 3 ml de trietilamina se disolvieron en 3 ml de THF. Esta solución se añadió gota a gota en el transcurso de 15 minutos a una solución enfriada con hielo de 2 ml el POCl₃ en 20 ml de tetrahidrofurano en agitación. La agitación continuó durante 10 minutos adicionales con enfriamiento y a temperatura ambiente durante 45 minutos adicionales. La mezcla de reacción se enfrió en hielo y, gota a gota, se añadió una solución de 1,21 ml de etanolamina y 5,6 ml de trietilamina en 50 ml de THF durante el transcurso de 20 minutos. La agitación se continuó durante 10 minutos con enfriamiento y a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en una mezcla de 24 ml de ácido acético y 10 ml de agua y se calentó hasta 70 °C durante 1 hora. La mezcla se extrajo tres veces con 50 ml de cloroformo, la fase orgánica se lavó dos veces con 50 ml de agua, y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 4,0 gramos de (R)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina como una cera amarilla.

Caracterización por RMN de 1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina:

Una muestra de 1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl₃). Después, los espectros se midieron a 300 MHz. Las muestras se midieron mediante espectroscopia de RMN tanto de ¹H como de ¹³C.

Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

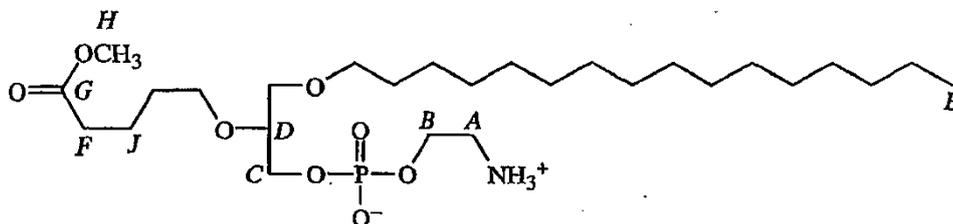
La asignación de los picos de ¹H observados de acuerdo con la estructura de 1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina fue la siguiente.



RMN de ¹H (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl₃) = 7,28 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
6,905	3 H, s, a	D
4,200	2 H, s, a	A
3,594	3H, s	I
3,336 - 3,562	10 H, m, 5 x CH ₂	C
3,291 - 3,313	1 H, m	B
2,250 - 2,299	2 H, t, J = 7,35 Hz	E
1,454 - 1,620	6 H, m, 3 x CH ₂	F
1,185	26 H, m, 13 x CH ₂	G
0,807	3 H, t, 1 x CH ₃ , J = 6,75 Hz	H

La asignación de los picos de ^{13}C observados de acuerdo con la estructura de 1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina fue la siguiente.



5 RMN de ^{13}C (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 77,0 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
174,08	G
79,00	D
72,01	
70,38	
70,13	
66,25 - 66,34	C
62,34 - 62,43	B
51,61	H
40,42 - 40,51	A
33,87	F
32,05	
29,81	
29,65	
29,47	
26,20	
22,77	
21,74	J
20,74	
14,00	E

Caracterización por espectrometría de masas de 1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina:

La masa calculada para 1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina ($\text{C}_{27}\text{H}_{56}\text{NO}_8\text{P}$) fue 553,7092.

10 El espectro de masas obtenido usando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI + -MS), mostró un ion molecular con $m/z = 554$, correspondiente al ion molecular protonado $[\text{M} + \text{H}]^+$. El espectro de espectrometría de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina.

15 **Síntesis de (R)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-202)** 3,5 gramos de (R)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina se disolvieron en 100 ml de una mezcla de 8:2 (v / v) de metanol: 10 % de solución de hidróxido sódico. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. El pH de la reacción se ajustó a 4 mediante la adición de dihidrógeno fosfato sódico y ácido fórmico. Se añadieron agua (100 ml) y cloroformo (100 ml). Después de la extracción, se separaron las fases y el disolvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en cloroformo, se secó sobre sulfato sódico y se filtró, y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 3,0 gramos de (R)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina bruta. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (120

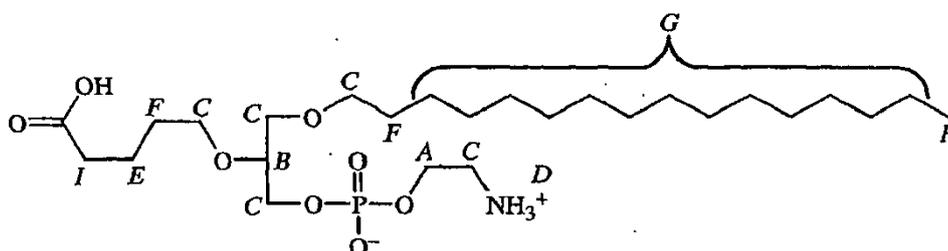
5 gramos). El producto se eluyó con una mezcla de cloroformo: metanol y agua a una relación volumétrica 60:35:5. El disolvente de las fracciones que contienen el producto deseable se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió en cloroformo y se secó sobre sulfato sódico, y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 2,11 gramos de (R)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina pura como una cera. La cera se secó a presión reducida sobre pentóxido de fósforo.

Caracterización de RMN de CI-202:

Una muestra de CI-202 se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl₃). Después, los espectros se midieron a 300 MHz. Las muestras se midieron mediante espectroscopia de RMN tanto de ¹H como de ¹³C.

10 Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-202) y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

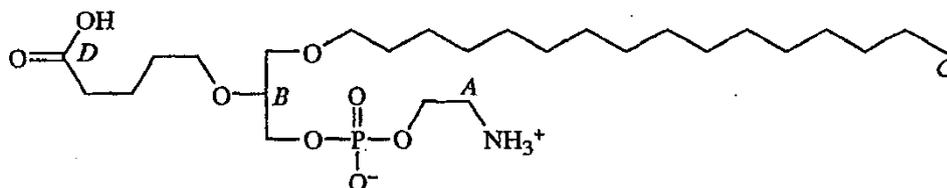
La asignación de los picos de ¹H observados de acuerdo con la estructura de 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina fue la siguiente.



15 RMN de ¹H (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl₃) = 7,26 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
8,140	3 H, s, a	D
4,144	2 H, s, a	A
3,838 - 4,037	2H, m	C
3,612 - 3,697	2H, m	C
3,385- 3,530	6 H, m, 3 x CH ₂	C
3,256	1 H, s, a	B
2,302 - 2,348	2H, t, CH ₂ , J = 6,9Hz	I
1,672 - 1,710	2H, m	E
1,518 - 1,606	4 H, m, 2 x CH ₂	F
1,254	26 H, m, 13 x CH ₂	G
0,879	3 H, t, 1 x CH ₃ , J = 6,75 Hz	H

La asignación de los picos de ¹³C observados de acuerdo con la estructura de 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina fue la siguiente.



20 RMN de ¹³C (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl₃) = 77,004 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
177,16	D
77,868	B
71,776	
70,218	
69,814	
66,161	
62,205	
40,533	A
33,818	
31,916	
29,714	
29,664	
29,549	
29,359	
29,156	
26,080	
22,679	
21,732	
14,109	C

Espectrometría de masas y caracterización de CI-202:

La masa calculada para 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina ($C_{26}H_{54}NO_8P$) fue 539,36.

- 5 El espectro de masas obtenido usando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI + -MS), mostró un ion molecular con $m/z = 538$, correspondiente al ión molecular desprotonado $[M + H]^-$. El espectro de espectrometría de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-202).

Producción in vitro de IL12/23 p40:

- 10 El efecto de CI-202 sobre la producción *in vitro* de IL12/23 p40 se determinó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos:

Como se muestra en la FIG. 1, CI-202 inhibió la producción de IL12 / 23 p40 por las células derivadas de médula ósea de una manera dependiente de la dosis.

Expresión del ARNm de IL12/23p40:

- 15 El efecto de CI-202 sobre la expresión *in vitro* del ARNm de IL12/23 p40 se determinó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

Como se muestra en la FIG. 2, CI-202 inhibió la expresión de ARNm de IL12/23 p40 durante el periodo de tiempo analizado (2-4 horas después de la administración de CI-202) y la inhibición por CI-202 fue comparable a la inhibición por CI-201.

Fosforilación de tirosina:

- 20 El efecto de CI-202 sobre la fosforilación de tirosina *in vitro* en macrófagos primarios se determinó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

Como se muestra en la FIG. 3, el tratamiento con 10 $\mu\text{g/ml}$ (18,5 μM) de CI-202 tiene como resultado la inducción de la fosforilación de tirosina, mientras que la exposición a 20 $\mu\text{g/ml}$ (37 μM) de CI-202 produce reducción en los niveles de fosfotirosina. Estos cambios son muy similares al efecto inducido por, respectivamente, 10 $\mu\text{g/ml}$ (17 μM) y 20

µg/ml (34 µM) del control positivo de CI-201.

Toxicidad de CI-202:

La toxicidad de CI-202 se evaluó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

- 5 Como se muestra en las FIG. 4A y 4B, se detectó toxicidad significativa de CI-202 únicamente a dosis superiores a 50 µg/ml y la DL₅₀ de CI-202 se sitúa entre 50 y 100 µg/ml.

Desarrollo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) inducida con glicoproteínas de la mielina de oligodendrocitos:

- 10 El efecto de CI-202 sobre el desarrollo *in vivo* de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) inducida con glicoproteínas de la mielina de oligodendrocitos en ratones se determinó como se ha descrito anteriormente en la sección de Materiales y Métodos.

Como se muestra en la FIG. 5, la administración de 4 mg / kg de CI-202 retrasó el inicio de la enfermedad y redujo la manifestación clínica de EAE.

Desarrollo de artritis inducida con colágeno (AIC):

- 15 El efecto de CI-202 sobre el desarrollo *in vitro* de artritis inducida con colágeno en ratones se determinó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

Como se muestra en la FIG. 6, la administración de 0,4 mg / kg de CI-202 redujo significativamente la gravedad de la artritis en todo el período de estudio. La puntuación clínica máxima de la artritis se redujo en un 42 % con respecto a los ratones control.

20 **Ejemplo 2**

1-hexadecil-2-(6-carboxi)hexanil-glicero-3-fosfocolina (CI-203)

- 25 (R)-1-hexadecil-2-(6-carboxi)hexanil-*sn*-glicero-3-fosfocolina se sintetizó como se describe a continuación en el presente documento usando (R)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida. (S)-1-hexadecil-2-(6-carboxi)hexanil-*sn*-glicero-3-fosfocolina se sintetiza utilizando los mismos procedimientos, pero con (S)-(+)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida.

Síntesis de (R)-1-hexadecil-3-tritil-glicerol: (R)-1-hexadecil-3-tritil-glicerol se preparó como se describe en el Ejemplo 1, preparando en primer lugar (S)-1-hexadecil-glicerol usando (R)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol.

- 30 **Síntesis de (R)-1-hexadecil-2(6-etilcarboxi)hexanil-3-tritil-glicerol:** 5 gramos de (R)-1-hexadecil-3-tritil-glicerol y 2 ml de 7-bromo-heptanoato de etilo se disolvieron en 70 ml de benceno. Se añadieron 23 gramos de KOH en polvo y la mezcla de reacción se agitó y se calentó a reflujo durante 14 horas, mientras se eliminaba el agua formada en la reacción mediante destilación azeotrópica. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se lavó tres veces con 70 ml de agua, y se secó sobre sulfato sódico. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo obtenido se disolvió en 25 ml de hexano caliente y la solución se enfrió a 4 °C durante la noche. El subproducto precipitado se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 5 gramos de (R)-1-hexadecil-2-(6-etilcarboxi)hexanil-3-tritil-glicerol como un sólido blanco.

- 35 **Síntesis de (S)-1-hexadecil-2(6-etilcarboxi)hexanil-1-glicerol:** 5 gramos de (R)-1-hexadecil-2(6-etilcarboxi)hexanil-3-tritil-glicerol se disolvieron en 90 ml de etanol. Se añadieron lentamente 20 ml de ácido clorhídrico concentrado y la mezcla se agitó y se calentó a reflujo durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se vertió en hielo y se extrajo tres veces con 100 ml de éter dietílico. La fase orgánica se lavó con 100 ml de agua, 100 ml de solución de bicarbonato sódico saturado y de nuevo con 100 ml de agua, y se secó sobre sulfato sódico. Después de la filtración del sulfato sódico, el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en n-hexano caliente y después la mezcla se mantuvo a 4 °C durante la noche. Después de la filtración del precipitado, el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 3,1 gramos de un aceite de color amarillo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (140 gramos). El producto se eluyó con 300 ml de CHCl₃: acetato de etilo (6:4 v/v). La eliminación del disolvente a presión reducida dio 1,34 gramos de un aceite incoloro. El secado a presión reducida sobre pentóxido de fósforo dio (S)-1-hexadecil-2-(6-etilcarboxi)hexanil-glicerol como un sólido incoloro.

- 40 **Síntesis de (R)-1-hexadecil-2(6-etilcarboxi)hexanil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina:** 1,34 gramos de (S)-1-hexadecil-2-(6-etilcarboxi)hexanil-glicerol y 1,2 ml de trietilamina se disolvieron en 15 ml de THF. Esta solución se añadió gota a gota en el transcurso de 15 minutos a una solución enfriada con hielo de 0,8 ml el POCl₃ en 10 ml de THF. La solución se agitó durante 10 minutos adicionales con enfriamiento y durante 45 minutos adicionales a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfrió en hielo y, gota a gota, se añadió una solución de 0,52 ml de etanolamina y 2,4 ml de trietilamina en 25 ml de THF durante el transcurso de 15 minutos. Se continuó la agitación

de la mezcla de reacción durante 10 minutos mientras se enfriaba en un baño de hielo y después durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en una mezcla de 24 ml de ácido acético y 10 ml de agua y después se calentó hasta una temperatura de 70 °C durante 1 hora. Después, la mezcla se extrajo tres veces con 50 ml de cloroformo y se lavó dos veces con 50 ml de agua. La eliminación del disolvente a presión reducida dio 1,87 gramos de (*R*)-1-hexadecil-2-(6-etilcarboxi)hexanil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina como un aceite de color amarillo.

Síntesis de (*R*)-1-hexadecil-2(6-etilcarboxi)hexanil-*sn*-glicero-3-fosfocolina: 1,87 gramos de (*R*)-1-hexadecil-2-(6-etilcarboxi)hexanil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina se disolvieron en una mezcla de 50 ml de isopropanol y 18 ml de diclorometano. Gota a gota se añadió una solución de 2,17 gramos de carbonato potásico en 10 ml de agua en el transcurso de 5 minutos mientras que la reacción se mantuvo a una temperatura de 35-40 °C. Se añadió una solución de 1,52 ml sulfato de dimetilo en 10 ml de isopropanol gota a gota a una temperatura de 40 °C en el transcurso de 10 minutos. La reacción se mantuvo a una temperatura de 40 °C durante 90 minutos, y después se añadió agua y la mezcla se extrajo dos veces con 50 ml de cloroformo. La fase orgánica se lavó con 50 ml de agua y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 1,8 gramos de (*R*)-1-hexadecil-2-(6-etilcarboxi)hexanil-*sn*-glicero-3-fosfocolina como una cera.

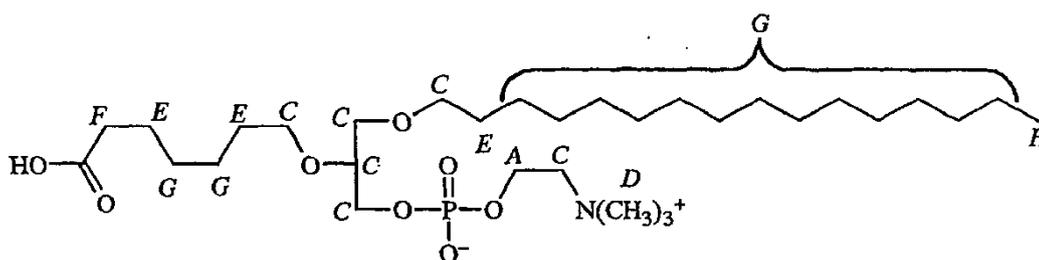
Síntesis de (*R*)-1-hexadecil-2(6-carboxi)hexanil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (CI-203): 1,8 gramos de (*R*)-1-hexadecil-2(6-etilcarboxi)hexanil-*sn*-glicero-3-fosfocolina se disolvieron en 50 ml de metanol. Se añadió una solución de 10 % de hidróxido sódico y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. El pH de la reacción se ajusta a un intervalo de 4-5 mediante la adición de dihidrógeno fosfato sódico. Se añadieron 70 ml de agua y 70 ml de cloroformo. Se separaron las fases acuosa y orgánica, y el disolvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en cloroformo, se secó sobre sulfato sódico y se filtró, y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 1,29 gramos de una cera blanca. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (62 gramos). El producto se eluyó con CHCl₃: metanol : H₂O a una relación volumétrica 60:35:5. Después de la eliminación del disolvente a presión reducida, el residuo se disolvió en cloroformo, se secó sobre sulfato sódico y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 1,0 gramos de (*R*)-1-hexadecil-2-(6-carboxi)hexanil-*sn*-glicero-3-fosfocolina como una cera blanca.

Caracterización por RMN de 1-hexadecil-2-(6-carboxi)hexanil-glicero-3-fosfocolina:

La muestra se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl₃). Los espectros de RMN de ¹H y RMN de ¹³C se midieron a 300 MHz.

Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-hexadecil-2-(6-carboxi)hexanil-glicero-3-fosfocolina y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

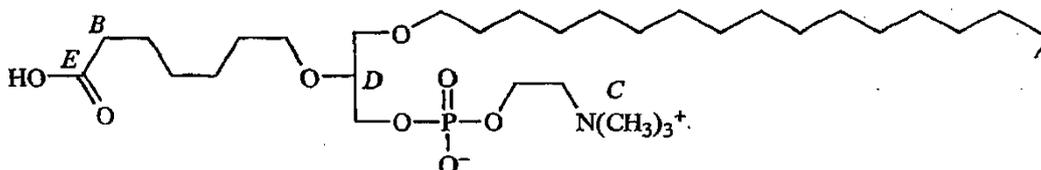
La asignación de los picos de ¹H observados de acuerdo con la estructura de 1-hexadecil-2-(6-carboxi)hexanil-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente.



RMN de ¹H (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl₃) = 7,260 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
4,279	2H, a, s	A
3,375 - 3,539	11 H, m, 5 x CH ₂ + CH	C
3,242	9H, s, 3 x CH ₃	D
2,302	2 H, t, CH ₂ , J = 6,15Hz	F
1,543 - 1556	6H, m	E
1,256 - 1374	30 H, m, 15 x CH ₂	G
0,879	3 H, t, 1 x CH ₃ , J = 6,75 Hz	H

La asignación de los picos de ^{13}C observados de acuerdo con la estructura de 1-hexadecil-2-(6-carboxi)hexanil-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente.



5

RMN de ^{13}C (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 77,002 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
176,60	E
78,166	D
71,749	
70,368	
70,116	
65,972	
59,777	
54,390	C
34,120	B
31,925	
29,732	
29,597	
29,526	
29,368	
28,412	
26,109	
25,373	
24,665	
22,685	
14,111	A

Caracterización por espectrometría de masas de 1-hexadecil-2-(6-carboxi)hexanil-glicero-3-fosfocolina:

La masa calculada para 1-hexadecil-2-(6-carboxi)hexanil-glicero-3-fosfocolina ($\text{C}_{31}\text{H}_{64}\text{NO}_8\text{P}$) fue 609,82.

- 10 El espectro de masas obtenido usando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI + -MS), mostró un ion molecular con $m/z = 609$, correspondiente al ion molecular desprotonado $[\text{M} + \text{H}]^-$. El espectro de espectrometría de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-hexadecil-2-(6-carboxi)hexanil-glicero-3-fosfocolina.

Producción *in vitro* de IL12/23 p40:

- 15 El efecto de CI-203 sobre la producción *in vitro* de IL12/23 p40 se determinó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

Como se muestra en la FIG. 7, CI-203 inhibió la producción de IL12 / 23 p40 por las células derivadas de médula ósea de una manera dependiente de la dosis.

Fosforilación de tirosina:

El efecto de CI-203 sobre la fosforilación de tirosina *in vitro* en células derivadas de médula ósea se determinó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos. Tanto el enantiómero R de CI-203 como el racémico de CI-203 se analizaron. Tanto el enantiómero R como el enantiómero S del CI-201 se utilizaron como controles.

Como se muestra en la FIG. 8, el tratamiento con 20 µg/ml (33 µM) de (*R*)-CI-203 y CI-203 racémico causó una reducción en los niveles de fosfotirosina, mientras que el tratamiento con 1 µg/ml (1,7 µM) CI-203 no tenía ningún efecto aparente. El efecto aparente efecto, de (*R*)-CI-203 y CI-203 racémico fue similar al efecto inducido por los enantiómeros R y S de CI-201.

Toxicidad de CI-203:

La toxicidad de CI-203 se evaluó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

Como se muestra en las FIG. 9A y 9B, se observó toxicidad significativa de CI-203 únicamente a dosis de 100 µg/ml y la DL₅₀ de CI-203 se sitúa entre 50 y 100 µg/ml.

Ejemplo 3**1-dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicerol-3-fosfocolina (CI-209)**

(*R*)-1-dodecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicerol-3-fosfocolina se sintetizó como se describe a continuación en el presente documento usando (*R*)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida. (*S*)-1-dodecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicerol-3-fosfocolina se sintetiza utilizando los mismos procedimientos, pero con (*S*)-(+)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida.

Síntesis de (*S*)-1-dodecil-glicerol: 11 gramos de (*R*)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol, 20,6 gramos de hidróxido potásico en polvo y 24,08 gramos de bromuro de dodecilo se agitaron en 300 ml de benceno y se sometieron a reflujo durante 14 horas al tiempo que se retiraba el agua formada mediante destilación azeotrópica. La mezcla de reacción se enfrió después a temperatura ambiente y se añadieron 150 ml de agua. La mezcla de reacción se extrajo después tres veces con 150 ml de éter metil-terc-butílico (MTBE), la fase orgánica combinada se lavó con 100 ml de agua y el disolvente se eliminó después a presión reducida, produciendo 29,71 gramos de un aceite de color marrón claro. Este residuo se disolvió en 100 ml de metanol. Se añadieron 6 ml de ácido clorhídrico concentrado y la solución resultante se sometió a reflujo hasta que se obtuvo una solución transparente, seguido de enfriamiento a temperatura ambiente y la adición de 100 ml de agua. El producto se extrajo con 150 ml de cloroformo, se lavó consecutivamente con 150 ml de agua, 150 ml de solución acuosa saturada de carbonato sódico y de nuevo con 150 ml de agua. El disolvente se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, y se eliminó a presión reducida, produciendo 23,77 gramos del producto bruto. El producto bruto se recrystalizó en 200 ml de hexano a 4 °C para dar 19,83 gramos de (*S*)-1-dodecil-glicerol como cristales blancos.

Síntesis de (*R*)-1-dodecil-3-tritil-glicerol: 19,83 gramos de (*S*)-1-dodecil-glicerol y 21,0 gramos de trifetilclorometano se añadieron a una mezcla de 250 ml de tetrahidrofurano seco (THF) y 60 ml de acetonitrilo seco. Se añadieron 22 ml de trietilamina y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 17 horas en nitrógeno. La mezcla de reacción se enfrió después a temperatura ambiente y se añadieron 5 ml de trietilamina y 10 gramos de hielo. La mezcla se transfirió a un embudo de separación y se extrajo con 100 ml de MTBE. La fase orgánica se lavó consecutivamente con 150 ml de agua, 150 ml (1,5 %) de H₂SO₄, 150 ml de agua, 150 ml de bicarbonato sódico acuoso saturado y de nuevo con 150 ml de agua. Después, la solución se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo, 40,63 gramos de un aceite de color marrón, se disolvió en 200 ml de acetato de etilo y se enfrió hasta -20 °C durante un par de días. La mezcla se centrifugó a una temperatura de -10 °C y el líquido madre se separó mediante vertido. El sólido fundió a temperatura ambiente y se purificó mediante cromatografía en una columna de gel de sílice (195 gramos). 18,57 gramos de (*R*)-1-dodecil-3-tritil-glicerol puro eluyeron mediante mezclas de cloroformo y hexano, seguido de una mezcla de 9:1 (v/v) de cloroformo: acetato de etilo. En rendimiento fue del 48,5 %.

Síntesis de (*S*)-1-dodecil-2-(5'-hexenil)-glicerol: 18,57 gramos de (*R*)-1-dodecil-3-tritil-glicerol, 4 ml de 6-bromo-1-hexeno y 22,57 gramos de hidróxido potásico en polvo se agitaron en 100 ml de benceno y se calentó a reflujo durante 9 horas, mientras se eliminaba del agua formada mediante destilación azeotrópica. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se añadieron 100 ml de agua y la solución se transfirió a un embudo de separación. La solución se extrajo cuatro veces con 50 ml de éter dietílico y el disolvente de la fase orgánica combinada se eliminó a presión reducida, produciendo 19,31 gramos de un residuo. El residuo se disolvió en 100 ml de metanol y después se añadieron 6 ml de HCl concentrado (37 %). La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 4 horas, se enfrió hasta la temperatura ambiente y se agitó a esta temperatura durante más de 96 horas. La mezcla de reacción se concentró hasta aproximadamente 50 ml mediante la eliminación del disolvente a presión reducida y se añadieron 50 ml de agua. La solución se transfirió a un embudo de separación y se extrajo dos veces con 100 ml de MTBE. Después, el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo (18,85 gramos) se disolvió en

hexano y la solución obtenida se enfrió en un baño de hielo durante 30 minutos. El precipitado se separó por filtración, se lavó con hexano enfriado y el disolvente del filtrado se eliminó a presión reducida. El residuo (15,23 gramos) se disolvió de nuevo en hexano caliente y se enfrió a 4 °C durante la noche. Después de la filtración y la eliminación del disolvente del filtrado, el filtrado se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (77,34 gramos). La elución se realizó con una mezcla 1:1 (v / v) de cloroformo y acetato de etilo, seguido de cloroformo puro y luego cloroformo con 3 % de acetona. Se obtuvieron 10,03 gramos de (S)-1-dodecil-2-(5'-hexenil)-glicerol. En rendimiento fue del 78,1 %.

Síntesis de (R)-1-dodecil-2(5'-hexenil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina: 5,75 gramos de (S)-1-dodecil-2-(5'-hexenil)-sn-glicerol (que se secó en un desecador sobre P₂O₅) y 3,11 ml de trietilamina se disolvieron en 50 ml de THF. Esta solución se añadió gota a gota en el transcurso de 30 minutos a una solución enfriada con hielo de 1,7 ml el POCl₃ en 20 ml de THF. La agitación continuó durante 30 minutos adicionales con enfriamiento y durante 45 minutos adicionales a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfrió después en un baño de hielo y después, gota a gota, se añadió una solución de 1,3 ml de etanolamina y 3,3 ml de trietilamina en 30 ml de THF durante el transcurso de 15 minutos. La agitación se continuó durante 30 minutos en el baño de hielo y después a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente del filtrado se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió en una mezcla de 36 ml de ácido acético y 15 ml de agua, se calentó a 70 °C durante 1 hora, y se enfrió hasta la temperatura ambiente. La solución se extrajo dos veces con 50 ml de una mezcla 2:1 (v / v) de cloroformo: metanol, se lavó con solución de bicarbonato sódico diluido y el disolvente se eliminó a presión reducida, produciendo 8,54 gramos de un producto bruto. Este producto en bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (55 gramos). 4,99 gramos de pura (R)-1-dodecil-2-(5'-hexenil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina eluyeron con cloroformo seguido de mezclas de cloroformo con 2,5% - 40% de metanol. En rendimiento fue del 63,85 %.

Síntesis de (R)-1-dodecil-2(5'-hexenil)-sn-glicero-3-fosfocolina: 4,99 gramos de (R)-1-dodecil-2-(5'-hexenil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina se disolvieron en una mezcla de 35 ml de metanol y 100 ml de diclorometano. Se añadió una solución de 10 gramos de carbonato potásico en 20 ml de agua. A continuación, gota a gota se añadieron 2,5 ml de sulfato de dimetilo en el transcurso de 1 hora y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Según lo determinado por cromatografía en capa fina, todavía quedaba algo de material de partida en la mezcla de reacción. Se añadió 1 ml adicional de sulfato de dimetilo y la mezcla de reacción se calentó a 40 °C durante 5 horas. Después, la mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se añadieron 100 ml de agua, seguido de extracción de la mezcla tres veces con 100 ml de una mezcla 2:1 (v / v) de cloroformo: metanol. El disolvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida, produciendo 5,8 gramos de (R)-1-dodecil-2-(5'-hexenil)-sn-glicero-3-fosfocolina bruta.

Síntesis de (R)-1-dodecil-2-(4-carboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina (CI-209): Se añadieron 2,76 gramos de bicarbonato sódico a una solución de 5,18 gramos de (R)-1-dodecil-2-(5'-hexenil)-sn-glicero-3-fosfocolina en 100 ml de agua. Después se añadió una solución de 20,4 gramos de peryodato sódico en 100 ml de agua. Una solución de 270 mg de permanganato potásico en 82 ml de agua se introdujo en un embudo de goteo y se añadió gota a gota según lo necesario para mantener un color rosa de la mezcla de reacción. Se añadió un total de 58 ml de solución de permanganato durante la reacción. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El pH de la reacción se ajustó a aproximadamente 4 mediante la adición de 20 gramos de dihidrógeno fosfato sódico y después 3 ml de ácido fosfórico al 80 %. La mezcla de reacción se extrajo tres veces con 50 ml de una mezcla 2:1 de cloroformo: metanol, y el disolvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió en cloroformo y se lavó con agua. La solución orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, y el disolvente se eliminó a presión reducida, produciendo 4,89 gramos del producto bruto. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (58,2 gramos). 1,81 gramos de pura (R)-1-dodecil-2-(4-carboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina eluyeron con cloroformo seguido de mezclas de cloroformo con 10 % - 60 % de metanol. En rendimiento fue del 33,76 %.

Una ruta sintética adicional para la síntesis de CI-209 se realizó del siguiente modo:

Síntesis de (R)-1-dodecil-2-(5'-hexenil)-3-acetil-glicerol: (R)-1-dodecil-3-tritil-glicerol (67 gramos), preparado como se ha descrito anteriormente en el presente documento, 6-bromo-1-hexeno (26,14 gramos) y KOH (35 gramos) en polvo se agitaron en benceno (200 ml) y se sometieron a reflujo durante 9 horas, mientras se eliminaba del agua formada mediante destilación azeotrópica. El volumen del disolvente se redujo gradualmente hasta aproximadamente 100 ml. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadió agua (150 ml). La solución se transfirió a un embudo de separación y se extrajo con éter dietílico (3 x 150 ml). La fase orgánica combinada se lavó con agua (3x 150 ml) y después el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo (78 gramos) se disolvió en ácido acético (200 ml) y la solución se enfrió en un baño de hielo. A esta solución enfriada se añadió una mezcla de 40 ml de anhídrido acético (40 ml) y 1 ml de ácido perclórico al 70 %. La mezcla de reacción se dejó alcanzar la temperatura ambiente y después se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se añadió hielo, y después se añadieron éter dietílico (400 ml) y agua (400 ml). La fase orgánica se separó y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió en hexano caliente y la solución se almacenó durante la noche a una temperatura de 4 °C. Los subproductos precipitados se separaron por filtración y el disolvente del filtrado se eliminó a presión reducida para dar 55 gramos de un producto oleoso de color marrón. El producto en bruto se

purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (350 gramos). El (*R*)-1-dodecil-1-(5'-hexenilo)-3-acetil-glicerol puro se eluyó con una mezcla de 1:1 (v/v) de cloroformo: hexano (1.500 ml) seguido de cloroformo (1.500 ml). La eliminación del disolvente de las fracciones que contienen el producto dio 52 gramos de producto.

5 **Síntesis de (*S*)-1-dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicerol:** Se suspendieron peryodato sódico (150 gramos), permanganato potásico (2,5 gramos) e hidrógenocarbonato de sódico (10 gramos) en agua (500 ml). A la suspensión acuosa se añadió una solución de (*R*)-1-dodecil-2-(5'-hexenil)-3-acetil-glicerol (52 gramos) en terc-butanol (500 ml) durante 1 hora y después la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite, que se lavó adicionalmente con *tert*-butanol. La solución se extrajo con hexano (3x 100 ml). La fase orgánica combinada se lavó dos veces con bisulfito sódico acuoso (15 gramos en 100 ml de agua) y luego con agua (100 ml). El disolvente se concentró a presión reducida y se trató con 100 ml de agua y 10 ml de NaOH al 30 % para alcanzar un pH de 12. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se extrajo con una mezcla 8:2 (v / v) de hexano: MTBE (200 ml) para eliminar las impurezas restantes. La solución acuosa básica se acidificó con HCl (6 ml) hasta un pH de 1 y después se extrajo con una mezcla 7: 3 (v / v) de hexano: acetato de etilo (3 x 100 ml). La fase orgánica combinada se secó sobre sulfato sódico y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo (30 gramos de un aceite de color amarillo) se purificó por cromatografía en una columna de gel de sílice (500 gramos). El (*S*)-1-dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicerol puro se eluyó con una mezcla de 1:1 (v/v) de cloroformo: hexano (1.000 ml) seguido de cloroformo (1000 ml) y después mezclas de cloroformo: acetato de etilo (9:1 a 1:1, v/v). La eliminación del disolvente de las fracciones que contienen el producto dio 13,4 gramos de producto.

Síntesis de (*S*)-1-dodecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicerol: (*S*)-1-dodecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicerol (13,38 gramos) se disolvió en 100 ml de metanol y se añadieron 2 ml de ácido clorhídrico concentrado. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Se añadió agua (50 ml) y la solución se transfirió a un embudo de separación y se extrajo con cloroformo (3 x 100 ml). La fase orgánica combinada se lavó con agua (100 ml), bicarbonato sódico concentrado (100 ml) y de nuevo con agua (100 ml). El secado sobre Na₂SO₄ anhidro y la evaporación del disolvente a presión reducida proporcionaron 13,9 gramos de producto BRUTO como un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (200 gramos). El (*S*)-1-dodecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicerol puro se eluyó con cloroformo, seguido de mezclas de cloroformo: acetato de etilo (9:1 a 1:7, v/v). La eliminación del disolvente de las fracciones que contienen el producto dio 10,7 gramos de producto puro.

Síntesis de (*R*)-1-dodecil-2(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina: 10,7 gramos de (*S*)-1-dodecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicerol (que se secó mediante destilación azeotrópica con benceno) y 5,2 ml de trietilamina se disolvieron en THF(50 ml). Esta solución se añadió gota a gota en el transcurso de 90 minutos a una solución enfriada con hielo de POCl₃ (3,2 ml) en 50 ml de THF en agitación. La agitación continuó durante 15 minutos adicionales con enfriamiento y durante 45 minutos adicionales a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfrió después en un baño de hielo y después, gota a gota, se añadió una solución de etanolamina (22 ml) y trietilamina (7,2 ml) en 50 ml de THF durante el transcurso de 60 minutos en agitación. La agitación se continuó durante 30 minutos en el baño de hielo y después a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente del filtrado se eliminó a presión reducida. El residuo (14 gramos de un aceite amarillo) se disolvió en una mezcla de ácido acético (120 ml) y agua (50 ml), se calentó a 70 °C durante 1 hora, y se enfrió hasta la temperatura ambiente. La solución se extrajo con una mezcla 2:1 (v / v) de cloroformo: metanol (3 x 100 ml), la fase orgánica combinada se lavó con agua (2 x 100 ml) y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 15 gramos de (*R*)-1-dodecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina como un aceite de color naranja. (*R*)-1-dodecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (14 gramos) se disolvieron en una mezcla de isopropanol (100 ml) y diclorometano (55 ml). Gota a gota se añadió una solución de carbonato potásico (22 gramos) en agua (100 ml) mientras la mezcla de reacción se mantenía a 35-40 °C. Una solución de sulfato de dimetilo (14 ml) en isopropanol (50 ml) se añadió gota a gota a 40 °C. La mezcla se agitó a 40 °C durante 2 horas, se enfrió hasta la temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió agua (80 ml) y la mezcla se extrajo con cloroformo (3 x 100 ml). La fase orgánica combinada se lavó con agua (100 ml) y el disolvente se eliminó a presión reducida para (*R*)-1-dodecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (14,6 gramos) como una cera de color naranja.

Síntesis de (*R*)-1-dodecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (CI-209): (*R*)-1-dodecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (14,6 gramos) se disolvió en una mezcla de 8:2 (v/v) de metanol: solución al 10 % de NaOH (100 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. El pH de la reacción se ajustó a 5 mediante la adición de dihidrógeno fosfato sódico y ácido fórmico. Se añadieron agua (150 ml), cloroformo (150 ml) y metanol (50 ml). Se separaron las fases acuosa y orgánica, y el disolvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en cloroformo, se secó sobre sulfato sódico y se filtró, y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 15 gramos de una cera. La cera se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (224 gramos). El producto se eluyó con cloroformo (600 ml), seguido de una mezcla 8:2 (v / v) de cloroformo: metanol (600 ml) y después de una mezcla de cloroformo: metanol: H₂O (60:35:5, v/v). Después de la eliminación del disolvente a presión reducida de las fracciones que contienen el producto deseado, el residuo se disolvió en cloroformo, se secó sobre sulfato sódico y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 10,5 gramos de (*R*)-1-dodecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina como una cera blanca.

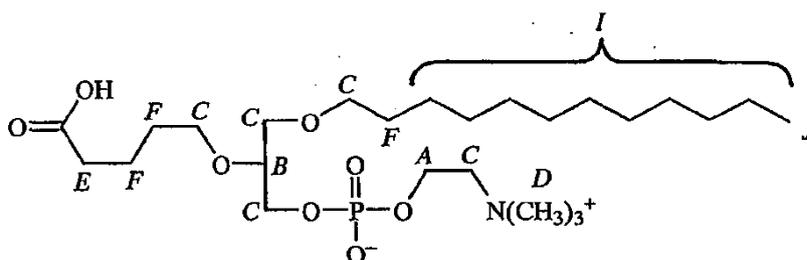
Caracterización por RMN de 1-dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina:

La muestra se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl_3) con unas pocas gotas de metanol deuterado. Los espectros de RMN de ^1H y RMN de ^{13}C se midieron a 300 MHz.

5 Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

La asignación de los picos de ^1H observados de acuerdo con la estructura de 1-dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente:

RMN de ^1H



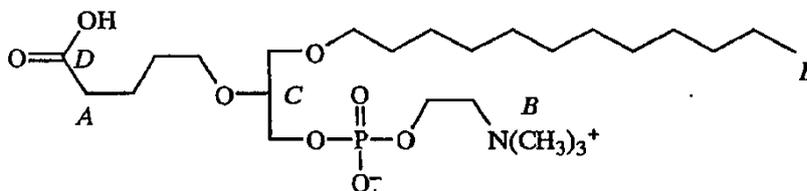
10

RMN de ^1H (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 7,282 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
4,264	2 H, s, a	A
3,775	1 H, m	B
3,381- 3,671	10 H, m, 5 x CH_2	C
3,251	9 H, s, 3 x CH_3	D
2,261	2 H, t,	E
1,535 - 1,582	6 H, m, 3 x CH_2	F
1,258	18 H, m, 9 x CH_2	I
0,880	3 H, t, 1 x CH_3 , J = 6,6 Hz	J

La asignación de los picos de ^{13}C observados de acuerdo con la estructura de 1-dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente:

15 **RMN de ^{13}C**



RMN de ^{13}C (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 78,020 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
178,51	D
78,446	C
72,200	

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
70,535 - 70,642	
66,805 - 66,812	
65,997 - 66,070	
59,515 - 59,580	
54,419	B
35,578	A
32,310	
30,015	
29,892	
29,730	
26,449	
23,037	
22,685	
14,224	E

Caracterización por espectrometría de masas de 1-dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina:

La masa calculada para 1-dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina ($C_{25}H_{52}NO_8P$) fue 525,3431.

- 5 El espectro de masas obtenido usando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI + -MS), mostró un ion molecular con $m/z = 524$, correspondiente al ión molecular desprotonado $[M + H]^-$. El espectro de espectrometría de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina.

Producción *in vitro* de IL12/23 p40:

- 10 El efecto de CI-209 sobre la producción *in vitro* de IL12/23 p40 se determinó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

Como se muestra en la FIG. 10, CI-209 inhibió la producción de IL12 / 23 p40 por las células derivadas de médula ósea de una manera dependiente de la dosis.

Fosforilación de tirosina:

- 15 El efecto de CI-209 sobre la fosforilación de tirosina *in vitro* en células macrófagos primarias se determinó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

Como se muestra en la FIG. 11, el tratamiento con 20 $\mu\text{g/ml}$ de CI-209 indujo un incremento de los niveles de fosfotirosina, mientras que el tratamiento con 20 $\mu\text{g/ml}$ de CI-201 produjo una disminución en los niveles de fosfotirosina.

Toxicidad de CI-209:

- 20 La toxicidad de CI-209 se evaluó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

Como se muestra en las FIG. 9A y 9B, en dos experimentos que se realizaron, no se observó toxicidad de CI-209 a ninguna de las dosis analizadas. Así, la DL_{50} de CI-209 fue superior a 150 $\mu\text{g/ml}$ (286 μM).

Ejemplo 4

- 25 **Ácido 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina-N-glutámico (CI-210)**

El ácido (*R*)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-glutámico se sintetizó como se describe a continuación en el presente documento usando (*R*)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina como material de partida. El ácido (*S*)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-glutámico se sintetiza usando los mismos procedimientos pero con (*S*)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-

fosfoetanolamina como material de partida.

La síntesis de (*R*)- y (*S*)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina se ha descrito anteriormente en el presente documento en el Ejemplo 1.

5 1,85 gramos (3,33 mmol) de (*R*)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina se disolvieron en 175 ml de diclorometano y se añadieron 1,39 ml de trietilamina. Esta solución se añadió gota a gota durante el transcurso de 15 minutos a una solución de 0,42 gramos de anhídrido glutárico en 175 ml de diclorometano. Después de completar la adición, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadieron 20 gramos de hidrógenofosfato sódico en 100 ml de agua y la mezcla de reacción se agitó enérgicamente durante 20 minutos. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo de separación, se separaron las fases, y la fase acuosa se extrajo dos veces con 100 ml de cloroformo. La fase orgánica combinada se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. Se obtuvieron 1,16 gramos del producto bruto, que se purificó sobre gel de sílice (60 gramos). El producto se eluyó de la columna con 200 ml de cloroformo, seguido de mezclas de cloroformo: metanol en relaciones de 9:1, 8:2 y 7:3 (v / v) y después 200 ml de cloroformo: metanol (1: 1 por relación volumétrica). El disolvente de las fracciones que contienen el producto deseable se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió en cloroformo y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 131,4 mg de ácido (*R*)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-*N*-glutárico puro (Cl-210) como una cera blanquecina.

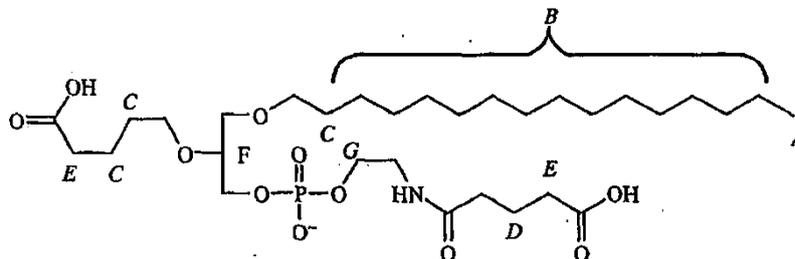
Caracterización por RMN de ácido 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina-*N*-glutárico:

20 La muestra se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl₃) con unas pocas gotas de metanol deuterado. Los espectros de RMN de ¹H y RMN de ¹³C se midieron a 300 MHz.

Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de ácido 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina-*N*-glutárico y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

La asignación de los picos de ¹H observados de acuerdo con la estructura de ácido 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina-*N*-glutárico fue la siguiente:

25 **RMN de ¹H**

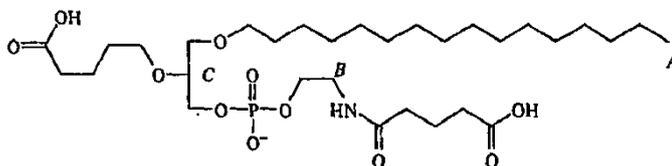


RMN de ¹H (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl₃) = 7,28 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
3,945	2 H, s, a	G
3,896	1 H, s, a	F
3,585 - 3,608	4 H, m, 2 x CH ₂	
3,385 - 3,431	4 H, m, 2 x CH ₂	
3,058 - 3,130	2 H, m, CH ₂	
2,332	4 H, m, 2 x CH ₂	E
1,933	2 H, m, CH ₂	D
1,533 - 1,673	6 H, m, 3 x CH ₂	C
1,255	26 H, m, 13 x CH ₂	B
0,879	3 H, t, 1 x CH ₃ , J = 6,45 Hz	A

La asignación de los picos de ^{13}C observados de acuerdo con la estructura de ácido 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina-N-glutárico fue la siguiente:

RMN de ^{13}C



5

RMN de ^{13}C (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 77,062 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
177,78	
177,37	
174,31	
78,656	C
71,836	
70,343	
69,841	
65,463 - 65,790	
64,541 - 64,861	
45,732	B
35,075	
33,872	
33,213	
31,951	
30,938	
29,748	
29,698	
29,572	
29,391	
29,084	
26,142	
22,710	
21,566	
20,985	
14,128	A

Caracterización por espectrometría de masas de ácido 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina-N-glutárico:

10 La masa calculada para ácido 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina-N-glutárico ($\text{C}_{31}\text{H}_{59}\text{NO}_{11}\text{P}$) fue 652,7746.

El espectro de masas obtenido usando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI + -MS),

mostró un ion molecular con $m/z = 652$, correspondiente al ión molecular desprotonado $[M + H]^-$. El espectro de espectrometría de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de ácido 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina-N-glutárico (CI-210).

Producción *in vitro* de IL12/23 p40:

- 5 El efecto de CI-210 sobre la producción *in vitro* de IL12/23 p40 se determinó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

Como se muestra en la FIG. 13, CI-210 inhibió la producción de IL12 / 23 p40 por las células derivadas de médula ósea de una manera dependiente de la dosis.

Fosforilación de tirosina:

- 10 El efecto de CI-210 sobre la fosforilación de tirosina *in vitro* en células macrófagos primarias se determinó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

Como se muestra en la FIG. 14, el tratamiento con 20 $\mu\text{g/ml}$ de CI-210 indujo un incremento de los niveles de fosfotirosina, mientras que el tratamiento con 20 $\mu\text{g/ml}$ de CI-201 produjo una disminución en los niveles de fosfotirosina.

- 15 **Toxicidad de CI-210:**

La toxicidad de CI-210 se evaluó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

Como se muestra en las FIG. 15A y 15B, se observó una toxicidad significativa de CI-210 a una dosis de 100 $\mu\text{g/ml}$ (156,6 μM) o superior, y la DL_{50} de CI-210 fue de aproximadamente 150 $\mu\text{g/ml}$ (235 μM).

- 20 **Ejemplo 5**

1-octadecil-2-(4-carboxi) butil-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-216) y 1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (CI-215)

- 25 (R)-1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina y (R)-1-octadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina se sintetizaron como se describe a continuación en el presente documento usando (R)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida. (S)-1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina y (S)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina se sintetizan usando los mismos procedimientos pero con (S)-(+)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida.

- 30 **Síntesis de (S)-1-octadecil-glicerol:** 20 ml de (R)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol, 27 gramos de hidróxido potásico en polvo y 59 gramos de 1-bromooctadecano se agitaron en 250 ml de benceno y se sometieron a reflujo durante 6 horas al tiempo que se retiraba el agua formada mediante destilación azeotrópica. El volumen del disolvente se redujo gradualmente hasta aproximadamente 200 ml. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se agitó a esta temperatura durante la noche. Se añadieron 200 ml de agua, la mezcla de reacción se extrajo dos veces con 200 ml de éter dietílico, la fase orgánica combinada se lavó con 200 ml de agua, y el disolvente se eliminó después a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en 100 ml de una mezcla de 90:10:5 (volumen / volumen) de metanol: agua: ácido clorhídrico concentrado, y la solución resultante se sometió a reflujo durante 1 hora, seguido de enfriamiento hasta la temperatura ambiente y la adición de 200 ml de agua. El producto se extrajo dos veces con 200 ml de cloroformo, se lavó consecutivamente con 200 ml de agua, 200 ml de solución acuosa saturada de carbonato sódico y de nuevo con 200 ml de agua. Después, el disolvente se eliminó a presión reducida y el producto bruto se cristalizó en 500 ml de hexano para dar 39,5 gramos de (S)-1-octadecil-glicerol puro, que se secó en un desecador a presión reducida con óxido de fósforo.

- 35 **Síntesis de (R)-1-octadecil-3-tritil-glicerol:** 39 gramos (113 mmol) de (S)-1-octadecil-glicerol y 40 gramos (137 mmol) de trifenilclorometano se añadieron a una mezcla de 500 ml de THF seco y 130 ml de acetonitrilo seco. Se añadieron 32 ml de trietilamina seca y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 17 horas. La mezcla de reacción se enfrió después hasta la temperatura ambiente, se vertió en hielo (1 kilogramo), se transfirió a un embudo de separación y se extrajo dos veces con 200 ml de éter dietílico. La fase orgánica se lavó consecutivamente con 200 ml de agua, dos veces con 100 ml (1,5 %) de H_2SO_4 diluido, 200 ml de agua, 200 ml de bicarbonato sódico acuoso saturado y de nuevo con 200 ml de agua. Después, la solución se secó sobre sulfato sódico anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo, un aceite marrón, se disolvió en 250 ml de acetato de etilo y se enfrió hasta -20°C durante la noche. La mezcla se centrifugó (3.500 revoluciones por minuto) a una temperatura de -10°C (3.500 rpm) y el líquido madre se separó mediante vertido. El sólido restante se disolvió en hexano y se refrigeró ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) durante la noche. La filtración del precipitado dio 50 gramos de (R)-1-octadecil-3-tritil-glicerol puro.

- 50 **Síntesis de (R)-1-octadecil-2-(5'-hexenil)-3-tritil-glicerol:** 50 gramos (89,2 mmol) de (R)-1-octadecil-3-tritil-glicerol y 18 gramos (102 mmol) de sulfonato de 5-hexenil-1-metano se disolvieron en 150 ml de benceno. Se añadieron 20

gramos de KOH en polvo y la mezcla de reacción se agitó y se calentó a reflujo durante 6 horas, mientras se eliminaba el agua formada en la reacción mediante destilación azeotrópica. El volumen del disolvente se redujo gradualmente hasta aproximadamente 50 ml. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 200 ml de agua. La mezcla se extrajo tres veces con 200 ml de éter dietílico, la fase orgánica combinada se lavó tres veces con 200 ml de agua y el disolvente se eliminó a presión reducida, obteniéndose 50 gramos de (*R*)-1-octadecil-2-(5'-hexenil)-3-tritil-glicerol como un aceite naranja.

Síntesis de (*S*)-1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-glicerol: 145 gramos de NaIO₄ se disolvieron en 500 ml de agua. A esta solución se añadieron 14 gramos de K₂CO₃ y 2,4 gramos de KMnO₄ y la suspensión se calentó hasta una temperatura de 40 °C. Gota a gota se añadió una solución de 50 gramos de (*R*)-1-octadecil-2-(5'-hexenil)-3-tritil-glicerol en 500 ml de terc-butanol durante el transcurso de 1,5 horas, y la mezcla se calentó durante 4 horas adicionales. Cantidades adicionales de una solución de KMnO₄ se añadieron según sea necesario para mantener un color rosado. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se agitó a esta temperatura durante la noche. Se añadió bisulfito sódico en porciones hasta que se obtuvo el color rosa y después desapareció el color marrón y la mezcla de reacción se volvió amarilla. Después de agitar esta solución durante 30 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 100 ml de ácido sulfúrico al 10 % gota a gota y la solución se transfirió a un embudo de separación y se extrajo tres veces con 200 ml de hexano. La fase orgánica se lavó dos veces con una solución de 15 gramos de Na₂S₂O₅ en 100 ml de agua y después con 200 ml de agua. La fase orgánica se concentró mediante eliminación de aproximadamente 500 ml de disolvente a presión reducida. A la solución restante, se añadieron 15 ml de agua y 1,5 ml de ácido clorhídrico concentrado y la mezcla obtenida se sometió a reflujo durante 6 horas, después se enfrió a temperatura ambiente y se concentró nuevamente mediante la eliminación del disolvente a presión reducida. El pH del residuo se ajustó a 12 mediante la adición de 100 ml de agua y 10 ml de una solución de NaOH al 30 %. El precipitado se eliminó mediante filtración y se lavó cuatro veces con 10 ml de agua. El filtrado se extrajo con 100 ml de una mezcla 1:1 (v / v) de hexano: acetato de etilo. La fase acuosa se acidificó a un pH de 1 mediante la adición de 8 ml de ácido clorhídrico concentrado, y después se extrajo con 100 ml de hexano. El secado sobre NaSO₄ anhidro, la eliminación del disolvente a presión reducida y la recristalización durante la noche del producto bruto en una mezcla 1:9 (v/v) de acetona:hexano a 5 ± 3 °C produjo 19 gramos de (*S*)-1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicerol en forma de un sólido blanquecino.

Síntesis de (*S*)-1-octadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicerol: Se disolvieron 17 gramos de (*S*)-1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicerol en 100 ml de metanol. Se añadieron 2 ml de HCl concentrado (37 %) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se eliminó a presión reducida y se añadieron 100 ml de agua al residuo obtenido. La mezcla se extrajo tres veces con 70 ml de cloroformo. La fase orgánica combinada se lavó con 70 ml de agua, 70 ml de una solución concentrada de bicarbonato sódico, y de nuevo con 70 ml de agua. Después, la solución se secó sobre sulfato sódico, se filtró, y se evaporó a presión reducida para dar 14 gramos de (*S*)-1-octadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicerol como una cera blanca.

Síntesis de (*R*)-1-octadecil-2(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina: 7 gramos de (*S*)-1-octadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicerol (que se secó mediante destilación azeotrópica con benceno) y 7 ml de trietilamina se disolvieron en 60 ml de THF. Esta solución se añadió gota a gota en el transcurso de 30 minutos a una solución enfriada con hielo de 4,3 ml de POCl₃ en 40 ml de THF. La agitación continuó durante 15 minutos adicionales con enfriamiento y después durante 45 minutos adicionales a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfrió después en un baño de hielo y después, gota a gota, se añadió una solución de 3 ml de etanolamina y 13 ml de trietilamina en 60 ml de THF durante el transcurso de 30 minutos. La agitación se continuó durante 15 minutos en el baño de hielo y después a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en una mezcla de 72 ml de ácido acético y 30 ml de agua y se calentó hasta una temperatura de 70 °C durante 1 hora. La mezcla se extrajo tres veces con 80 ml de cloroformo y se lavó dos veces con 100 ml de agua. La eliminación del disolvente a presión reducida dio 10 gramos de (*R*)-1-octadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina como un aceite de color amarillo.

Síntesis de (*R*)-1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-216): 3 gramos de (*R*)-1-octadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina se disolvieron en 100 ml de una mezcla de 8:2 (v/v) de metanol: 10 % de hidróxido sódico acuoso y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. El pH de la mezcla de reacción se ajustó después a aproximadamente 4 con la adición de ácido fórmico. Se añadieron 100 ml de agua y 100 ml de cloroformo. Se separaron las fases y el disolvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en cloroformo, se secó sobre sulfato sódico y se filtró, y el disolvente se eliminó después a presión reducida. El residuo obtenido (3 gramos) se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (55 gramos). Una mezcla de cloroformo y hexano, seguido de mezclas de cloroformo y metanol, y, finalmente, mezclas de cloroformo, metanol y agua, se usaron para eluir 760 mg de (*R*)-1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina de la columna.

Caracterización por RMN de 1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina:

La muestra se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl₃) con unas pocas gotas de metanol deuterado. Los espectros de RMN de ¹H y RMN de ¹³C se midieron a 600 MHz.

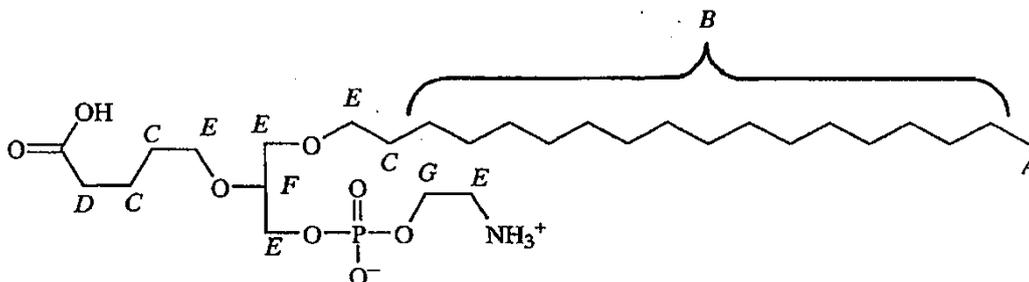
Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-

glicero-3-fosfoetanolamina y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

La asignación de los picos de ^1H observados de acuerdo con la estructura de 1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina fue la siguiente:

RMN de ^1H

5

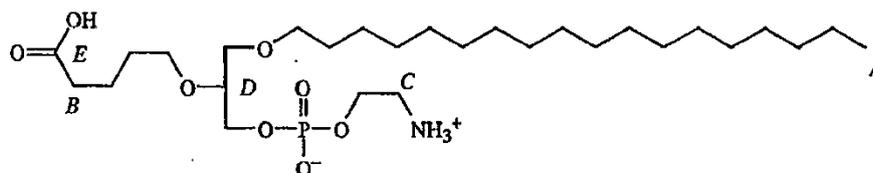


RMN de ^1H (600 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 7,341 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
4,113	2 H, s a	G
3,858	1 H, m	F
3,670	2 H, m, CH_2	E
3,614	2 H, m, CH_2	E
3,562	2 H, m, CH_2	E
3,480	2 H, t, $J = 5,7$ Hz, CH_2	E
3,422	2 H, m, CH_2	E
2,334	2 H, t, $J = 7,2$ Hz, CH_2	D
1,692	2 H, tt, $J = 7,2$ Hz, CH_2	C
1,604	2 H, tt, $J = 6,6$ Hz, CH_2	C
1,545	2 H, tt, $J = 6,6$ Hz, CH_2	C
1,259 - 1,312	30 H, m, 15 x CH_2	B
0,881	3 H, t, $J = 7,2$ Hz, CH_3	A

10 La asignación de los picos de ^{13}C observados de acuerdo con la estructura de 1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina fue la siguiente:

RMN de ^{13}C



RMN de ^{13}C (600 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 77,281 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
177,251	E

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
78,072	D
71,962	
70,306	
70,005	
66,007	
61,995	
40,537	C
34,061	B
32,030	
29,815	
29,764	
29,727	
29,645	
29,459	
29,314	
26,178	
22,778	
21,877	
14,140	A

Caracterización por espectrometría de masas de 1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina:

La masa calculada para 1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina ($C_{28}H_{58}NO_8P$) fue 567.

5 El espectro de masas obtenido usando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI + -MS), mostró un ion molecular con $m/z = 566$, correspondiente al ión molecular desprotonado $[M + H]^-$. La espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI + -MS), mostró un ion molecular con $m/z = 590$, correspondiente al ión molecular cationado $[M+Na]^+$. El espectro de espectrometría de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-216).

10 **Síntesis de (R)-1-octadecil-2(4-metilcarbonil)butil-sn-glicero-3-fosfocolina:** 6 gramos de (R)-1-octadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina se disolvieron en una mezcla de 50 ml de isopropanol y 18 ml de diclorometano, y la mezcla se calentó hasta una temperatura en el intervalo de 35-40 °C. Gota a gota se añadió una solución de 7,5 gramos de carbonato potásico en 10 ml de agua gota a gota mientras que la temperatura se mantuvo a 35-40 °C. Después se añadió gota a gota una solución de 5 ml de sulfato de dimetilo en 10 ml de isopropanol a una temperatura de 40 °C. La reacción se mantuvo a 40 °C durante 2 horas y luego a temperatura ambiente durante la noche. Se añadieron 100 ml de agua, seguido de extracción de la mezcla tres veces con 100 ml de diclorometano. La fase orgánica se lavó con 100 ml de agua y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 6 gramos de (R)-1-octadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina como un aceite amarillo.

15 **Síntesis de (R)-1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina (CI-215):** 6 gramos de (R)-1-octadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina se disolvieron en 100 ml de una mezcla de 8:2 (v/v) de metanol: 10 % de hidróxido sódico acuoso y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. El pH de la mezcla de reacción se ajustó después a aproximadamente 4 con la adición de ácido fórmico. Se añadieron 100 ml de agua y 100 ml de cloroformo. Se separaron las fases y el disolvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió en cloroformo, se secó sobre sulfato sódico y se filtró, y el disolvente se eliminó después a presión reducida. El residuo obtenido (5,3 gramos) se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (112 gramos). Una mezcla de cloroformo y hexano, seguido de mezclas de cloroformo y metanol y, finalmente, mezclas de cloroformo, metanol y agua, se utilizaron para eluir el producto. La eliminación del disolvente a presión reducida de las fracciones que contienen el producto dio 2,8 gramos de (R)-1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina (CI-215) como una cera blanca.

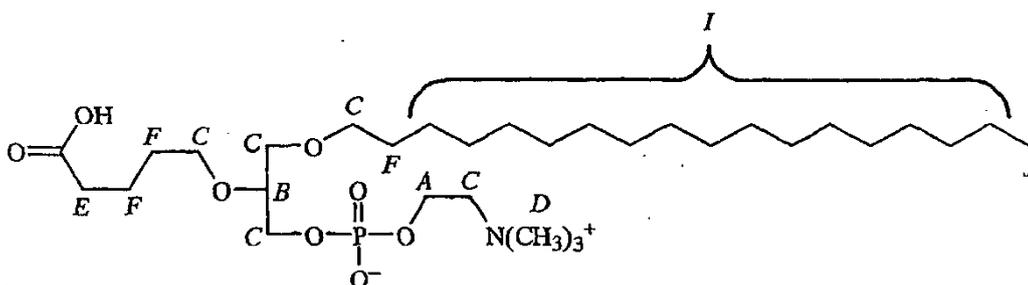
Caracterización por RMN de 1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina:

La muestra se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl_3) con unas pocas gotas de metanol deuterado. Los espectros de RMN de ^1H y RMN de ^{13}C se midieron a 600 MHz.

5 Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

La asignación de los picos de ^1H observados de acuerdo con la estructura de 1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente:

RMN de ^1H :



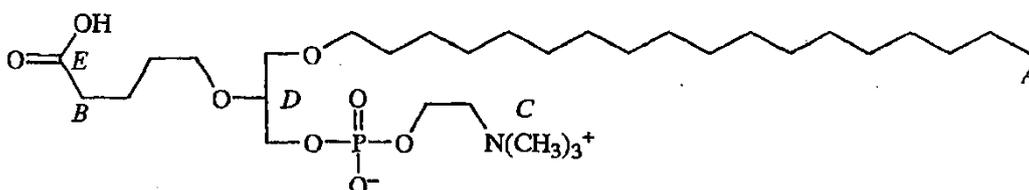
10

RMN de ^1H (600 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 7,343 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
4,267	2 H, s, a	A
3,775	1 H, m	B
3,657	2 H, m, CH_2	C
3,623	2 H, m, CH_2	C
3,505 - 3,562	4 H, m, CH_2	C
3,413	2 H, m, CH_2	C
3,227	9H, s, 3 x CH_3	D
2,358	2H, dt, $J_1 = 7,2 \text{ Hz}$, $J_2 = 3 \text{ Hz}$	E
1,699	2 H, tt CH_2	F
1,602	2 H, tt CH_2	F
1,542	2 H, tt CH_2	F
1,259 - 1,312	30 H, m, 15 x CH_2	I
0,881	3 H, t, 1 x CH_3 , $J = 7,2\text{Hz}$	J

La asignación de los picos de ^{13}C observados de acuerdo con la estructura de 1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente:

15 **RMN de ^{13}C :**



RMN de ^{13}C (600 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 77,285 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
176,580	E
78,216	D
71,936	
70,477	
69,961	
66,613	
65,926	
59,155	
54,424	C
34,117	B
32,026	
29,802	
29,767	
29,750	
29,717	
29,625	
29,452	
29,346	
26,164	
22,774	
22,073	
14,133	A

Caracterización por espectrometría de masas de 1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina:

La masa calculada para 1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina ($\text{C}_{31}\text{H}_{64}\text{NO}_8\text{P}$) fue 609.

- 5 El espectro de masas obtenido usando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI + MS), mostró un ion molecular con $m/z = 610$, correspondiente al ión molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$. El espectro de espectrometría de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (CI-215).

Producción *in vitro* de IL12/23 p40:

- 10 El efecto de CI-216 sobre la producción *in vitro* de IL12/23 p40 se determinó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

Como se muestra en la FIG. 16, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de CI-216 inhibieron la producción de IL-12/23 p40 por las células derivadas de la médula ósea.

Fosforilación de tirosina:

- 15 El efecto de CI-215 y CI-216 sobre la fosforilación de tirosina *in vitro* en células macrófagos primarias se determinó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

Como se muestra en la FIG. 17, el tratamiento con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (17 μM) de CI-215 indujo un incremento de los niveles de fosfotirosina, mientras que el tratamiento con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (34 μM) de CI-215 produjo una disminución en los niveles de fosfotirosina.

- 20 De un modo similar, como se muestra en la FIG. 18, el tratamiento con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (15 μM) de CI-216 tiene como

resultado la inducción de la fosforilación de tirosina, mientras que la exposición a 20 µg/ml (30 µM) de CI-216 produce reducción en los niveles de fosfotirosina. Estos cambios fueron muy similares al efecto inducido por, respectivamente, 10 µg/ml (17 µM) y 20 µg/ml (34 µM) del control positivo de CI-201.

Ejemplo 6

5 **1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-206) y 1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicero-3-fosfocolina (CI-205)**

(R)-1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina y (R)-1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-*sn*-glicero-3-fosfocolina se sintetizaron como se describe a continuación en el presente documento usando (R)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida. (S)-1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicero-3-fosfoetanolamina y (S)-1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicero-3-fosfocolina se sintetizan usando los mismos procedimientos pero con (S)-(+)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida.

Síntesis de (R)-1-hexadecil-3-tritil-glicerol (R)-1-hexadecil-3-tritil-glicerol se preparó como se describe en el Ejemplo 1, preparando en primer lugar (S)-1-hexadecil-glicerol usando (R)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol.

15 **Síntesis de (R)-1-hexadecil-2-(4'-pentenil)-3-tritil-glicerol** 7,35 gramos de (R)-1-hexadecil-3-tritil-glicerol y se disolvieron 1,87 ml de 5-bromo-1-penteno en 150 ml de benceno. Se añadieron 3 gramos de KOH en polvo y la mezcla de reacción se agitó y se calentó a reflujo durante 10 horas, mientras se eliminaba el agua formada mediante destilación azeotrópica. El benceno se destiló hasta que esté casi seco. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se añadieron 100 ml de éter dietílico y la mezcla se lavó con agua (3 x 50 ml) y se secó sobre sulfato sódico. El disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido (7,8 gramos) se disolvió en 20 ml de hexano y se enfrió hasta 4 °C durante la noche. El subproducto precipitado se separó por filtración y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 7,75 gramos del producto como un aceite amarillo.

20 **Síntesis de (R)-1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-3-tritil-glicerol** 7,75 gramos de (R)-1-hexadecil-2-(4'-pentenil)-3-tritil-glicerol se disolvieron en 280 ml de *t*-butanol. Se añadió una solución de 3,2 gramos de carbonato de potasio en 90 ml de agua. Después se añadieron 50 ml de una solución de 34 gramos de peryodato de sodio en 250 ml de agua y 2 ml de una solución de 470 mg de permanganato de potasio en 10 ml de agua. La mezcla se agitó y las porciones restantes de la solución de peryodato se añadieron durante un periodo de 10 minutos. Cantidades adicionales de la solución de permanganato se añadieron según era necesario para mantener un color rosado. La mezcla se calentó hasta 40 °C durante 4,5 horas, se enfrió hasta la temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió bisulfito de sodio en porciones y el color de la mezcla se volvió marrón, a continuación, los sólidos desaparecieron y el color se convirtió en amarillo. Después, la mezcla se agitó durante 30 minutos y gota a gota se añadieron 25 ml de una solución de ácido sulfúrico al 10%. La solución se extrajo con éter dietílico (3 x 100 ml). La fase orgánica combinada se lavó con 50 ml de agua, dos veces con 20 ml de una solución de bisulfito de sodio (preparada a partir de 5 gramos de bisulfito de sodio en 20 ml de agua), y dos veces con 50 ml de agua, después se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a presión reducida, para dar 11 gramos del producto como una cera amarilla.

25 **Síntesis de (S)-1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicerol** 11 gramos de 1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-3-tritil-glicerol se disolvieron en 100 ml de ácido fórmico y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después, el ácido fórmico se eliminó a presión reducida. Se añadieron 100 ml de una solución 1:1 de tolueno:hexano y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. La solución se extrajo dos veces con 100 ml de una mezcla 8:2 (v / v) de metanol: solución acuosa al 10 % de NaOH. La solución básica se acidificó con dihidrogenofosfato de sodio hasta que se obtuvo un pH en el intervalo de 4-5. Se añadieron 100 ml de éter dietílico y 100 ml de agua, se separaron las fases y la fase acuosa se lavó dos veces con 100 ml de éter dietílico. La fase orgánica combinada se lavó después con 100 ml de agua y 100 ml de salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y el disolvente se eliminó a presión reducida, para dar 8 gramos de producto. El producto se cristalizó en una mezcla 1:9 de acetona:hexano para dar 2,4 gramos de (S)-1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicerol.

30 **Síntesis de (S)-1-hexadecil-2-(3-metilcarboxi)propil-glicerol** 2,4 gramos de (S)-1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicerol se disolvieron en 50 ml de metanol. Se añadió 1 ml de HCl concentrado, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas y después se dejó a 4 °C durante la noche. El disolvente se eliminó a presión reducida, se añadieron 50 ml de agua y la mezcla se extrajo tres veces con 50 ml de cloroformo. La fase orgánica se lavó con 50 ml de agua, 50 ml de bicarbonato de sodio concentrado y de nuevo con 50 ml de agua. La mezcla se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y el disolvente se eliminó a presión reducida, para dar 2,9 gramos del producto, que se secó a presión reducida con pentóxido de fósforo.

35 **Síntesis de (R)-1-hexadecil-2-(3-metilcarboxi)propil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina** 2,9 gramos de (S)-1-hexadecil-2-(3-metilcarboxi)propil-glicerol y 3 ml de trietilamina se disolvieron en 3 ml de THF. Esta solución se añadió gota a gota en el transcurso de 15 minutos a una solución enfriada con hielo de 2 ml de POCl₃ en 20 ml de THF. La agitación continuó durante 10 minutos adicionales con enfriamiento y después durante 45 minutos adicionales a temperatura ambiente. A la mezcla de reacción enfriada con hielo, gota a gota se añadió una solución de 1,3 ml de etanolamina y 6 ml de trietilamina en 50 ml de THF en el transcurso de 15 minutos. Se continuó la agitación durante 10 minutos a 0 °C y después durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se

filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió en una mezcla de 24 ml de ácido acético y 10 ml de agua y se calentó hasta 70 °C durante 1 hora. La mezcla se extrajo tres veces con 50 ml de cloroformo y se lavó dos veces con 50 ml de agua. La eliminación del disolvente a presión reducida dio 3,8 gramos de (*R*)-1-hexadecil-2-(3-metilcarboxi)propil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina como un aceite de color marrón.

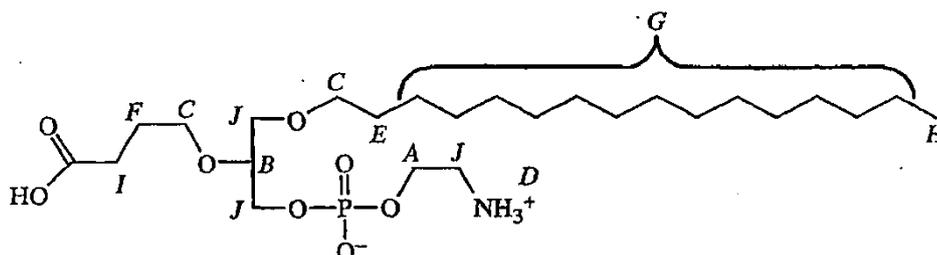
- 5 **Síntesis de (*R*)-1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-206)** 0,8 gramos de (*R*)-1-hexadecil-2-(3-metilcarboxi)propil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina se disolvieron en 20 ml de una mezcla de 8:2 (v/v) de metanol: 10 % de solución de hidróxido sódico acuoso. Se añadió una solución al 10 % de hidróxido sódico y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El pH de la reacción se ajustó hasta un intervalo de 4-5 mediante la adición de dihidrógeno fosfato sódico. Se añadieron 50 ml de agua y 50 ml de cloroformo. Se separaron las fases y el disolvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en cloroformo, se secó sobre sulfato sódico y se filtró, y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 684 gramos del producto bruto como residuo. Este residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (30 gramos). El producto se eluyó con una mezcla de cloroformo: metanol: agua a una relación volumétrica 60:35:5. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió en cloroformo y se secó sobre sulfato de sodio, y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 314 mg de (*R*)-2-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina como una cera de color blanco, que se secó a presión reducida con pentóxido de fósforo

Caracterización por RMN de 1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicero-3-fosfoetanolamina:

La muestra se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl₃). Los espectros de RMN de ¹H y RMN de ¹³C se midieron a 300 MHz.

- 20 Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-206) y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

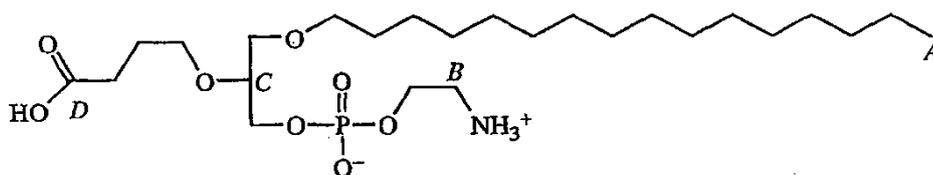
La asignación de los picos de ¹H observados de acuerdo con la estructura de CI-206 fue el siguiente:



- 25 **RMN de ¹H (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl₃) = 7,338 ppm)**

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
4,137	2H, a, s	A
3,828 - 3,900	1H, m	B
3,620 - 3,726	6H, m	J
3,371 - 3,489	4 H, m, 2 x CH ₂	C
2,302 - 2,518	2H, m	I
1,838 - 1,895	2 H, m	F
1,525 - 1,574	2H, m	E
1,258	26 H, m, 13 x CH ₂	G
0,881	3 H, t, 1 x CH ₃ , J = 6,75 Hz	H

La asignación de los picos de ¹³C observados de acuerdo con la estructura de CI-206 fue el siguiente:



RMN de ^{13}C (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 77,256 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
176,760	D
77,850 - 77,951	C
71,938	
70,268	
69,376	
66,045	
62,068	
40,408	B
35,035	
32,017	
30,886	
29,803	
29,698	
29,631	
29,456	
26,150	
25,231	
22,774	
22,149	
14,160	A

Caracterización por espectrometría de masas de 1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicero-3-fosfoetanolamina:

- 5 La masa calculada para 1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicero-3-fosfoetanolamina ($\text{C}_{25}\text{H}_{52}\text{NO}_8\text{P}$) fue 525,6560.

El espectro de masas obtenido usando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI + -MS), mostró un ion molecular con $m/z = 524$, correspondiente al ión molecular desprotonado $[\text{M} + \text{H}]^-$. El espectro de espectrometría de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-206).

- 10 **Síntesis de (R)-1-hexadecil-2-(3-metilcarboxi)propil-sn-glicero-3-fosfocolina** 2,8 gramos de (R)-1-hexadecil-2-(3-metilcarboxi)propil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina se disolvieron en una mezcla de 50 ml de isopropanol y 18 ml de diclorometano. Gota a gota se añadió una solución de 3,7 gramos de carbonato de potasio en 10 ml de agua al tiempo que la mezcla de reacción se mantenía a una temperatura en el intervalo de 35-40 °C. Gota a gota se añadió una solución de 2,52 ml sulfato de dimetilo en 10 ml de isopropanol a 40 °C durante el transcurso de 5 minutos.
- 15 La mezcla de reacción se mantuvo después a 40 °C durante 90 minutos, se enfrió hasta la temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió agua y la mezcla se extrajo tres veces con 50 ml de cloroformo. La fase orgánica se lavó con 50 ml de agua y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 3 gramos de (R)-1-hexadecil-2-(3-metilcarboxi)propil-sn-glicero-3-fosfocolina como un aceite marrón.

- 20 **Síntesis de (R)-1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-sn-glicero-3-fosfocolina (CI-205)** 3 gramos de (R)-1-hexadecil-2-(3-metilcarboxi)propil-sn-glicero-3-fosfocolina se disolvieron en 50 ml de una mezcla de 8:2 (v/v) de metanol: una solución al 10 % de hidróxido sódico y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El pH de la

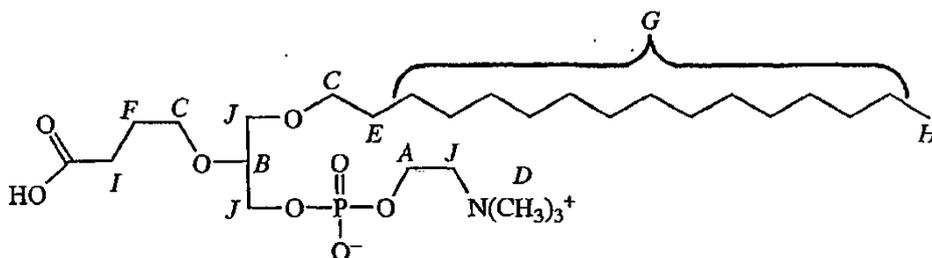
reacción se ajusta a un intervalo de 4-5 mediante la adición de dihidrógeno fosfato sódico. Se añadieron 50 ml de agua y 50 ml de cloroformo y la solución obtenida se transfirió a un embudo de separación. Se separaron las fases y el disolvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en cloroformo, se secó sobre sulfato sódico y se filtró, y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 2,3 gramos del producto bruto como residuo. Este residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (110 gramos). El producto se eluyó con cloroformo: metanol: agua a una relación volumétrica 60:35:5. Después de la eliminación del disolvente a presión reducida, el residuo se disolvió en cloroformo y se secó sobre sulfato de sodio, y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 677 mg de (R)-1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (CI-205) como una cera de color blanco, que se secó a presión reducida con pentóxido de fósforo.

10 **Caracterización por RMN de 1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicero-3-fosfocolina:**

La muestra se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl₃). Los espectros de RMN de ¹H y RMN de ¹³C se midieron a 300 MHz.

Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicero-3-fosfocolina y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

15 La asignación de los picos de ¹H observados de acuerdo con la estructura de 1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente:

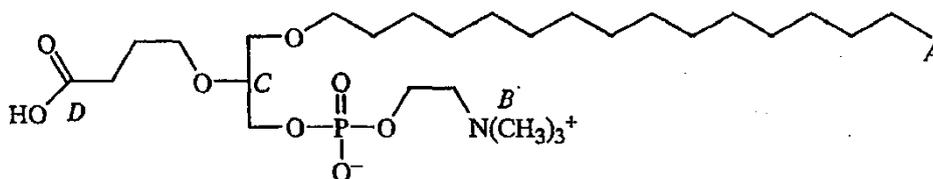


RMN de ¹H (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl₃) = 7,338 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
4,272	2H, s, a	A
3,940 - 3,995	1H, m	B.
3,583 - 3,728	6H,m	J
3,377 - 3,482	4 H, m, 2 x CH ₂	C
3,241	9H, s, 3 x CH ₃	D
2,304 - 2,510	2H, m	I
1,801 - 1904	2 H, m	F
1,517 - 1,560	2H, m	E
1,256	26 H, m, 13 x CH ₂	G
0,880	3 H, t, 1 x CH ₃ , J = 6,75 Hz	H

20

La asignación de los picos de ¹³C observados de acuerdo con la estructura de 1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicero-3-fosfoetanolamina fue la siguiente:



RMN de ^{13}C (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 77,231 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
176,790	D
78,082 - 78,186	C
71,888	
70,389	
69,298	
66,494	
65,922	
59,115 - 59,178	
54,327	B
31,992	
31,280	
29,772	
29,732	
29,673	
29,598	
29,431	
26,115	
25,462	
22,753	
14,148	A

Caracterización por espectrometría de masas de 1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicero-3-fosfoetanolamina:

La masa calculada para 1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicero-3-fosfoetanolamina ($\text{C}_{28}\text{H}_{58}\text{NO}_8\text{P}$) fue 567,7358.

- 5 El espectro de masas realizado usando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI + -MS), mostró un ion molecular con $m/z = 566$, correspondiente al ión molecular desprotonado $[\text{M} + \text{H}]^-$. El espectro de espectrometría de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-hexadecil-2-(3-carboxi)propil-glicero-3-fosfocolina.

Fosforilación de tirosina:

- 10 El efecto de CI-205 y CI-206 sobre la fosforilación de tirosina *in vitro* en macrófagos primarias se determinó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

Como se muestra en la FIG. 19, el tratamiento con 20 $\mu\text{g/ml}$ de CI-206 causa una reducción en los niveles de fosfotirosina.

- 15 Del mismo modo, como se muestra en la FIG. 20, el tratamiento con 20 $\mu\text{g/ml}$ de CI-205 causa una reducción en los niveles de fosfotirosina, al igual que el tratamiento con 20 $\mu\text{g/ml}$ del control positivo, CI-201.

Toxicidad de CI-205 y CI-206:

Las toxicidades de CI-205 y CI-206 se evaluaron como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

- 20 Como se muestra en las FIG. 21A y 21B, se detectó toxicidad significativa de CI-206 a dosis de 50 $\mu\text{g/ml}$ o superiores, estando la DL_{50} de CI-206 entre 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$.

Como se muestra en las FIG. 22A y 22B, se detectó toxicidad significativa de CI-205 a una dosis de 100 µg/ml en dos experimentos y a una dosis de 20-50 µg/ml en un solo experimento, estando la DL₅₀ de CI-205 entre 50 y 100 µg/ml.

Ejemplo 7

5 **1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (CI-207) y 1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina**

(R)-1-octil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina y (R)-1-octil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina se sintetizaron como se describe a continuación en el presente documento usando (R)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida. (S)-1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina y (S)-1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina se sintetizan usando los mismos procedimientos pero con (S)-(+)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida.

Síntesis de (S)-1-octil-glicerol: 21 ml de (R)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol, 29 gramos de hidróxido potásico en polvo y 32 ml de 1-bromooctadecano se agitaron en 150 ml de benceno y se sometieron a reflujo durante 6 horas al tiempo que se retiraba el agua formada mediante destilación azeotrópica. El volumen del disolvente se redujo gradualmente hasta aproximadamente 100ml. La mezcla de reacción se enfrió después a temperatura ambiente y se añadieron 200 ml de agua. Después, la mezcla de reacción se extrajo tres veces con 150 ml de éter dietílico, la fase orgánica combinada se lavó con 100 ml de agua, y a continuación el disolvente se eliminó después a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en 100 ml de una mezcla de 90:10:5 (v/v) de metanol: agua: ácido clorhídrico concentrado, y la solución resultante se sometió a reflujo durante 2 horas, seguido de enfriamiento hasta la temperatura ambiente y la adición de 100 ml de agua. El producto se extrajo tres veces con 150 ml de cloroformo, se lavó consecutivamente con 150 ml de agua, 150 ml de una solución acuosa saturada de carbonato sódico y de nuevo con 100 ml de agua. El disolvente se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, y se eliminó a presión reducida, produciendo 34 gramos de (S)-1-octil-glicerol.

Síntesis de (R)-1-octil-3-tritil-glicerol: 34 gramos de (S)-1-octil-glicerol y 61 gramos de trifenilclorometano se añadieron a una mezcla de 500 ml de THF seco y 130 ml de acetonitrilo seco. Se añadieron 46 ml de trietilamina seca y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 17 horas. La mezcla de reacción se enfrió después a temperatura ambiente y se vertió en hielo (1 kilogramo). La mezcla se transfirió a un embudo de separación y se extrajo tres veces con 200 ml de éter dietílico. La fase orgánica se lavó consecutivamente con 150 ml de agua, dos veces con 100 ml (1,5 %) de H₂SO₄ diluido, 200 ml de agua, 200 ml de bicarbonato sódico acuoso saturado y de nuevo con 200 ml de agua. Después, la solución se secó sobre Na₂SO₄ anhidro₂ y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido, 80 gramos de un aceite de color marrón, se disolvió en 500 ml de hexano caliente y se mantiene a una temperatura de 4 °C durante la noche. El precipitado se separó mediante filtración y el disolvente del filtrado se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en gel de sílice. El (R)-1-octil-3-tritil-glicerol puro resultante se eluyó mediante mezclas de cloroformo con 10 % de hexano, cloroformo con 5 % de hexano, seguido de cloroformo con acetato de etilo (5 % y 10 %). El rendimiento fue del 73 %.

Síntesis de (R)-1-octil-2-(5'-hexenil)-3-tritil-glicerol: 18,7 gramos de (R)-1-octil-3-tritil-glicerol, 5,5 gramos de 6-bromo-1-hexeno y 22 gramos de hidróxido de potasio en polvo se agitaron en 100 ml de benceno y se calentó a reflujo durante 9 horas, mientras se eliminaba del agua formada mediante destilación azeotrópica. El volumen del disolvente se redujo gradualmente hasta aproximadamente 30 ml. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 100 ml de agua. La mezcla obtenida se transfirió a un embudo de separación y se extrajo con éter dietílico. La fase orgánica combinada se lavó dos veces con 200 ml de agua y el disolvente se eliminó a presión reducida, produciendo 20,2 gramos de (R)-octil-2-(5'-hexenil)-3-tritilglicerol.

Síntesis de (S)-1-octil-2-(5'-hexenil)-*sn*-glicerol: 20,2 gramos de (R)-1-octil-2-(5'-hexenil)-3-tritilglicerol se disolvieron en 100 ml de metanol, se añadieron 10 ml de ácido clorhídrico concentrado (32 %) y la mezcla de reacción obtenida se sometió a reflujo durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadieron 100 ml de agua y la solución se extrajo dos veces con 100 ml de éter dietílico. La fase orgánica combinada se lavó con 100 ml de agua, 100 ml de una solución bicarbonato sódico acuoso saturado y de nuevo con 100 ml de agua. El disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido (20,1 gramos) se disolvió en 250 ml de hexano y la solución obtenida se almacenó a una temperatura de 4 °C durante 96 horas, lo que hace que la mayor parte del trifenilcarbinol precipite. Después de la filtración y la eliminación del disolvente del filtrado, el producto restante (12 gramos) se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (91,4 gramos). El (S)-1-octil-2-(5'-hexenil)-*sn*-glicerol (5,7 gramos) se eluyó con cloroformo, seguido por cloroformo con 5 % de acetona. El rendimiento fue del 52 %.

Síntesis de (R)-1-octil-2-(5'-hexenil)-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina: 4,9 gramos de (S)-1-octil-2-(5'-hexenil)-*sn*-glicerol (que se secó en un desecador sobre P₂O₅) y 2,65 ml de trietilamina se disolvieron en 40 ml de THF. Esta solución se añadió gota a gota en el transcurso de 30 minutos a una solución enfriada con hielo de 1,4 ml de POCl₃ en 20 ml de THF en agitación. La agitación continuó durante 30 minutos adicionales con enfriamiento y después durante 45 minutos adicionales a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfrió después en un baño de hielo y después, gota a gota, se añadió una solución de 1,1 ml de etanolamina y 2,8 ml de trietilamina en 30 ml de THF durante el transcurso de 15 minutos en agitación. La agitación se continuó durante 35 minutos en el baño de hielo y después a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se filtró, el sólido se lavó dos

veces con 15 ml de THF y el disolvente del filtrado se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido (5,6 gramos) se disolvió en una mezcla de 36 ml de ácido acético y 15 ml de agua y se calentó hasta una temperatura de 70 °C durante 1 hora. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente, la solución se transfirió a un embudo de separación y se extrajo dos veces con una mezcla 2:1 (v/v) de cloroformo: metanol y se lavó con solución de bicarbonato sódico diluido y el disolvente se eliminó después a presión reducida, produciendo 4,6 gramos de (*R*)-1-octil-2-(5'-hexenil)-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina bruta. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (59 gramos). 2,6 gramos de producto puro se eluyeron con cloroformo, seguido de mezclas de cloroformo con 10 % - 40 % de metanol. El rendimiento fue del 75,9 %.

Síntesis de (*R*)-1-octil-2-(5'-hexenil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina: 2,1 gramos de (*R*)-1-octil-2-(5'-hexenil)-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina se disolvieron en una solución de 100 ml de etanol con 6 gramos de carbonato potásico. Se añadieron 8 ml de sulfato de dimetilo y la mezcla de reacción se calentó hasta una temperatura de 40 °C durante 6 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 100 ml de agua. A continuación, la mezcla se extrajo dos veces con 100 ml de cloroformo. El disolvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en cloroformo y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (59 gramos). 2,0 gramos de (*R*)-1-octil-2-(5'-hexenil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina se eluyeron con cloroformo seguido de mezclas de cloroformo con 20 % - 60 % de metanol. El rendimiento fue del 86,4 %.

Síntesis de (*R*)-1-octil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (CI-207): Una solución de 172 mg de Se bicarbonato de sodio en 17 ml de agua se añadió a una solución de 700 mg de (*R*)-1-octil-2-(5'-hexenilo)-*sn*-glicero-3-fosfocolina en 28 ml de agua. Después se añadió una solución de 3,0 gramos de peryodato sódico en 28 ml de agua. Una solución de 40 mg de permanganato de potasio en 12 ml de agua se introdujo en un embudo de goteo y se añadió gota a gota a la mezcla de reacción según lo necesario para mantener un color rosa de la mezcla de reacción. Aproximadamente la mitad de la solución de permanganato se añadió durante la reacción. Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 horas, se añadieron 6 gramos de dihidrógeno fosfato de sodio, y la mezcla de reacción se extrajo tres veces con 50 ml de una mezcla 2:1 (v / v) de cloroformo: metanol. La fase orgánica combinada se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida, obteniéndose 360 mg de producto bruto. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (12,23 gramos). 119 gramos de (*R*)-1-octil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina eluyeron con cloroformo seguido de mezclas de cloroformo con 10 % - 60 % de metanol.

Se realizó una síntesis alternativa usando (*S*)-1-octil-2-(5'-hexenilo)-3-tritil-glicerol preparado como se ha descrito anteriormente se realizó del siguiente modo:

Síntesis de (*S*)-1-octil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicerol: 77 gramos de NaIO₄ se disolvieron en 300 ml de agua. A esta solución se añadieron 9 gramos de NaHCO₃ y 1,26 gramos de KMnO₄ y la suspensión se calentó hasta 40 °C. Gota a gota se añadió una solución de 21 gramos de (*S*)-1-octil-2-(5'-hexenil)-3-tritil-glicerol en 300 ml de terc-butanol a la mezcla de reacción durante el transcurso de 1 hora, y la mezcla se calentó durante 3 horas adicionales. Cantidades adicionales de una solución de KMnO₄ se añadieron según sea necesario para mantener un color rosado. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se filtró a través de celite y el celite se lavó con terc-butanol. Gota a gota se añadieron 100 ml de solución de ácido sulfúrico al 10 % y la solución se transfirió a un embudo de separación y se extrajo tres veces con 200 ml de hexano. La fase orgánica se lavó con una solución de 20 gramos de Na₂S₂O₅ en 100 ml de agua y después con 200 ml de agua. La fase orgánica se concentró mediante eliminación del disolvente a presión reducida hasta que el volumen se redujo a aproximadamente 150 ml. A la solución restante se añadieron 15 ml de agua y 2 ml de HCl concentrado y la mezcla obtenida se sometió a reflujo durante 6 horas, después se enfrió hasta la temperatura ambiente y se concentró nuevamente mediante la eliminación del disolvente a presión reducida. El pH del residuo se ajustó a 12 mediante la adición de 100 ml de agua y 10 ml de una solución de NaOH al 30 %. El precipitado se eliminó mediante filtración y se lavó cuatro veces con 20 ml de agua. El filtrado se extrajo con 100 ml de una mezcla 1:1 (v / v) de hexano: acetato de etilo. La fase acuosa se acidificó a un pH de 1 mediante la adición de 10 ml de HCl concentrado y se extrajo tres veces con 100 ml de hexano. El secado sobre Na₂SO₄ anhidro y la eliminación del disolvente a presión reducida proporcionaron 7,4 gramos de producto bruto como un aceite amarillo. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (100 gramos). 4,8 gramos de (*S*)-1-octil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicerol eluyeron con cloroformo, seguido de cloroformo con 5 % - 50 % de acetato de etilo. El rendimiento fue del 39,7 %.

Síntesis de (*S*)-1-octil-2-(4-benchedilcarboxi)butil-*sn*-glicerol: Se disolvieron 1,14 gramos de (*S*)-1-octil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicerol en 20 ml de diclorometano. Se añadieron 748 mg de difenildiazometano, preparados como se describe en J. Organic Chem. (1959) 24: 560 - 561, y la mezcla de reacción de color rojo oscuro se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 horas hasta que la solución se volvió incolora. El disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo (1,9 gramos) se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (43 gramos). 1,08 gramos de (*S*)-1-octil-2-(4-benchedilcarboxi)butil-*sn*-glicerol eluyeron con cloroformo, seguido de cloroformo con 5 % - 20 % de acetato de etilo. El rendimiento fue del 61,4 %.

Síntesis de (*R*)-1-octil-2-(4-benchedilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina: 1 gramo de (*S*)-1-octil-2-(4-benchedilcarboxi)butil-*sn*-glicerol (que se secó mediante destilación azeotrópica con benceno) y 0,885 ml de trietilamina se disolvieron en 30 ml de THF. Esta solución se añadió gota a gota en el transcurso de 15 minutos a

una solución enfriada con hielo de 0,235 ml de POCl_3 en 20 ml de THF en agitación. La agitación continuó durante 15 minutos adicionales con enfriamiento y después durante 45 minutos adicionales a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfrió después en un baño de hielo y después, gota a gota, se añadió una solución de 0,154 ml de etanolamina y 0,885 ml de trietilamina en 50 ml de THF durante el transcurso de 15 minutos en agitación. La agitación se continuó durante 15 minutos en el baño de hielo y después a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en una mezcla de 24 ml de ácido acético y 10 ml de agua y se calentó hasta 70°C durante 1 hora. La mezcla se extrajo tres veces con 80 ml de cloroformo y se lavó dos veces con 50 ml de agua. La eliminación del disolvente a presión reducida dio como resultado 1,12 gramos de (*R*)-1-octil-2-(4-benchedrilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina como un aceite de color amarillo.

Síntesis de (*R*)-1-octil-2-(4-benchedrilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina: 1,12 gramos de (*R*)-1-octil-2-(4-benchedrilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina se disolvieron en una mezcla de 65 ml de metanol y 18 ml de diclorometano, y la mezcla se calentó hasta una temperatura en el intervalo de $35\text{--}40^\circ\text{C}$. Gota a gota se añadió una solución de 1,3 gramos de carbonato de potasio en 10 ml de agua mientras que la temperatura se mantuvo a $35\text{--}40^\circ\text{C}$. Después se añadió gota a gota una solución de 7,2 ml de sulfato de dimetilo en 10 ml de metanol a 40°C . La mezcla de reacción se mantuvo a 40°C durante 2 horas y luego a temperatura ambiente durante la noche. Se añadieron 50 ml de agua y la mezcla se extrajo después tres veces con 50 ml de cloroformo. La fase orgánica se lavó con 50 ml de agua y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 1 gramo de (*R*)-1-octil-2-(4-benchedrilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina como un aceite amarillo.

Síntesis de (*R*)-1-octil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (CI-207): Se introdujeron burbujas de HCl gaseoso durante 90 minutos a través de una solución enfriada con hielo de 1 gramo de (*R*)-1-octil-2-(4-benchedrilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina en 40 ml de cloroformo. La solución resultante se agitó en un baño de hielo durante 2 horas adicionales. El pH de la mezcla de reacción se ajustó después a aproximadamente 6 mediante la adición de dihidrógenofosfato de sodio. Se añadieron 50 ml de agua y la mezcla se extrajo tres veces con 60 ml de cloroformo. La fase orgánica combinada se lavó con 60 ml de agua y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 0,370 gramos de (*R*)-1-octil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina. El rendimiento fue del 50,2 %.

Síntesis de (*R*)-1-octil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina: Se introdujeron burbujas de HCl gaseoso a través de una solución enfriada con hielo de 5 gramos de (*R*)-1-octil-2-(4-benchedrilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, preparada como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en 40 ml de cloroformo durante 90 minutos. Una vez finalizada la adición de HCl, la mezcla de reacción se agitó en un baño enfriado con hielo durante 2 horas adicionales. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 6 mediante la adición de una solución acuosa de hidrógenofosfato disódico. La mezcla se extrajo con cloroformo (3 x 50 ml) y la fase orgánica combinada se lavó con agua (100 ml). El disolvente se eliminó a presión reducida, proporcionando 3,5 gramos de un aceite marrón. Este aceite se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (68,5 gramos). El producto se eluyó con cloroformo, seguido de una mezcla 8:2 (v/v) de cloroformo: metanol, y después de una mezcla 700:26:45 (v/v) de cloroformo: metanol: H_2O . Después de la eliminación del disolvente a presión reducida de las fracciones que contienen el producto deseado, el residuo obtenido se disolvió en cloroformo, se secó sobre sulfato sódico y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 150 mg de (*R*)-1-octil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina como una cera de color amarillo.

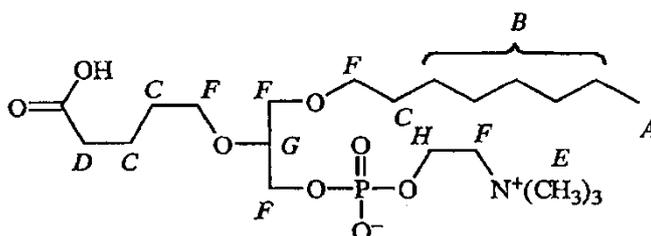
Caracterización por RMN de 1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (CI-207):

La muestra se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl_3) con unas pocas gotas de metanol deuterado (CD_3OD). Después, los espectros se midieron a 300 MHz. Las muestras se midieron mediante espectroscopia de RMN tanto de ^1H como de ^{13}C .

Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

La asignación de los picos de ^1H observados de acuerdo con la estructura de 1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente:

RMN de ^1H

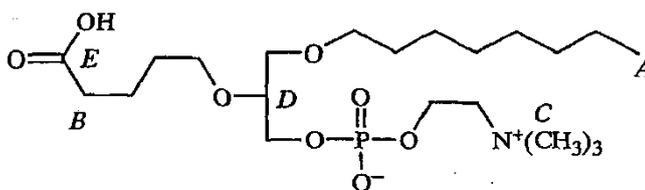


RMN de ^1H (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 7,33 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
4,268	2 H, s a	H
3,942 - 3,969	1H, m	G
3,394 - 3,673	10 H, m, 5 x CH_2	F
3,234	9 H, s, 3 x CH_3	E
2,307	2H, t, J= 7,2Hz	D
1,518 - 1,652	6 H, m, 3 x CH_2	C
1,270	10 H, m, 5 x CH_2	B.
0,879	3 H, t, 1 x CH_3 , J = 6,75 Hz	A

RMN de ^{13}C

- 5 La asignación de los picos de ^{13}C observados de acuerdo con la estructura de 1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente:



RMN de ^{13}C (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 76,99 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
177,530	E
77,895	D
71,646	
69,964	
69,762	
65,207	
65,642	
59,013	
54,080	c
34,629	B
31,664	
29,404	
29,273	
29,179	
29,101	
25,856	
22,482	
22,009	

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
13,890	A

Caracterización por espectrometría de masas de 1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina:

La masa calculada para 1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina ($C_{21}H_{44}NO_8P$) fue 469.

- 5 El espectro de masas realizado usando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI + -MS), mostró un ion molecular con $m/z = 468$, correspondiente al ión molecular desprotonado $[M + H]^-$. El espectro de espectrometría de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina.

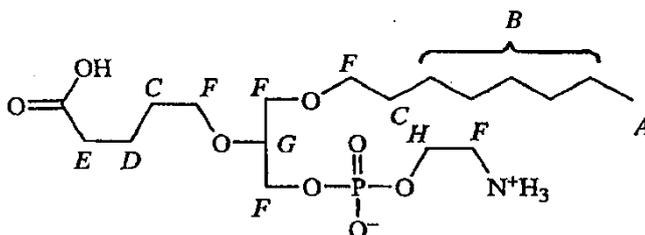
Caracterización por RMN de 1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina:

- 10 La muestra se disolvió en cloroformo deuterado ($CDCl_3$) con unas pocas gotas de metanol deuterado (CD_3OD). Después, los espectros se midieron a 600 MHz. Las muestras se midieron mediante espectroscopia de RMN tanto de 1H como de ^{13}C .

Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

- 15 La asignación de los picos de 1H observados de acuerdo con la estructura de 1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina fue la siguiente:

RMN de 1H



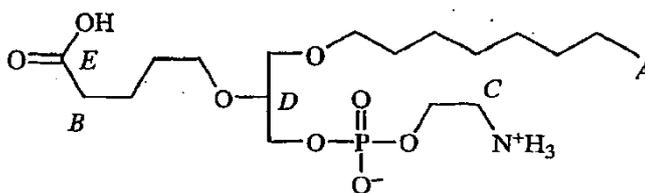
RMN de 1H (300 MHz, disolvente de referencia ($CDCl_3$) = 7,361 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
4,136	2 H, s a	H
3,883 - 3,901	1H, m	G
3,420-- 3,766	10 H, m, 5 x CH_2	F
2,344	2 H, t, J = 7,2 Hz	E
1,673 - 1,719	2H, m, CH_2	D
1,588 - 1,632	2H, m, CH_2	C
1,527 - 1,561	2H, m, CH_2	C
1,272 - 1,290	10 H, m, 5 x CH_2	B
0,882	3 H, t, 1 x CH_3 , J = 6,9 Hz	A

20

RMN de ^{13}C

La asignación de los picos de ^{13}C observados de acuerdo con la estructura de 1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina fue la siguiente:



RMN de ^{13}C (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 79,344 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
178,820	E
77,895	D
79,996	
73,980	
72,367	
72,066	
68,205	
64,103	
42,529	C
35,874	B
33,953	
32,948	
31,699	
31,557	
31,471	
31,383	
31,327	
28,162	
27,320	
24,785	
23,819	
23,691	
16,123	A

Caracterización por espectrometría de masas de 1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina:

5 La masa calculada para 1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina ($\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{NO}_8\text{P}$) fue 427.

El espectro de masas realizado usando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI-MS), mostró un ion molecular con $m/z = 426$, correspondiente al ión molecular desprotonado $[\text{M} + \text{H}]^-$. El espectro de masas realizado utilizando espectrometría de masas con ionización por electropulverización positiva (ESI+ -MS) mostró un ion molecular con $m/z = 428$ correspondiente al ión molecular protonado $[\text{M} + \text{H}]^+$ y un ión con $m/z = 450$ correspondiente a la ion molecular cationado $[\text{M} + \text{Na}]^+$. El espectro de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina.

Ejemplo 8

1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (Cl-208)

15 (*R*)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina se sintetizó como se describe a continuación en el presente documento a partir de (*S*)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicerol. (*R*)-1-hexadecil-2-(4-

metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfocolina se sintetiza a partir de (*R*)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicerol usando los mismos procedimientos.

La síntesis de (*S*)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicerol y (*R*)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicerol se describe en el Ejemplo 1.

5 **Síntesis de (*R*)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (CI-208):** Una solución de 8,60 gramos (19,97 mmol) de (*S*)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicerol (preparado como se describe en el Ejemplo 1) y 2,63 gramos (26 mmol) de trietilamina en 500 ml de THF se añadió gota a gota, en el transcurso de 25 minutos, a una solución enfriada con hielo de 3,90 gramos (26 mmol) de POCl₃ en 100 ml de THF. La agitación continuó durante 10 minutos adicionales con enfriamiento y después durante 45 minutos adicionales a temperatura ambiente.
10 A la mezcla de reacción enfriada con hielo, gota a gota se añadió una solución de 1,6 ml de etanolamina y 6,4 ml de trietilamina en 500 ml de THF con agitación enérgica. La agitación se continuó durante 10 minutos adicionales en el baño de hielo y continuó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió en una mezcla de 24 ml de ácido acético y 100 ml de agua y se calentó hasta 70 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se extrajo dos veces con 250 ml de diclorometano. Después, el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió en una mezcla de 500 ml de isopropanol y 180 ml de diclorometano. Se añadió una solución de 50 gramos de carbonato de potasio en 100 ml de agua a fin de obtener un pH superior a 11. La solución se mantuvo a una temperatura en el intervalo de 35-40 °C durante la adición gota a gota de 11,15 gramos de metiltosilato en 100 ml de isopropanol durante un período de tiempo de 45 minutos. Después de 90 minutos adicionales, la mezcla se acidificó con ácido clorhídrico. Se añadieron 100 ml de agua y 550 ml de diclorometano y se separaron las fases. La fase orgánica se lavó con 100 ml de agua y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice. 11,0 gramos (18,46 mmol) de (*R*)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfocolina se eluyó con cloroformo seguido de una mezcla de cloroformo, metanol y agua. El rendimiento fue del 92,45 %.

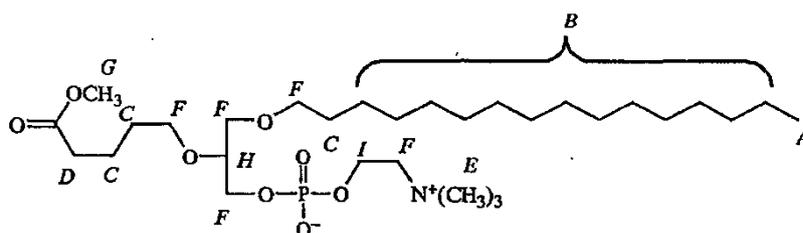
25 **Caracterización por RMN de 1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (CI-208):**

La muestra se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl₃) con unas pocas gotas de metanol deuterado (CD₃OD). Después, los espectros se midieron a 300 MHz. Las muestras se midieron mediante espectroscopia de RMN tanto de ¹H como de ¹³C.

30 Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfocolina y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

La asignación de los picos de ¹H observados de acuerdo con la estructura de 1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente.

RMN de ¹H



35

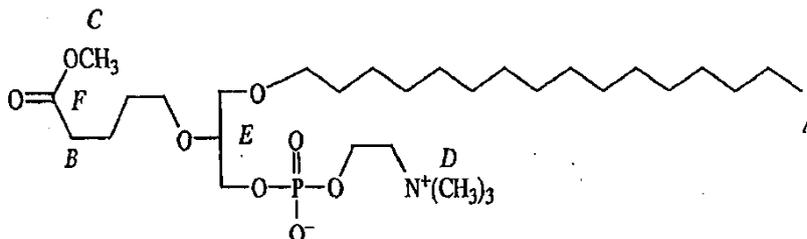
RMN de ¹H (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl₃) = 7,27 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
4,303	2 H, s a	I
3,821 - 3,840	1H, m	H
3,648	3H, s, 1 x CH ₃	G
3,383 - 3,606	10 H, m, 5 x CH ₂	F
3,340	9 H, s, 3 x CH ₃	E
2,334	2 H, t, J = 7,5 Hz	D
1,530 - 1,657	6 H, m, 3 x CH ₂	C

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
1,253	26 H, m, 13 x CH ₂	B
0,879	3H, t, 1 x CH ₃ , J = 6,3Hz	A

RMN de ¹³C

La asignación de los picos de ¹³C observados de acuerdo con la estructura de 1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente:



5

RMN de ¹³C (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl₃) = 77,03 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
174,23	F
77,97	E
71,74	
70,65	
69,84	
66,16	
65,40	
59,44	
54,35	D
51,51	C
33,66	B
31,93	
29,74	
29,62	
29,47	
29,38	
26,14	
22,70	
21,68	
14,13	A

Caracterización por espectrometría de masas de 1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (Cl-208):

10 La masa calculada para 1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (C₃₀H₆₂NO₈P) fue 595,79.

El espectro de masas realizado usando Fast Atom Bombardment (FAB+) mostró un ion molecular con m / z =

596.324, correspondiente al ión molecular protonado $[M+H]^+$. El espectro de MS es de acuerdo con la estructura química de 1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicero-3-fosfocolina.

Fosforilación de tirosina:

5 El efecto de CI-208 sobre la fosforilación de tirosina *in vitro* en macrófagos primarios se determinó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

Como se muestra en la FIG. 23, el tratamiento con 20 $\mu\text{g/ml}$ de CI-208 provoca una reducción en los niveles de fosfotirosina, que es más fuerte que la reducción causada por el tratamiento con 20 $\mu\text{g/ml}$ de CI-201 control.

Toxicidad de CI-208:

10 La toxicidad de CI-208 se evaluó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

Como se muestra en las FIG. 24A y 24B, la toxicidad de CI-208 se detectó a dosis de 50 $\mu\text{g/ml}$ o superiores, detectándose una toxicidad a una dosis de 20 $\mu\text{g/ml}$ en sólo uno de los dos experimentos. El DL_{50} de CI-208 parecía estar entre 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$.

Ejemplo 9

15 **1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (CI-213) y 1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-214)**

(R)-1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina y (R)-1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina se sintetizaron como se describe a continuación en el presente documento usando (R)-(+)-3-benciloxi-1,2-propanodiol como material de partida. (S)-1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina y (S)-1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina se sintetizaron usando los mismos procedimientos pero con (S)-(-)-3-benciloxi-1,2-propanodiol como material de partida.

25 **Síntesis de 1-tritil-3-bencil-*sn*-glicerol** 5 gramos (27,44 mmol) de (R)-(+)-3-benciloxi-1,2-propanodiol y 10 gramos (35,87 mmol) de trifenilclorometano se añadieron a 100 ml de THF seco y 25 ml de acetonitrilo seco. Se añadieron 8 ml de trietilamina seca y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 17 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se vertió en hielo (100 gramos), se transfirió a un embudo de separación y se extrajo tres veces con 100 ml de éter dietílico. La fase orgánica se lavó consecutivamente con 100 ml de agua, dos veces con 100 ml (1,5 %) de ácido sulfúrico diluido, 100 ml de agua, 100 ml de bicarbonato sódico concentrado y de nuevo con 100 ml de agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida, obteniéndose 11 gramos de 1-tritil-3-bencil-*sn*-glicerol como un aceite amarillo. El rendimiento fue del 94 %.

30 **Síntesis de 1-tritil-2-(5'-hexenil)-3-bencil-*sn*-glicerol:** 11 gramos de 1-tritil-3-bencil-*sn*-glicerol y 5,7 gramos de sulfonato de 5-hexenil-1-metano se disolvieron en 110 ml de benceno. Se añadieron 6 gramos de KOH en polvo y la mezcla de reacción se agitó y se calentó a reflujo durante 12 horas, mientras se eliminaba el agua formada en la reacción mediante destilación azeotrópica. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se lavaron tres veces con 100 ml de agua. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió en 150 ml de hexano caliente, se enfrió y se mantuvo a 4 °C durante la noche, durante la cual se produjo la precipitación de subproductos. La filtración y la eliminación del disolvente del filtrado a presión reducida produjo 13 gramos de 1-tritil-2-(5'-hexenil)-3-bencil-*sn*-glicerol como un aceite marrón.

40 **Síntesis de 2-(5'-hexenil)-3-bencil-*sn*-glicerol:** Se disolvieron 13 gramos de 1-tritil-2-(5'-hexenil)-3-bencil-*sn*-glicerol en 100 ml de metanol. Se añadieron 4 ml de ácido clorhídrico concentrado (37 %) y la solución se sometió a reflujo durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se vertió en hielo (100 gramos), se transfirió a un embudo de separación y se extrajo tres veces con 100 ml de éter dietílico. La fase orgánica se lavó consecutivamente con 100 ml de agua, 100 ml de una solución de bicarbonato sódico saturado y de nuevo con 100 ml de agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 14,5 gramos del producto bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (150 gramos). 3,17 gramos de 2-(5'-hexenil)-3-bencil-*sn*-glicerol se eluyó mediante diclorometano seguido de una mezcla de diclorometano y acetato de etilo. El rendimiento fue del 46,8 %.

45 **Síntesis de 1-(15'-carboxi)pentadecilo-2-(5'-hexenil)-3-bencil-*sn*-glicerol** 3 gramos de 2-(5'-hexenil)-3-bencil-*sn*-glicerol se disolvieron en 100 ml de benceno. Se añadieron 3 gramos de KOH y la mezcla de reacción se secó mediante destilación azeotrópica durante 2 horas. A esta mezcla, se añadió una solución de 5,35 gramos de *terc*-butil-16-bromohexadecanoato en 100 ml de benceno gota a gota durante el transcurso de 3 horas. Una vez finalizada la adición de la reacción, la mezcla se sometió a reflujo durante 12 horas adicionales. El volumen del disolvente se redujo gradualmente hasta aproximadamente 20 ml. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se añadieron 100 ml de agua y 100 ml de *terc*-butanol. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a aproximadamente 1 mediante la adición de HCl concentrado. La mezcla se agitó a temperatura ambiente

durante 2 horas y se extrajo tres veces con 100 ml de éter dietílico. La fase orgánica combinada se lavó con porciones de 100 ml de porciones de agua hasta que el pH fue neutro. El secado sobre Na₂SO₄ anhidro y la eliminación del disolvente a presión reducida produjo 6 gramos de un aceite marrón. El aceite se disolvió en 100 ml de una mezcla 1:1 (v / v) de hexano: acetato de etilo. La solución se extrajo dos veces con 100 ml de una mezcla 8:2 (v / v) de metanol: 10% de NaOH acuoso. La solución básica se acidificó a un pH de 4-5 mediante la adición de NaH₂PO₄. Se añadieron 100 ml de éter dietílico y 100 ml de agua y después se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo dos veces con 100 ml de éter dietílico y se combinó con la fase orgánica. La fase orgánica se lavó con 100 ml de agua y 100 ml de salmuera. El secado sobre y Na₂SO₄ y la eliminación del disolvente a presión reducida produjeron 5,3 gramos de 1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(5'-hexenil)-3-bencil-*sn*-glicerol como un aceite amarillo. El rendimiento fue del 90 %.

Síntesis de 1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-3-bencil-*sn*-glicerol 5,3 gramos de 1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(5'-hexenil)-3-bencil-*sn*-glicerol se disolvieron en 130 ml de *tert*-butanol y se añadió una solución de 1,2 gramos de bicarbonato de sodio en 40 ml de agua. Después se añadieron 54 mg de KMnO₄ en 1 ml de agua. Se disolvieron 20 gramos de NaIO₄ en 115 ml de agua y a continuación esta solución se añadió a la mezcla de reacción durante el transcurso de 10 minutos. Se añadieron cantidades adicionales de una solución de 216 mg de KMnO₄ en 4 ml de agua según lo necesario para mantener el color rosado de la reacción. Se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 6 horas y después mezcla de reacción se mantuvo a 4 °C durante la noche. Se añadió bisulfito de sodio hasta que el color de la mezcla de reacción se volvió de color amarillo claro. La mezcla se agitó durante 30 minutos, gota a gota se añadieron 25 ml de solución de ácido sulfúrico al 10 % y la mezcla se extrajo tres veces con 100 ml de éter dietílico. La fase orgánica combinada se lavó consecutivamente con 100 ml de agua, dos veces con 100 ml de una solución que contiene 25 gramos de bisulfito de sodio en 100 ml de agua, y dos veces con 100 ml de agua. El secado sobre y Na₂SO₄ y la eliminación del disolvente a presión reducida produjeron 5,3 gramos de 1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-3-bencil-*sn*-glicerol bruto como una cera amarilla.

Síntesis de (S)-1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicerol 5,0 gramos de 1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)-butil-3-bencil-*sn*-glicerol se disolvieron en 50 ml de *metanol* y se añadieron 10 ml de ácido fórmico al 85 %. Se añadieron 5 gramos de negro de paladio y la mezcla de reacción se calentó a 60 °C en nitrógeno durante 24 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se filtró a través de Celite. El Celite se lavó con metanol y después con agua. Las soluciones de lavado se combinaron con el filtrado y el disolvente del filtrado se eliminó a presión reducida. El residuo (5 gramos) se disolvió en una mezcla de 10 ml de solución de hidróxido de sodio acuoso al 10 % y 40 ml de metanol, y la mezcla obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se lavó con 50 ml de una mezcla 1: 1 (v / v) de hexano: tolueno. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 5 mediante la adición de dihidrógeno fosfato de sodio y después la mezcla se extrajo tres veces con 50 ml de cloroformo. La fase orgánica se lavó con 50 ml de salmuera y se secó sobre Na₂SO₄, anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto en bruto (4 gramos) se recrystalizó en una mezcla 9: 1 (v / v) de hexano: acetona, obteniéndose 3 gramos de (S)-1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicerol como un sólido incoloro. El rendimiento fue del 72 %.

Síntesis de (S)-1-(15'-metilcarboxi)pentadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicerol 3 gramos de (S)-1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)-butil-*sn*-glicerol se disolvieron en 50 ml de metanol. Se añadió 1 ml de ácido clorhídrico concentrado (37 %) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se concentró hasta aproximadamente 10 ml a presión reducida, se añadieron 50 ml de agua y después la mezcla se extrajo tres veces con 50 ml de cloroformo. La fase orgánica combinada se lavó consecutivamente con 50 ml de agua, 50 ml de bicarbonato de sodio concentrado y con 50 ml de agua. El secado sobre y Na₂SO₄ y la eliminación del disolvente a presión reducida produjeron 3 gramos de (S)-1-(15'-metilcarboxi)pentadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicerol como una cera amarilla.

Síntesis de (R)-1-(15'-metilcarboxi)pentadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina 2,8 gramos de (S)-1-(15'-metilcarboxi)pentadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicerol y 2,5 ml de trietilamina seca se disolvieron en 3 ml de THF. Esta solución se añadió gota a gota en el transcurso de 20 minutos a una solución enfriada con hielo de 1,65 ml de POC_l₃ en 20 ml de THF en agitación. La agitación continuó durante 10 minutos adicionales con enfriamiento y después durante 45 minutos adicionales a temperatura ambiente. A la mezcla de reacción enfriada con hielo, gota a gota se añadió una solución de 1,1 ml de etanolamina y 5 ml de trietilamina en 50 ml de THF en el transcurso de 60 minutos en agitación. La agitación se continuó durante 10 minutos adicionales en un baño de hielo y continuó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en una mezcla de 24 ml de ácido acético y 100 ml de agua y se calentó hasta 70 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se extrajo tres veces con 50 ml de cloroformo, y la fase orgánica se lavó dos veces con 50 ml de agua. La eliminación del disolvente a presión reducida dio 4 gramos de (R)-1-(15'-metilcarboxi)pentadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina como un aceite de color marrón.

Síntesis de (R)-1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-214) 1,5 gramos de (R)-1-(15'-metilcarboxi)pentadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina se disolvieron en 50 ml de una mezcla de 8:2 (v / v) de metanol: solución al 10 % de hidróxido sódico acuoso y la mezcla obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. El pH de la reacción se ajustó a 4 mediante la adición de dihidrógeno fosfato de sodio y ácido fórmico. Se añadieron 100 ml de agua y 100 ml de cloroformo. Después de la extracción, se

separaron las fases y el disolvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en cloroformo y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 500 mg de (R)-1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-fosfoetanolamina bruta. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (15 gramos). La elución se realizó con 100 ml de cloroformo, seguido de 100 ml de mezclas de cloroformo: metanol (9: 1 y 8: 2 por relación volumétrica) y después 200 ml de mezclas de metanol: agua (70:26:4, y 60:35:5 por relación volumétrica). El disolvente de las fracciones que contienen el producto deseado se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió en cloroformo y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 88 mg de (R)-1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina pura (CI-214) como una cera amarilla.

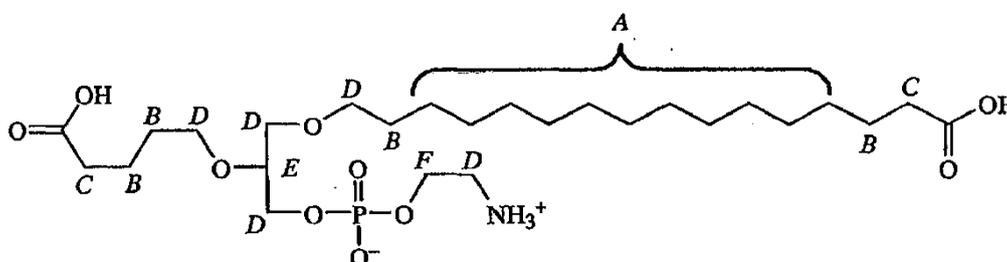
5

10 **Caracterización mediante RMN de 1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina:**

La muestra se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl₃) con unas pocas gotas de metanol deuterado. Después, los espectros se midieron a 300 MHz.

Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

15 **RMN de ¹H**

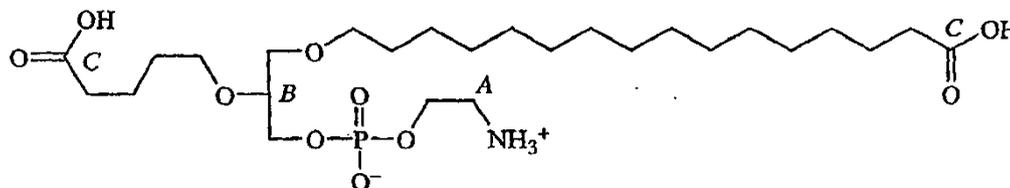


RMN de ¹H (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl₃) = 7,44 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
4,37	2 H, s, a	F
3,93 - 3,98	1 H, m	E
3,42 - 3,85	1,0 H, m, 5 x CH ₂	D
2,27 - 2,36	4H, m, 2 x CH ₂	C
1,54 - 1,70	8 H, m, 4 x CH ₂	B
1,27	22 H, m, 11 x CH ₂	A

RMN de ¹³C

20 La asignación de los picos de ¹³C observados de acuerdo con la estructura de 1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina fue la siguiente.



RMN de ¹³C (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl₃) = 77,614 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
177,250	C
177,125	C

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
78,174	B
72,097	
70,388	
70,199	
65,850	
61,841	
40,788	A
34,424	
34,228	
29,851	
29,698	
29,527	
29,392	
26,289	
25,198	
21,945	

Caracterización mediante espectrometría de masas de 1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina:

5 La masa calculada para 1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina ($C_{26}H_{52}NO_{10}P$) fue 569,6655.

El espectro de masas realizado usando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ES⁺MS), mostró un ion molecular con $m/z = 568$, correspondiente al ión molecular desprotonado $[M + H]^-$.

Además, se observó un catión molecular con $m/z = 570$ mediante espectrometría de masas de ionización por electropulverización positiva (ES⁺-MS), correspondiente al ión molecular protonado $[M + H]^+$.

10 El espectro de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-(15'-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina.

15 **Síntesis de (R)-1-(15'-metilcarboxi)pentadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina** 1,2 gramos de (R)-1-(15'-metilcarboxi)pentadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina se disolvieron en una mezcla de 60 ml de metanol y 20 ml de diclorometano. Se añadió una solución de 2 gramos de carbonato de potasio en 10 ml de agua y la solución se calentó y se mantuvo a una temperatura en el intervalo de 35-40 °C. Se añadió gota a gota una solución de 1,25 ml sulfato de dimetilo en 10 ml de metanol. Una vez completada la adición, la mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 90 minutos adicionales, después se enfrió hasta la temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadieron 100 ml de agua y la extracción con 100 ml de cloroformo se realizó tres veces. La fase orgánica combinada se lavó con 100 ml de agua y el disolvente se eliminó a presión reducida, produciendo 900 mg de (R)-1-(15'-metilcarboxi)pentadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina como un aceite marrón.

20 **Síntesis de (R)-1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina (CI-213)** 1,88 gramos de (R)-1-(15'-metilcarboxi)pentadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina se disolvieron en 50 ml de una mezcla de 8:2 (v / v) de metanol: solución al 10 % de hidróxido sódico acuoso y la mezcla obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. El pH de la reacción se ajustó a 4 mediante la adición de dihidrógeno fosfato de sodio y ácido fórmico. Se añadieron 100 ml de agua y 100 ml de cloroformo. Se separaron las fases y el disolvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en cloroformo y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 860 mg de (R)-1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-fosfocolina bruta. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (20 gramos). La elución se realizó con 100 ml de cloroformo, seguido de 100 ml de cloroformo: metanol (9: 1 y 8: 2 por relación volumétrica) y después 200 ml de mezclas de metanol: agua (70:26:4, y 60:35:5 por relación volumétrica). El disolvente de las fracciones que contienen el producto deseado se eliminó a presión reducida, el residuo se

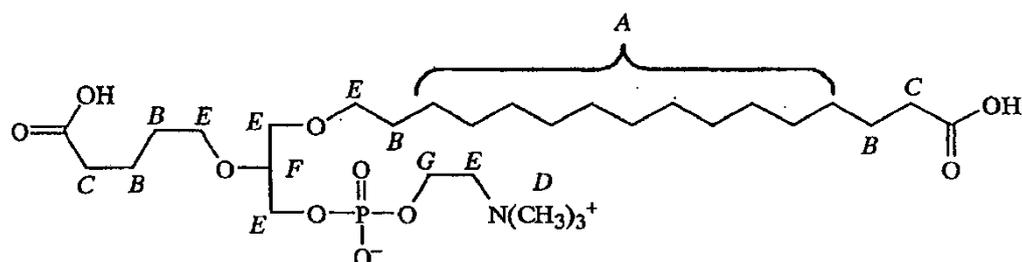
disolvió en cloroformo y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 105 mg de (R)-1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina pura (CI-213) como una cera amarilla.

Caracterización mediante RMN de 1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina:

5 La muestra se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl₃) con unas pocas gotas de metanol deuterado. Los espectros se midieron a 300 MHz.

Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

RMN de ¹H



10

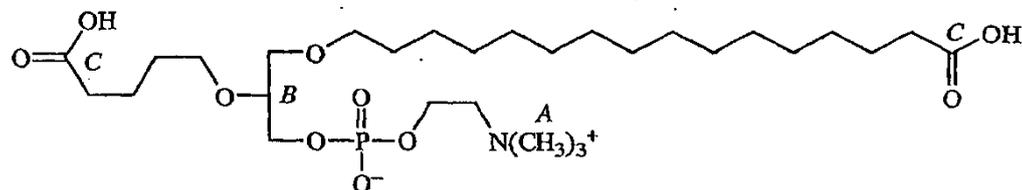
RMN de ¹H (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl₃) = 7,38 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
4,27	2 H, s, a	G
3,94 - 4,00	1 H, m	F
3,36 - 3,89	10 H, m, 5 x CH ₂	E
3,23	9 H, s, 3 x CH ₃	D
2,26 - 2,37	4 H, m, 2 x CH ₂	C
1,52 - 1,72	8 H, m, 4 x CH ₂	B
1,26	22 H, m, 11 x CH ₂	A

RMN de ¹³C

La asignación de los picos de ¹³C observados de acuerdo con la estructura de 1(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente:

15



RMN de ¹³C (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl₃) = 77,35 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
176,90	C
176,72	C
78,21	B
71,92	

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
70,37	
70,01	
66,58	
65,87	
59,14	
54,34	A
34,31	
34,07	
29,66	
29,56	
29,52	
29,36	
29,24	
26,12	
25,06	
21,98	

Caracterización mediante espectrometría de masas de 1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina:

La masa calculada para 1-(15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina ($C_{29}H_{58}NO_{10}P$) fue 611,7453.

- 5 El espectro de masas realizado usando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESMS), mostró un ion molecular con $m/z = 610$, correspondiente al ión $[M + H]^+$.

Además, la espectrometría de masas con ionización por electropulverización positiva (ESI + -MS) mostró un ion molecular con $m/z = 612$ correspondiente al ión molecular protonado $[M + H]^+$ acompañado de un catión molecular con $m/z = 634$ correspondiente al ion cationado $[M + Na]^+$.

- 10 El espectro de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-(15'-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina.

Toxicidad de CI-213 y CI-214:

Las toxicidades de CI-213 y CI-214 se evaluaron como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

- 15 Como se muestra en las FIG. 25A y 25B, CI-213 no mostró claramente una toxicidad significativa dentro de la gama de dosis analizadas (es decir, hasta 150 $\mu\text{g/ml}$, 245,2 μM). Se detectó una disminución estadísticamente significativa en el número de células en un solo experimento, a una dosis de 100 $\mu\text{g/ml}$ (163,5 μM).

- 20 Del mismo modo, como se muestra en las FIG. 26A y 26B, CI-214 no mostró claramente una toxicidad significativa dentro de la gama de dosis analizadas (es decir, hasta 150 $\mu\text{g/ml}$, 263,3 μM). Se detectó una disminución estadísticamente significativa en el número de células en un solo experimento, a una dosis de 100 $\mu\text{g/ml}$ (175,5 μM).

Estos resultados indican que la DL_{50} tanto de CI-213 como de CI-214 es superior a 150 $\mu\text{g/ml}$.

Ejemplo 10

1-hexadecil-2-(2-carboxi)etil-glicero-3-fosfocolina (CI-217)

- 25 (R)-1-hexadecil-2-(2-carboxi)etil-*sn*-glicero-3-fosfocolina se sintetizó como se describe a continuación en el presente documento usando (R)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida. (S)-1-hexadecil-2-(2-carboxi)etil-*sn*-glicero-3-fosfocolina se sintetiza utilizando los mismos procedimientos, pero con (S)-(+)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida.

Síntesis de (S)-1-hexadecil-*sn*-glicerol: 40 gramos de (R)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol, 80 gramos de hidróxido potásico en polvo y 100 gramos de bromuro de hexadecilo se agitaron en 350 ml de benceno y se sometieron a reflujo durante 7 horas al tiempo que se retiraba el agua formada mediante destilación azeotrópica. El volumen del disolvente se redujo gradualmente hasta aproximadamente 50 ml. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se añadieron 300 ml de agua enfriada con hielo y la mezcla se extrajo tres veces con 150 ml de diclorometano. La fase orgánica combinada se lavó con agua y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en 500 ml de una mezcla de 90:10:5 (v/v) de metanol: agua: ácido clorhídrico concentrado, y la solución resultante se sometió a reflujo durante 2 horas. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente se añadieron 200 ml de agua. El producto se extrajo tres veces con 200 ml de cloroformo y se lavó consecutivamente con 200 ml de agua, 200 ml de solución acuosa saturada de carbonato sódico y de nuevo con 200 ml de agua. El disolvente se eliminó a presión reducida y el producto se cristalizó en 450 ml de éter de petróleo a 4 °C, dando 69,93 gramos de (S)-1-Hexadecil-*sn*-glicerol. El rendimiento fue del 73 %.

Síntesis de 1-hexadecil-3-tritil-glicerol: 18,47 gramos de (S)-1-hexadecil-*sn*-glicerol y 19 gramos de trifetilclorometano se disolvieron en una mezcla de 250 ml de THF seco y 58 ml de acetonitrilo seco. Se añadieron 17 ml de trietilamina y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 17 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se vertió en hielo (20 gramos) y trietilamina (5 ml), se transfirió a un embudo de separación y se extrajo con éter dietílico. La fase orgánica se lavó consecutivamente con 200 ml de agua, dos veces con 200 ml (1,5 %) de ácido sulfúrico diluido, 200 ml de agua, 200 ml de bicarbonato sódico acuoso saturado y de nuevo con 200 ml de agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 41,79 gramos del producto crudo como un residuo. Este residuo se disolvió en 300 ml de acetato de etilo y se enfrió a -20 °C durante la noche. La mezcla se centrifugó (3. 500 revoluciones por minuto) a -10 °C y el líquido madre se separó mediante vertido. El sólido obtenido se fundió y se disolvió en hexano y se refrigeró (5 ± 3 °C) durante la noche. La filtración del precipitado dio 18,97 gramos de (R)-1-hexadecil-3-tritil-*sn*-glicerol puro como un sólido blanquecino.

Síntesis de sulfonato 3-hexenil-1-metano: Una mezcla de 20 ml de cis-3-hexeno-1-ol y 40 ml de trietilamina seca en 100 ml de diclorometano seco se enfrió en un baño de hielo. Gota a gota se añadió una solución de 20 ml de cloruro de metanosulfonilo en 50 ml de diclorometano en el transcurso de 75 minutos, y después la mezcla se mantuvo a 4 °C durante 2 horas. Se añadió hielo (50 gramos) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se extrajo dos veces con 100 ml de cloroformo. La fase orgánica se lavó con 50 ml de agua, 50 ml de ácido sulfúrico acuoso al 50 %, 50 ml de agua, 50 ml de bicarbonato de sodio acuoso al 10% y después dos veces con 50 ml de agua. El disolvente se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido (34,90 gramos) se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (85,37 gramos). 18,83 gramos de sulfonato de 3-hexenil-1-metano se obtuvo mediante elución con una mezcla 1:1 (v / v) de cloroformo y hexano.

Síntesis de (S)-1-hexadecil-2-(3'-hexenil)-glicerol 10,60 gramos de (R)-1-hexadecil-3-tritil-*sn*-glicerol se disolvió en una mezcla de 50 ml de benceno y 50 ml de éter de petróleo. Se añadieron 16,65 gramos de KOH en polvo y la mezcla de reacción se calentó a reflujo en atmósfera de nitrógeno. Se añadió una solución de 10 ml de sulfonato de 3-hexenil-1-metano en 50 ml de benceno y 200 ml de éter de petróleo gota a gota a la mezcla de reacción a reflujo durante el transcurso de más de 10 horas mientras se retiraba el agua formada en la reacción por destilación azeotrópica. Una vez completada la adición, se continuó la agitación durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 200 ml de agua. La mezcla se extrajo tres veces con 200 ml de éter dietílico, la fase orgánica combinada se lavó tres veces con 200 ml de agua y el disolvente se eliminó a presión reducida, obteniéndose 11,88 gramos de (R)-1-hexadecil-2-(3'-hexenil)-3-tritil-*sn*-glicerol bruto. El 1-hexadecil-2-(3'-hexenil)-3-tritil-glicerol se disolvió en 100 ml de metanol, se añadieron 4 ml de HCl concentrado y la solución resultante se sometió a reflujo durante 4 horas. Se añadieron 100 ml de agua y la mezcla se extrajo cuatro veces con 100 ml de éter dietílico. La fase orgánica combinada se lavó con 100 ml de agua y se secó sobre Na₂SO₄, anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en hexano y se almacenó a 4 °C durante la noche. La filtración del precipitado y la eliminación del disolvente a presión reducida produjeron 10,08 gramos de producto bruto. Este residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (95,91 gramos). 3,71 gramos del producto, (S)-1-Hexadecil-2-(3'-hexenil)-*sn*-glicerol, se eluyó con una mezcla 1: 1 (v / v) de hexano y cloroformo, seguido de cloroformo y después cloroformo con 2 % de acetona

Síntesis de (R)-1-hexadecil-2-(3'-hexenil)-*sn*-glicerol-3-fosfoetanolamina: 2,08 gramos de (S)-1-hexadecil-2-(3'-hexenil)-*sn*-glicerol (que se secó en un desecador sobre P₂O₅) y 1,2 ml de trietilamina se disolvieron en 60 ml de THF. Esta solución se añadió gota a gota en el transcurso de 55 minutos a una solución enfriada con hielo de 0,84 ml de POCl₃ y 0,7 ml de trietilamina en 40 ml de THF en agitación. La agitación continuó durante 10 minutos adicionales con enfriamiento y después durante 45 minutos adicionales a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfrió después en un baño de hielo y después, gota a gota, se añadió una solución de 0,55 ml de etanolamina y 2,0 ml de trietilamina en 15 ml de THF durante el transcurso de 25 minutos. La agitación se continuó durante 30 minutos en el baño de hielo y después a temperatura ambiente durante la noche. Se añadieron 0,18 ml adicionales de etanolamina y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente del filtrado se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en una mezcla de 48 ml de ácido acético y 20 ml de agua, se calentó a 77 °C durante 1 hora, y se enfrió hasta la temperatura ambiente. La solución se extrajo tres veces con 100 ml de una mezcla 2:1 (v / v) de cloroformo:

metanol, se lavó con una solución diluida de bicarbonato de sodio y 100 ml de agua, y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en cloroformo, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 2,57 gramos de (*R*)-1-hexadecil-2-(3'-hexenil)-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina.

5 **Síntesis de (*R*)-1-hexadecil-2-(3'-hexenil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina:** Se añadieron 6,8 gramos de carbonato potásico a una solución de 2,54 gramos de (*R*)-1-hexadecil-2-(3'-hexenil)-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina en 100 ml de metanol y 100 ml de diclorometano. Gota a gota se añadieron 3 ml sulfato de dimetilo y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7 horas. Se añadió 1 ml adicional de sulfato de dimetilo y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. A la mezcla de reacción se añadieron 26,4 gramos de dihidrógeno fosfato de sodio, después se añadieron 100 ml de agua y la mezcla se extrajo tres veces con 100 ml de una mezcla 2: 1 (v / v) de cloroformo: metanol. La fase orgánica combinada se lavó con 100 ml de agua y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 3,44 gramos de (*R*)-1-hexadecil-2-(3'-hexenil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina bruto.

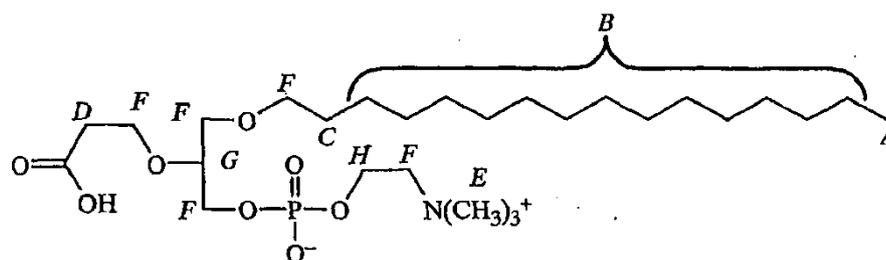
15 **Síntesis de (*R*)-1-hexadecil-2(2-carboxi)etil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (CI-217):** Una solución de 3,4 gramos de (*R*)-1-hexadecil-2-(3'-hexenil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina en 200 ml de agua se calentó hasta 35 °C y se añadieron 4,33 gramos de bicarbonato de sodio. Después, una solución de 13,5 gramos de peryodato de sodio en 90 ml de agua se introdujo en un embudo de goteo y se añadió gota a gota. Una solución de 180 mg de permanganato de potasio en 10 ml de agua se introdujo en un segundo embudo de goteo y se añadió gota a gota según lo necesario para mantener un color rosa de la mezcla de reacción. Se añadió un total de aproximadamente 4 ml de la solución de permanganato. La mezcla de reacción se agitó durante 5 horas a 35 - 40 °C y después a temperatura ambiente durante la noche. El pH de la reacción se ajustó a aproximadamente 3 mediante la adición de dihidrógeno fosfato de sodio y después ácido fosfórico (80 %). mezcla de reacción se extrajo tres veces con 100 ml de cloroformo y el disolvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en cloroformo y se lavó dos veces con 50 ml de solución de bisulfito de sodio y luego con 50 ml de agua. La solución orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, y el disolvente se eliminó a presión reducida, produciendo 2,78 gramos del producto bruto. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (30,89 gramos). 1,98 gramos de (*R*)-1-hexadecil-2-(2-carboxi)etil-*sn*-glicero-3-fosfocolina eluyeron con mezclas de hexano con 20 % - 50 % de cloroformo, seguido de cloroformo y después mezclas de cloroformo con 10 % - 80 % de metanol.

Caracterización por RMN de 1-hexadecil-2-(2-carboxi)etil-glicero-3-fosfocolina:

30 La muestra se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl₃) con unas pocas gotas de metanol deuterado. Los espectros se midieron a 600 MHz.

Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-hexadecil-2-(2-carboxi)etil-glicero-3-fosfocolina y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

RMN de ¹H



35

RMN de ¹H (600 MHz, disolvente de referencia (CDCl₃) = 7,27 ppm)

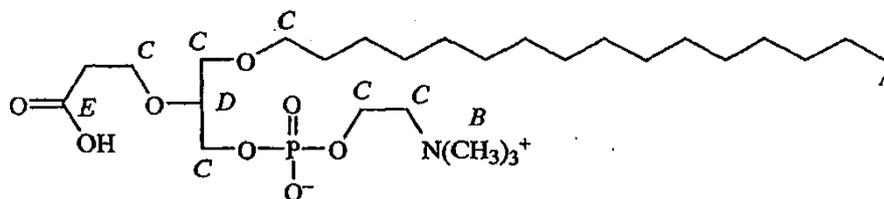
δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
4,052	2 H, s, a	H
3,72	1 H, m	G
3,66	2 H, m, CH ₂	F
3,469	2 H, m, CH ₂	F
3,400	2 H, m, CH ₂	F
3,299	2 H, m, CH ₂	F
3,227	2 H, m, CH ₂	F

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
3,012	9 H, s, 3 x CH ₃	E
2,351	2 H, m, CH ₂	D
1,347	2 H, m, CH ₂	C
1,059	26 H, m, 13 x CH ₂	B
0,675	3 H, t, J = 7,2 Hz, CH ₃	A

RMN de ¹³C

La asignación de los picos de ¹³C observados de acuerdo con la estructura de 1-hexadecil-2-(2-carboxi)etil-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente:

5



RMN de ¹³C (600 MHz, disolvente de referencia (CDCl₃) = 77,817 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
173,126	E
78,990	D
72,220	C
70,695	C
66,932	C
66,584	C
66,271	C
59,509	C
54,487	B
35,945	
35,651	
32,291	
30,040	
29,880	
29,707	
26,432	
23,013	
14,211	A

Caracterización por espectrometría de masas de 1-hexadecil-2-(2-carboxi)etil-glicero-3-fosfocolina:

- 10 La masa calculada para 1-hexadecil-2-(2-carboxi)etil-glicero-3-fosfocolina (C₂₇H₅₆NO₈P) fue 554.
El espectro de masas realizado usando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ES⁺MS),

mostró un ion molecular con $m/z = 553$, correspondiente al ión molecular desprotonado $[M + H]^-$.

Además, el espectro de masas realizado mediante espectrometría de masas con ionización por electropulverización positiva (ESI + -MS) mostró un ion molecular con $m/z = 555$ correspondiente al ión molecular protonado $[M + H]^+$ acompañado de un catión molecular con $m/z = 577$ correspondiente al ion molecular cationado $[M + Na]^+$.

- 5 El espectro de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-hexadecil-2-(2-carboxi)etil-glicero-3-fosfocolina.

Fosforilación de tirosina:

El efecto de CI-217 sobre la fosforilación de tirosina *in vitro* en macrófagos primarios se determinó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

- 10 Como se muestra en la FIG. 27, el tratamiento con 20 $\mu\text{g/ml}$ (36 μM) de CI-217 causó una reducción en los niveles de fosfotirosina, mientras que el tratamiento con 10 $\mu\text{g/ml}$ (18 μM) de CI-217 no tuvo ningún efecto. Estos resultados fueron muy similares a los resultados de los respectivos tratamientos con 20 $\mu\text{g/ml}$ (34 μM) y 10 $\mu\text{g/ml}$ (17 μM) del control positivo CI-201.

Ejemplo 11

- 15 **1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (CI-219) y 1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-220)**

- (R)-1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina y (R)-1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina se sintetizaron como se describe a continuación en el presente documento usando (R)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida. (S)-1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina y (S)-1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina se sintetizan usando los mismos procedimientos pero con (S)-(+)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida.

- 25 **Síntesis de (S)-1-eicosanil-*sn*-glicerol:** 8,6 ml (76,08 mmol) de (R)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol, 15 gramos de hidróxido potásico en polvo y 27,5 gramos (76,08 mmol) de 1-bromoeicosano se agitaron en 150 ml de benceno y se sometieron a reflujo durante 6 horas al tiempo que se retiraba el agua formada mediante destilación azeotrópica. El volumen del disolvente se redujo gradualmente hasta aproximadamente 70 ml. La mezcla de reacción se enfrió después a temperatura ambiente y se añadieron 150 ml de agua. Después, la mezcla de reacción se extrajo tres veces con 150 ml de éter dietílico, la fase orgánica combinada se lavó con 100 ml de agua, y a continuación el disolvente se eliminó después a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en 105 ml de una mezcla de 90:10:5 (v/v) de metanol: agua: ácido clorhídrico concentrado y la solución resultante se sometió a reflujo hasta que la solución se volvió transparente. Después, la solución se enfrió hasta la temperatura ambiente y se añadieron 100 ml de agua. El producto se extrajo con 150 ml de cloroformo, se lavó consecutivamente con 150 ml de agua, 150 ml de solución acuosa saturada de carbonato sódico y de nuevo con 150 ml de agua. Después, el disolvente se eliminó a presión reducida y el producto se cristalizó en 200 ml de hexano para dar 21,0 gramos de 1-eicosanil-*sn*-glicerol puro, que se secó en un desecador a presión reducida con óxido de fósforo. El rendimiento fue del 81,5 %.

- 35 **Síntesis de (R)-1-eicosanil-3-tritil-*sn*-glicerol:** 20 gramos de 1-eicosanil-*sn*-glicerol y 18 gramos de trifetilclorometano se añadieron a una mezcla de 400 ml de tetrahidrofurano seco (THF) y 100 ml de acetonitrilo seco. Se añadieron 15 ml de trietilamina seca y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 17 horas. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se vertió en hielo (500 gramos), se transfirió a un embudo de separación y se extrajo tres veces con 200 ml de éter dietílico. La fase orgánica se lavó consecutivamente con 150 ml de agua, dos veces con 150 ml (1,5 %) de H_2SO_4 diluido, 150 ml de agua, 150 ml de bicarbonato sódico acuoso saturado y de nuevo con 150 ml de agua. Después, la solución se secó sobre sulfato sódico anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido, un aceite marrón, se disolvió en 300 ml de acetato de etilo y se enfrió hasta -20°C durante la noche. La mezcla se centrifugó (3. 500 revoluciones por minuto) a -10°C y el líquido madre se separó mediante vertido. El sólido obtenido se disolvió en hexano y se refrigeró ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) durante la noche. La filtración del precipitado dio 26,0 gramos de (R)-1-eicosanil-3-tritil-*sn*-glicerol puro como un sólido blanquecino. El rendimiento fue del 79 %.

- 45 **Síntesis de (R)-1-eicosanil-2-(5'-hexenil)-3-tritil-glicerol:** 26 gramos de (R)-1-eicosanil-3-tritil-*sn*-glicerol y 10 gramos de sulfonato de 5-hexenil-1-metano se disolvieron en 150 ml de benceno. Se añadieron 12 gramos de KOH en polvo y la mezcla de reacción se agitó y se calentó a reflujo durante 6 horas, mientras se eliminaba el agua formada en la reacción mediante destilación azeotrópica. El volumen del disolvente se redujo gradualmente hasta aproximadamente 75 ml. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 200 ml de agua. La mezcla se extrajo tres veces con 150 ml de éter dietílico, la fase orgánica combinada se lavó tres veces con 150 ml de agua y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido, 28 gramos de un aceite marrón, se purificó sobre una columna de gel de sílice (200 gramos). 28 gramos del producto se eluyeron con cloroformo como un aceite amarillo claro. El rendimiento fue del 87,5 %.

- 55 **Síntesis de (S)-1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicerol:** 70 gramos de NaIO_4 se disolvieron en 250 ml de agua.

A esta solución se añadieron 6 gramos de NaHCO_3 y 1,2 gramos de KMnO_4 y la suspensión se calentó hasta 40 °C. Gota a gota se añadió una solución de 25 gramos de (*R*)-1-eicosanil-2-(5'-hexenil)-3-tritil-*sn*-glicerol en 250 ml de *tert*-butanol durante el transcurso de 90 minutos y la mezcla se calentó durante 6 horas adicionales. Se añadieron cantidades adicionales de una solución de KMnO_4 según lo necesario para mantener un color rosado. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se filtró a través de celite y el celite se lavó con 50 ml de *tert*-butanol. Gota a gota se añadieron 100 ml de solución de ácido sulfúrico al 10 % y la solución se transfirió a un embudo de separación y se extrajo tres veces con 200 ml de hexano. La fase orgánica se lavó con una solución de 20 gramos de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ en 100 ml de agua y después con 100 ml de agua. La fase orgánica se concentró mediante eliminación de aproximadamente 400 ml de disolvente a presión reducida. A la solución restante se añadieron 15 ml de agua y 2 ml de HCl concentrado, y la mezcla obtenida se sometió a reflujo durante 6 horas. Después, la mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente y se concentró de nuevo mediante la eliminación del disolvente a presión reducida. El pH del residuo se ajustó a 12 mediante la adición de 100 ml de agua y 10 ml de una solución de NaOH al 30 %. El precipitado se eliminó mediante filtración y se lavó cuatro veces con 20 ml de agua. El filtrado se extrajo con 100 ml de una mezcla 1:1 (v/v) de hexano: acetato de etilo. La fase acuosa se acidificó a un pH de 1 mediante la adición de 10 ml de HCl concentrado y después se extrajo tres veces con 100 ml de hexano. El secado sobre NaSO_4 anhidro y la eliminación del disolvente a presión reducida, seguida de recristalización durante la noche del producto bruto a partir de una mezcla 1:9 (v/v) de acetona: hexano a 5 ± 3 °C, dieron 9,0 gramos de (*S*)-1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicerol puro. El rendimiento fue del 53,1 %.

Síntesis de (*S*)-1-eicosanil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicerol: Se disolvieron 8,9 gramos de 1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicerol en 50 ml de metanol. Se añadieron 1 ml de HCl concentrado (32 %) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se eliminó a presión reducida y se añadieron 50 ml de agua al residuo obtenido. La mezcla se extrajo tres veces con 50 ml de cloroformo. La fase orgánica combinada se lavó con 50 ml de agua, 50 ml de bicarbonato de sodio saturado y de nuevo con 50 ml de agua. Después, la solución se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y se evaporó a presión reducida para dar 8,9 gramos de (*S*)-1-eicosanil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicerol como una cera blanca.

Síntesis de (*R*)-1-eicosanil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina: 8,9 gramos de 1-eicosanil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicerol (que se secó mediante destilación azeotrópica con benceno) y 8 ml de trietilamina se disolvieron en 70 ml de THF. Esta solución se añadió gota a gota en el transcurso de 30 minutos a una solución enfriada con hielo de 5,36 ml de POCl_3 en 40 ml de THF en agitación. La agitación continuó durante 30 minutos adicionales con enfriamiento y después durante 45 minutos adicionales a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfrió después en un baño de hielo y después, gota a gota, se añadió una solución de 3,5 ml de etanolamina y 16 ml de trietilamina en 50 ml de THF durante el transcurso de 30 minutos en agitación. La agitación se continuó durante 30 minutos en el baño de hielo y después a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido (14 gramos de un aceite amarillo) se disolvió en una mezcla de 72 ml de ácido acético y 30 ml de agua y se calentó hasta 70 °C durante 1 hora. La mezcla obtenida se extrajo tres veces con 150 ml de cloroformo y se lavó dos veces con 150 ml de agua. La eliminación del disolvente eliminado a presión reducida dio 13 gramos de (*R*)-1-eicosanil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina como un aceite de color amarillo.

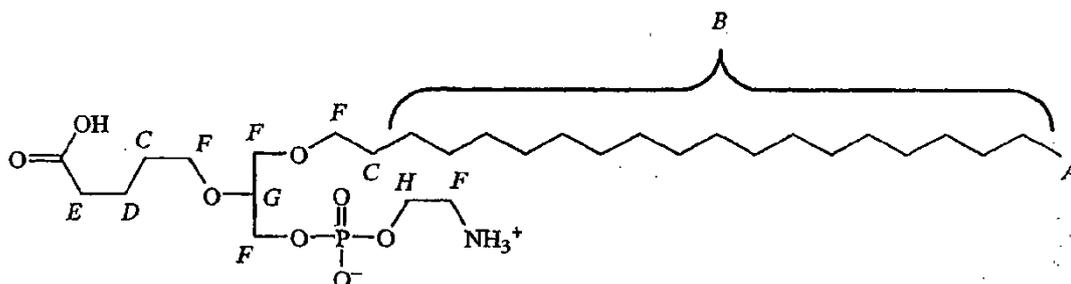
Síntesis de (*R*)-1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-220): 4 gramos de (*R*)-1-eicosanil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina se disolvieron en 100 ml de una mezcla de 8:2 (v/v) de metanol: una solución acuosa al 10 % de hidróxido sódico y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El pH de la mezcla de reacción se ajustó después a aproximadamente 4 con la adición de ácido fórmico. Se añadieron 150 ml de agua y 150 ml de cloroformo. Se separaron las fases y el disolvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en cloroformo, se secó sobre sulfato sódico y se filtró, y el disolvente se eliminó después a presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (70 gramos). Una mezcla de cloroformo y hexano, seguido de mezclas de cloroformo y metanol, y, finalmente, mezclas de cloroformo, metanol y agua, se usaron para eluir 835 mg de (*R*)-1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-220) de la columna. El rendimiento fue del 21 %.

Caracterización por RMN de 1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina:

La muestra se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl_3) con unas pocas gotas de metanol deuterado (CD_3OD). Después, los espectros se midieron a 600 MHz. Las muestras se midieron mediante espectroscopia de RMN tanto de ^1H como de ^{13}C .

Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

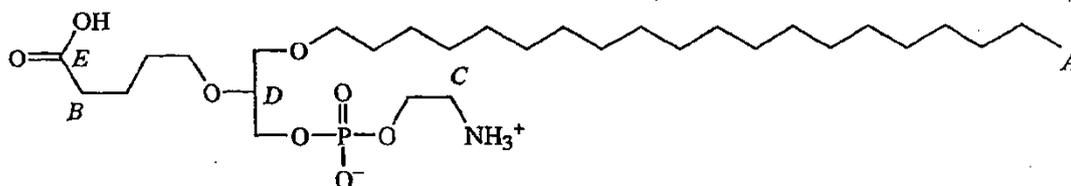
La asignación de los picos de ^1H observados de acuerdo con la estructura de 1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina fue la siguiente:



RMN de ^1H (600 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 7,357 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
4,107	2 H, s, a	H
3,858 - 3,876	1 H, m	G
3,398 - 3,745	10 H, m, 5 x CH_2	F
2,346	2 H, t, J = 7,2 Hz	E
1,666 - 1,737	2H, m	D
1,599 - 1,631	2 H, m	C
1,535 - 1,569	2 H, m	C
1,260	34 H, m, 17 x CH_2	B
0,882	3 H, t, 1 x CH_3 , J = 6,9 Hz	A

- 5 La asignación de los picos de ^{13}C observados de acuerdo con la estructura de 1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina fue la siguiente.



RMN de ^{13}C (600 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 77,318 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
177,352	E
78,023 - 78,075	D
71,977	
70,293	
70,019	
65,968	
61,913	
40,525	C
34,108	B
32,045	

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
29,825	
29,778	
29,730	
29,659	
29,476	
29,320	
26,186	
22,794	
21,884	
14,154	A

Caracterización por espectrometría de masas de 1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina:

La masa calculada para 1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina ($C_{30}H_{62}NO_8P$) fue 595,42.

5 El espectro de masas realizado usando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ES⁺MS), mostró un ion molecular con $m/z = 594$, correspondiente al ión desprotonado $[M + H]^-$.

El espectro de masas realizado usando espectrometría de masas con ionización por electropulverización positiva (ESI⁺ -MS) mostró un ion molecular con $m/z = 596$ correspondiente al ión molecular protonado $[M + H]^+$ acompañado de un catión molecular con $m/z = 618$ correspondiente al ion molecular cationado $[M + Na]^+$.

10 El espectro de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina.

15 **Síntesis de (R)-1-eicosanil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina:** 9 gramos de (R)-1-eicosanil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina se disolvieron en una mezcla de 40 ml de isopropanol y 18 ml de diclorometano, y la mezcla se calentó hasta una temperatura en el intervalo de 35-40 °C. Gota a gota se añadió una solución de 10,3 gramos de carbonato de potasio en 20 ml de agua mientras que la mezcla de reacción se mantuvo a 35-40 °C. Después se añadió gota a gota una solución de 7,2 ml de sulfato de dimetilo en 10 ml de isopropanol (10 ml) a 40 °C. La mezcla de reacción se mantuvo a 40 °C durante 2 horas y después a temperatura ambiente durante la noche. Se añadieron 150 ml de agua y la mezcla se extrajo tres veces con 150 ml de cloroformo. La fase orgánica se lavó con 150 ml de agua y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 8 gramos de (R)-1-eicosanil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina como una cera.

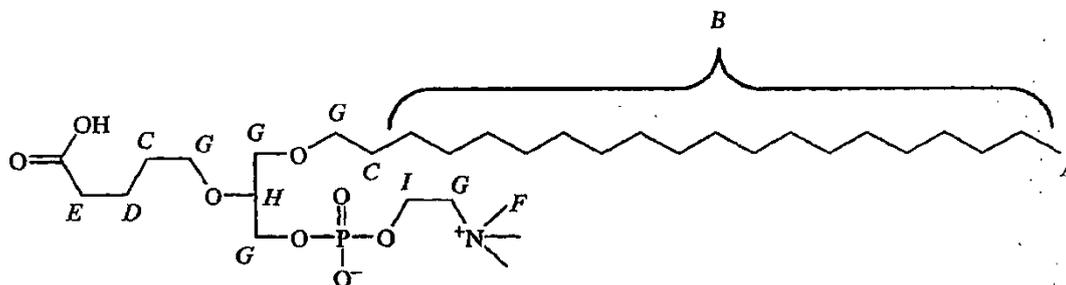
20 **Síntesis de (R)-1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (CI-219):** 8 gramos de (R)-1-eicosanil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina se disolvieron en 100 ml de una mezcla de 8:2 (v/v) de metanol: 10 % de hidróxido sódico acuoso y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. El pH de la mezcla de reacción se ajustó después a aproximadamente 6 mediante la adición de dihidrógenofosfato de sodio y después ácido fórmico. Se añadieron 100 ml de agua y 150 ml de cloroformo. Se separaron las fases y el disolvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en cloroformo, se secó sobre sulfato sódico y se filtró, y el disolvente se eliminó después a presión reducida. El residuo obtenido (7,5 gramos) se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (150 gramos). Se usó cloroformo, seguido de mezclas de cloroformo y metanol y, finalmente, mezclas de cloroformo, metanol y agua para eluir el producto. La eliminación del disolvente a presión reducida de las fracciones que contienen el producto dio 4 gramos de (R)-1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (CI-215) como un sólido blanco. El rendimiento fue del 51,1 %.

Caracterización por RMN de 1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina:

La muestra se disolvió en cloroformo deuterado ($CDCl_3$) con unas pocas gotas de metanol deuterado (CD_3OD). Después, los espectros se midieron a 600 MHz. Las muestras se midieron mediante espectroscopia de RMN tanto de 1H como de ^{13}C .

35 Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

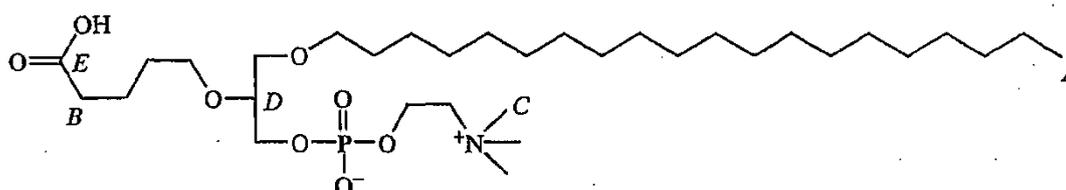
La asignación de los picos de 1H observados de acuerdo con la estructura de 1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente:



RMN de ^1H (600 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 7,246 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
4,264	2 H, s, a	I
3,834 - 3,872	1 H, m	H
3,404 - 3,679	10 H, m, 5 x CH_2	G
3,224	9 H, s, 3 x CH_3	F
2,188	2 H, dt, $J_1 = 2,4 \text{ Hz}$, $J_2 = 7,2 \text{ Hz}$	E
1,503 - 1,561	2 H, m	D
1,431 - 1,465	2 H, m	C
1,359 - 1,394	2 H, m	C
1,095 - 1,136	34 H, m, 17 x CH_2	B
0,716	3H, t, 1 x CH_3 , $J = 7,2 \text{ Hz}$	A

- 5 La asignación de los picos de ^{13}C observados de acuerdo con la estructura de 1-icosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfolina fue la siguiente:



RMN de ^{13}C (600 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 77,386 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
176,589	E
78,209 - 78,263	D
71,974	
70,467	
70,034	
66,615	
65,856 - 65,892	
59,151- 59,183	

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
54,382	C
34,053	B
32,062	
29,835	
29,787	
29,736	
29,662	
29,490	
29,387	
26,190	
22,810	
22,023	
14,156	A

Caracterización por espectrometría de masas de 1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina:

La masa calculada para 1-eicosano-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina ($C_{33}H_{68}NO_8P$) fue 637,47.

5 El espectro de masas realizado usando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESMS), mostró un ion molecular con $m/z = 637$, correspondiente al ión molecular desprotonado $[M + H]^-$.

Además, el espectro de masas realizado usando espectrometría de masas con ionización por electropulverización positiva (ESI + -MS) mostró un ion molecular con $m/z = 638$ correspondiente al ión molecular protonado $[M + H]^+$ acompañado de un catión molecular con $m/z = 660$ correspondiente al ion molecular cationado $[M + Na]^+$.

10 El espectro de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina.

Fosforilación de tirosina:

El efecto de CI-219 y CI-220 sobre la fosforilación de tirosina *in vitro* en macrófagos primarias se determinó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

15 Como se muestra en la FIG. 28, el tratamiento con 20 $\mu\text{g/ml}$ de CI-219 causó una reducción en los niveles de fosfotirosina, mientras que el tratamiento con 10 $\mu\text{g/ml}$ de CI-219 tuvo poco efecto, si tuvo alguno. El efecto de 20 $\mu\text{g/ml}$ DE CI-219 fue similar al de 20 $\mu\text{g/ml}$ de CI-201.

De un modo similar, como se muestra en la FIG. 29, el tratamiento con 20 $\mu\text{g/ml}$ de CI-220 causó una reducción en los niveles de fosfotirosina, mientras que el tratamiento con 10 $\mu\text{g/ml}$ de CI-220 tuvo poco efecto, si tuvo alguno. El efecto de 20 $\mu\text{g/ml}$ DE CI-220 fue similar al de 20 $\mu\text{g/ml}$ de CI-201.

20 **Ejemplo 12**

1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfato (CI-201-PA)

25 (*R*)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfato se sintetizó como se describe a continuación en el presente documento a partir de (*S*)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicerol. (*R*)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfato se sintetiza usando los mismos procedimientos, pero a partir de (*R*)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicerol.

La síntesis de (*S*)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicerol y (*R*)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-glicerol se describe en el Ejemplo 1.

30 **Síntesis de (*R*)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfato:** Una solución de (*S*)-1-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicerol (1,44 gramos), preparada de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 1, y trietilamina (1,5 ml) en THF (15 ml) se añadió gota a gota en el transcurso de 20 minutos a una solución enfriada con hielo de POCl_3 (1 ml) en THF (15 ml) en agitación. La agitación continuó durante 30 minutos adicionales con enfriamiento y a temperatura ambiente durante 1 hora adicional. El disolvente se evaporó a presión reducida. El

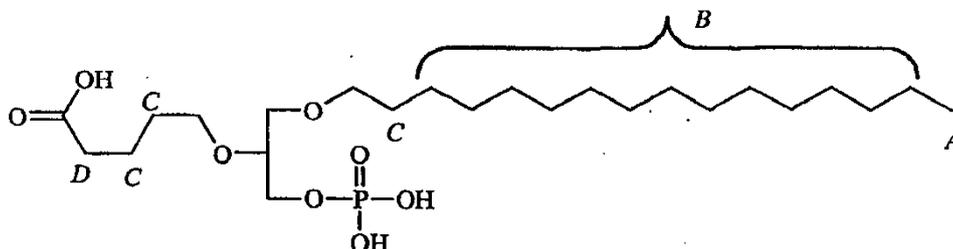
- 5 residuo obtenido se disolvió en una solución enfriada con hielo de bicarbonato de sodio saturado (100 ml) y la mezcla de reacción se agitó en un baño de hielo durante 45 minutos. El pH de la solución se ajusta a un intervalo de 4-5 mediante la adición de HCl (32 %). La mezcla se extrajo con cloroformo (3 x 50 ml), la fase orgánica se lavó con agua (50 ml) y el disolvente se eliminó a presión reducida. La mezcla se disolvió en cloroformo y se purificó sobre gel de sílice (30 gramos). Se usó cloroformo, seguido de mezclas de cloroformo con 10% - 50% de metanol, para eluir 470 mg de 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfato puro.

Caracterización mediante RMN de 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfato (CI-201-PA):

La muestra se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl₃). A continuación, los espectros de RMN de ¹H y RMN de ¹³C se midieron a 300 MHz.

- 10 Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfato y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

La asignación de los picos de ¹H observados de acuerdo con la estructura de 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfato fue la siguiente:



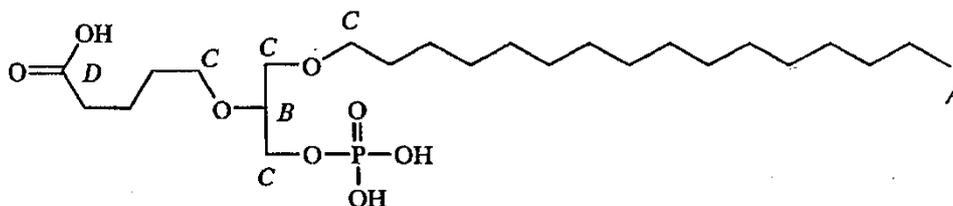
15

RMN de ¹H (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl₃) = 7,29 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
3,900	2H, m	
3,658 - 3,680	3 H, m, CH ₂ y CH	
3,413	4 H, m, 2 x CH ₂	
2,336	2H, m	D
1,539 - 1,609	6 H, m, 3 x CH ₂	C
1,255	26 H, m, 13 x CH ₂	B
0,880	3 H, t, 1 x CH ₃ , J = 6,75 Hz	A

La asignación de los picos de ¹³C observados de acuerdo con la estructura de 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfato fue la siguiente:

20



RMN de ¹³C (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl₃) = 77,113 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
178,54	D

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
78,057	B
71,791	C
70,624	C
69,837	C
65,271	C
33,931	
33,766	
31,970	
30,952	
29,775	
29,649	
29,413	
29,048	
26,156	
22,729	
21,571	
14,138	A.

Caracterización por espectrometría de masas de 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfato:

La masa calculada para 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfato ($C_{24}H_{49}O_8P$) fue 496,3165.

- 5 El espectro de masas realizado usando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESMS), mostró un ion molecular con $m/z = 495$, correspondiente al ión desprotonado $[M + H]^-$. El espectro de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfato (CI-201-PA).

Toxicidad de CI-201-PA:

La toxicidad de CI-201-PA se evaluó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

- 10 Como se muestra en las FIG. 30 A y 30B, se detectó toxicidad para CI-201-PA en dosis de 20 $\mu\text{g/ml}$ o superiores, siendo la DL_{50} aproximadamente 50 $\mu\text{g/ml}$. A una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, se observó toxicidad en solamente uno de los dos experimentos.

Ejemplo 13

- 15 **1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (1-S-CI-201) y 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (1-S-CI-202)**

- 20 1-(S)-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina y 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina se sintetizaron como se describe a continuación en el presente documento usando p-toluenosulfonato de (R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida. 3-(S)-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-1-fosfocolina y 3-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-1-fosfoetanolamina se sintetizan usando los mismos procedimientos usando p-toluenosulfonato de (S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida.

- 25 **Síntesis de 1-S-hexadecil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina:** 48 ml de 1-hexadecanotiol se agitó en 150 ml de benceno y se sometió a reflujo mientras se separaba el agua mediante destilación azeotrópica. El volumen del disolvente se redujo gradualmente hasta aproximadamente 125 ml. Se añadieron 58 ml de una solución de etilato de sodio en etanol, y la mezcla se agitó durante 30 minutos en nitrógeno. Se añadieron 30 gramos de p-toluenosulfonato de (R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol en 100 ml de benceno seco y la mezcla se sometió a reflujo durante 3 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se vertió en hielo y se extrajo tres veces con 150 ml de éter dietílico. La fase orgánica se lavó dos veces

con 150 ml de agua, se secó sobre sulfato sódico y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en 100 ml de una mezcla de 9:1:0,5 (v/v) de metanol: agua: HCl concentrado, y la solución resultante se sometió a reflujo durante 2 horas, después se enfrió hasta la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vertió en hielo y se extrajo tres veces con 200 ml de cloroformo, después se lavó con 200 ml de agua, 200 ml de solución saturada de carbonato sódico, y de nuevo con 200 ml de agua. El disolvente se eliminó a presión reducida, proporcionando 70 gramos de un sólido de color naranja. El residuo se recristalizó dos veces en 400 ml de hexano para producir 30 gramos de 1-S-hexadecil-sn-glicerol (30 g) como un sólido blanco.

Síntesis de 1-S-hexadecil-3-tritil-sn-glicerol: 28 gramos de 1-S-hexadecil-glicerol y 31 gramos de clorotrifetilmetano se introdujeron en una mezcla de 370 ml de THF seco y 100 ml de acetonitrilo seco. Se añadieron 25 ml de trietilamina seca y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 17 horas. La mezcla de reacción se enfrió después hasta la temperatura ambiente, se vertió en hielo (1 kilogramo), se transfirió a un embudo de separación y se extrajo tres veces con 200 ml de éter dietílico. La fase orgánica se lavó con 200 ml de agua, dos veces con 200 ml (1,5 %) de ácido sulfúrico diluido, 200 ml de agua, 200 ml de una solución de bicarbonato sódico concentrado y 200 ml de agua. Después, la solución se secó sobre sulfato sódico anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 60 gramos de un aceite marrón. Este aceite se disolvió en 150 ml de acetato de etilo y la solución obtenida se mantuvo a -20 °C durante la noche. La mezcla se centrifugó (-10 °C) y la solución madre se separó mediante vertido. El sólido obtenido se recristalizó en hexano a 4 °C. Después de la filtración, 36 gramos de 1-S-hexadecil-3-tritil-sn-glicerol se obtuvo como un sólido blanco.

Síntesis de 1-S-hexadecil-2-(4-t-butil-carboxi)butil-sn-glicerol: 10 gramos de 1-S-hexadecil-3-tritil-sn-glicerol se disolvió en una mezcla de 150 ml de benceno y después se añadieron 50 ml de éter de petróleo y 20,48 gramos de KOH en polvo. La mezcla de reacción se agitó y se sometió a reflujo. Gota a gota se añadió una solución de 10 ml de valerato de t-butilo en 200 ml de éter de petróleo a la solución sometida a reflujo en el transcurso de aproximadamente 10 horas, mientras se retiraba el agua formada mediante destilación azeotrópica. Una vez finalizada la adición, la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 1 hora adicional para reducir el volumen de los disolventes. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se añadió una mezcla de 100 ml de agua enfriada con hielo y 20 ml de ácido fórmico. Después, la mezcla de reacción se extrajo dos veces con 100 ml de cloroformo, se secó sobre sulfato sódico y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 15,65 gramos de un aceite de color marrón claro. El aceite obtenido se disolvió en una mezcla de 160 ml de éter de metil-terc-butilo (MTBE) y 20 ml de metanol. Se añadieron 3 ml de HCl concentrado y la solución resultante se sometió a reflujo durante 4 horas, después se enfrió hasta la temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se lavó con 100 ml de solución saturada acuosa de carbonato de sodio y se secó sobre sulfato de sodio, y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 14,10 gramos de un aceite de color marrón claro. El aceite se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (91 gramos). Se usó hexano, seguido de mezclas de hexano y cloroformo, y después cloroformo y acetona, para eluir el producto de la columna. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar 6,84 gramos de 1-S-hexadecil-2-(4-t-butil-carboxi)butil-sn-glicerol.

Síntesis de 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-sn-glicerol: Se disolvieron 6,84 gramos de 1-S-hexadecil-(4-t-butil-carboxi)butil-sn-glicerol en 80 ml de metanol. Se añadió una solución de 3,7 gramos de KOH en 5 ml de agua y la mezcla se agitó y se sometió a reflujo durante 6 horas. Después de enfriar la mezcla a temperatura ambiente, se añadieron 16 ml de agua y 100 ml de una mezcla 8: 2 (v / v) de hexano: cetato de etilo. Las fases se separaron y se añadieron 50 ml de agua y 5 ml de ácido fórmico a la fase orgánica. La extracción con cloroformo, el secado sobre sulfato sódico y la eliminación de los disolventes a presión reducida produjeron 3,89 gramos de 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-sn-glicerol como un aceite de color marrón claro.

Síntesis de 1-S-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicerol: 3,89 gramos de 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-sn-glicerol se disolvieron en 100 ml de metanol y se añadió 1 ml de ácido clorhídrico concentrado. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se extrajo dos veces con 100 ml de cloroformo. La fase orgánica se lavó dos veces con 50 ml de agua y se secó sobre sulfato sódico y, después, el disolvente se eliminó a presión reducida, para dar 3,75 gramos de un residuo. Este residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (49 gramos). Se usó cloroformo, seguido de mezclas de cloroformo y acetona para eluir el producto de la columna. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar 2,94 gramos de 1-S-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicerol puro.

Síntesis de 1-S-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina: 2,83 gramos de 1-S-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicerol y se disolvieron 1,7 ml de trietilamina en una mezcla de 20 ml de benceno y 120 ml de THF. Esta solución se añadió gota a gota en el transcurso de 60 minutos a una solución enfriada con hielo de 1,14 ml de POCl₃ y 0,98 ml de trietilamina en 20 ml de THF en agitación. La agitación continuó durante 10 minutos adicionales con enfriamiento y después durante 45 minutos adicionales a temperatura ambiente. A la mezcla de reacción enfriada con hielo, después gota a gota se añadió una solución de 1,02 ml de etanolamina y 2,8 ml de trietilamina en 50 ml de THF en el transcurso de 40 minutos. Se continuó la agitación durante 10 minutos a 0 °C y después durante la noche a temperatura ambiente. Después, la mezcla de reacción se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo (4,23 gramos) se disolvió en una mezcla de 48 ml de ácido acético y 20 ml de agua y se calentó hasta 70 °C durante 1 hora. Después, la solución se extrajo tres veces con 50 ml de una mezcla 2:1 (v / v) de cloroformo: Metanol y el disolvente orgánico se eliminó a presión reducida para dar 4,05 gramos de 1-

S-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina bruta.

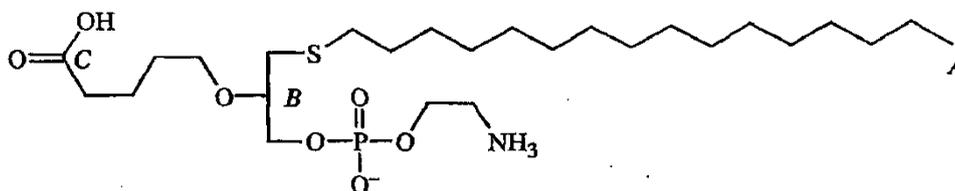
Síntesis de 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina: 0,97 gramos de 1-S-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina se disolvieron en 50 ml de metanol. Se añadieron 7 ml de una solución de 10 % de hidróxido sódico y la solución obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 8 horas. Se añadieron 2 ml de ácido fórmico y la mezcla se extrajo después tres veces con 50 ml de cloroformo. El disolvente orgánico combinado se eliminó a presión reducida para dar 0,70 gramos de un residuo ceroso. Este residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (32 gramos). Se usó cloroformo, seguido de mezclas de cloroformo y metanol para eluir el producto de la columna. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar 0,625 gramos de 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina pura (1-S-CI-202).

10 **Caracterización mediante RMN de 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (1-S-CI-202):**

Las muestras se midieron mediante espectroscopia de RMN de ^{13}C .

Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (1-S-CI-202) y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

15 La asignación de los picos de ^{13}C observados de acuerdo con la estructura de 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (1-S-CI-202) fue la siguiente.



RMN de ^{13}C (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 77,724 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
179,382	C
78,616	B
69,824	
66,630	
62,304	
53,954	
40,447	
35,308	
33,130	
32,680	
32,072	
29,877	
29,514	
29,165	
22,824	
22,277	
14,179	A

20 **Caracterización mediante espectroscopia de masas de 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (1-S-CI-201):**

La masa calculada para 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina ($\text{C}_{26}\text{H}_{54}\text{NO}_7\text{PS}$) fue 555,75.

El espectro de masas realizado usando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ES/MS), mostró un ion molecular con $m/z = 554$, correspondiente al ión desprotonado $[M + H]^-$.

El espectro de masas realizado utilizando espectrometría de masas con ionización por electropulverización positiva (ESI + -MS) mostró un ion molecular con $m/z = 556$ correspondiente al ión molecular protonado $[M + H]^+$ y un ión con $m/z = 578$, correspondiente a la ion molecular cationado $[M + Na]^+$.

El espectro de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (1-S-CI-202).

Síntesis de 1-S-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina: 3,48 gramos de 1-S-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina se disolvieron en una mezcla de 35 ml de metanol y 100 ml de diclorometano. Se añadió una solución de 10 gramos de carbonato de potasio en 20 ml de agua. A continuación se añadieron 3,5 ml sulfato de dimetilo y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El pH de la reacción se ajustó a 4 mediante la adición de 1 ml de ácido fórmico. La extracción de la mezcla tres veces con 75 ml de una mezcla 2:1 (v/v) de cloroformo: metanol, seguida de la eliminación del disolvente, dieron 3,72 gramos de 1-S-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina bruta.

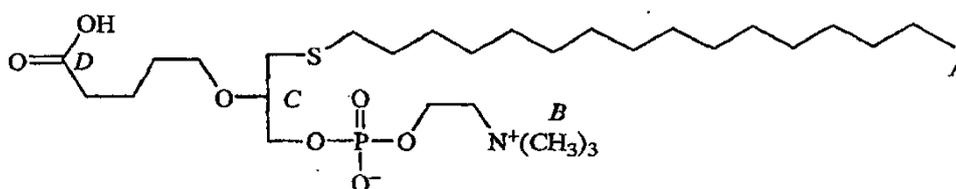
Síntesis de (R)-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina: 3,72 gramos de 1-S-hexadecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina se disolvieron en 100 ml de metanol. Se añadieron 10 ml de una solución de 10 % de hidróxido sódico y la solución obtenida se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadieron 1,2 ml de ácido fórmico y la mezcla se extrajo tres veces con 100 ml de una mezcla 2:1 (v/v) de cloroformo: metanol. El disolvente orgánico combinado se eliminó a presión reducida para dar 2,92 gramos de un residuo. 2,46 gramos de este residuo se purificaron mediante cromatografía en gel de sílice (54 gramos). Una mezcla de cloroformo y hexano, seguido de cloroformo, y después de mezclas de cloroformo y metanol, se utilizaron para eluir el producto de la columna. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar 1,21 gramos de 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina pura (1-S-CI-201).

Caracterización mediante RMN de 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (1-S-CI-201):

Las muestras se midieron mediante espectroscopia de RMN de ^{13}C .

Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (1-S-CI-201) y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

La asignación de los picos de ^{13}C observados de acuerdo con la estructura de 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (1-S-CI-201) fue la siguiente:



RMN de ^{13}C (300 MHz, disolvente de referencia ($CDCl_3$) = 75,948 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
175,904	D
76,958	C
68,150	
664,677 - 64,749	
57,613 - 57,676	
52,612	B
52,185	
33,133	
31,379	
31,076	

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
30,314	
28,096	
27,745	
27,345	
21,069	
20,499	
12,427	A

Caracterización mediante espectroscopia de masas de 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (1-S-CI-201):

La masa calculada para 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina ($C_{29}H_{60}NO_7PS$) fue 597.

- 5 El espectro de masas realizado usando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ES/MS), mostró un ion molecular con $m/z = 596$, correspondiente al ión desprotonado $[M + H]^-$.

El espectro de masas realizado utilizando espectrometría de masas con ionización por electropulverización positiva (ESI + -MS) mostró un ion molecular con $m/z = 598$ correspondiente al ión molecular protonado $[M + H]^+$ y un ión con $m/z = 620$, correspondiente a la ion molecular cationado $[M + Na]^+$.

- 10 El espectro de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-S-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (1-S-CI-201).

Fosforilación de tirosina:

Los efectos de 1-S-CI-201 y 1-S-CI-202 sobre la fosforilación de la tirosina *in vitro* en macrófagos primarios se determinaron como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

- 15 Como se muestra en la FIG. 31, el tratamiento con 20 $\mu\text{g/ml}$ (34 μM) de 1-S-CI-201 causó una reducción en los niveles de fosfotirosina, al igual que 20 $\mu\text{g/ml}$ (34 μM) del control positivo, CI-201. Sin embargo, el tratamiento con 10 $\mu\text{g/ml}$ (17 μM) de 1-S-CI-201 tuvo poco efecto, si lo hay, mientras que 10 $\mu\text{g/ml}$ (34 μM) de CI-201 causó un aumento en los niveles de fosfotirosina.

- 20 Como se muestra en la FIG. 32, el tratamiento con 20 $\mu\text{g/ml}$ (36 μM) de 1-S-CI-202 causó una reducción en los niveles de fosfotirosina, mientras que el tratamiento con 10 $\mu\text{g/ml}$ (18 μM) de 1-S-CI-202 produjo un incremento en los niveles de fosfotirosina. Estos resultados son muy similares a los resultados obtenidos, respectivamente, para 10 $\mu\text{g/ml}$ y 20 $\mu\text{g/ml}$ de cada uno de CI-201 y CI-202.

Ejemplo 14

1-hexadecil-2-(5,6-dihidroxi)hexanil-glicero-3-fosfocolina (di-OH)

- 25 (R)-1-hexadecil-2-(5,6-dihidroxi)hexanil-*sn*-glicero-3-fosfocolina se sintetizó como se describe a continuación en el presente documento usando (R)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida. (S)-1-hexadecil-2-(5,6-dihidroxi)hexanil-*sn*-glicero-3-fosfocolina se sintetiza utilizando los mismos procedimientos, usando (S)-(+)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida.

- 30 **Síntesis de 1-hexadecil-*sn*-glicerol:** 19,4 gramos de (R)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol, 49 gramos de KOH en polvo y 4,8 gramos de bromuro de hexadecilo se agitaron en 500 ml de tolueno (500 ml) y se sometieron a reflujo durante 6 horas al tiempo que se retiraba el agua formada mediante destilación azeotrópica. El volumen del disolvente se redujo gradualmente a aproximadamente 100 ml y la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción enfriada se disolvió en 500 ml de diclorometano, se lavó dos veces con 200 ml de agua, y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en 500 ml de una mezcla de
- 35 90:10:5 (v/v) de metanol: agua: H_2SO_4 concentrado y la solución resultante se sometió a reflujo durante 30 minutos, se enfrió hasta la temperatura ambiente, y se extrajo con 500 ml de diclorometano. El extracto se lavó dos veces con 100 ml de agua, 100 ml de carbonato de sodio acuoso al 5 % y de nuevo con 100 ml de agua, hasta neutralidad. El disolvente se eliminó a presión reducida y el producto bruto se recristalizó en hexano a 4 °C, dando 35,3 gramos de 1-hexadecil-*sn*-glicerol puro. El rendimiento fue del 76 %.

- 40 **Síntesis de 1-hexadecil-3-tritil-*sn*-glicerol:** Una solución de 35,3 gramos de 1-hexadecil-*sn*-glicerol, 37,3 gramos de trifetilclorometano y 22,44 gramos de trietilamina seca en una mezcla de 470 ml de tetrahidrofurano seco y 120

ml de acetonitrilo seco se sometió a reflujo durante 15 horas en atmósfera de nitrógeno. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró. El filtrado se vertió en hielo (500 gramos) y después se extrajo tres veces con 200 ml de cloroformo. La fase orgánica se lavó sucesivamente con 500 ml de agua, 500 ml de HCl 0,15 N, 500 ml de solución saturada acuosa de NaHCO₃ y de nuevo con agua. El extracto se secó sobre Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo amarillo obtenido se disolvió en 500 ml de hexano caliente y la solución transparente obtenida se refrigeró (5 ± 3 °C) durante la noche. Durante este tiempo se produjo la precipitación. Después de la filtración del precipitado, el disolvente del filtrado se eliminó a presión reducida, produciendo 58,3 gramos de 1-hexadecil-3-tritil-*sn*-glicerol. El rendimiento fue del 95 %.

Síntesis de (S)-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-*sn*-glicerol: 36,3 gramos de 1-hexadecil-3-tritil-*sn*-glicerol y 11,5 gramos de 5-hexenil-metanosulfonato (preparado a partir de 5-hexeno-1ol y cloruro de metanosulfonilo en piridina seca) se disolvieron en 500 ml de tolueno. Se añadieron 20 gramos de KOH en polvo y la mezcla de reacción se agitó y se calentó a reflujo durante 8 horas, mientras se eliminaba el agua formada mediante destilación azeotrópica. El volumen del disolvente se redujo gradualmente a aproximadamente 100 ml y la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción enfriada se disolvió en 500 ml de diclorometano, se lavó dos veces con 200 ml de agua, y el disolvente se eliminó a presión reducida. El 1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-tritil-glicerol resultante se disolvió en 500 ml de una mezcla de 90:10:5 (v/v) de metanol: agua: HCl concentrado (32 %) y la solución obtenida se sometió a reflujo durante 3 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se añadieron 500 ml de agua y después la mezcla se extrajo tres veces con 250 ml de diclorometano. La fase orgánica combinada se lavó dos veces con 100 ml de agua y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en 250 ml de hexano y la solución obtenida se almacenó a -20 °C durante 48 horas, lo que hace que la mayor parte del trifenilcarbinol precipite. Después de la filtración y la eliminación del disolvente del filtrado, el producto restante se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice. 11,65 gramos de (S)-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-*sn*-glicerol puro se eluyó con una mezcla de 1:1 (v/v) de cloroformo: éter de petróleo. El rendimiento fue del 45 %.

Síntesis de (R)-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina: 11,65 gramos de 1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-*sn*-glicerol y 13,23 gramos de trietilamina se disolvieron en 650 ml de THF seco. Esta solución se añadió gota a gota a una solución enfriada con hielo de 5,34 gramos oxicluro de fósforo en 130 ml de THF en agitación. La adición se realizó a tal velocidad que la temperatura de la reacción no exceda de 15 °C. La agitación se continuó durante 10 minutos adicionales con enfriamiento y durante otros 45 minutos a temperatura ambiente. Después, la mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y se añadió gota a gota una solución de 2,10 ml de etanolamina y 9,73 ml de trietilamina en THF durante el curso de 30 minutos en agitación. La agitación se continuó durante 20 minutos en el baño de hielo y después a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido (15,93 gramos) se disolvió en una mezcla de 240 ml de ácido acético y 100 ml de agua. La solución resultante se calentó a 70 °C durante 1 hora, se enfrió hasta la temperatura ambiente y se extrajo dos veces con 250 ml de una mezcla 2:1 (v/v) de cloroformo: metanol. El disolvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida, produciendo 12,50 gramos de (R)-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina.

Síntesis de (R)-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina: (R)-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-3-fosfoetanolamina se disolvió en 650 ml de isopropanol y 220 ml de diclorometano. Se añadió una solución de 66,5 gramos de K₂CO₃ en 130 ml de agua y la mezcla de reacción se calentó a 40 °C. Gota a gota se añadió una solución de 13,3 ml de sulfato de dimetilo en 130 ml de isopropanol (durante el transcurso de 45 minutos) a tal velocidad que la temperatura de la reacción no exceda de 35-40 °C. Una vez finalizada la adición se continuó agitando a 40 °C durante 90 minutos. Después, la mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se extrajo tres veces con 500 ml de una mezcla 2: 1 (v / v) de cloroformo: metanol y el disolvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida, produciendo 12,50 gramos de (R)-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina.

Síntesis de (R)-1-hexadecil-2(5,6-dihidroxi-hexil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina: 8,57 gramos de (R)-1-hexadecil-2(5'-hexenil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina se disolvieron en 80 ml de ácido fórmico. Se añadieron 18,7 ml de peróxido de hidrógeno al 30 % y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadieron 250 ml de agua y la solución se transfirió a un embudo de separación y se extrajo 5 veces con 100 ml de una mezcla 2: 1 (v / v) una mezcla de cloroformo: metanol. El disolvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se disolvió en 150 ml de metanol. Se añadieron 55 ml de hidróxido sódico acuoso (10 %) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron 3 ml de una mezcla fría de HCl concentrado (32 %) en 150 ml de agua, la solución obtenida se transfirió a un embudo de separación, y el producto se extrajo 5 veces con 100 ml de una mezcla 2:1 (v / v) de cloroformo: metanol. El disolvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida y el producto bruto obtenido se purificó por cromatografía sobre gel de sílice. 4,5 gramos de (R)-1-hexadecil-2-(5,6-dihidroxi-hexil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina (di-OH) se eluyeron con mezclas de cloroformo y 4- % - 60 % de metanol. El rendimiento fue del 50 %.

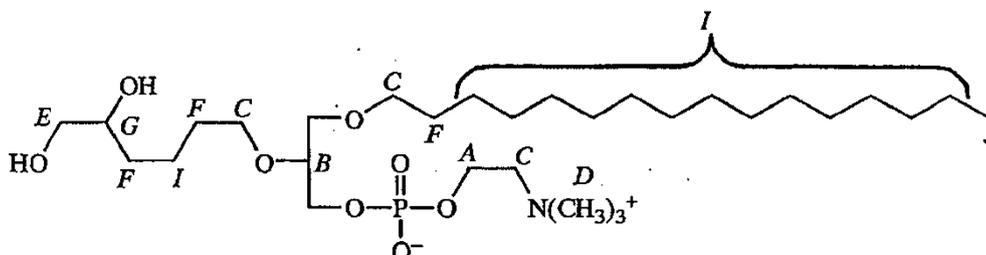
Caracterización por RMN de 1-hexadecil-2-(5,6-dihidroxi-hexil)-glicero-3-fosfocolina:

La muestra se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl₃). Los espectros de RMN de ¹H y RMN de ¹³C se midieron a 300 MHz.

Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-hexadecil-2-(5,6-dihidroxi)hexanil-glicero-3-fosfocolina y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

La asignación de los picos de ^1H observados de acuerdo con la estructura de 1-hexadecil-2-(5,6-dihidroxi)hexanil-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente.

5

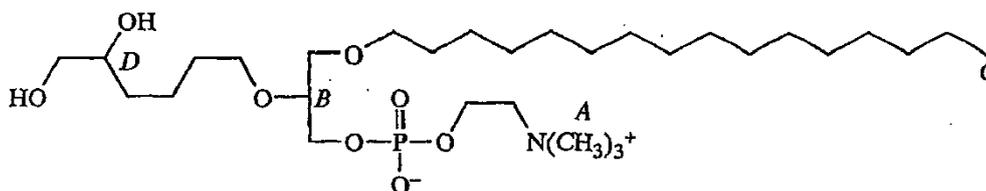


RMN de ^1H (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 7,299 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
4,300	2 H, s, a	A
3,930	2H, m	E
3,880 - 3,898	1H, m	B
3,653 - 3,784	2H, m	G
3,477 - 3,566	10 H, m, 5 x CH_2	C
3,320	9 H, s, 3 x CH_3	D
1,506 - 1,532	6H, m 3 x CH_2	F
1,246	28 H, m, 14 x CH_2	I
0,872	3 H, t, 1 x CH_3 , J = 6,75 Hz	J

10

La asignación de los picos de ^{13}C observados de acuerdo con la estructura de 1-hexadecil-2-(5,6-dihidroxi)hexanil-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente.



RMN de ^{13}C (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 77,700 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
78,691	B
72,734	
72,443	D
70,993	
70,661	
67,645	
66,843	

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
66,690	
60,067	
55,007	A
33,669	
33,512	
32,612	
30,586	
30,411	
30,258	
30,051	
26,779	
23,373	
23,176	
14,800	C

Caracterización por espectrometría de masas de 1-hexadecil-2-(5,6-dihidroxi)hexanil-glicero-3-fosfocolina:

La masa calculada para 1-hexadecil-2-(5,6-dihidroxi)hexanil-glicero-3-fosfocolina ($C_{30}H_{64}NO_8P$) fue 597,4370.

- 5 El espectro de masas obtenido usando Fast Atom Bombardment (FAB+) mostró un ion molecular con $m/z = 598.400$, correspondiente al ión molecular protonado $[M+H]^+$. El espectro de espectrometría de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-hexadecil-2-(5,6-dihidroxi)hexanil-glicero-3-fosfocolina (di-OH).

Toxicidad de di-OH:

La toxicidad de di-OH se evaluó como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

- 10 Como se muestra en las FIG. 33A y 33B, se detectó toxicidad de di-OH a dosis de 20 $\mu\text{g/ml}$ o superiores, estando la DL_{50} de di-OH entre 20 y 50 $\mu\text{g/ml}$.

Ensayo de lesión aterosclerótica:

La eficacia *in vivo* de di-OH contra las lesiones ateroscleróticas se analizó en ratones LDL-RD macho, como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección de Materiales y Procedimientos. Di-OH se administró a una dosis de 1 mg por ratón, equivalente a una dosis de 60 mg / kg.

- 15 Como se muestra en la FIG. 34, 1 mg / ratón de di-OH disminuyó el área de la lesión aterosclerótica en un 25 % en comparación con el control (PBS).

Estos resultados indican que di-OH es eficaz contra la aterosclerosis.

Ejemplo 15

1-(-cis-9-hexadecenil)-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina

- 20 (R)-1-(cis-9-hexadecenil)-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina se sintetizó como se describe a continuación en el presente documento usando (R)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida. (S)-1-(cis-9-hexadecenil)-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina se sintetiza utilizando los mismos procedimientos, usando (S)-(+)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida.

- 25 **Síntesis de 1-(cis-9-hexadecenil)-*sn*-glicerol:** 5,32 gramos de (R)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol, 12,26 gramos de hidróxido potásico en polvo y 10 gramos de cis-9-hexadecenil-metanosulfonato se agitaron en 250 ml de benceno y se sometieron a reflujo durante 10,5 horas al tiempo que se retiraba el agua formada mediante destilación azeotrópica. El volumen del disolvente se redujo gradualmente hasta aproximadamente 50 ml. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se añadieron 50 ml de agua y la mezcla se extrajo tres veces con 100 ml de éter dietílico. La fase orgánica combinada se lavó con 100 ml de agua y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo (12,01 gramos) se disolvió en 200 ml de una mezcla de 90:10:3 (v/v) de metanol: agua: ácido
- 30

clorhídrico concentrado, y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche y después se sometió a reflujo durante 1 hora. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente se añadieron 100 ml de agua. El producto se extrajo tres veces con 75 ml de éter dietílico, se lavó consecutivamente con 100 ml de agua, 100 ml de solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y de nuevo con 100 ml de agua. Después de secar sobre Na_2SO_4 , el disolvente se eliminó a presión reducida, obteniéndose 9,104 gramos de 1-(cis-9-hexadecenil)-sn-glicerol. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (30 gramos). 9,07 gramos de 1-(cis-9-hexadecenil)-glicerol puro se eluyó con cloroformo, seguido de una mezcla de cloroformo y 5 % de metanol. El rendimiento fue del 91,8 %.

Síntesis de (S)-1-(cis-9-hexadecenil)-3-tritil-sn-glicerol: 9,07 gramos de 1-(cis-9-hexadecenil)-glicerol se disolvieron en una mezcla de THF seco (160 ml) y acetonitrilo seco (40 ml). Se añadieron 10,62 gramos de trifenilclorometano y 10 ml de trietilamina, y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 15 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se vertió en hielo (100 gramos), se transfirió a un embudo de separación y se extrajo tres veces con 100 ml de cloroformo. La fase orgánica se lavó consecutivamente con 100 ml de agua, con 100 ml (1,0 %) de ácido sulfúrico diluido, 100 ml de agua, 100 ml de bicarbonato sódico acuoso saturado y de nuevo con 100 ml de agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. Este residuo obtenido se disolvió en hexano caliente (100 ml) y la solución resultante se enfrió a 4 °C durante 36 horas. La filtración de los subproductos precipitados y la eliminación del disolvente a presión reducida produjeron 14,57 gramos de producto bruto. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (200 gramos). 9,81 gramos de 1-(cis-9-hexadecenil)-3-tritil-sn-glicerol puro se eluyó con cloroformo. El rendimiento fue del 61,1 %.

Síntesis de (S)-1-(cis-9-hexadecenil)-2-(4-terc-butil-carboxi)butil-sn-glicerol: 8,83 gramos de 1-(cis-9-hexadecenil)-3-tritil-sn-glicerol se disolvió en mezcla de benceno (170 ml) y éter de petróleo (100 ml). Se añadió KOH (23,1 gramos) en polvo y la mezcla de reacción se calentó a un reflujo suave. Gota a gota se añadió una solución de valerato de *terc*-butilo (20 ml) en éter de petróleo (420 ml) en el transcurso de 25 horas mientras se retiraba el agua formada mediante destilación azeotrópica. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente, el pH de la mezcla de reacción se ajustó a aproximadamente 6 mediante la adición de ácido fórmico (10 ml). La mezcla se extrajo con éter dietílico (3 x 100 ml) y la fase orgánica se lavó con agua (100 ml). La eliminación del disolvente bajo presión reducida produjo 17,72 gramos de un producto oleoso. Este residuo se disolvió en metanol (50 ml), se añadieron 4 ml de HCl concentrado (32 %) y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 5,5 horas. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente, se añadieron 50 ml de agua y la mezcla se extrajo con éter dietílico (3 x 50 ml). La fase orgánica combinada se lavó con agua (50 ml) y el disolvente se eliminó a presión reducida, produciendo 14,26 gramos de producto bruto. 2,93 gramos de 1-(cis-9-hexadecenil)-2-(4-terc-butil-carboxi)butil-sn-glicerol puro se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (110 gramos). El producto se eluyó con una mezcla de cloroformo: hexano (1: 1 en relación volumétrica), seguido de mezclas de cloroformo con hasta 3 % de acetato de etilo. El solvente de las fracciones que contienen el producto deseado se eliminó a presión reducida. El rendimiento fue del 39,2 %.

Síntesis de (R)-1-(cis-9-hexadecenil)-2-(4-carboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina: 1,59 gramos de (S)-1-(cis-9-hexadecenil)-2-(4-terc-butil-carboxi)butil-sn-glicerol (que se secó mediante destilación azeotrópica con benceno) y 0,7 ml de trietilamina se disolvieron en THF (45 ml). Esta solución se añadió gota a gota en el transcurso de 18 minutos a una solución enfriada con hielo de POCl_3 (0,5 ml) y trietilamina (0,05 ml) en THF (20 ml) en agitación. La agitación continuó durante 10 minutos adicionales con enfriamiento y después durante 45 minutos adicionales a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y gota a gota, se añadió una solución de etanolamina (0,38 ml) y trietilamina (3,25 ml) en THF (54 ml) durante el transcurso de 65 minutos en agitación. La agitación se continuó durante 10 minutos durante el enfriamiento y después a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se filtró, se lavó con THF (2 x 10 ml) y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo (2,1 gramos) se disolvió en una mezcla de ácido acético (48 ml) y agua (20 ml) y se calentó hasta 70 °C durante 1 hora. La extracción con éter dietílico (2 x 50 ml), lavando con agua (2 x 50 ml) y la eliminación del disolvente a presión reducida dieron 2,15 gramos de producto crudo como un aceite de color marrón claro. Este aceite se disolvió en mezcla de metanol (35 ml) y diclorometano (100 ml). Se añadió una solución de carbonato potásico (10 gramos) en agua (20 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadió sulfato de dimetilo (2,5 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. Se añadió 1 ml adicional de sulfato de dimetilo y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. La mezcla se extrajo con cloroformo (3 x 50 ml) y el disolvente de la fase orgánica combinada se eliminó a presión reducida para dar 2,48 gramos de un producto ceroso. Este residuo se disolvió en metanol (100 ml), se añadió una solución (pH \approx 11) de hidróxido de litio (0,19 g) en agua (6 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 4 - 5 mediante la adición de ácido fórmico y después la mezcla se extrajo con cloroformo (3 x 100 ml). El disolvente de la fase orgánica combinada se eliminó a presión reducida. El análisis mediante cromatografía en capa fina mostró una conversión de aproximadamente 60 %. El residuo obtenido se disolvió en etanol (100 ml), se añadió una solución (pH \approx 11) de hidróxido de litio (0,2 gramos) en agua (5 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 4 - 5 mediante la adición de ácido fórmico (0,22 ml) y después la mezcla se extrajo con una mezcla de 2:1 (v/v) cloroformo: metanol (3 x 100 ml). La fase orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida, obteniéndose 2,18 gramos de producto bruto.

1,14 gramos de (*R*)-1-(*cis*-9-hexadecenil)-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina eluyeron con cloroformo seguido de mezclas de cloroformo con 10 % - 80 % de metanol.

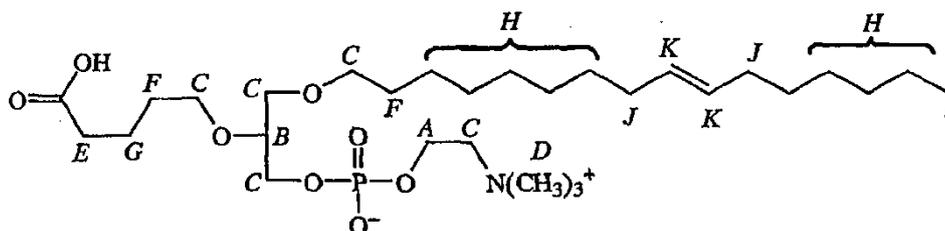
Caracterización mediante RMN de 1-(*cis*-9-hexadecenil)-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina:

5 Las muestras se disolvieron en cloroformo deuterado (CDCl₃). Los espectros de RMN de ¹H y RMN de ¹³C se midieron a 300 MHz.

Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-(*cis*-9-hexadecenil)-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina.

La asignación de los picos de ¹H observados de acuerdo con la estructura de 1-(*cis*-9-hexadecenil)-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente:

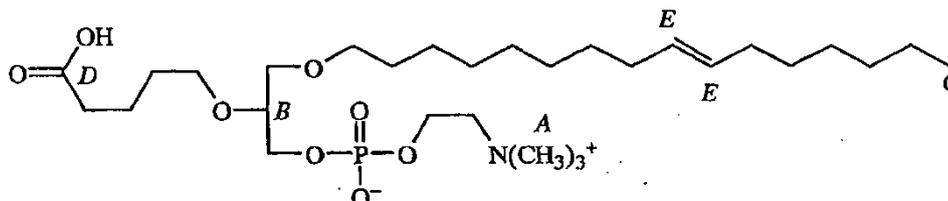
10



RMN de ¹H (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl₃) = 7,26 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
5,340	2 H vinilo, dt, J ₁ = 3,9Hz, J ₂ = 1,5 Hz	K
3,896	2 H, m	A
3,690	1 H, m	B
3,400 - 3,626	10 H, m, 5 x CH ₂	C
3,307	9 H, s, 3 x CH ₃	D
2,335	2 H, t = 6,9 Hz	E
1,983 - 2,023	4 H, alilo	J
1,6576 - 1,721	2 H, m	G
1,526 - 1,622	4 H, m, 2 x CH ₂	F
1,288	18 H, m, 9 x CH ₂	H
0,884	3 H, t, 1 x CH ₃ , J = 7,2 Hz	I

15 La asignación de los picos de ¹³C observados de acuerdo con la estructura de 1-(*cis*-9-hexadecenil)-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente:



RMN de ¹³C (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl₃) = 77,257 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
178,41	D
130,02	E
129,87	E
77,876	B
71,868	
70,200	
69,940	
65,439	
65,368	
52,725	A
33,896	
31,854	
29,838	
29,799	
29,669	
29,609	
29,568	
29,361	
29,146	
29,049	
27,273	
26,139	
22,724	
21,514	
14,137	C

Caracterización mediante espectrometría de masas de 1-(*cis*-9-hexadecenil)-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina:

La masa calculada para 1-(*cis*-9-hexadecenil)-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (C₂₉H₅₈NO₈P) fue 579,3900.

- 5 El espectro de masas obtenido usando Fast Atom Bombardment (FAB+) mostró un ion molecular con $m/z = 580,3995$, correspondiente al ión molecular protonado $[M+H]^+$. El espectro de espectrometría de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-(*cis*-9-hexadecenil)-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina.

Ejemplo 16

(S)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicerol

- 10 (S)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicerol se sintetizó como se describe en el Ejemplo 1 usando (*R*)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida. La síntesis de (*R*)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicerol, usando (*S*)-(+)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida, también se describe en el Ejemplo 1.

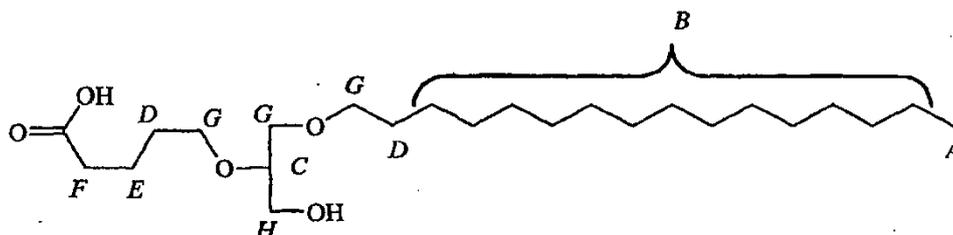
Caracterización mediante RMN de (S)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicerol:

- 15 La muestra se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl₃) con unas pocas gotas de metanol deuterado (CD₃OD). Después, los espectros se midieron a 600 MHz. Las muestras se midieron mediante espectroscopia de RMN tanto de ¹H como de ¹³C.

Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicerol y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

La asignación de los picos de ^1H observados de acuerdo con la estructura de 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicerol fue la siguiente:

5 RMN de ^1H

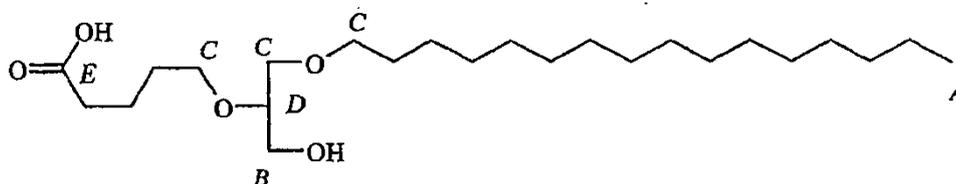


RMN de ^1H (600 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 7,26 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
3,721	1 H, m	C
3,655	2 H, m	H
3,480 - 3,573	4 H, m, 2 x CH_2	G
3,431	2 H, m	G
2,403	2 H, t, J = 7,2 Hz	F
1,750	2 H, tt CH_2	E
1,653	2 H, tt CH_2	D
1,555	2 H, tt CH_2	D
1,254	26 H, m, 13 x CH_2	B
0,880	3 H, t, 1 x CH_3 , J = 7,2 Hz	A

10 RMN de ^{13}C

La asignación de los picos de ^{13}C observados de acuerdo con la estructura de 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicerol fue la siguiente:



15 RMN de ^{13}C (600 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 77,014 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
176,95	E
78,495	D
71,914	
70,921	

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
69,685	C
63,068	B
33,302	
31,937	
29,708	
29,682	
29,633	
29,609	
29,473	
29,372	
29,242	
26,099	
22,701	
21,609	
14,127	A

Caracterización por espectrometría de masas de 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicerol:

La masa calculada para 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicerol ($C_{24}H_{48}O_5$) fue 416.635.

- 5 El espectro de masas realizado usando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI + -MS), mostró un ion molecular con $m/z = 417,0$, correspondiente al ión molecular protonado $[M + H]^+$. El espectro de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicerol.

Ejemplo 17

1-hexadecil-2-(5',5'-dimetoxipentil)-glicero-3-fosfocolina (diMeAc) y 1-hexadecil-2-(5',5'-dietoxipentil)-glicero-3-fosfocolina (diEtAc)

- 10 (R)-1-hexadecil-2-(5',5'-dietoxipentil)-sn-glicero-3-fosfocolina y (R)-1-hexadecil-2-(5',5'-dimetoxipentil)-sn-glicero-3-fosfocolina se prepararon a partir de (R)-1-hexadecil-2-(5,6-dihidroxihexanil)-sn-glicero-3-fosfocolina, tal como se describe a continuación en el presente documento. Usando los mismos procedimientos, el (S)-1-hexadecil-2-(5',5'-dietoxipentil)-sn-glicero-3-fosfocolina y (S)-1-hexadecil-2-(5',5'-dimetoxipentil)-sn-glicero-3-fosfocolina se preparan a partir de (S)-1-hexadecil-2-(5,6-dihidroxihexanil)-sn-glicero-3-fosfocolina.

- 15 La síntesis de (R)-1-hexadecil-2-(5,6-dihidroxihexanil)-sn-glicero-3-fosfocolina y (S)-1-hexadecil-2-(5,6-dihidroxihexanil)-glicero-3-fosfocolina se describen en el Ejemplo 14.

- 20 **Síntesis de (R)-1-hexadecil-2-(5'-oxo-pentil)-sn-glicero-3-fosfocolina:** 2 gramos de peryodato de sodio se añadió a una solución enfriada con hielo de (R)-1-hexadecil-2-(5',6'-dihidroxihexanil)-sn-glicero-3-fosfocolina (2 gramos) en agua (200 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos con enfriamiento y a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo de separación y se extrajo con una mezcla de 2:1 (v / v) de cloroformo: Metanol (3 x 100 ml) y el disolvente de la fase orgánica combinada se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en cloroformo y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtró, y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto en bruto obtenido se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (21 gramos). 1,2 gramos de (R)-1-hexadecil-2-(5'-oxo-pentil)-sn-glicero-3-fosfocolina se eluyeron con cloroformo seguido de mezclas de cloroformo con 40 % - 60 % de metanol. El rendimiento fue del 63 %.

- 25 **Síntesis de (R)-1-hexadecil-2-(5',5'-dietoxipentil)-sn-glicero-3-fosfocolina (diEtAc):** La reacción se realizó en atmósfera de nitrógeno. (R)-1-hexadecil-2-(5'-oxo-pentil)-sn-glicero-3-fosfocolina (50 mg, 0,088 mmol) se disolvió en etanol (10 ml). Se añadieron ortoformiato de trietilo (0,053 ml, 0,0476 gramos, 0,32mmol) y 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado (95 - 97 %) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se transfirió con la ayuda de diclorometano (75 ml) a un embudo separador. La solución se lavó sucesivamente con agua (75 ml), solución acuosa de bicarbonato de sodio al 2,5% (75 ml), y agua (75 ml), y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. La filtración y la eliminación del disolvente a presión reducida dieron 50 mg de (R)-1-

30

hexadecil-2-(5',5'-dietoxipentil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina. El rendimiento fue del 88,4 %.

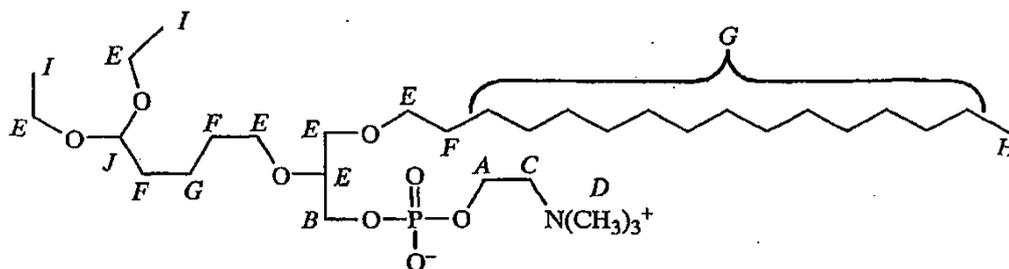
Síntesis de (*R*)-1-hexadecil-2-(5',5'-dietoxipentil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina (diMeAc): La reacción se realizó en atmósfera de nitrógeno. (*R*)-1-hexadecil-2-(5'-oxo-pentil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina (55 mg, 0,097 mmol) se disolvió en metanol (10 ml). Se añadieron ortoformiato de trimetilo (0,043 ml, 0,0414 gramos, 0,39 mmol) y 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado (95 - 97 %) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió diclorometano (75 ml) y la mezcla de reacción se transfirió a un embudo separador. La solución se lavó sucesivamente con agua (75 ml), solución acuosa de 2,5 % de bicarbonato sódico (75 ml) y de nuevo con agua (75 ml). El secado sobre sulfato sódico anhidro y la eliminación del disolvente a presión reducida dieron 36,8 mg de (*R*)-1-hexadecil-2-(5',5'-dietoxipentil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina. El rendimiento fue del 62 %.

10 **Caracterización mediante RMN de 1-hexadecil-2-(5',5'-dietoxipentil)-glicero-3-fosfocolina (DiEtAc):**

La muestra se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl₃). Los espectros de RMN de ¹H y RMN de ¹³C se midieron a 300 MHz.

Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-hexadecil-2-(5',5'-dietoxipentil)-glicero-3-fosfocolina y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

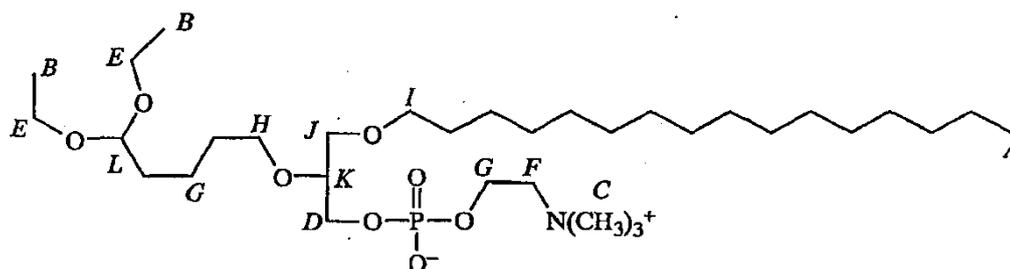
15 La asignación de los picos de ¹H observados de acuerdo con la estructura de 1-hexadecil-2-(5',5'-dietoxipentil)-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente:



RMN de ¹H (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl₃) = 7,270 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
4,459	1 H, t, J = 5,6 Hz	J
4,309	2H, s, a	A
3,859	2H, t, J = 5,4 Hz	C
3,808	2H, s, a	B
3,430 - 3,679	11 H, m, 5 x CH ₂ + CH	E
3,388	9H, s, 3 x CH ₃	D
1,509 - 1,587	6H, m	F
1,256	28H, 14 x CH ₂	G
1,195	6H, t, 2 x CH ₃ , J = 7,05 Hz	I
0,881	3 H, t, 1 x CH ₃ , J = 6,6 Hz	H

20 La asignación de los picos de ¹³C observados de acuerdo con la estructura de 1-hexadecil-2-(5',5'-dietoxipentil)-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente:



RMN de ^{13}C (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 77,0046 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
102,980	L
78,2741	K
71,7498	J
71,0295	I
70,2381	H
65,5827	G
64,9656	F
61,0510	E
59,1392	D
54,6214	C
33,5956	
31,9161	
30,0866	
29,8112	
29,7010	
29,3441	
26,1672	
22,6671	
21,3484	
15,3929	B
14,0619	A

5 **Caracterización mediante espectrometría de masas de 1-hexadecil-2-(5',5'-dietoxipentil)-glicero-3-fosfocolina (DiEtAc):**

La masa calculada para 1-hexadecil-2-(5',5'-dietoxipentil)-glicero-3-fosfocolina ($\text{C}_{33}\text{H}_{70}\text{NO}_8\text{P}$) fue 639,88.

10 El espectro de masas obtenido usando espectrometría de masas con ionización por electropulverización positiva (ESI + -MS) mostró un ion molecular con $m/z = 640$ correspondiente al ion molecular protonado $[\text{M} + \text{H}]^+$ acompañado de un catión molecular con $m/z = 662$ correspondiente al ion molecular cationado $[\text{M} + \text{Na}]^+$ y un ion con $m/z = 594$, correspondiente al ion molecular deetoxilado $[\text{M} - \text{OEt}]^+$. El espectro de espectrometría de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-hexadecil-2-(5',5'-dietoxipentil)-glicero-3-fosfocolina.

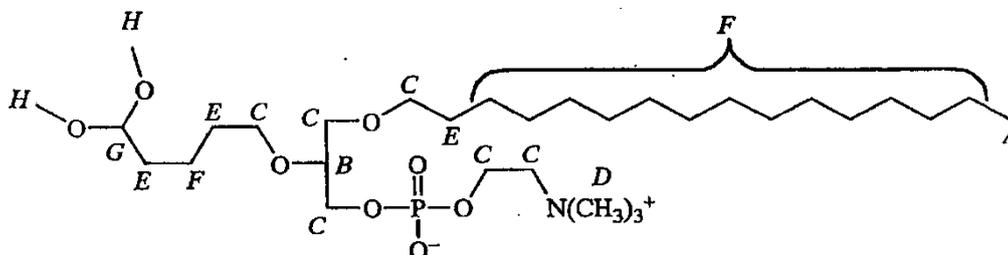
Caracterización mediante RMN de 1-hexadecil-2-(5',5'-dimetoxipentil)-glicero-3-fosfocolina (DiMeAc):

La muestra se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl_3). Los espectros de RMN de ^1H y RMN de ^{13}C se midieron a 300 MHz.

15 Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-hexadecil-2-(5',5'-

dimetoxipentil)-glicero-3-fosfocolina (DiMeAc) y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

La asignación de los picos de ^1H observados de acuerdo con la estructura de 1-hexadecil-2-(5',5'-dimetoxipentil)-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente:



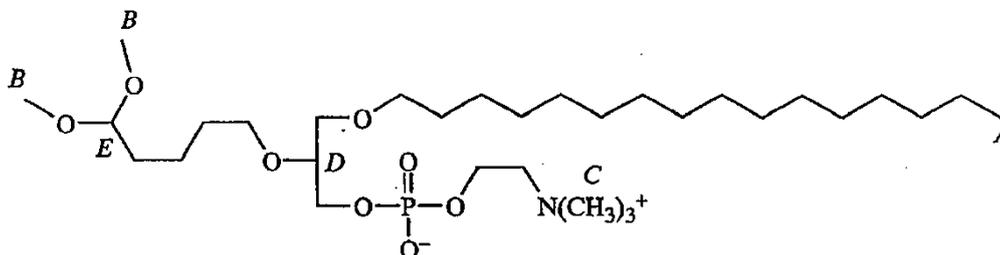
5

RMN de ^1H (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 7,28 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
4,337	1 H, t, J = 5,7 Hz	G
3,855	2H, s, a	A
3,834 - 3,855	4H, m, 2 x CH_2	C
3,703	1H, m	B
3,529 - 3,591	4H, m	C
3,430 - 3,464	2H, m, CH_2	C
3,388	9H, s, 3 x CH_3	D
3,302	6H, s, 2 x CH_3	H
1,506 - 1,605	6H, m	E
1,256	28H, 14 x CH_2	F
0,880	3H, t, 1 x CH_3 , J = 6,9 Hz	A

La asignación de los picos de ^{13}C observados de acuerdo con la estructura de 1-hexadecil-2-(5',5'-dimetoxipentil)-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente:

10



RMN de ^{13}C (300 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 77,000 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
104,50	E
78,133	D
71,686	
70,845	

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
70,121	
66,330	
64,974	
59,187	
54,411	C
52,721	B
52,692	B
32,324	
31,884	
29,963	
29,756	
29,554	
29,320	
26,112	
25,348	
22,646	
21,165	
14,071	A

Ensayo de lesión aterosclerótica:

La eficacia *in vivo* de diMeAc contra las lesiones ateroscleróticas se analizó en ratones ApoE KO, tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección de Materiales y Procedimientos. Se administró diMeAc a una dosis de 1 mg por ratón, equivalente a una dosis de 40 mg / kg.

Como se muestra en la FIG. 35, 1 mg / ratón de diMeAc disminuyó el área de la lesión aterosclerótica en un 23 % en comparación con el control (PBS).

Estos resultados indican que diMeAc es eficaz contra la aterosclerosis.

Toxicidad de diEtAc:

La toxicidad de diEtAc se evaluó como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Como se muestra en las FIG. 36A y 36B, diEtAc exhibió toxicidad a dosis de 20 $\mu\text{g/ml}$ o superiores, estando la DL_{50} de diEtAc entre 20 y 50 $\mu\text{g/ml}$. A una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, se observó toxicidad en solamente uno de los dos experimentos.

Ejemplo 18

15 1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoserina (VB-223)

(*R*)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoserina se preparó a partir de (*S*)-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-sn-glicerol, como se describe a continuación en el presente documento. Usando los mismos procedimientos, (*S*)-hexadecil-2-(5'-hexenil)-glicero-3-fosfoserina se prepara a partir de (*R*)-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-glicerol.

La síntesis de (*S*)-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-sn-glicerol y (*R*)-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-glicerol se describen en el Ejemplo 14.

Síntesis de (*R*)-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-sn-glicero-3-fosfato 1,0 gramos de (*S*)-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-glicerol (que se secó mediante destilación azeotrópica con benceno) y piridina seca (1 ml) se disolvieron en THF (60 ml). Esta solución se añadió gota a gota a una solución enfriada con hielo de POCl_3 (0,3 ml) en THF (12 ml) en agitación. La agitación se continuó durante 3 horas adicionales con refrigeración. A la mezcla de reacción enfriada, se añadió una solución de bicarbonato de sodio (2,44 gramos) en agua (24 ml), y la mezcla se agitó en un baño de

hielo durante 30 minutos adicionales. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a aproximadamente 1 con la adición lenta de ácido clorhídrico al 10 %. La extracción con éter dietílico (3 x 150 ml), el lavado de la fase orgánica combinada con agua (2 x 150 ml), el secado sobre Na₂SO₄ anhidro y la eliminación del disolvente eliminado a presión reducida proporcionaron 1,43 g de (R)-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-sn-glicero-3-fosfato.

5 **Síntesis de éster de (R)-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-sn-glicero-3-fosfo-N-Boc-L-serina-benchedrilo:** 1,30 gramos de (R)-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-sn-glicero-3-fosfato y 0,95 gramos de éster de N-Boc-serina-benchedrilo (que se secaron en un desecador con P₂O₅) se disolvieron en piridina (30 ml). Se añadió cloruro de sulfonil benceno 2,4,6-triisopropilo (2,99 gramos) y la mezcla de reacción se agitó en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 20 horas. Se añadió agua (50 ml) y la mezcla se transfirió a un embudo de separación. La extracción se realizó con una mezcla de 8: 2 (v / v) de hexano: acetato de etilo (3 x 50 ml), la fase orgánica combinada se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disuelve en una mezcla de 8: 2 (v / v) de hexano: acetato de etilo (50 ml) y se lavó con ácido acético diluido enfriado (5 %). El disolvente se eliminó después presión reducida, produciendo 1,33 gramos de éster de (R)-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-sn-glicero-3-fosfo-N-Boc-L-serina-benchedrilo.

15 **Síntesis de éster de (R)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)-sn-glicero-3-fosfo-N-Boc-L-serina-benchedrilo:** Se suspendieron peryodato de sodio (3,0 gramos), permanganato de potasio (0,05 gramos), carbonato sódico (0,15 gramos) y carbonato potásico (0,03 gramos) se disolvieron en agua (100 ml). A esta solución, gota a gota se añadió una solución de éster de (R)-1-hexadecil-2-(5'-hexenil)-sn-glicero-3-fosfo-N-Boc-L-serina-benchedrilo (0,90 gramos) en *tert*-butanol (100 ml) a temperatura ambiente durante un período de 30 minutos. Después de completar la adición, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió una cantidad adicional de permanganato de potasio (0,02 gramos) y la mezcla de reacción se agitó durante 90 minutos. Se añadió una solución de dihidrógeno fosfato de sodio (10 gramos) en agua (100 ml) y la mezcla de reacción se extrajo con cloroformo (3 x 100 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (100 ml) y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 1,02 gramos de éster de (R)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-sn-glicero-3-fosfo-N-boc-L-serina-benchedrilo bruto.

20 **Síntesis de (R)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (VB-223):** 1,02 gramos de éster de (R)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-sn-glicero-3-fosfo-N-boc-L-serina-benchedrilo se disolvieron en diclorometano (100 ml). La solución se enfrió en un baño de hielo y se saturó con gas HCl durante 30 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora adicional. A continuación, la mezcla de reacción se neutralizó mediante la adición de una solución acuosa de dihidrógeno fosfato de sodio y después se extrajo con una mezcla de 2: 1 (v / v) de cloroformo: metanol (3 x 100 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto en bruto obtenido (0,72 gramos) se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (12,60 gramos). 0,60 gramos de (R)-1-hexadecil-2-(4-carboxi)butil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina se eluyó con una mezcla 1:1 (v / v) de hexano: cloroformo, seguido de cloroformo, y después una mezcla de cloroformo con 10 % de metanol.

35 **Fosforilación de tirosina:**

El efecto de VB-223 sobre la fosforilación de tirosina *in vitro* en macrófagos primarios se determinó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

Como se muestra en la FIG. 37, el tratamiento con 5, 10 y 20 µg/ml (8,3, 16,7 y 33,3 µM) de VB-223 y quizás también con 1 µg/ml (1,7 µM) de VB-223 tiene como resultado la inducción de la fosforilación de la tirosina.

40 **Ejemplo 18**

1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (VB-221) y 1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (VB-222)

45 (R)-1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina y (R)-1-(2-octil)dodecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina se sintetizaron como se describe a continuación en el presente documento usando (R)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida. (S)-1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina y (S)-1-(2-octil)-dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina se sintetizan usando los mismos procedimientos pero con (S)-(+)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol como material de partida.

50 **Éster 2-octil-dodecilo de ácido metanosulfónico:** 2-octil-1-dodecanol (20 ml, 56,14 mmol) y trietilamina anhidra (16 ml, 112,28 mmol) se disolvieron en diclorometano seco (60 ml). La solución se enfrió a 0 °C y gota a gota se añadieron cloruro de metanosulfonilo (5,2 ml, 67,36 mmol) en diclorometano seco (40 ml). Una vez finalizada la adición, la mezcla se agitó a 0 °C durante 3 horas y después se refrigeró (2 - 8 °C) durante la noche. La mezcla de reacción se vertió en hielo (500 gramos), se dejó calentar hasta la temperatura ambiente, y se extrajo con éter (3 x 150 ml). La fase orgánica se lavó consecutivamente con agua (150 ml), 2 % de H₂SO₄ (150 ml), agua (150 ml), bicarbonato sódico saturado (150 ml) y de nuevo con agua (150 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida, produciendo 22,8 gramos de éster 2-octil-dodecilo del ácido metanosulfónico como un aceite amarillo.

55 **1-(2-octil)dodecil-glicerol:** 5,32 gramos de (R)-(-)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol (8,3 ml, 66,59 mmol),

hidróxido potásico en polvo (12 gramos) y éster 2-octil-dodecilo de ácido metanosulfónico (22,77 gramos, 60,50 mmol) se agitaron en benceno (250 ml) y se sometieron a reflujo durante 5 horas al tiempo que se retiraba el agua formada mediante destilación azeotrópica. El volumen del disolvente se redujo gradualmente hasta aproximadamente 150 ml. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadieron 200 ml de agua y la mezcla se extrajo con éter dietílico (3 x 200 ml). La fase orgánica combinada se lavó con agua (200 ml) y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en 105 ml de una mezcla de 90:10:5 (v/v) de metanol: agua: ácido clorhídrico concentrado, y la solución resultante se sometió a reflujo durante 30 minutos. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente se añadió agua (100 ml). El producto se extrajo con cloroformo (3 x 100 ml) y se lavó consecutivamente con agua (100 ml), solución acuosa saturada de carbonato sódico (1100 ml) y de nuevo con agua (100 ml). El disolvente se eliminó a presión reducida, y el producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (400 gramos). 17 gramos de 1-(2-octil)dodecil-glicerol puro eluyeron con cloroformo, seguido de mezclas de cloroformo y 10 % - 30 % de acetato de etilo como un aceite incoloro. El rendimiento fue del 75,5 %.

(S)-1-(2-octil)dodecil-3-tritil-glicerol: 17 gramos de 1-(2-octil)dodecil-glicerol (secado por destilación azeotrópica con benceno) se disolvieron en una mezcla de THF seco (400 ml) y acetonitrilo seco (160 ml). Se añadieron trifenilclorometano (15,8 gramos) y trietilamina seca (14 ml), y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 17 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se vertió en hielo (1 kilogramo), se transfirió a un embudo de separación y se extrajo con éter dietílico (3 x 200 ml). La fase orgánica combinada se lavó consecutivamente con agua (200 ml), ácido sulfúrico diluido (1,5 %) (2 x 100 ml), agua (200 ml), bicarbonato sódico acuoso concentrado (200 ml) y de nuevo con agua (200 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, el disolvente se eliminó a presión reducida, y el producto bruto obtenido se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (350 gramos). 26 gramos de (S)-1-(2-octil)dodecil-3-tritil-glicerol puro se eluyeron mediante hexano, seguido de mezclas de hexano y cloroformo (50 – 100 %) como un aceite amarillo. El rendimiento fue del 92,7 %.

1-(2-octil)dodecil-2-(5'-hexenil)-3-tritil-glicerol: 1-(2-octil)dodecil-3-tritil-glicerol (26 gramos, 42,28 mmol) y sulfonato de 5-hexenil-1-metano (9,4 gramos, 50,73 mmol) se disolvieron en benceno (150 ml). Se añadió KOH (17 gramos) en polvo y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 5,5 horas, mientras se eliminaba el agua formada mediante destilación azeotrópica. El volumen del disolvente se redujo gradualmente hasta aproximadamente 50 ml. Después de enfriar la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente, se añadieron 200 ml de agua y la mezcla se extrajo con éter dietílico (3 x 100 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (3 x 100 ml) y el disolvente se eliminó a presión reducida, produciendo 22,8 gramos de producto bruto. 21 gramos de 1-(2-octil)dodecil-2-(5'-hexenil)-3-tritil-glicerol puro se obtuvieron purificando el producto en bruto mediante cromatografía sobre gel de sílice (300 gramos). El producto se eluyó con cloroformo como un aceite amarillo. El rendimiento fue del 71,2 %.

(S)-1-(2-octil)dodecil-2-(carboxi)butil-glicerol: Se suspendieron peryodato de sodio (58 gramos), permanganato de potasio (960 mg) y carbonato potásico (7 gramos) en agua (250 ml). Se añadió una solución de 1-(2-octil)dodecil-2-(5'-hexenil)-3-tritil-glicerol (21 gramos) en *tert*-butanol (250 ml) gota a gota durante el transcurso de 2,5 horas. La mezcla de reacción se agitó después durante la noche (se añadió solución de permanganato según lo necesario para mantener un color rosado). La mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite, que se lavó adicionalmente con *tert*-butanol. Se añadieron 10 ml de ácido sulfúrico diluido (10 %) gota a gota y después la solución obtenida se extrajo con hexano (3 x 200 ml). La fase orgánica combinada se lavó dos veces con una solución de bisulfito de sodio acuoso (20 gramos) en agua (100 ml) y luego con agua (200 ml). El disolvente se concentró a presión reducida hasta un volumen de 150 ml. Se añadieron 20 ml de agua y 5 ml de HCl concentrado y la mezcla obtenida se sometió a reflujo durante 6 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, el disolvente se concentró a presión reducida y el residuo obtenido se trató con una mezcla de hidróxido sódico al 30 % (10 ml) y agua (100 ml), y la mezcla de reacción alcanzó un pH de 12. El trifenilmetanol precipitado se filtró y se lavó con agua (4 x 10 ml). El filtrado se extrajo con una mezcla 1:1 (v/v) de hexano: acetato de etilo (100 ml). La solución básica se acidificó con HCl concentrado (10 ml) a un pH de 1 y se extrajo con hexano (100 ml). La solución orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida, obteniéndose 8,5 gramos de (S)-1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicerol como un aceite amarillo. El rendimiento fue del 60 %.

(S)-1-(2-octil)dodecil-2-(4'-carboximetil)butil-glicerol: (S)-1-(2-octil)dodecil-2-(carboxi)butil-glicerol (8,39 gramos) se disolvió en metanol (100 ml). Se añadieron 2 ml de HCl concentrado (32 %) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió agua (100 ml) y la mezcla se extrajo con cloroformo (3 x 100 ml). La fase orgánica combinada se lavó consecutivamente con agua (100 ml), solución de bicarbonato de sodio concentrado (100 ml), y agua (100 ml), y después se secó sobre sulfato de sodio anhidro. La eliminación del disolvente a presión reducida dio 8,48 gramos de (S)-1-(2-octil)dodecil-2-(4'-metilcarboxi)butil-glicerol como un aceite de color amarillo. El rendimiento fue del 98 %.

(R)-1-(2-octil)dodecil-2(4'-metilcarboxi)butil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina: (S)-1-(2-octil)dodecil-2-(4'-carboximetil)butil-glicerol (8,48 gramos) y trietilamina (7,3 ml) se disolvieron en THF seco (50 ml). Esta solución se añadió gota a gota en el transcurso de 60 minutos a una solución enfriada con hielo de POCl₃ (4,85 ml) en THF (50 ml) en agitación. La agitación continuó durante 15 minutos adicionales con enfriamiento y después durante 45 minutos adicionales a temperatura ambiente. Esta mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y gota a gota se

añadió una solución de etanolamina (3,2 ml) y trietilamina (15 ml) en THF seco (50 ml) durante el transcurso de 60 minutos en agitación. La agitación se continuó durante 10 minutos en hielo y después a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en una mezcla de ácido acético (24 ml) y agua y (10 ml) se calentó hasta 70 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se extrajo con cloroformo (3 x 80 ml). La fase orgánica combinada se lavó con agua (2 x 50 ml) y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo (11 gramos) se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (220 gramos). 4,25 gramos de (*R*)-1-(1-octil)dodecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina eluyeron con cloroformo seguido de mezclas de cloroformo con 5 % - 20 % de metanol y, por ultimo, con una mezcla de 70:26:4 cloroformo: metanol: agua. El rendimiento fue del 40 %.

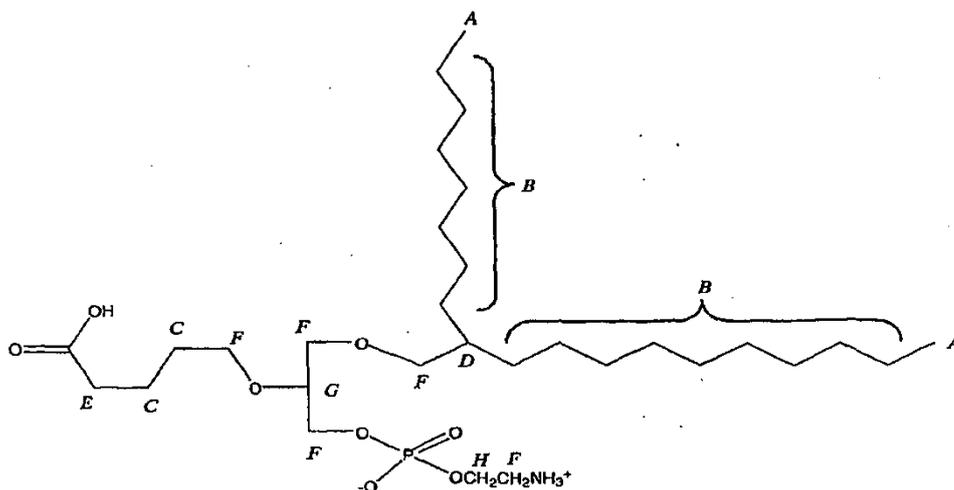
10 **(*R*)-1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (VB-222):** (*R*)-1-(2-octil)dodecil-2-(4-metilcarboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (1,2 gramos) se disolvió en 100 ml de una mezcla de 8:2 (v/v) de metanol: 10 % de solución de hidróxido sódico. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El pH de la reacción se ajustó a 5 mediante la adición de dihidrógeno fosfato de sodio. Se añadieron agua (100 ml) y cloroformo (100 ml). Se separaron las fases y el disolvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en cloroformo, se secó sobre sulfato sódico y se filtró, y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto en bruto (1,2 gramos) se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (23 gramos). El producto se eluyó con mezclas de 8: 2 (v / v) cloroformo: metanol seguido de mezclas de cloroformo: metanol: agua a 70:26:4, y después a 60:35:5 de relación volumétrica). El disolvente de las fracciones que contienen el producto deseado se eliminó a presión reducida, el residuo obtenido se disolvió en cloroformo y se secó sobre sulfato sódico y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 500 mg de (*R*)-1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina pura (CI-214) como una cera. El rendimiento fue del 42,65 %.

Caracterización mediante RMN de 1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina:

La muestra se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl₃) con unas pocas gotas de metanol deuterado (CD₃OD). Después, los espectros se midieron a 600 MHz. Las muestras se midieron mediante espectroscopia de RMN tanto de ¹H como de ¹³C.

Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

La asignación de los picos de ¹H observados de acuerdo con la estructura de 1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina fue la siguiente:

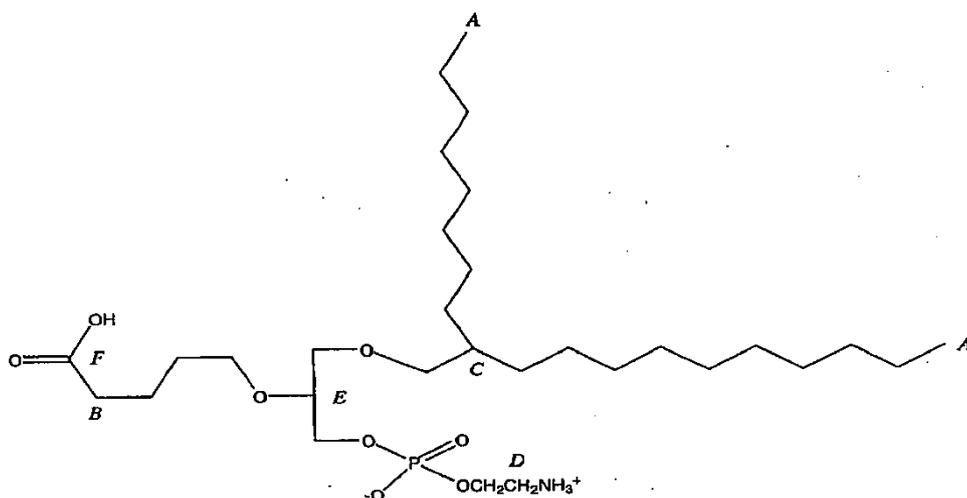


RMN de ¹H (600 MHz, disolvente de referencia (CDCl₃) = 7,313 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
4,117	2 H, s, a	H
3,835 - 3,844	1 H, m	G
3,394 - 3,718	10 H, m, 5 x CH ₂	F
2,329	2 H, m	E

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
1,680 - 1,700	1 H, m	D
1,595 - 1,606	2 H, m	C
1,533	2 H, m	C
1,261 - 1,300	32 H, m, 16 x CH ₂	B
0,882	6 H, t, 2 x CH ₃ , J = 6,9 Hz	A

La asignación de los picos de ¹³C observados de acuerdo con la estructura de 1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina fue la siguiente:



5

RMN de ¹³C (600 MHz, disolvente de referencia (CDCl₃) = 77,189 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
177,505	F
78,1013 - 78,152	E
75,103	
71,013	
70,085	
66,144	
61,989	
40,344	D
38,229	C
33,945	B
31,999	
31,350	
31,305	
31,227	
30,191	
29,792	

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
- 29,743	
29,439	
29,291	
26,883	
22,751	
21,792	
21,661	
14,138	A

Caracterización por espectrometría de masas de 1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina:

La masa calculada para 1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina ($C_{30}H_{62}NO_8P$) fue 595,42.

- 5 El espectro de masas realizado usando espectrometría de masas con ionización por electropulverización (ESI + -MS) mostró un ion molecular con $m/z = 596$ correspondiente al ión molecular protonado $[M + H]^+$ acompañado de un catión molecular con $m/z = 618$ correspondiente al ion cationado $[M + Na]^+$.

El espectro de MS es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina.

- 10 **(R)-1-(2-octil)dodecil-2(4-metilcarboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina:** (R)-1-(2-octil)dodecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (2,62 gramos) se disolvieron en una mezcla de isopropanol (18 ml) y diclorometano (40 ml). Gota a gota se añadió una solución de carbonato de potasio (3 gramos) en agua (10 ml) mientras la mezcla de reacción se mantenía a una temperatura de 35-40 °C. Una solución de sulfato de dimetilo (2,1 ml) en isopropanol (10 ml) se añadió gota a gota a 40 °C. La mezcla de reacción se mantuvo a 40 °C durante 2 horas, después se enfrió hasta la temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió agua (100 ml) y la mezcla se extrajo con cloroformo (3 x 100 ml). La fase orgánica combinada se lavó con agua (100 ml) y el disolvente se eliminó a presión reducida dando 2,78 gramos de (R)-1-(2-octil)dodecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina como una cera de color blanco.

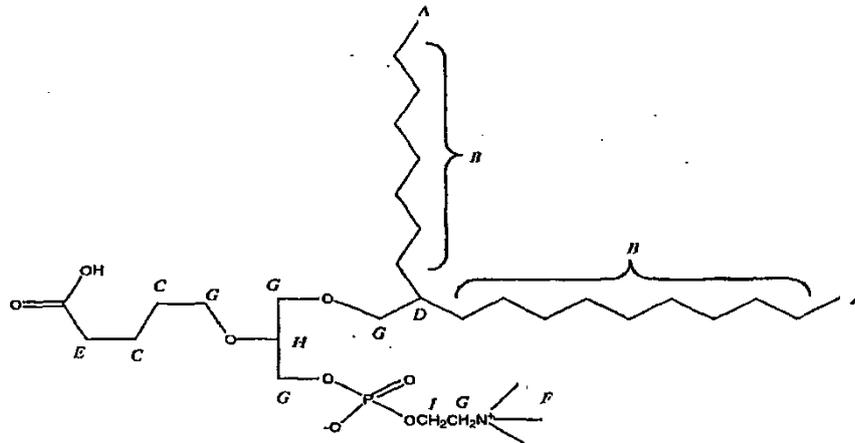
- 20 **(R)-1-(2-octil)dodecil-2(4-carboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina (VB-221):** (R)-1-(2-octil)dodecil-2-(4-metilcarboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina (2,78 gramos) se disolvió en 100 ml de una mezcla de 8:2 (v/v) de metanol y solución de hidróxido de sodio acuoso al 10 %, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El pH de la reacción se ajustó a 5 mediante la adición de dihidrógeno fosfato de sodio. Se añadieron agua (100 ml) y cloroformo (100 ml). Las fases se separaron La y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en cloroformo, se secó sobre sulfato sódico y se filtró, y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo (2,7 gramos) se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (50 gramos). Las impurezas no polares se eluyeron con 8: 2 (v / v) de cloroformo: metanol. Después, el producto se eluyó con mezclas de cloroformo: metanol: Agua a relaciones volumétricas de 70:26:4, seguido de 60:35:5. Después de la eliminación del disolvente a presión reducida, el residuo obtenido se disolvió en cloroformo y se secó sobre sulfato sódico y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar 800 mg de (R)-1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina pura como una cera blanca. El rendimiento fue del 29,4 %.

Caracterización mediante RMN de 1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina:

La muestra se disolvió en cloroformo deuterado ($CDCl_3$) con unas pocas gotas de metanol deuterado (CD_3OD). Después, los espectros se midieron a 600 MHz. Las muestras se midieron mediante espectroscopia de RMN tanto de 1H como de ^{13}C .

- 35 Los resultados mostraron las señales esperadas para los elementos estructurales de 1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-sn-glicero-3-fosfocolina y, por lo tanto, soportaban plenamente la estructura.

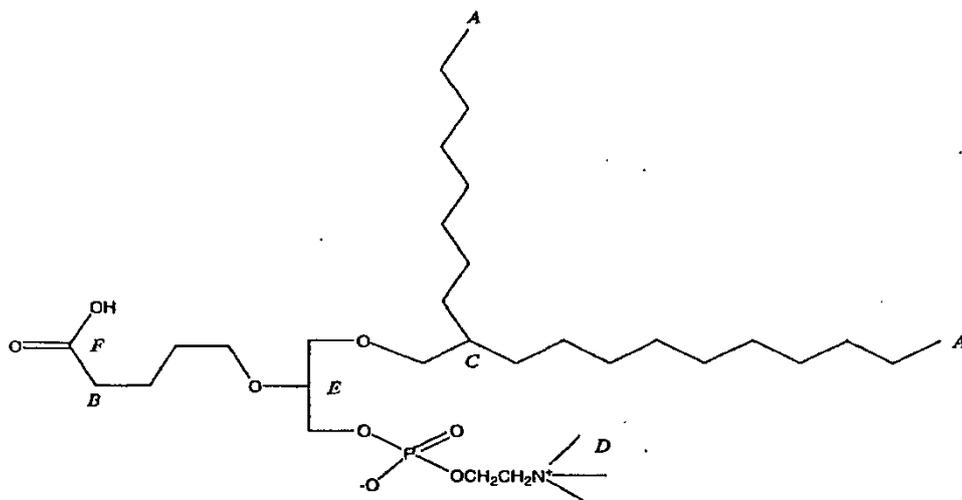
La asignación de los picos de 1H observados de acuerdo con la estructura de 1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente:



RMN de ^1H (600 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 7,352 ppm)

δ [ppm]	Descripción	Asignación (véase la fórmula anterior)
4,259	2 H, s, a	I
3,983 - 3,983	1 H, m	H
3,607 - 3,833	6 H, m, 3 x CH_2	G
3,432 - 3,493	2H, m	G
3,304 - 3,320	2H, m	G
3,281	9 H, s, 3 x CH_3	F
2,350	2 H, m	E
1,875	1H, m	D
1,710	2 H, m	C
1,602	2 H, m	C
1,262 - 7,313	32 H, m, 16 x CH_2	B
0,883	6 H, t, 2 x CH_3 , J = 6,9 Hz	A

5 La asignación de los picos de ^{13}C observados de acuerdo con la estructura de 1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina fue la siguiente:



RMN de ^{13}C (600 MHz, disolvente de referencia (CDCl_3) = 77,308 ppm)

δ [ppm]	Asignación (véase la fórmula anterior)
176,700	F
78,289 - 78,344	E
75,122	
71,137	
70,087	
66,662	
66,011- 66,046	
59,052 - 59,086	
54,420	D
38,274	C
34,150	B
32,032	
31,397	
31,356	
30,216	
29,809	
29,766	
29,466	
29,370	
26,930	
22,782	
22,102	
14,142	A

Caracterización mediante espectrometría de masas:

- 5 La masa calculada para 1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-*sn*-glicero-3-fosfocolina ($\text{C}_{33}\text{H}_{68}\text{NO}_8\text{P}$) fue 637,87.

El espectro de masas obtenido usando espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ES -MS), mostró un ion molecular con $m/z = 636$, correspondiente al ión molecular desprotonado $[M + H]^-$.

5 El espectro de masas obtenido utilizando espectrometría de masas con ionización por electropulverización positiva (ESI + -MS) mostró un ion molecular con $m/z = 638$ correspondiente al ión molecular protonado $[M + H]^+$, acompañado de un ión con $m/z = 660$, correspondiente a la ion molecular cationado $[M + Na]^+$.

El espectro de masas es, por lo tanto, de acuerdo con la estructura química de 1-(2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfolina.

Fosforilación de tirosina:

10 El efecto de VB-221 y VB-222 sobre la fosforilación de tirosina *in vitro* en macrófagos primarias se determinó como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la sección Materiales y Procedimientos.

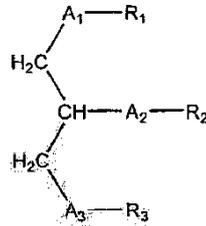
Como se muestra en la FIG. 38, el tratamiento con 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ (8, 16 y 32 μM) de VB-221 tiene como resultado la inducción de la fosforilación de la tirosina.

De un modo similar, como se muestra en la FIG. 39, el tratamiento con 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ (16,8 y 33,6 μM) de VB-222 tiene como resultado la inducción de la fosforilación de la tirosina.

15

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula:



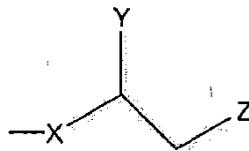
5

o un estereoisómero, un isómero óptico, un enantiómero, una mezcla racémica o una mezcla estereoisomérica del mismo, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que

(i) A_1 , A_2 y A_3 son seleccionados cada uno de forma independiente del grupo que consiste en O y S;

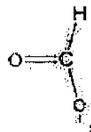
10 (ii) R_1 es seleccionado del grupo que consiste en dodecilo, octadecilo, octilo, eicosanilo, cis-9-hexadecenilo, (2-octilo)dodecilo y (15-carboxi)pentadecilo;

(iii) R_2 es seleccionado del grupo que consiste en una cadena alquilo de 2 - 28 carbonos de longitud y



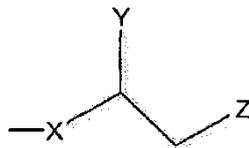
15

en la que X es un alquilo C_{1-25} , Y es seleccionado del grupo que consiste en:



20

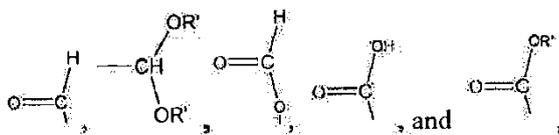
-OH, -H, alquilo, alcoxi, halógeno, acetoxi y grupos funcionales aromáticos; con la condición de que si R_1 es distinto de (15-carboxi)pentadecilo, R_2 es



como se ha definido anteriormente; y

25

Z es seleccionado del grupo que consiste en:



en la que R' es alquilo C₁₋₄; y

5 (iv) R₃ es seleccionado del grupo que consiste en H, acilo, fosfato, fosfocolina, fosfoetanolamina, ácido fosfoetanolamina-N-glutárico, fosfoserina y fosfoinositol.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R₂ es seleccionado del grupo que consiste en (4-metilcarboxi)butilo, (3-carboxi)propilo, (6-carboxi)hexanilo, (2-carboxi)etilo, 5,6-dihidroxihexanilo, 5,5-dietoxipentilo y 5,5-dimetoxipentilo.

10 3. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, o un estereoisómero, un isómero óptico, un enantiómero, una mezcla racémica, o una mezcla estereoisomérica del mismo, en el que el compuesto es seleccionado del grupo que consiste en:

1-dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (CI-209);

1-((15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (CI-213);

1-((15'-carboxi)pentadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-214);

1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (CI-215);

15 1-octadecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-216);

1-((-cis-9-hexadecenil)-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina;

1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (CI-207);

1-octil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina;

1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (CI-219);

20 1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (CI-220);

1-((2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (VB-221); y

1-((2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfoetanolamina (VB-222).

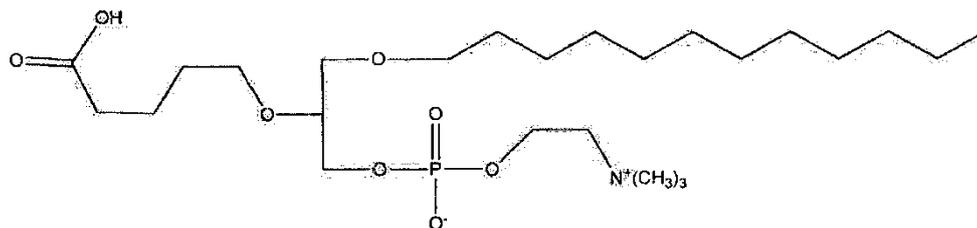
4. El compuesto de la reivindicación 3, o un estereoisómero, un isómero óptico, un enantiómero, una mezcla racémica, o una mezcla estereoisomérica del mismo, en el que el compuesto es

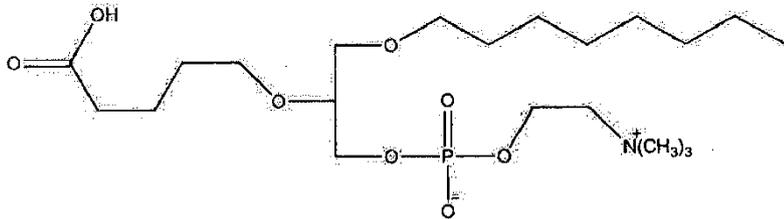
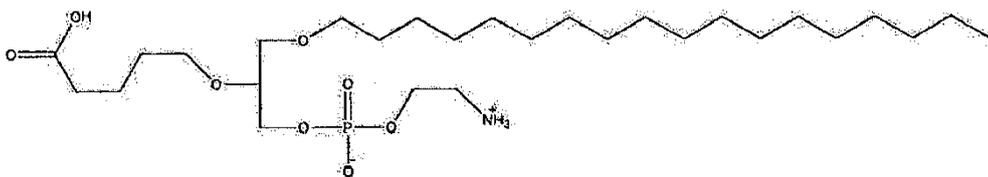
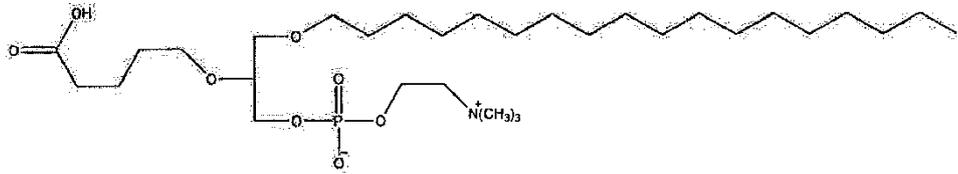
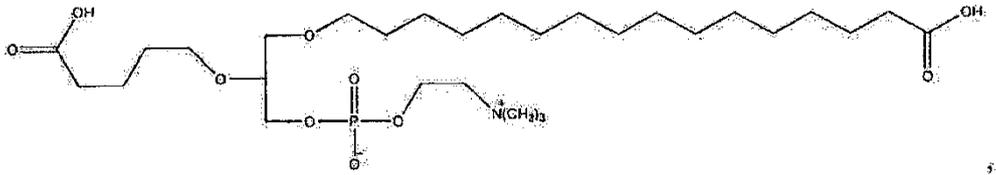
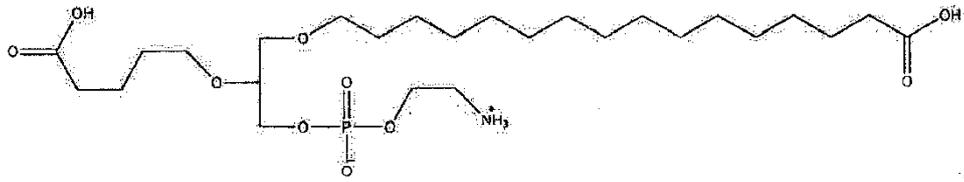
25 1-((2-octil)dodecil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (VB-221).

5. El compuesto de la reivindicación 3, o un estereoisómero, un isómero óptico, un enantiómero, una mezcla racémica, o una mezcla estereoisomérica del mismo, en el que el compuesto es

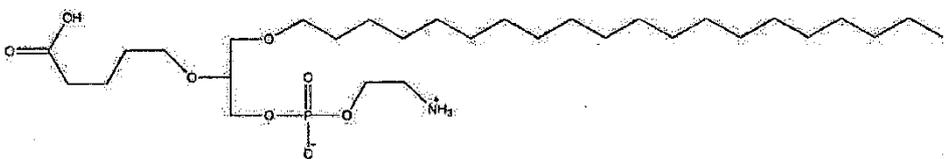
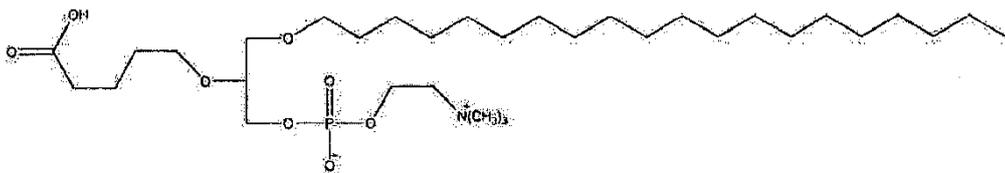
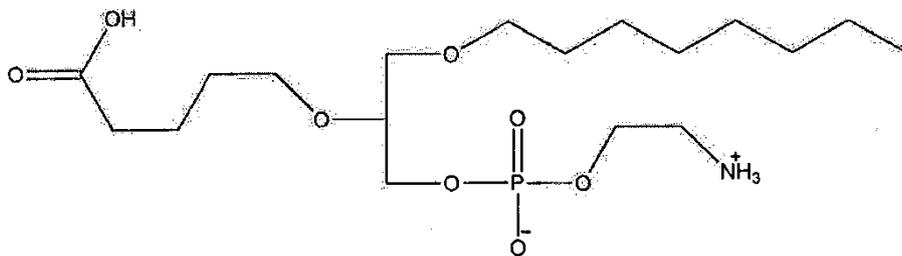
1-eicosanil-2-(4-carboxi)butil-glicero-3-fosfocolina (CI-219).

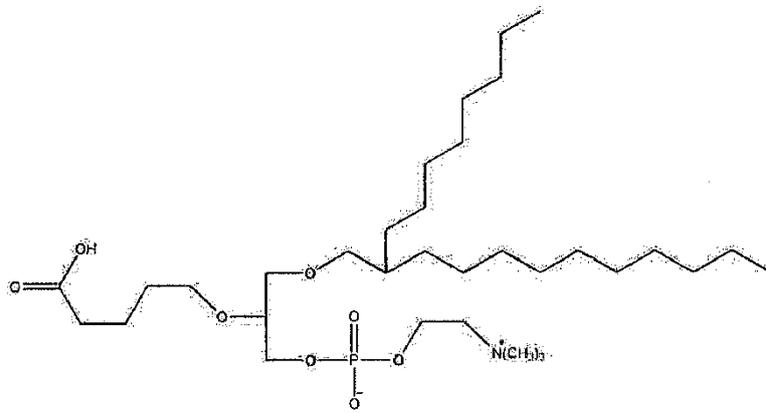
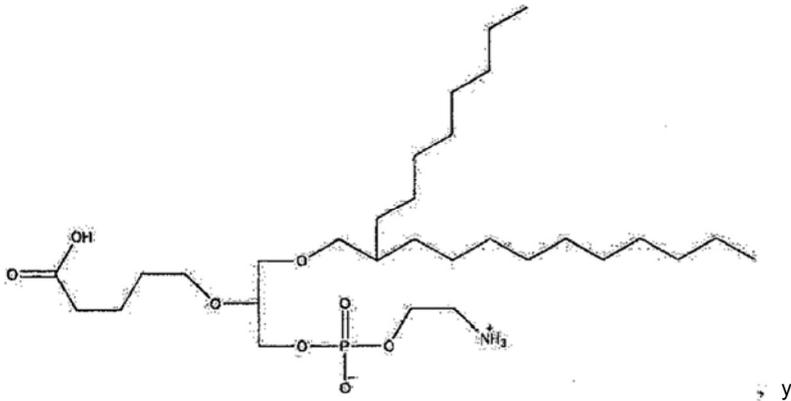
30 6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es seleccionado del grupo que consiste en:





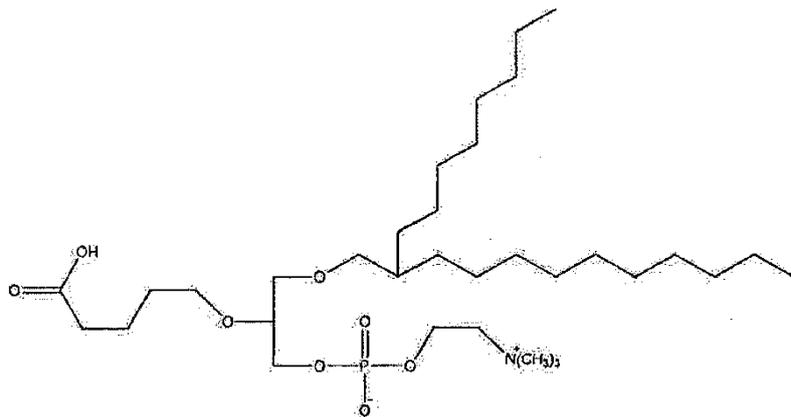
5



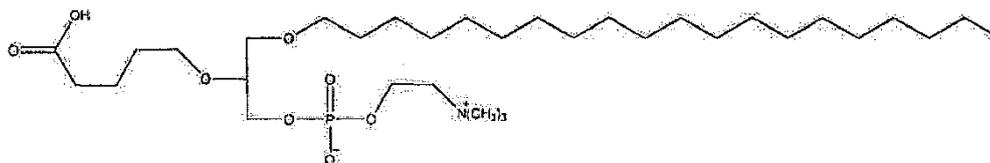


7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 de fórmula:

5



8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 de fórmula:



9. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8, para su uso en el tratamiento o la prevención de una inflamación asociada con un lípido oxidado endógeno.
- 5 10. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8, para su uso en un procedimiento para la disminución de un nivel de una citocina seleccionada del grupo que consiste en interleucina-12 e interleucina-23.
11. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en el que la disminución de un nivel de una citocina seleccionada del grupo que consiste de interleucina-12 e interleucina-23 es beneficioso.
- 10 12. Una composición farmacéutica, que comprende, como ingrediente activo, el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, envasada en un material de envasado e identificada en impresión, en o sobre dicho material de envasado, para su uso en el tratamiento o prevención de una inflamación asociada con un lípido oxidado endógeno.
- 15 14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, envasada en un material de envasado e identificada en la impresión, en o sobre dicho material de envasado, para la disminución de un nivel de una citocina seleccionada del grupo que consiste en interleucina-12 e interleucina-23.
15. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, envasada en un material de envasado e identificada en impresión, en o sobre dicho material de envasado, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en el que disminuir un nivel de una citocina seleccionada del grupo que consiste en interleucina-12 e interleucina-23 es beneficioso.
- 20 16. El compuesto o composición de la reivindicación 9 o la reivindicación 13, en el que dicha inflamación está asociada con una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en una enfermedad o trastorno inflamatorio idiopático, una enfermedad o trastorno inflamatorio crónico, una enfermedad o trastorno inflamatorio agudo, una enfermedad o trastorno autoinmunitario, enfermedad o trastorno infeccioso, una enfermedad o trastorno maligno inflamatorio, una enfermedad o trastorno inflamatorio relacionado con trasplante, una enfermedad o trastorno inflamatorio degenerativo, una enfermedad o trastorno asociado con hipersensibilidad, una enfermedad o trastorno cardiovascular inflamatorio, una enfermedad o trastorno cerebrovascular inflamatorio, una enfermedad o trastorno vascular periférico, una enfermedad o trastorno glandular inflamatorio, una enfermedad o trastorno gastrointestinal inflamatorio, una enfermedad o trastorno cutáneo inflamatorio, una enfermedad o trastorno hepático inflamatorio, una enfermedad o trastorno neurológico inflamatorio, una enfermedad o trastorno musculoesquelético inflamatorio, una enfermedad o trastorno renal inflamatorio, una enfermedad o trastorno reproductor inflamatorio, una enfermedad o trastorno sistémico inflamatorio, una enfermedad o trastorno del tejido conjuntivo inflamatorio, un tumor inflamatorio, necrosis, una enfermedad o trastorno inflamatorio relacionado con implantes, un proceso de envejecimiento inflamatorio, una enfermedad o trastorno de inmunodeficiencia y una enfermedad o trastorno pulmonar inflamatorio.
- 25
- 30
- 35

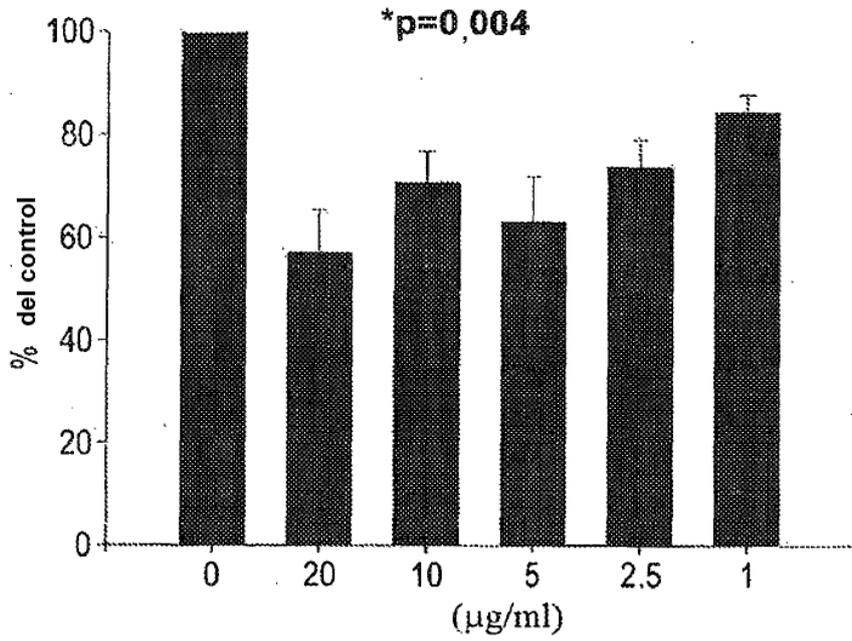


FIG. 1

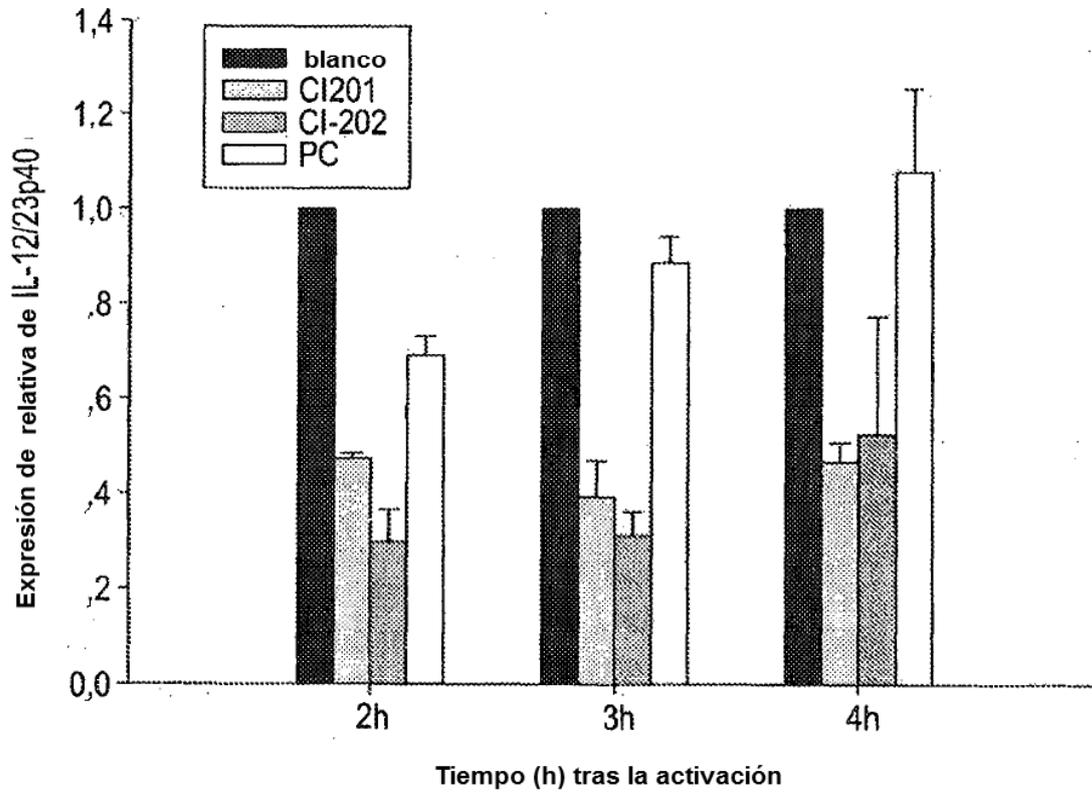


FIG. 2

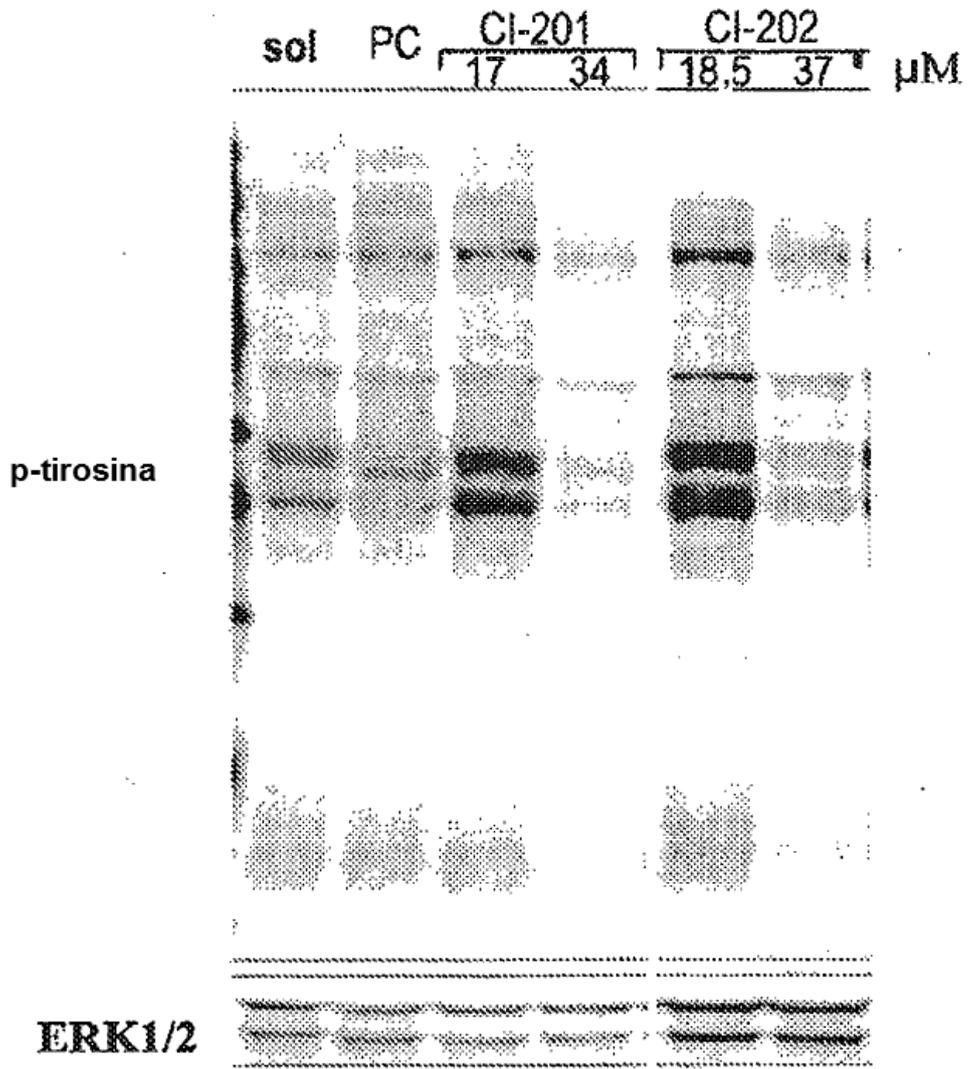


FIG. 3

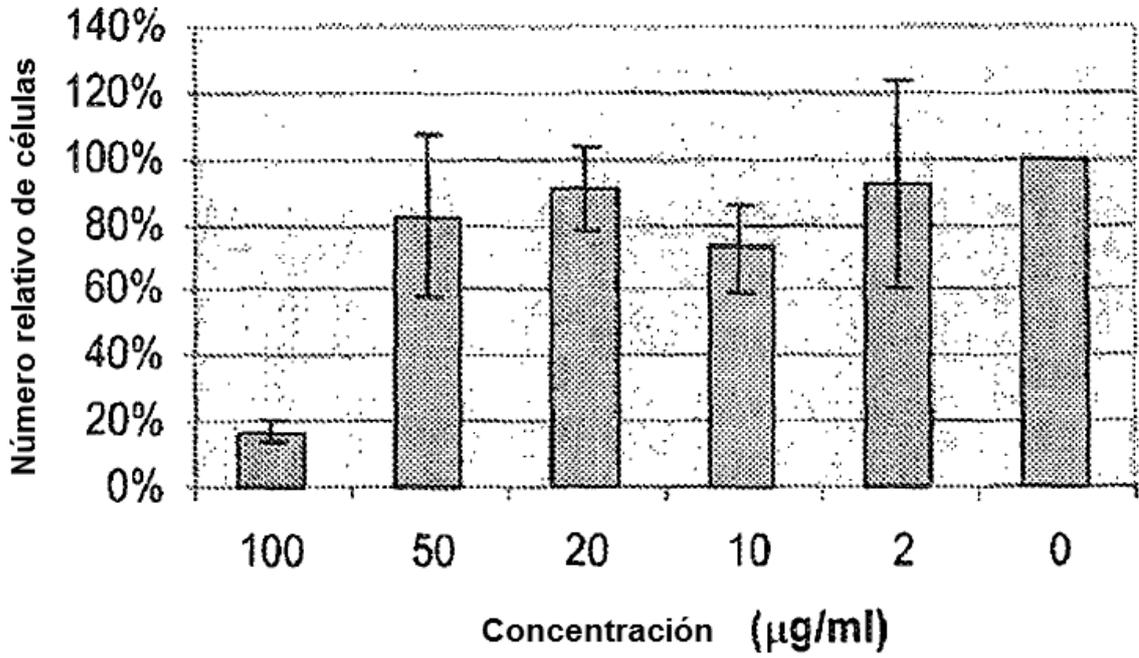


FIG. 4A

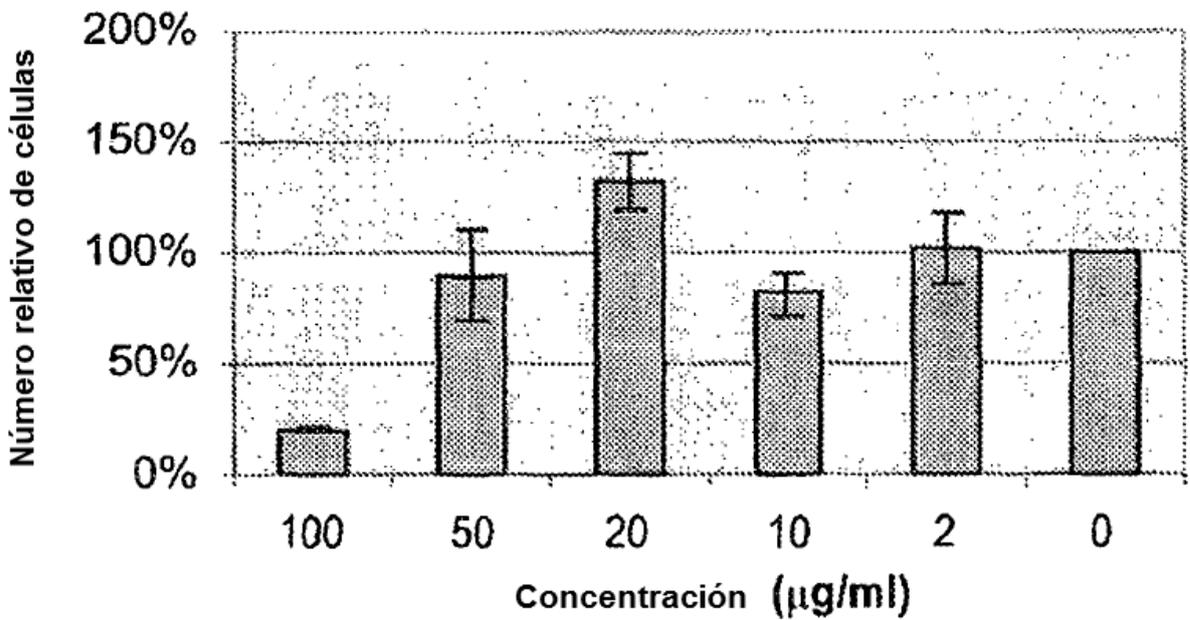


FIG. 4B

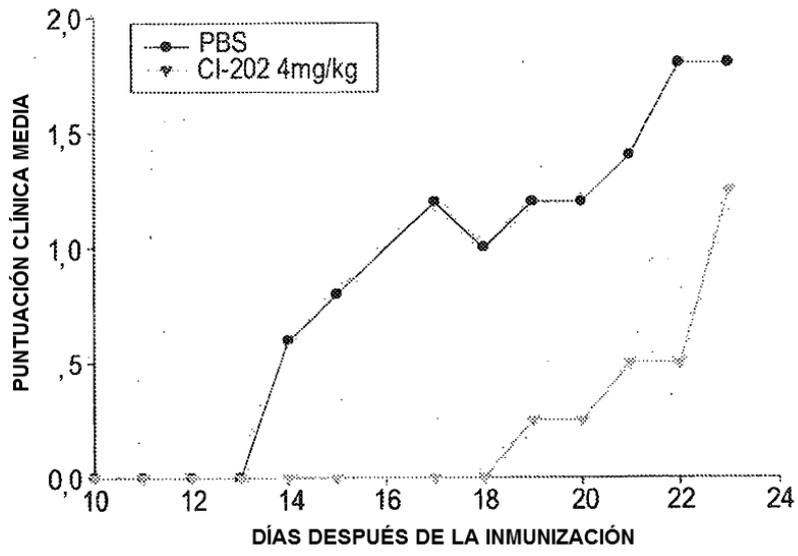


FIG. 5

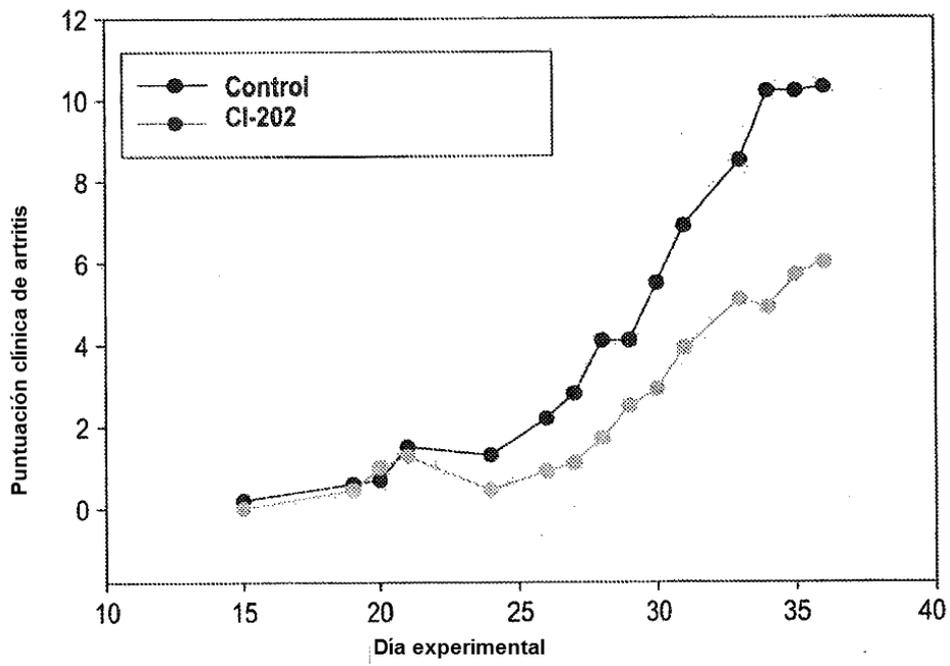


FIG. 6

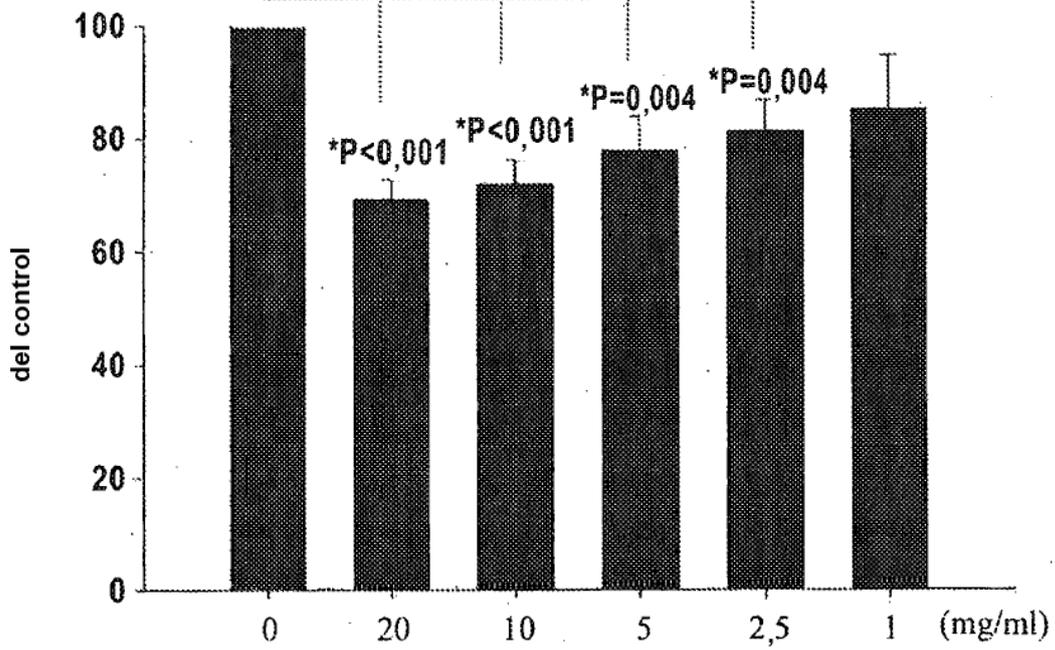


FIG. 7

Ph.Ch.	R-CI-201	S-CI-201	R-CI-203	rac-CI-203			
1,3	26	1,7	34	1,7	34		
					1,6	33	μM

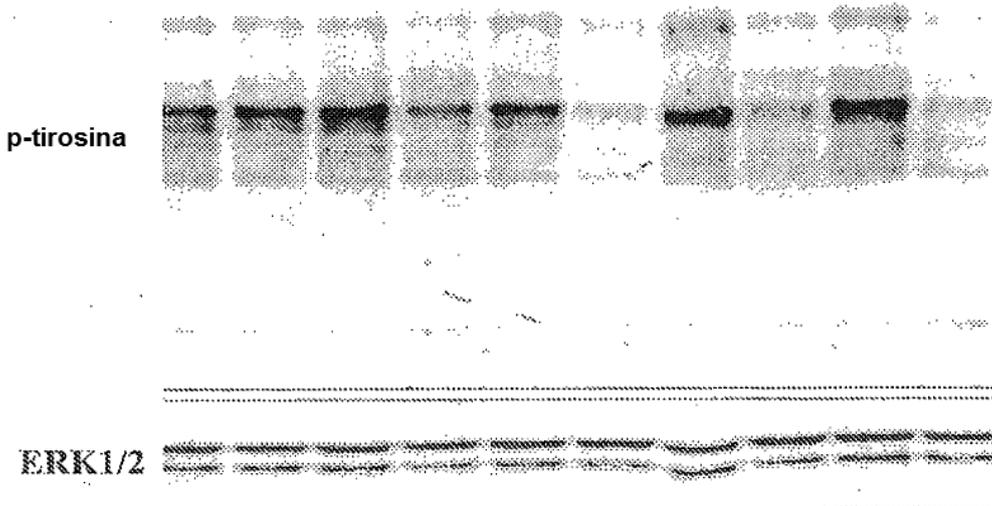


FIG. 8

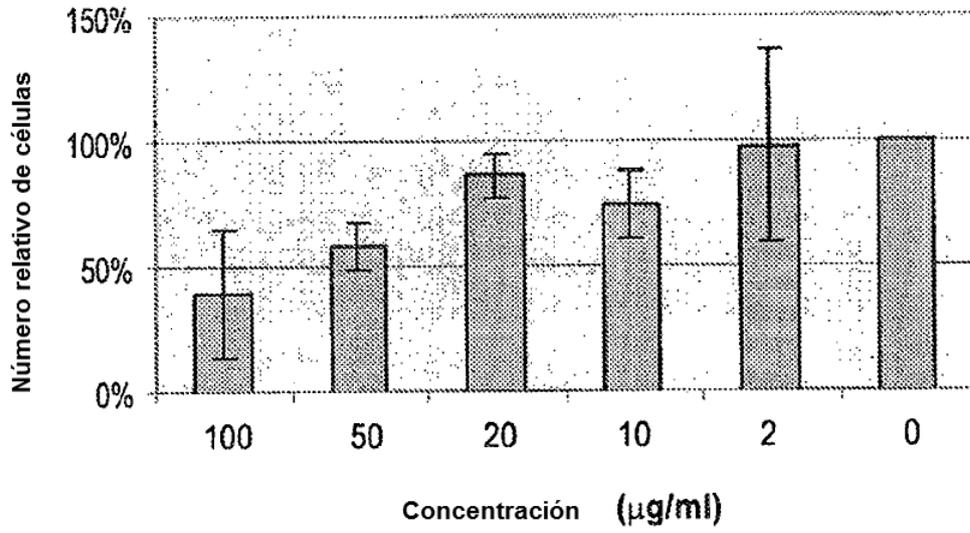


FIG. 9A

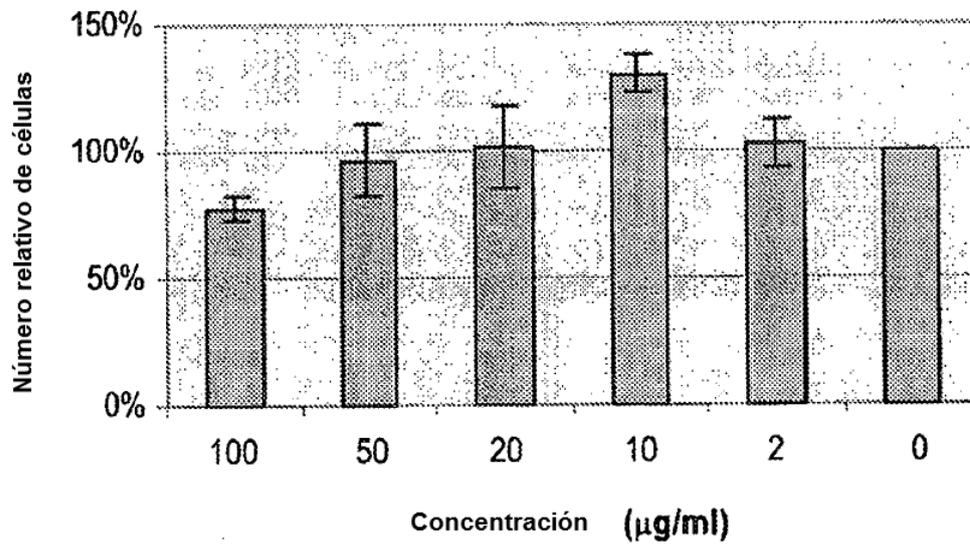


FIG. 9B

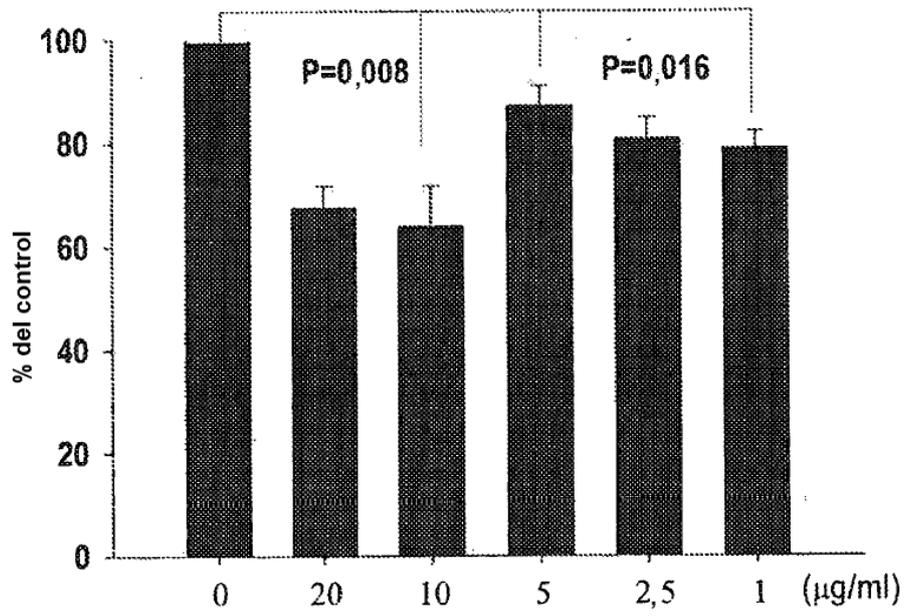


FIG. 10

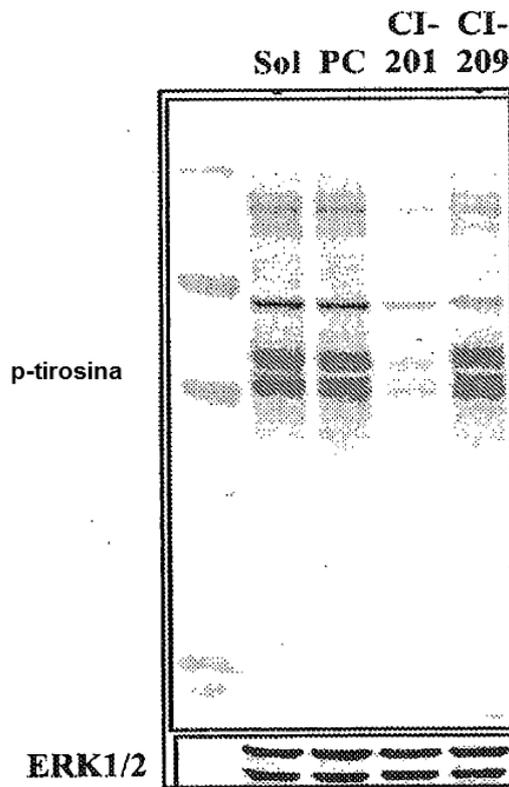


FIG. 11

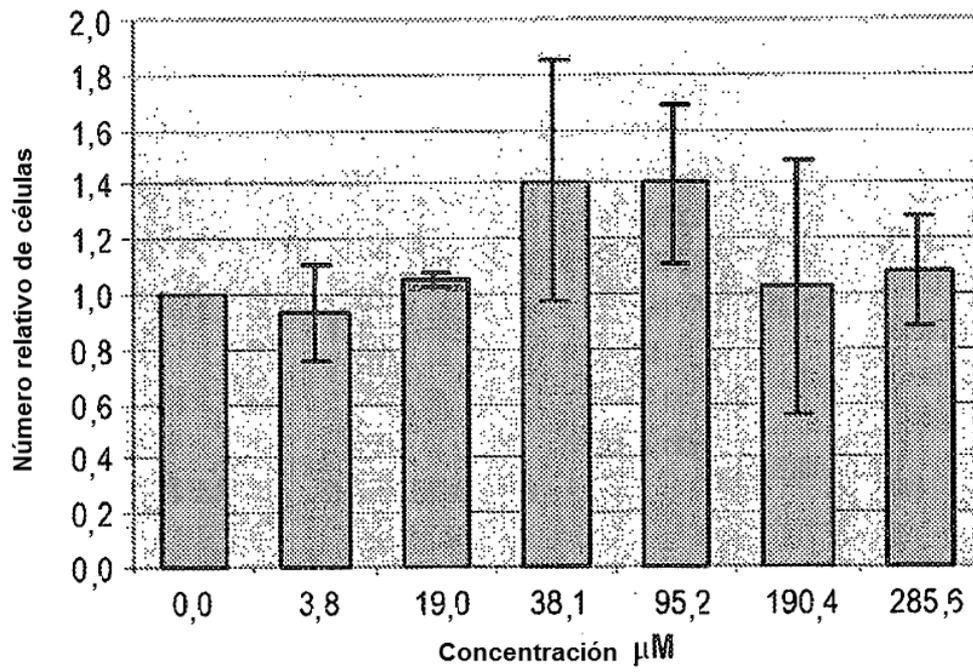


FIG. 12A

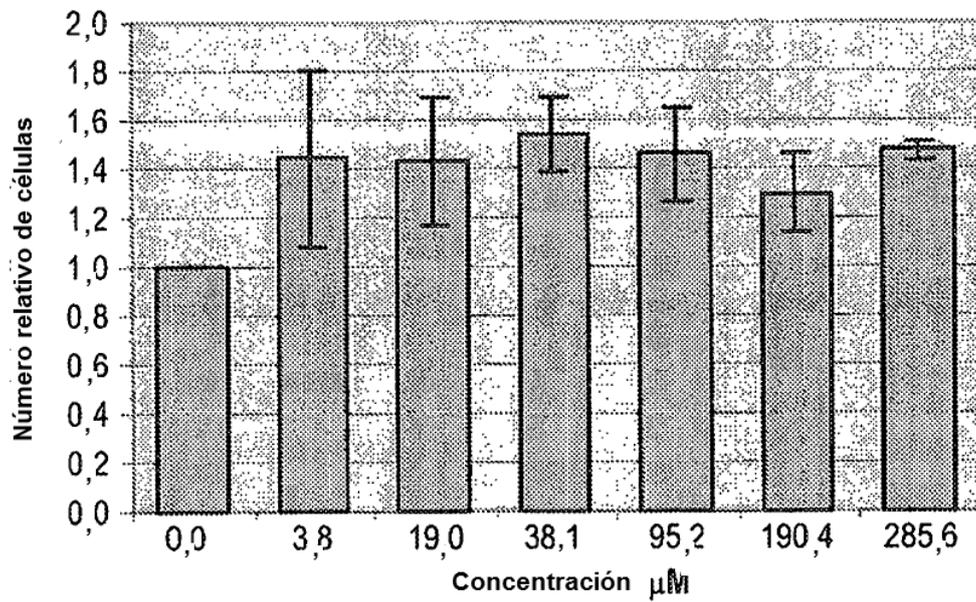


FIG. 12B

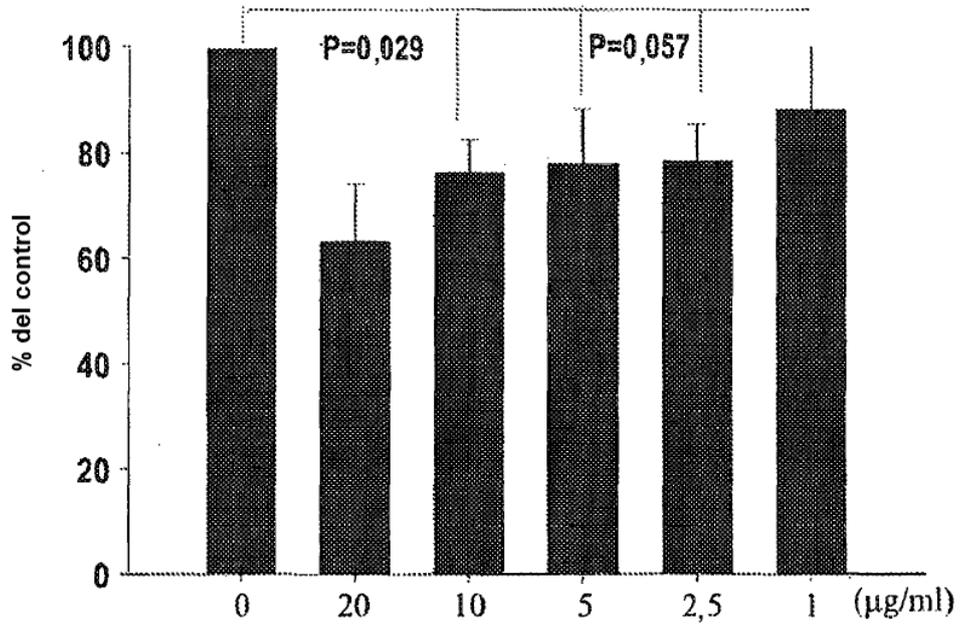


FIG. 13

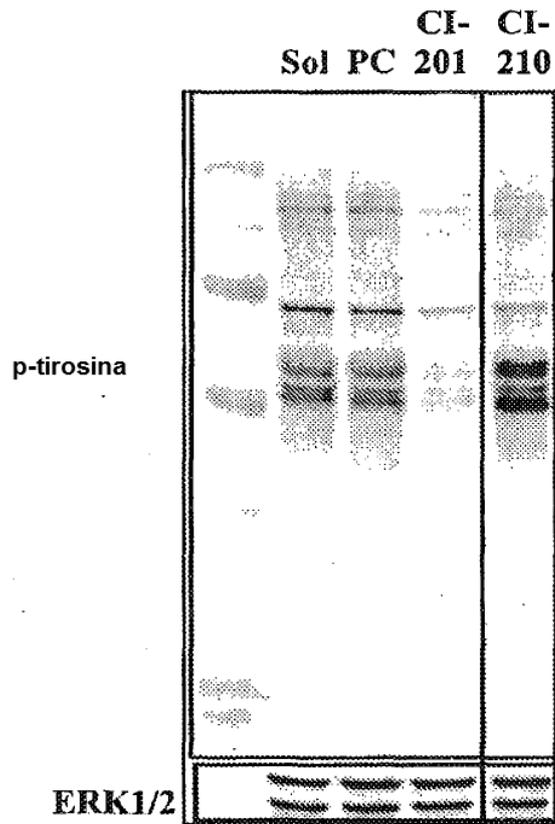


FIG. 14

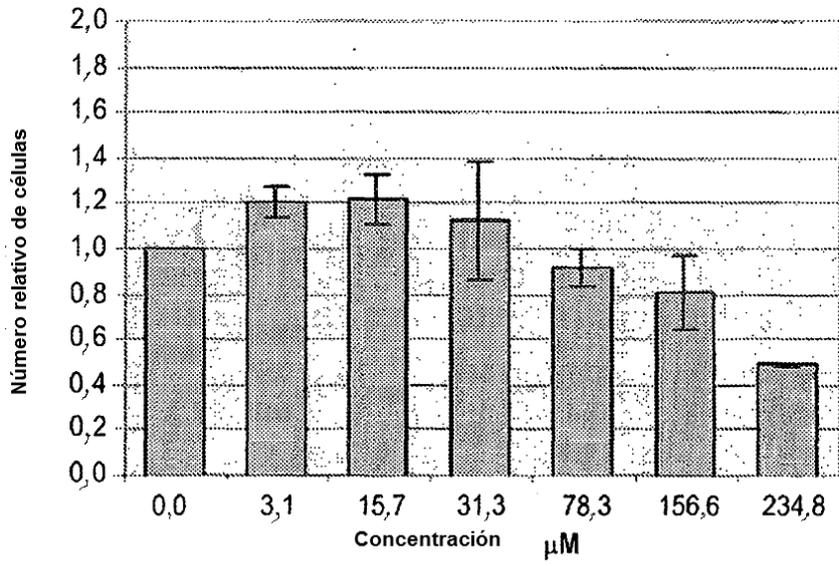


FIG. 15A

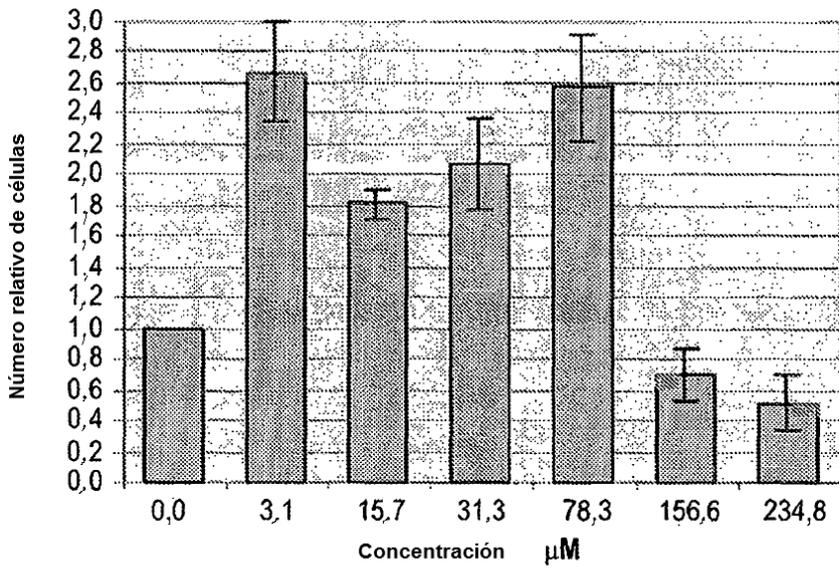


FIG. 15B

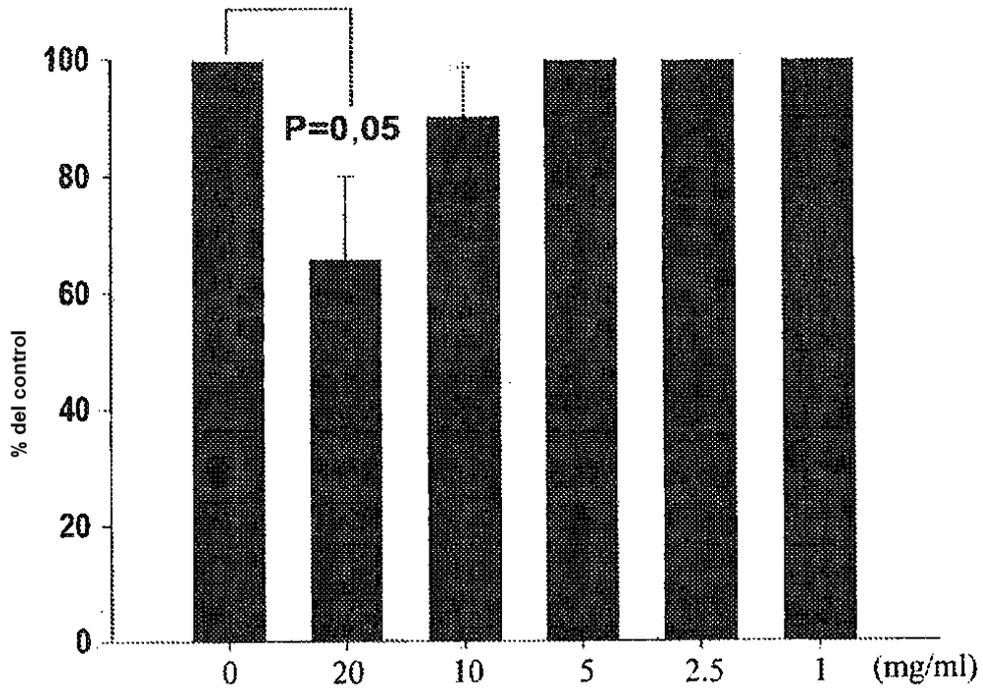


FIG. 16

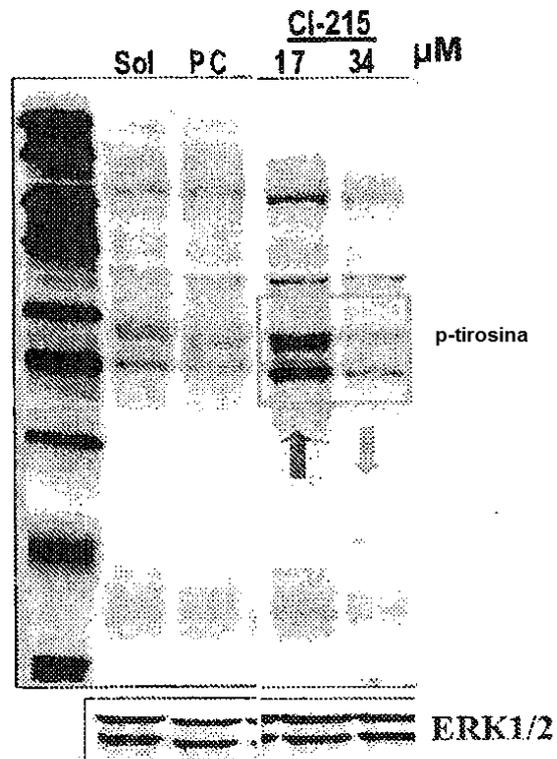


FIG. 17

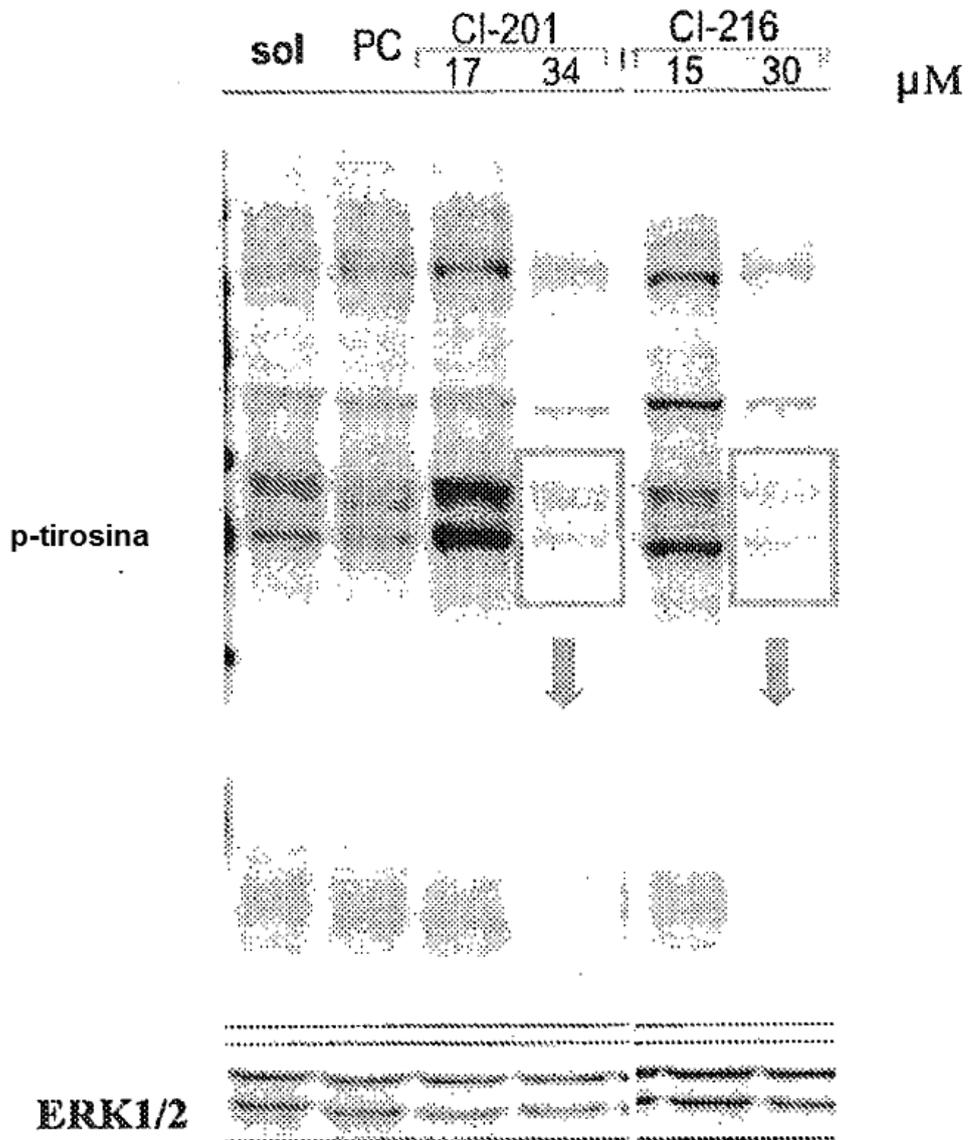


FIG. 18

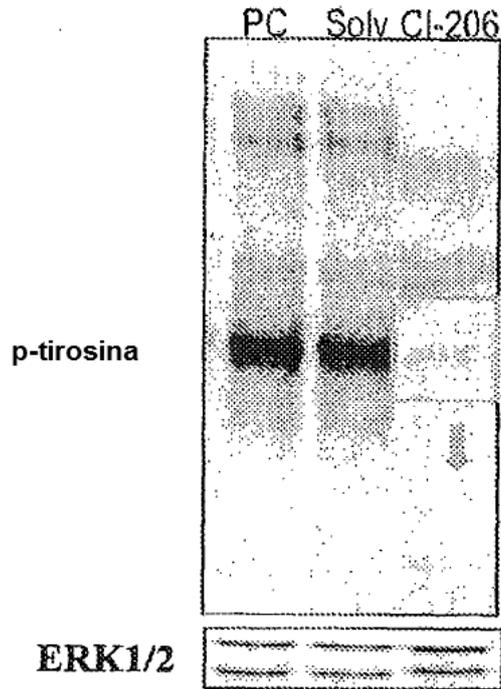


FIG. 19

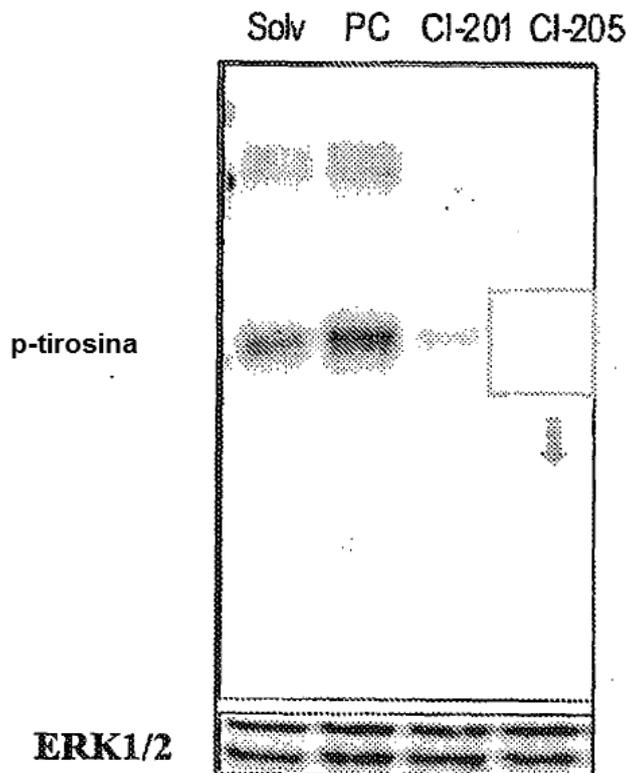


FIG. 20

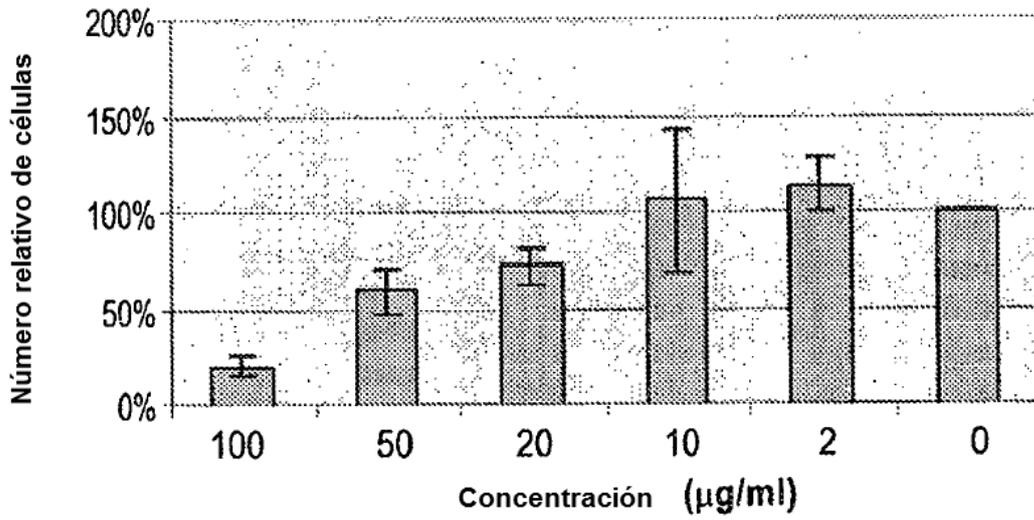


FIG. 21A

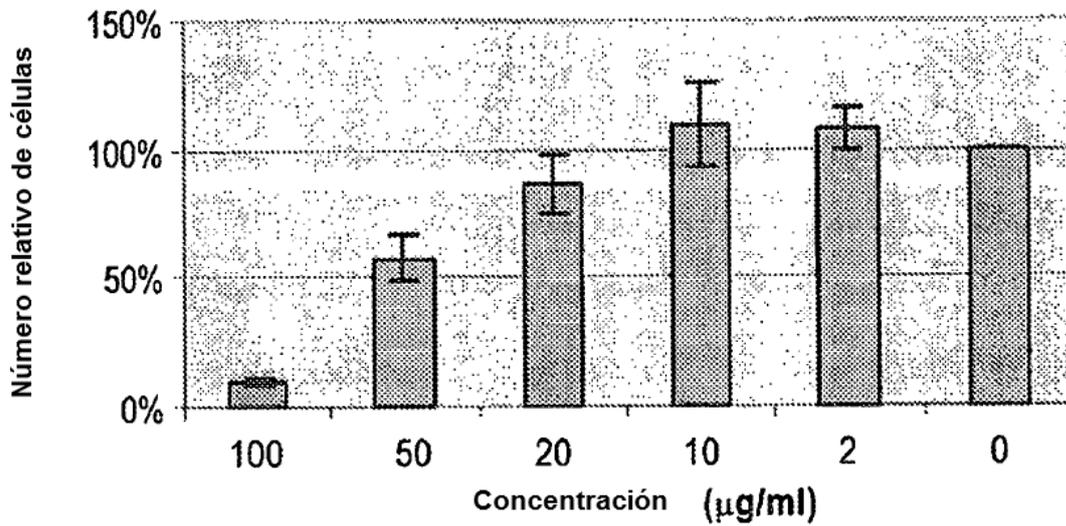


FIG. 21B

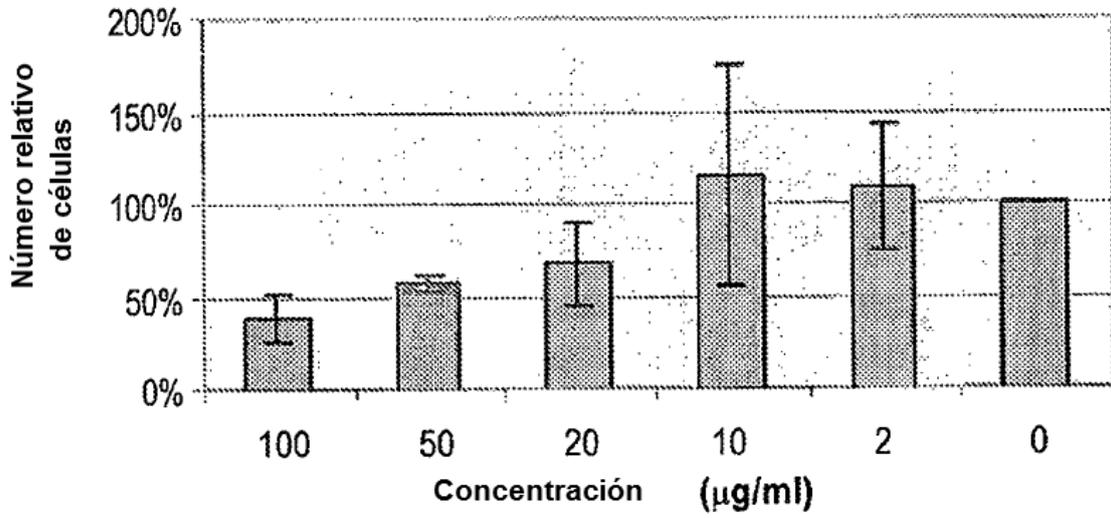


FIG. 22A

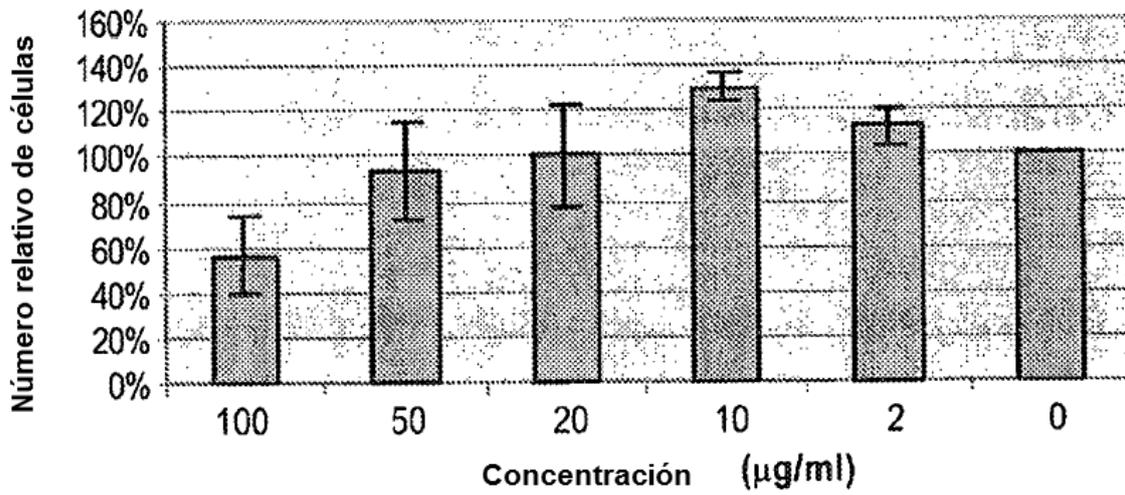


FIG. 22B

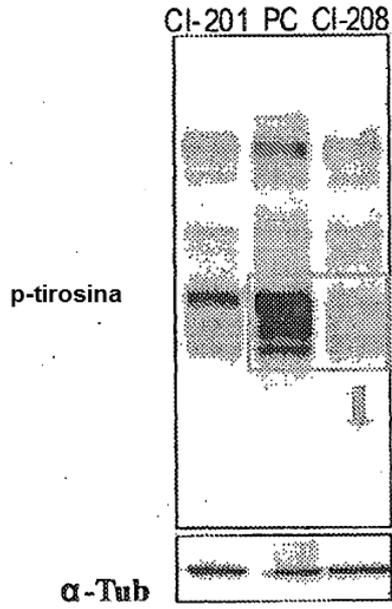


FIG. 23

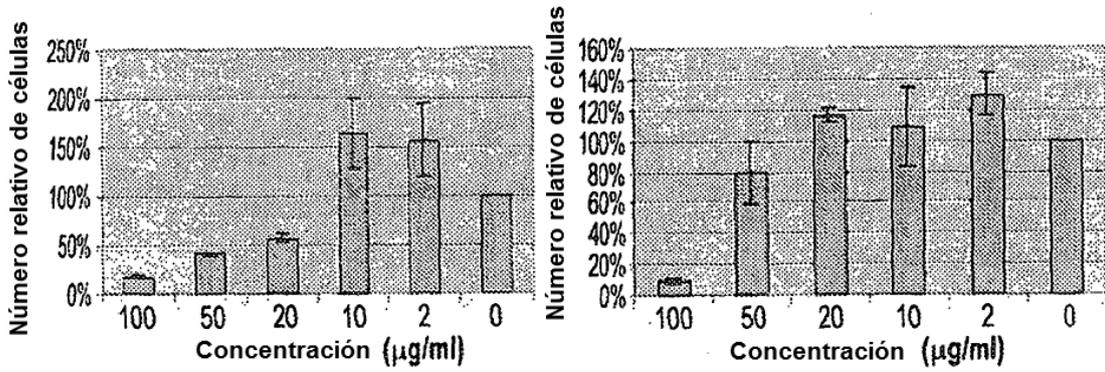


FIG. 24A

FIG. 24B

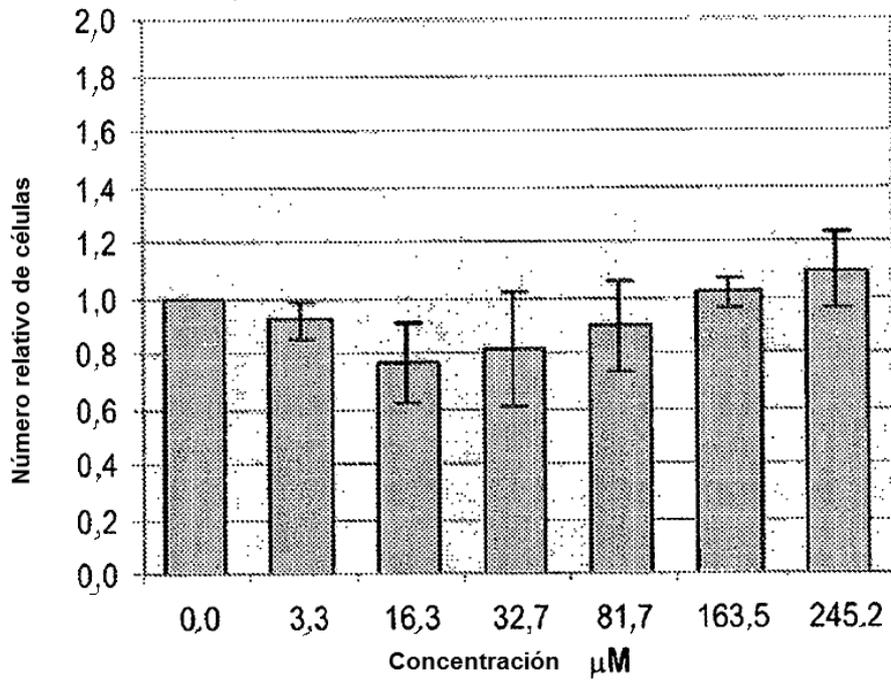


FIG. 25A

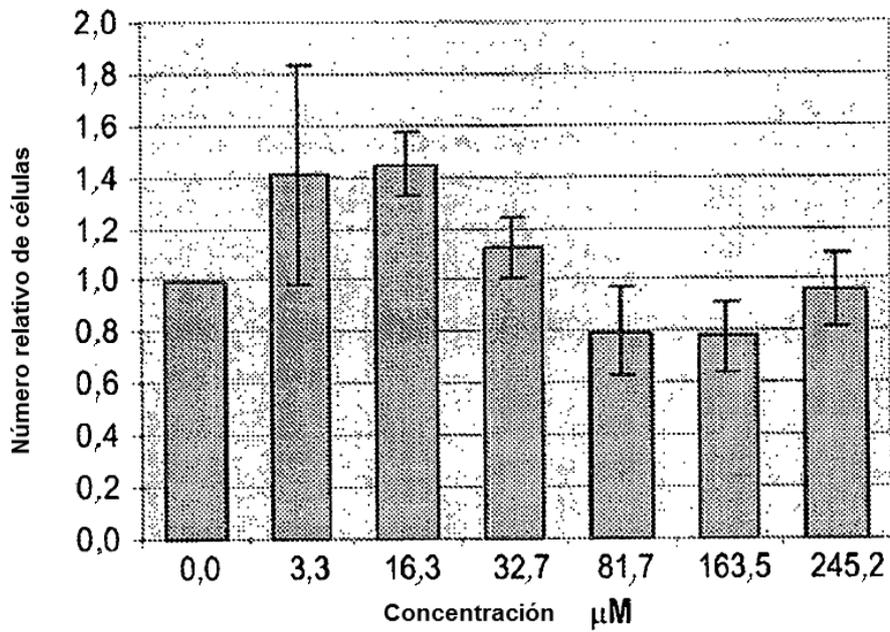


FIG. 25B

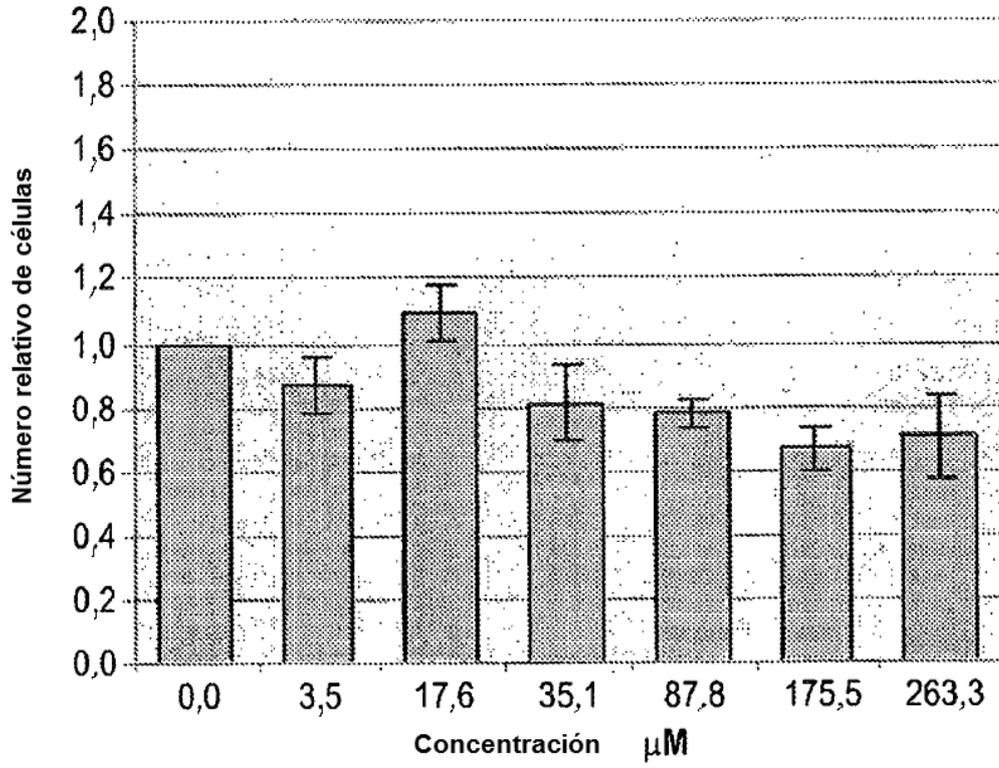


FIG. 26A

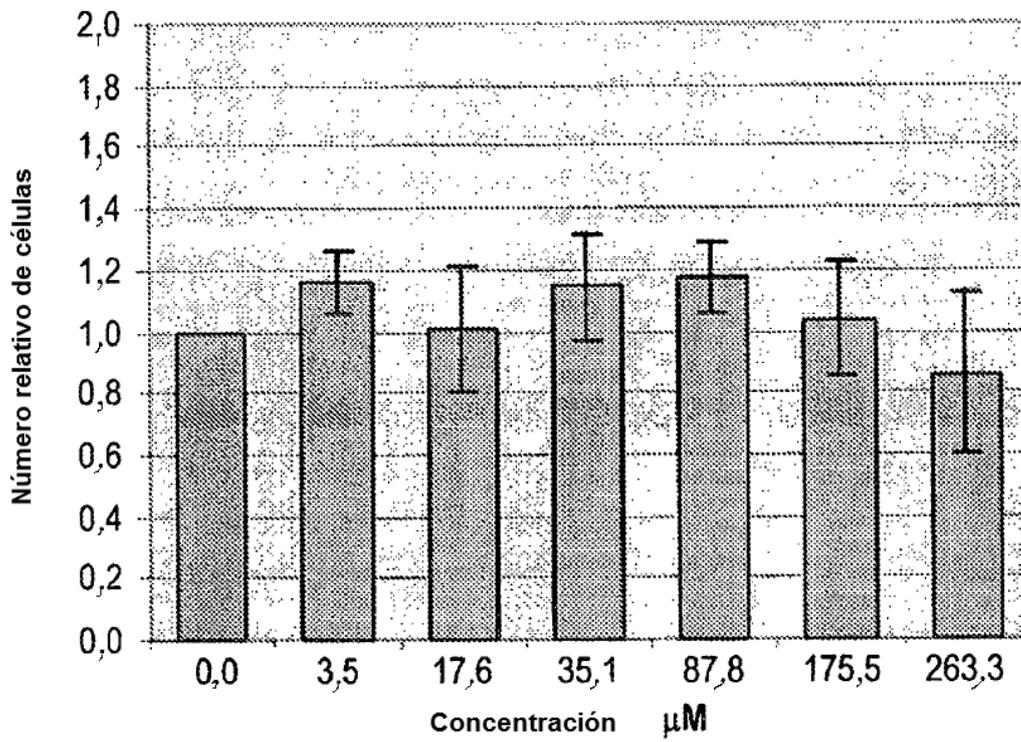


FIG. 26B

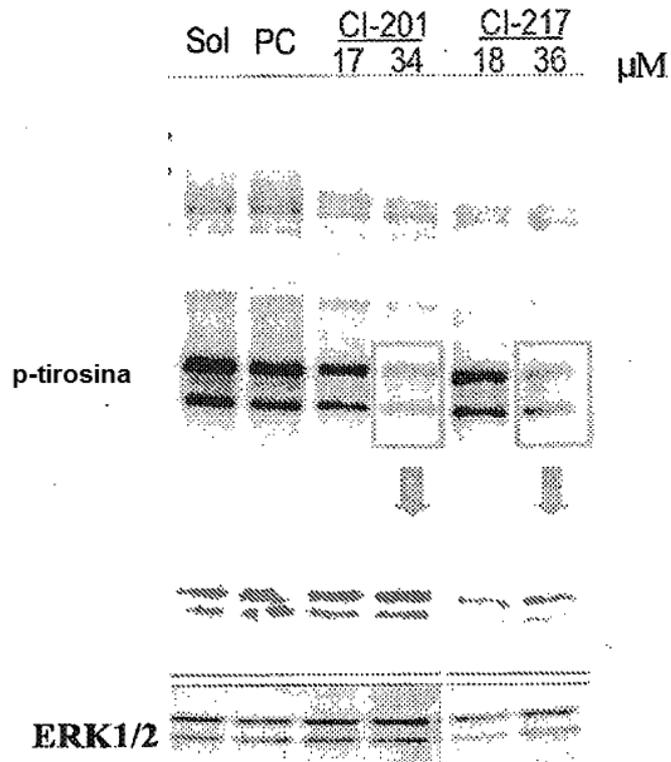


FIG. 27

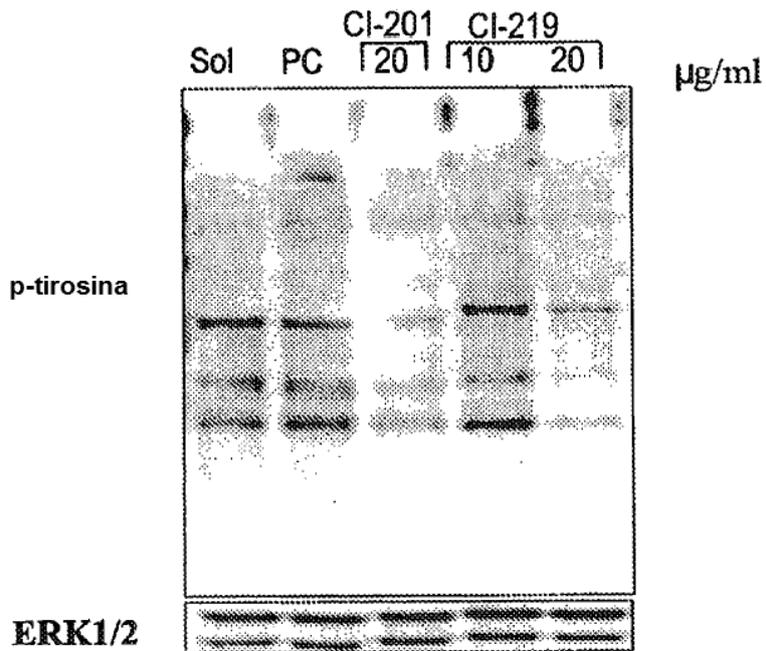


FIG. 28

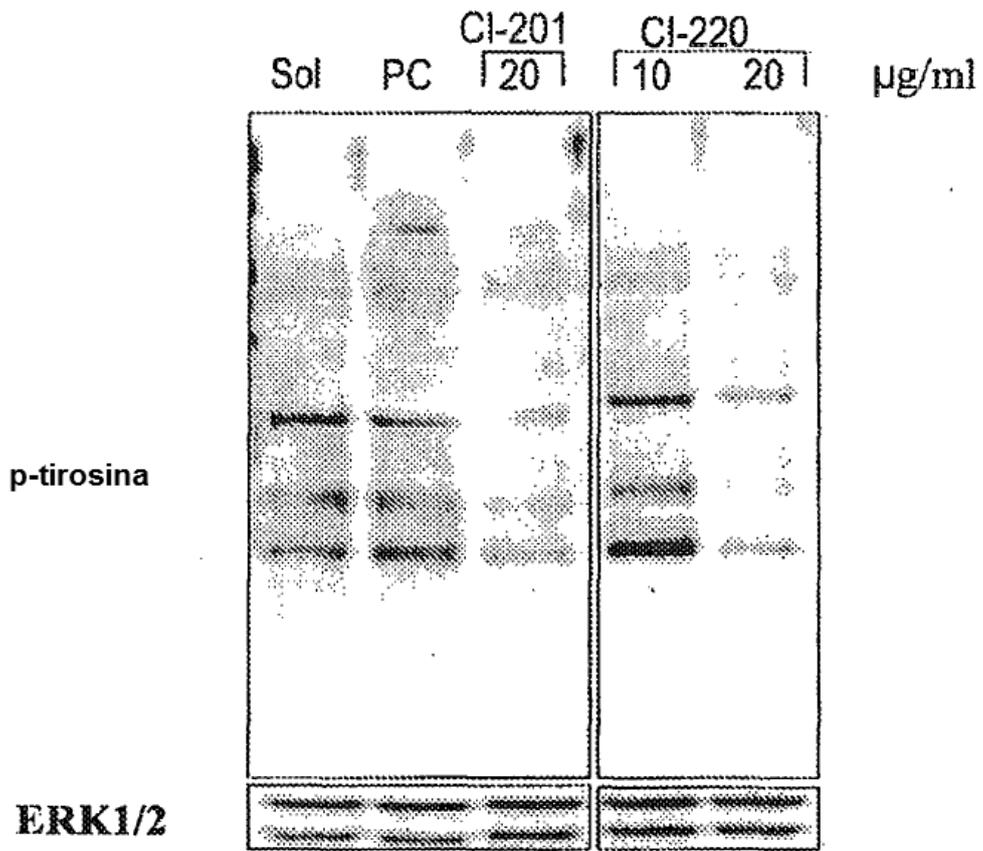


FIG. 29

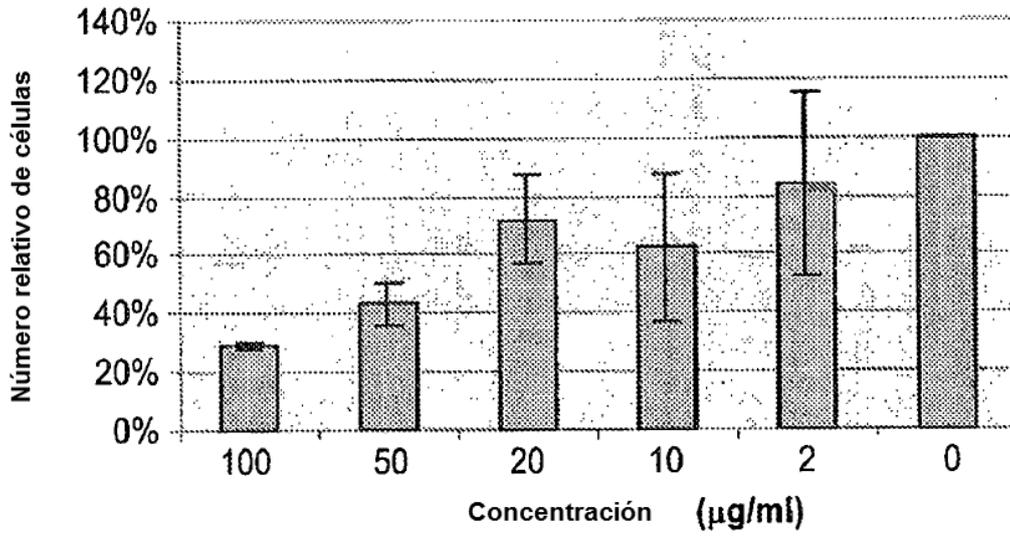


FIG. 30A

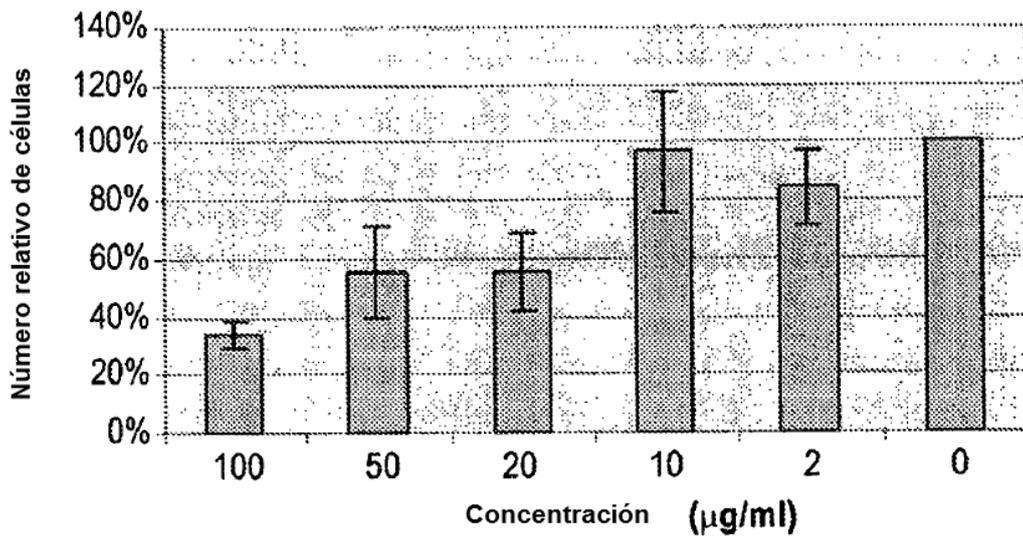


FIG. 30B

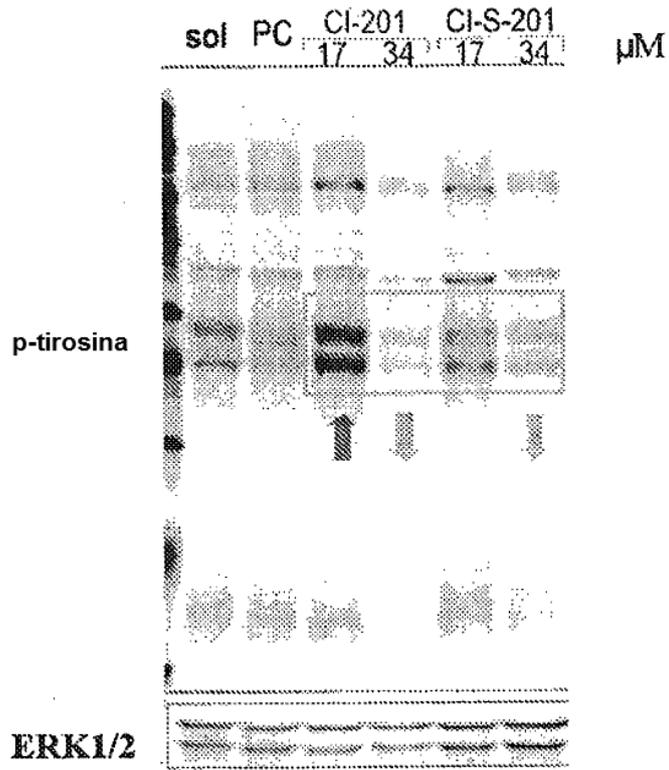


FIG. 31

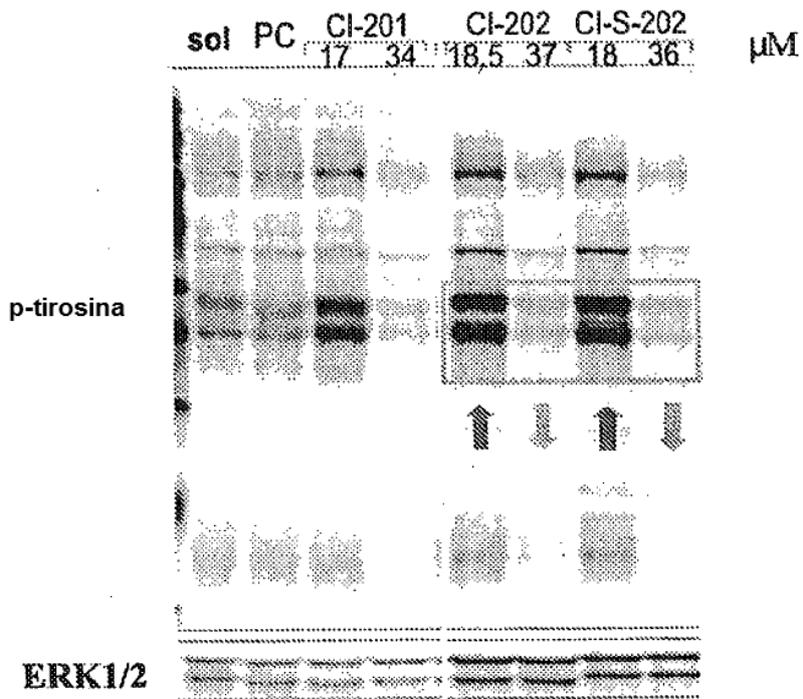


FIG. 32

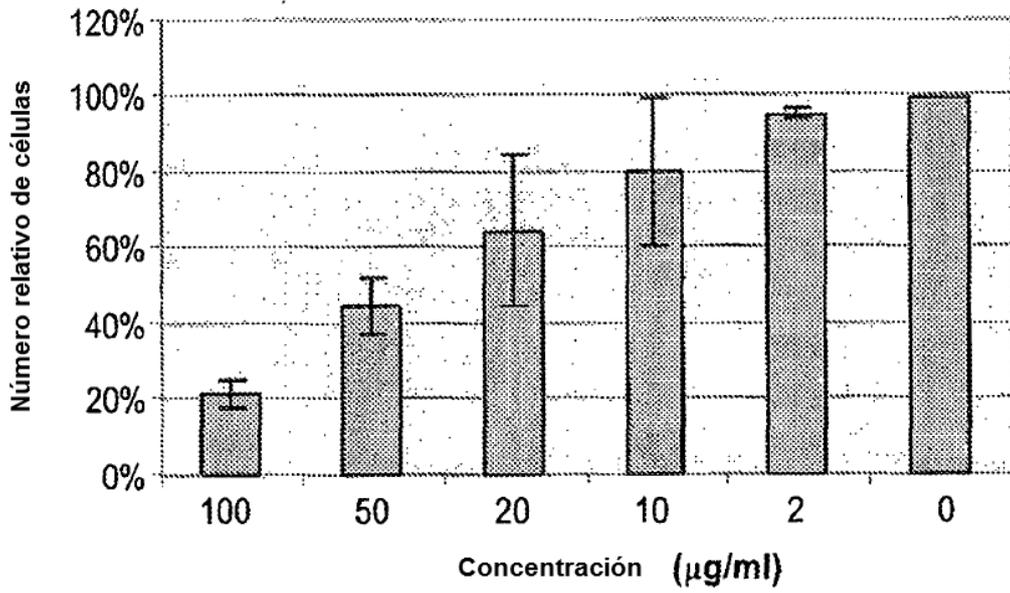


FIG. 33A

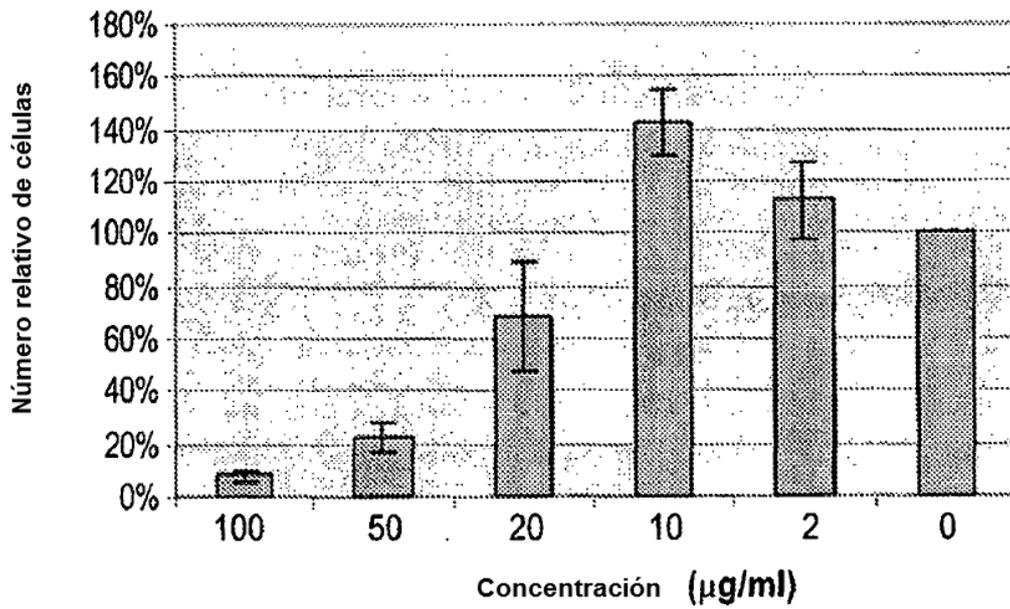


FIG. 33B

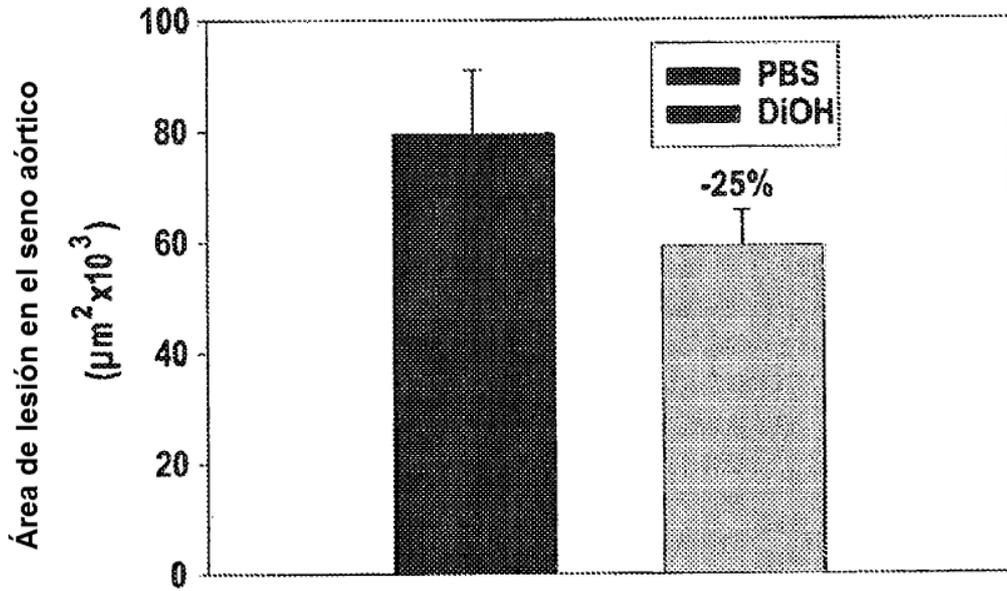


FIG. 34

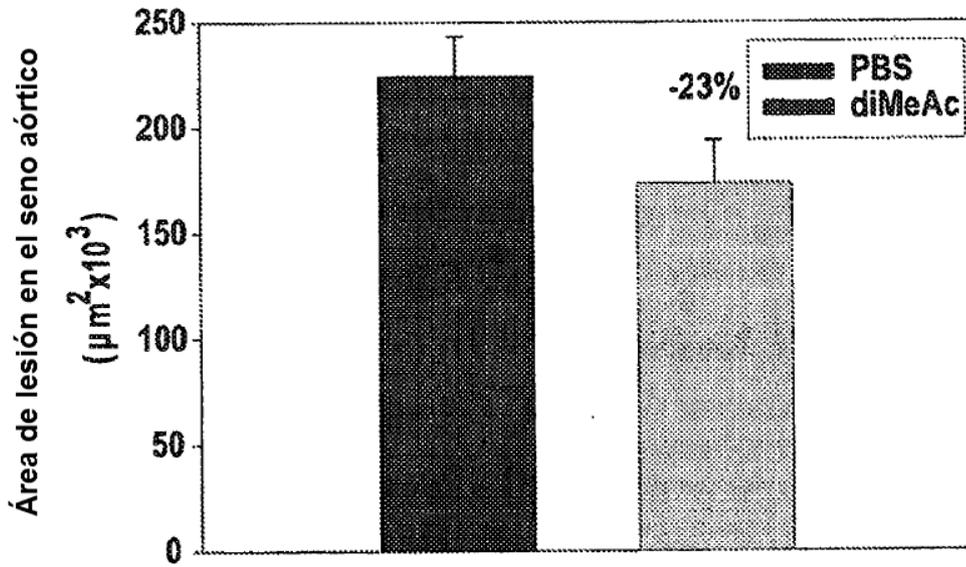


FIG. 35

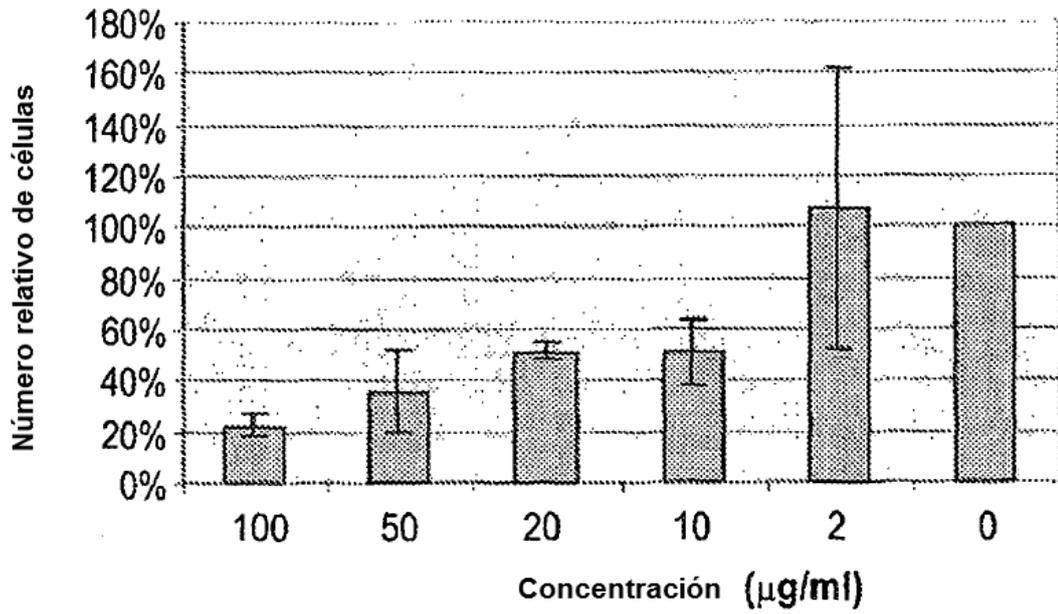


FIG. 36A

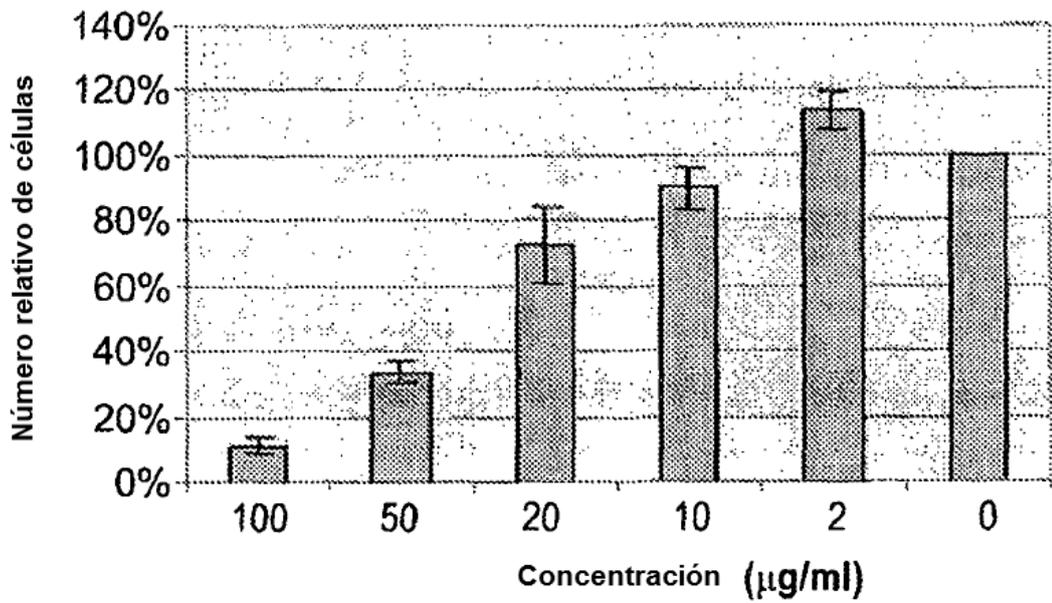


FIG. 36B

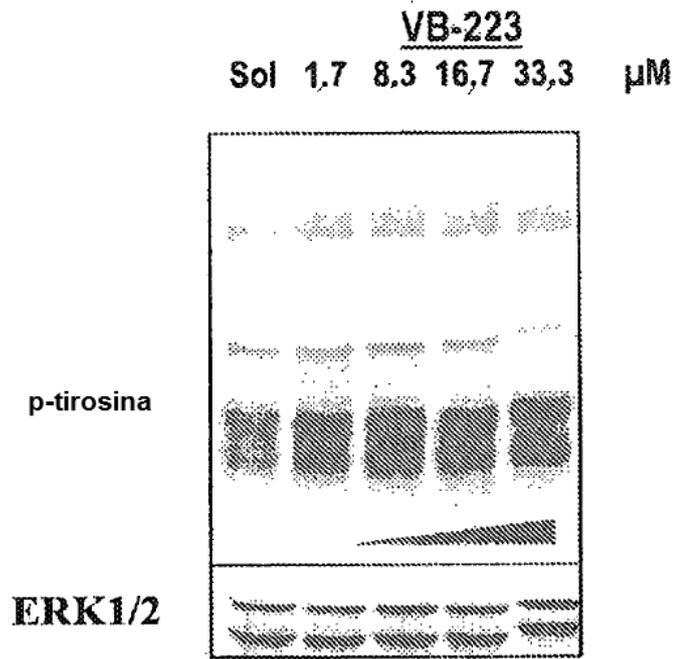


FIG. 37

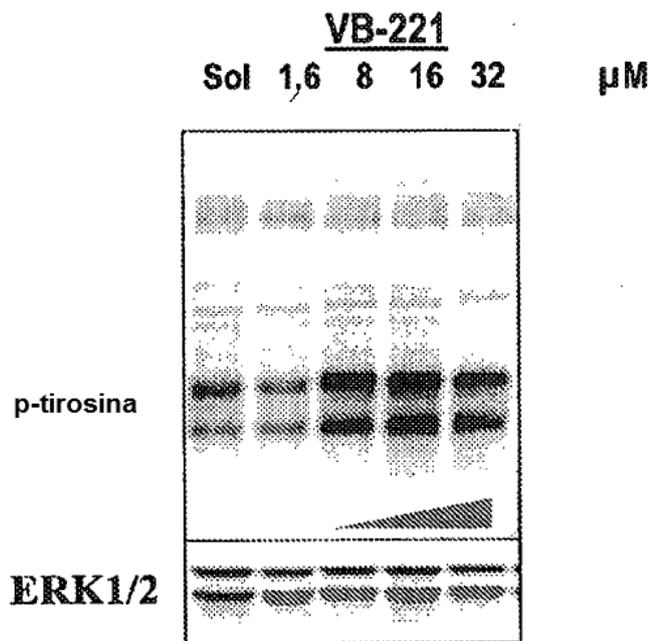


FIG. 38

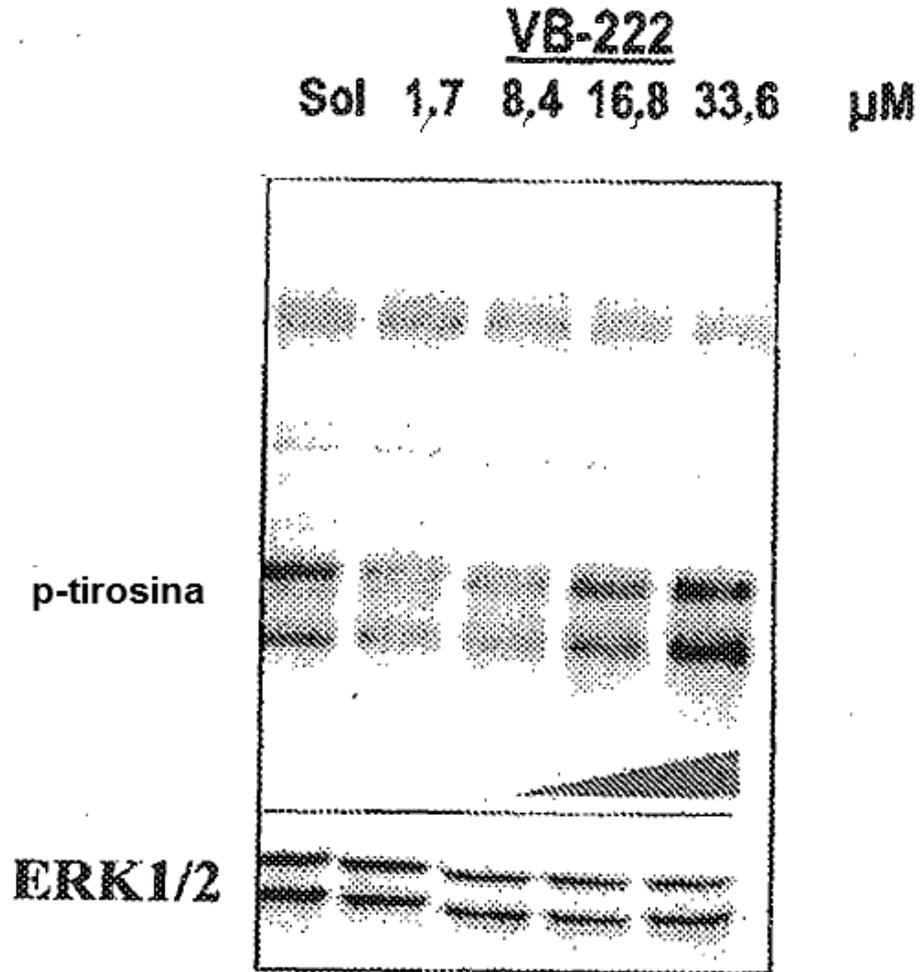


FIG. 39