

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 903**

51 Int. Cl.:

<b>C07C 233/18</b>	(2006.01)	<b>C07C 69/587</b>	(2006.01)
<b>C07C 233/49</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/165</b>	(2006.01)
<b>C07C 233/55</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/17</b>	(2006.01)
<b>C07C 235/60</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/232</b>	(2006.01)
<b>C07C 237/22</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/235</b>	(2006.01)
<b>C07C 271/28</b>	(2006.01)	<b>A61P 29/00</b>	(2006.01)
<b>C07C 275/42</b>	(2006.01)		
<b>C07D 295/192</b>	(2006.01)		
<b>C07C 69/90</b>	(2006.01)		
<b>C07C 69/94</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2009 E 14176625 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2813486**

54 Título: **Salicilatos acetilados de ácidos grasos y sus usos**

30 Prioridad:

**08.07.2008 US 78983 P**  
**10.10.2008 US 104364 P**  
**10.10.2008 US 104363 P**  
**10.10.2008 US 104366 P**  
**30.01.2009 US 148658 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.02.2018**

73 Titular/es:

**CATABASIS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**  
**19 Blackstone Street**  
**Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**MILNE, C. JILL;**  
**JIROUSEK, R. MICHAEL;**  
**BEMIS, E. JEAN y**  
**SMITH, J. JESSE**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 656 903 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

Salicilatos acetilados de ácidos grasos y sus usos

5 **2. Campo de la invención**

La invención se refiere a derivados de salicilatos acetilados de ácidos grasos ("Compuestos de la invención"); composiciones que comprenden una cantidad eficaz de un derivado de salicilato acetilado de ácido graso ("Compuesto de la invención"); y compuestos para su uso en métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria que comprende la administración de una cantidad eficaz de un Compuesto de la invención.

10 **3. Antecedentes de la invención**

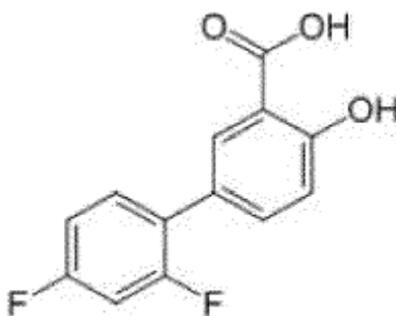
Las vías inflamatorias son la base de la fisiopatología clave de muchas enfermedades crónicas y agudas. La inflamación no resuelta es importante en muchos trastornos crónicos, incluyendo, pero sin limitación, enfermedad cardíaca, aterosclerosis, diabetes de tipo 1 y tipo 2, dislipidemia, asma, artritis (incluyendo artritis reumatoide (AR)), artrosis, fibrosis quística, enfermedad de desgaste muscular (incluyendo la distrofia muscular), dolor, resistencia a la insulina, estrés oxidativo, enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (incluyendo colitis y enfermedad de Crohn) y enfermedad neurodegenerativa (incluyendo la enfermedad de Alzheimer).

En años más recientes, el estudio de la inflamación ha profundizado en la célula. Se han identificado moléculas de señalización celular que modulan la expresión de genes que controlan la respuesta inflamatoria, incluyendo la respuesta proinflamatoria y la respuesta antiinflamatoria. Uno de los reguladores centrales que equilibran los genes que codifican los factores antiinflamatorios y proinflamatorios es el Factor Nuclear Kappa Beta (NFκB). El NFκB es una familia de factores de transcripción que incluyen p50 (NFκB1), p52 (NFκB2), p65 (RelA), c-Rel y RelB. Estos factores nucleares son mantenidos como complejos o pares diméricos en un estado inactivo en el citoplasma como un complejo por un factor IκB inhibidor de NFκB. Las proteínas IκB incluyen IκBα, IκBβ e IκBε, pero también existen otras. El complejo NFκB inactivo es liberado del citoplasma mediante la fosforilación de la proteína IκB a través de quinasas tales como IKKβ. Las quinasas que regulan la actividad de NFκB son activadas por respuestas inmunes o tensiones celulares. Por lo tanto, en el complejo citoplásmico de NFκB tal como IκB/p65/p50, IκB se fosforila a través de quinasas tales como IKKβ y libera pares diméricos de NFκB hacia el núcleo tales como p65/p50. En el núcleo, NFκB regula la expresión genética de factores proinflamatorios tales como las citocinas como TNFα, IL-6 e IL-1β, además de enzimas tales como la ciclooxigenasa-2 (COX-2), una de las enzimas que convierte el ácido araquidónico en prostaglandina H2 (PGH2). Estos factores inducen la inflamación en varios tejidos. Además, dependiendo del contexto celular y de los factores nucleares de NFκB liberados, NFκB puede causar la expresión de genes antiinflamatorios.

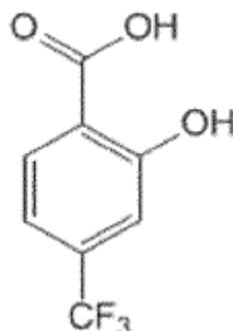
Los salicilatos y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) pueden influir en la vía de NFκB, permitiendo que las personas obtengan alivio y reduzcan la inflamación a partir de dichos fármacos. Los inhibidores aspirina y COX actúan para reducir la inflamación bloqueando de forma reversible o irreversible el acceso al canal hidrófobo a través de la acetilación de serina 530 (COX-1) o Serina 516 (COX-2). Para algunos AINE selectivos con un grupo carboxilato, hay una interacción significativa entre las cargas con Arginina 120. Esta unión o interacción bloquea la enzima ciclooxigenasa que forma PGH2. El salicilato no inhibe de manera irreversible la ciclooxigenasa, porque carece de la capacidad de acilar la enzima COX y tiene poca, o ninguna, acción inhibitoria directa sobre la enzima COX a concentraciones que son relevantes *in vivo*. Se ha demostrado que el salicilato inhibe la actividad de IKKβ y, por lo tanto, inhibe NFκB, lo que conduce a una expresión reducida de COX-2 en un estado inflamatorio en el que se ha inducido la expresión de COX-2.

Otro ejemplo de un AINE es diflunisal:

50



Otro ejemplo más de un AINE es triflusal:



Diflunisal y Triflusal se usan comúnmente para aliviar el dolor, la sensibilidad, la hinchazón y la rigidez causados por la artrosis y la artritis reumatoide, y para aliviar la molestia leve a moderada en general.

5

Los problemas surgen en la terapia con salicilato, debido a los efectos secundarios, lo que significa que se deben desarrollar y buscar formas alternativas para reducir la actividad de NFκB. Algunos salicilatos, cuando se administran por vía oral, tienen la desventaja clave de causar úlceras gástricas a largo plazo en la administración crónica. Además, los salicilatos pueden ser potentes irritantes, lo que se cree que es debido a la alta concentración local de estos inhibidores de COX. Muchos de los efectos no deseados de la aspirina están causados por la inhibición inapropiada de la vía de COX o NFκB. Aunque los AINE inhiben la COX y son eficaces agentes antiinflamatorios, los efectos adversos limitan su uso.

10

Otros agentes antiinflamatorios que modulan la actividad de NFκB son los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (AGPI). Los ácidos grasos omega-3 también reducen la IL-1, que es un activador de la NFκB, y aumentan las citocinas antiinflamatorias tales como la IL-10, y las adipocinas tales como la adiponectina. El pescado azul de agua fría tal como el salmón, la trucha, el arenque y el atún son fuente de ácidos grasos omega-3 marinos en la dieta, siendo el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) los ácidos grasos omega-3 marinos clave. Las verduras de hoja verde y ciertas judías, nueces o aceites tales como la soja, las nueces, la linaza y el aceite de colza, también son fuentes ricas en la dieta de ácidos grasos omega-3.

15

20

Los efectos antiinflamatorios de los ácidos grasos omega-3 se han estudiado ampliamente con resultados positivos para diversas enfermedades inflamatorias crónicas. El TNFα y la IL-6 son citocinas que aumentan drásticamente durante los procesos inflamatorios y se miden comúnmente como marcadores de la inflamación. Se ha demostrado que una mayor ingesta de AGPI omega-3 se asocia con gran fuerza a niveles más bajos de TNFα e IL-6 en circulación (Ferrucci *et al.*, 2006). Además, una mayor ingesta de AGPI omega-3 también se ha asociado a niveles elevados de marcadores de antiinflamación, incluyendo la citocina IL-10 antiinflamatoria bien caracterizada (Ferrucci *et al.*, 2006). Los modelos animales de colitis indican que el aceite de pescado disminuye el daño y la inflamación del colon, la pérdida de peso y la mortalidad. Los suplementos de aceite de pescado en pacientes con EII han demostrado que modulan los niveles de mediadores inflamatorios y pueden ser beneficiosos para la inducción y el mantenimiento de la remisión en la colitis ulcerosa.

25

30

En el tratamiento de la AR y otras afecciones inflamatorias, los efectos secundarios limitan el uso de los AINE. Un ensayo clínico demostró que el 39 por ciento de los pacientes con AR suplementada con aceite de hígado de bacalao pudieron reducir su requerimiento diario de AINE en más del 30 por ciento. Los ácidos grasos omega-3 se han usado para reducir el riesgo de muerte súbita causada por arritmias cardíacas, se han tomado como suplementos dietéticos, y el éster etílico de ácidos grasos omega-3 como una terapia combinada se usa para tratar la dislipidemia.

35

Además, se ha demostrado que los ácidos grasos omega-3 mejoran la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa en varones normoglucemiantes y en individuos obesos. También se ha demostrado que los ácidos grasos omega-3 mejoran la resistencia a la insulina en pacientes obesos y no obesos con un fenotipo inflamatorio. Se ha demostrado que el metabolismo de lípidos, glucosa e insulina mejora en sujetos hipertensos con sobrepeso a través del tratamiento con ácidos grasos omega-3.

40

45

Los ácidos grasos omega-3 C22 y C20 DHA o EPA se metabolizan en metabolitos activos antiinflamatorios, algunos de los cuales incluyen resolvinas y protectinas, y activan diversas vías antiinflamatorias.

La capacidad de truncar simultáneamente las vías proinflamatorias, por ejemplo, aquellas que afectan a los niveles de proteína C reactiva (CRP), citocinas TNFα e IL-6, mientras estimulan las vías antiinflamatorias al derivar los ácidos grasos omega-3 tales como DHA y EPA a las vías metabólicas que finalmente producen resolvinas, protectinas y otros metabolitos que resuelven la inflamación serían un gran beneficio en el tratamiento de las enfermedades anteriormente mencionadas. La inflamación podría ser particularmente vulnerable a un ataque en dos

50

frentes, mediante la inhibición de las vías proinflamatorias y la regulación positiva de las vías antiinflamatorias.

El documento WO2007/116027 desvela composiciones farmacéuticas antiinflamatorias que contienen como ingredientes ácido salicílico y un ácido graso poliinsaturado.

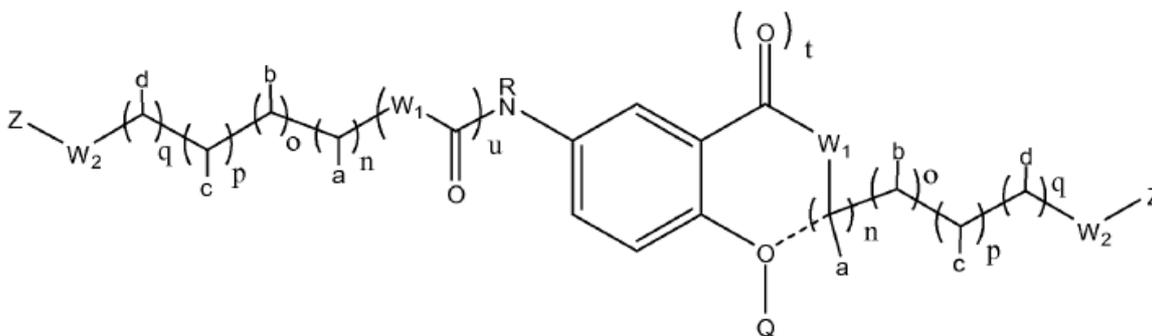
5

**4. Sumario de la invención**

La invención está definida por las reivindicaciones anexas.

10 La invención se basa en parte en el descubrimiento de derivados de salicilatos acetilados de ácidos grasos y sus efectos demostrados en la regulación positiva simultánea de las vías antiinflamatorias y la regulación negativa de las vías proinflamatorias. Estos nuevos compuestos son útiles en el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas a la inflamación.

15 Por consiguiente, en un aspecto, se describen compuestos de la **Fórmula III**:



**Fórmula III**

20 y sales, hidratos, solvatos, enantiómeros y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos; en la que

cada  $W_1$  y  $W_2$  son independientemente nulos, O o NH, o cuando  $W_1$  y  $W_2$  son ambos NH, entonces tanto  $W_1$  como  $W_2$  se pueden tomar conjuntamente para formar una fracción de piperazina;

----- representa un enlace opcional que cuando está presente, es necesario que Q sea nulo;

25 cada a y c son independientemente H, CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o C(O)OH;

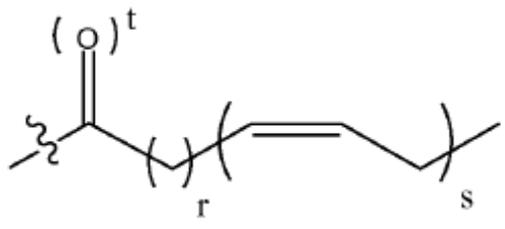
cada b es H, CH<sub>3</sub>, C(O)OH u O-Z;

cada d es H o C(O)OH;

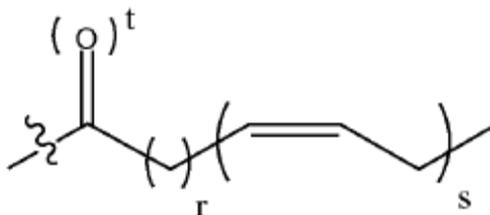
cada n, o, p y q es independientemente 0 o 1;

cada Z es H o

30



con la condición de que al menos haya un



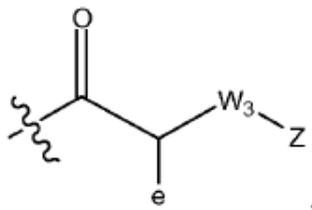
35

en el compuesto;

cada r es independientemente 2,3 o 7;  
 cada s es independientemente 3, 5 o 6;  
 cada t es 1;  
 u es 0 o 1;

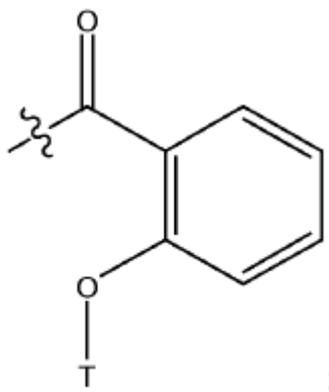
5

con la condición de que cuando r sea 7, s sea 3;  
 Q es nulo, C(O)CH<sub>3</sub>, Z



10

o



15

e es H o una cualquiera de las cadenas laterales de los aminoácidos naturales;  
 W<sub>3</sub> es nulo, -O- o -N(R)-;  
 R es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; y  
 T es H, C(O)CH<sub>3</sub> o Z.

20

En cualquiera de las fórmulas anteriores, uno cualquiera o más de H pueden estar sustituidos con un deuterio. También se entiende que, en cualquiera de las fórmulas anteriores, un sustituyente de metilo puede estar sustituido con un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

También se describen formulaciones farmacéuticas que comprenden al menos un Compuesto de la invención.

25

También se describen en el presente documento métodos de regulación positiva de las vías antiinflamatorias y regulación negativa de las vías de proinflamatorias de manera simultánea en una célula mediante la administración a la célula de un Compuesto de la invención.

30

También se describen en el presente documento métodos de regulación positiva de las vías antiinflamatorias y regulación negativa de las vías de proinflamatorias de manera simultánea en un paciente que lo necesita mediante la administración al paciente de una cantidad eficaz de un Compuesto de la invención.

35

También se describen en el presente documento métodos de tratamiento de una enfermedad susceptible al tratamiento con un Compuesto de la invención en un paciente que lo necesita mediante la administración al paciente de una cantidad eficaz de un Compuesto de la invención.

40

También se describen en el presente documento métodos de tratamiento de enfermedades asociadas a la inflamación mediante la administración a un paciente que lo necesita de una cantidad eficaz de un Compuesto de la invención.

La invención también incluye composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de un Compuesto de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones son útiles para tratar o prevenir una enfermedad inflamatoria. La invención incluye un Compuesto de la invención cuando se proporciona como un hidrato, una sal, tal como una sal farmacéuticamente aceptable, un enantiómero, un estereoisómero o mezclas de

los mismos.

Los detalles de la invención se exponen en la siguiente descripción adjunta. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, ahora se describen métodos y materiales ilustrativos. Otras características, objetivos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y de las reivindicaciones. En la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares también incluyen el plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención.

## 5. Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación gráfica de los datos que muestran los efectos de un Compuesto de la invención sobre los niveles de IL-10 en adipocitos 3T3-L1.

La Figura 2 es una representación gráfica de los datos que muestran los efectos de un Compuesto de la invención sobre la liberación de TNF $\alpha$ .

La Figura 3 es una representación gráfica de los datos que muestran los efectos de los Compuestos de la invención en un modelo de ratón de TNF $\alpha$  con exposición a LPS.

## 6. Descripción detallada de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones anexas.

La inflamación es la causa subyacente y el contribuyente patológico de muchas enfermedades crónicas, incluyendo diabetes de tipo 2, artritis reumatoide, soriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, epilepsia y cáncer, etc. La inflamación es la respuesta protectora natural del organismo a lesiones, traumatismos e infecciones. El proceso inflamatorio normal está altamente regulado. El proceso se inicia mediante un estímulo que conduce a la inducción de vías proinflamatorias. La respuesta persiste mientras el estímulo está presente y desaparece durante la fase de resolución de la inflamación. Durante cada una de estas fases de la respuesta inflamatoria, se activan e inactivan diferentes enzimas, receptores y efectores. Si el estímulo persiste, se produce inflamación crónica y se genera un desequilibrio en las vías proinflamatorias y antiinflamatorias. Las terapias actuales que se dirigen a la inflamación se han dirigido, en general, a dianas moleculares únicas o efectores en vías únicas. Por ejemplo, los anticuerpos de TNF $\alpha$ , los receptores solubles de TNF $\alpha$ , los inhibidores de COX-2, los antagonistas de CCR2, los inhibidores de p38, etc. se dirigen solo al grupo proinflamatorio de la inflamación. En general, estos enfoques no modifican la enfermedad y se asocian a los efectos secundarios debidos a una respuesta inflamatoria desequilibrada. La dirección simultánea tanto de las vías proinflamatorias como antiinflamatorias en la respuesta inflamatoria normal proporciona una actividad superior para dirigir la inflamación, la actividad modificadora de la enfermedad y un perfil de efectos secundarios reducido. Los Compuestos de la invención poseen la capacidad de inhibir las vías proinflamatorias, mientras que activan simultáneamente las vías antiinflamatorias. La dirección simultánea de estas vías conduce a una eficacia sinérgica y, por lo tanto, las dos actividades deben ser suministradas a la célula y/o al tejido diana juntos.

Los Compuestos de la invención se han diseñado para reunir análogos de salicilato y ácidos grasos omega 3 en un solo conjugado molecular. Los análogos de salicilato inhiben la vía proinflamatoria a través de la inhibición de NF $\kappa$ B. Los ácidos grasos omega 3, incluyendo DHA, EPA y ALA, activan la vía antiinflamatoria. Los Compuestos de la invención poseen, por tanto, dos actividades: la capacidad de truncar la actividad proinflamatoria y la capacidad de activar la actividad antiinflamatoria. Los Compuestos de la invención presentan una potente actividad inhibidora de NF $\kappa$ B y TNF $\alpha$  en una estirpe celular de macrófagos de ratón, RAW264.7, mientras que los componentes individuales, un análogo de salicilato y un EFA, solos o combinados entre sí, no lo hacen. La actividad de los Compuestos de la invención es sustancialmente superior a la suma de los componentes, lo que sugiere que la actividad inducida por los Compuestos de la Invención es sinérgica.

### Definiciones

Las siguientes definiciones se usan en relación con los derivados de salicilatos acetilados de ácidos grasos.

La expresión "Compuesto de la invención" se refiere a un derivado de salicilato acetilado de ácido graso descrito en el presente documento, incluyendo el derivado de salicilato, sin limitación, ácido salicílico y salicilatos sustituidos tales como ácido aminosalicílico. La expresión "Compuestos de la invención" se refiere a más de un Compuesto de la invención, y pueden ser derivados de salicilatos acetilados de ácidos grasos. Los Compuestos de la invención incluyen todos y cada uno de los posibles estereoisómeros, enantiómeros, diastereómeros, tautómeros, sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, solvatos y de los mismos.

Los artículos "un" y "una" se usan en la presente divulgación para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

- 5 El término "y/o" se usa en la presente divulgación para referirse bien a "y" o a "o", a menos que se indique lo contrario.

A menos que se defina específicamente de otra manera, el término "arilo" se refiere a grupos de hidrocarburos cíclicos, aromáticos, que tienen de 1 a 2 anillos aromáticos, incluyendo grupos monocíclicos o bicíclicos tales como fenilo, bifenilo o naftilo. Cuando contienen dos anillos aromáticos (bicíclicos, etc.), los anillos aromáticos del grupo arilo pueden estar unidos en un solo punto (por ejemplo, bifenilo) o condensados (por ejemplo, naftilo). El grupo arilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, por ejemplo, de 1 a 5 sustituyentes, en cualquier punto de unión. Los propios sustituyentes pueden estar opcionalmente sustituidos.

- 15 "Alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>" se refiere a un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que contiene de 1 a 3 átomos de carbono. Los ejemplos de un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, propilo e isopropilo.

"Alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>" se refiere a un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que contiene de 1 a 4 átomos de carbono. Los ejemplos de un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, propilo, butilo, isopropilo, isobutilo, *sec*-butilo y *terc*-butilo.

"Alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>" se refiere a un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que contiene de 1 a 5 átomos de carbono. Los ejemplos de un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, isopropilo, isobutilo, *sec*-butilo y *terc*-butilo, isopentilo y neopentilo.

25 "Alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" se refiere a un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que contiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos de un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, isopropilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, isopentilo y neopentilo.

30 La expresión "una cualquiera de las cadenas laterales de los aminoácidos de origen natural", como se usa en el presente documento, significa una cadena lateral de uno cualquiera de los siguientes aminoácidos: isoleucina, alanina, leucina, asparagina, lisina, aspartato, metionina, cisteína, fenilalanina, glutamato, treonina, glutamina, triptófano, glicina, valina, prolina, arginina, serina, histidina y tirosina.

35 La expresión "ácido graso", como se usa en el presente documento, significa un ácido graso omega-3 y ácidos grasos que son metabolizados *in vivo* en los ácidos grasos omega-3. Los ejemplos no limitantes de ácidos grasos son ácido all-cis-7,10,13-hexadecatrienoico, ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA o ácido all-cis-9,12,15-octadecatrienoico), ácido estearidónico (STD o ácido all-cis-6,9,12,15-octadecatetraenoico), ácido eicosatrienoico (ETE o ácido all-cis-11,14,17-eicosatrienoico), ácido eicosatetraenoico (ETA o ácido all-cis-8,11,14,17-eicosatetraenoico), ácido eicosapentaenoico (EPA o ácido all-cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico), ácido docosapentaenoico (DPA, ácido clupanodónico o ácido all-cis-7,10,13,16,19-docosapentaenoico), ácido docosahexaenoico (DHA o ácido all-cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico), ácido tetracosapentaenoico (ácido all-cis-9,12,15,18,21-docosahexaenoico) o ácido tetracosahexaenoico (ácido nisínico o ácido all-cis-6,9,12,15,18,21-tetracosenoico).

45 Un "sujeto" es un mamífero, por ejemplo, ser humano, ratón, rata, cobaya, perro, gato, caballo, vaca, cerdo o primate no humano, tal como mono, chimpancé, babuino o Rhesus.

50 La invención también incluye composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de un Compuesto de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención incluye un Compuesto de la invención cuando se proporciona como un hidrato, una sal, tal como una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómeros, estereoisómeros o mezclas de los mismos.

55 Las "sales farmacéuticamente aceptables" representativas incluyen, por ejemplo, sales hidrosolubles y no hidrosolubles tales como sales acetato, amonato (4,4-diaminoestilben-2,2-disulfonato), bencenosulfonato, benzonato, bicarbonato, bisulfato, bitartrato, borato, bromuro, butirato, calcio, edetato de calcio, camsilato, carbonato, cloruro, citrato, clavulato, diclorhidrato, edetato, edisilato, estolato, esilato, fiunarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexafluorofosfato, hexilresorcinato, hidrabamina, bromhidrato, clorhidrato, hidroxinaftoato, yoduro, isotionato, lactato, lactobionato, laurato, magnesio, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilbromuro, metilnitrato, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, sal de N-metilglucamin-amonio, 3-hidroxi-2-naftoato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato (1,1-meten-bis-2-hidroxi-3-naftoato, einbonato), pantotenato, fosfato/difosfato, picrato, poligalacturonato, propionato, *p*-toluenosulfonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, subsalicilato, suramato, tanato, tartrato, teoclato, tosilato, trietioduro y valerato.

65 Una "cantidad eficaz" cuando se usa en relación con un Compuesto de la invención es una cantidad eficaz para tratar o prevenir una enfermedad inflamatoria.

El término "vehículo", como se usa en la presente divulgación, engloba vehículos, excipientes y diluyentes, y significa un material, una composición o un vehículo, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante, implicado en llevar o transportar un agente farmacéutico desde un órgano o parte del cuerpo a otro órgano u otra parte del cuerpo.

El término "tratar", con respecto a un sujeto, se refiere a la mejora de al menos un síntoma del trastorno del sujeto. El tratamiento puede curar, mejorar o aliviar al menos parcialmente el trastorno.

El término "trastorno" se usa en la presente divulgación para referirse a, y se usa indistintamente con, los términos enfermedad o afección, a menos que se indique lo contrario.

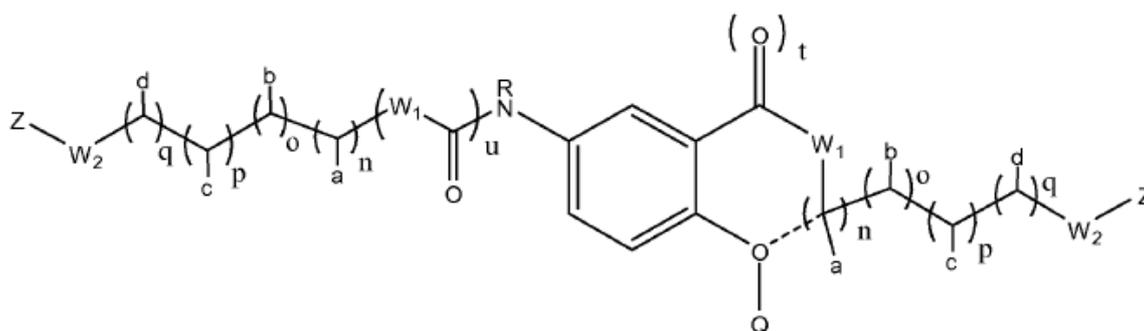
El término "administrar" o "administración", como se usa en la presente divulgación, se refiere bien a administrar directamente un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto o una composición a un sujeto, o a la administración de una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto o de la composición al sujeto, que puede formar una cantidad equivalente de compuesto activo dentro del organismo del sujeto.

Las siguientes abreviaturas se usan en el presente documento y tienen las definiciones indicadas: DCC es dicitohexilcarbodiimida, CDI es 1,1'-carbodiimidazol, EDC es clorhidrato de 1-metil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, HEPES es ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfónico, SA es ácido salicílico, 5-ASA es ácido 5-aminosalicílico, SDS es dodecilsulfato (sal de sodio), TNF es factor de necrosis tumoral, TRIS es Tris(hidroximetil)aminometano, Ts es tosilo (*p*-toluenosulfonilo), TA es la temperatura ambiente y h es hora.

### COMPUESTOS

La presente invención proporciona derivados de salicilatos acetilados de ácidos grasos de acuerdo con la Fórmula III como se exponen a continuación.

En el presente documento, se describen compuestos de **Fórmula III**:



**Fórmula III**

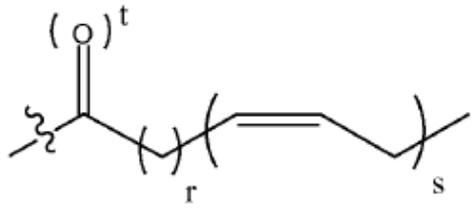
y sales, hidratos, solvatos, enantiómeros y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos; en la que  $W_1$ ,  $W_2$ , - - - - , a, b, c, d, n, o, p, q, Z, r, s, t, u, Q, T, e,  $W_3$ , R son como se han definido anteriormente para los compuestos de Fórmula III.

En algunas realizaciones,  $R_2$  es Cl o F. En otras realizaciones,  $R_3$  es Cl o F. En algunas realizaciones,  $W_1$  es O. En algunas realizaciones,  $W_2$  es O.

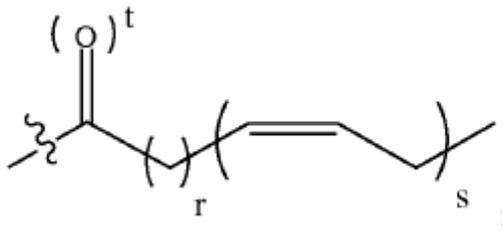
En algunas realizaciones,  $W_1$  es N. En otras realizaciones  $W_1$  está sustituido en N con un alquilo  $C_1$ - $C_6$ . En otras realizaciones,  $W_1$  es un N oxidado.

En algunas realizaciones,  $W_2$  es N. En otras realizaciones  $W_2$  está sustituido en N con un alquilo  $C_1$ - $C_6$ . En otras realizaciones,  $W_2$  es un N oxidado.

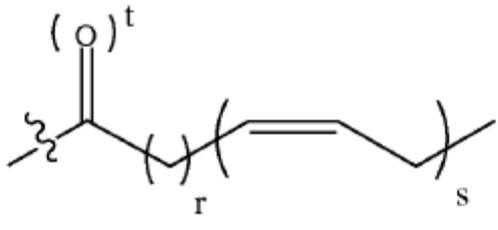
En algunas realizaciones, - - - - representa un enlace. En algunas realizaciones, a y c son cada uno independientemente H,  $CH_3$ ,  $-OCH_3$ ,  $-OCH_2CH_3$  o  $C(O)OH$ . En algunas realizaciones, b es O-Z y Z es



5 y t es 1. En algunas realizaciones, d es C(O)OH. En algunas realizaciones n, o, p y q son cada uno 1. En algunas realizaciones, n es 0. En algunas realizaciones, Z es

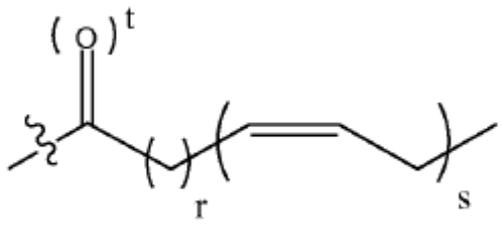


y r es 2. En algunas realizaciones, Z es



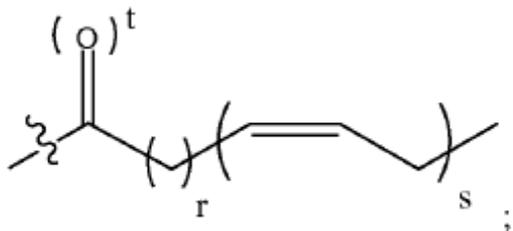
10

y r es 3. En algunas realizaciones, Z es



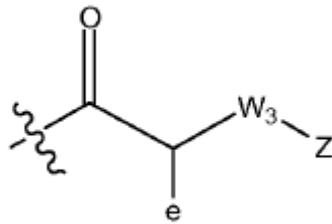
15

y s es 5. En algunas realizaciones, Z es

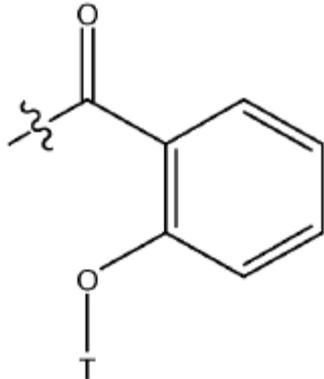


20

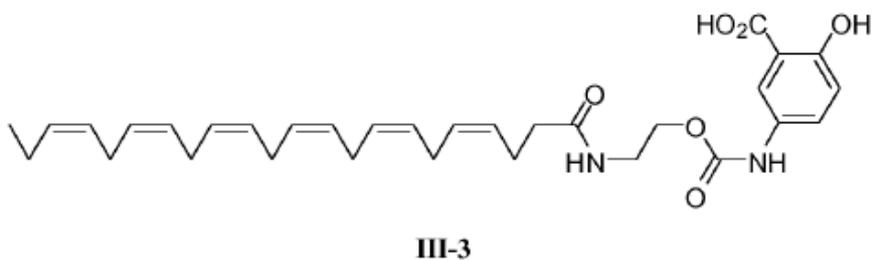
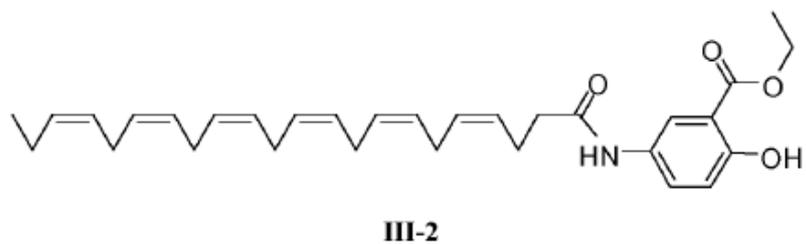
y s es 6. En algunas realizaciones, t es 1. En algunas realizaciones, Q es C(O)CH<sub>3</sub>. En algunas realizaciones, Q es Z. En algunas realizaciones, Q es



En algunas realizaciones, Q es

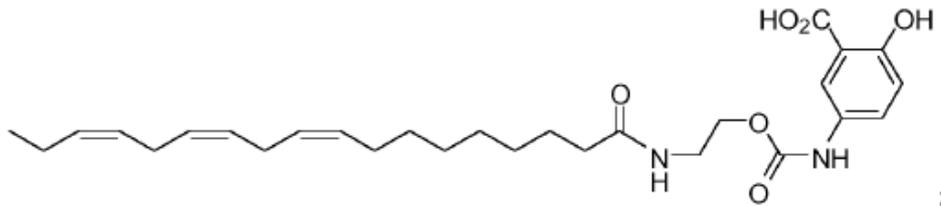


- 5 En algunas realizaciones, T es H. En algunas realizaciones, T es C(O)CH<sub>3</sub>. En algunas realizaciones, T es Z. En algunas realizaciones, e es una cualquiera de las cadenas laterales de los aminoácidos naturales. En algunas realizaciones, e es H.
- 10 En otras realizaciones ilustrativas, los compuestos de Fórmula III son como los expuestos a continuación:



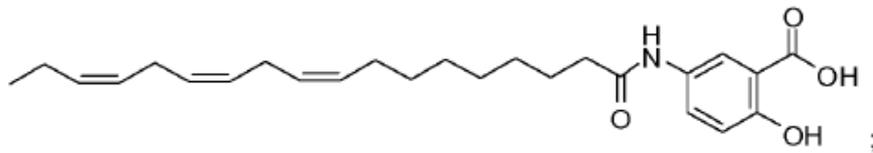


III-4

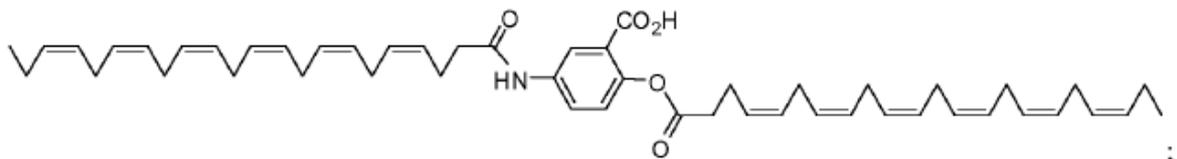


III-5

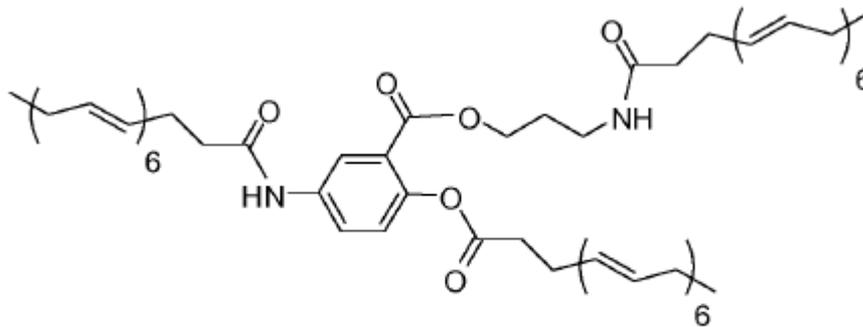
III-6



III-7



III-8



III-9

- 5 En cualquiera de las formulas anteriores, uno cualquiera o más de H pueden estar sustituidos con un deuterio. También se entiende que, en cualquiera de las fórmulas anteriores, un sustituyente de metilo puede estar sustituido con un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

*Métodos de uso de los Compuestos de la invención*

La invención también incluye métodos de regulación positiva de una vía antiinflamatoria y de regulación negativa de una vía proinflamatoria en una célula.

5 En una realización, el método comprende poner en contacto una célula con un Compuesto de la invención en una cantidad suficiente para regular positivamente una vía antiinflamatoria y regular negativamente una vía proinflamatoria en la célula. En general, se puede usar cualquier célula que tenga o pueda tener actividad inflamatoria o pueda expresar NFκB. La célula se puede proporcionar de cualquier forma. Por ejemplo, la célula puede proporcionarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. La actividad inflamatoria se puede medir usando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, los métodos descritos en Tran P. O., *et al*, *Diabetes*, 51; 1772-8, 2002. Los ejemplos ilustrativos de células capaces de tener actividad inflamatoria incluyen, pero sin limitación, células inmunes que incluyen monocitos, macrófagos, linfocitos T, Th-1, Th-2, Th-17, Treg, linfocitos, células del bazo, músculo, de tejido adiposo o grasa, células vasculares tales como endoteliales o pericitos, de hueso, encía, nervio, cerebro, glía, 10 astrocitos, nervio, hígado, riñón, páncreas, incluyendo células de islotes tales como células beta, pulmón, corazón, mama, vejiga, estómago, colon, recto, intestino delgado, piel, esófago, ojo, laringe, útero, ovario, próstata, tendón, médula ósea, sangre, linfa, testículo, células vaginales y neoplásicas.

También se proporciona en la invención un método de inhibición, prevención o tratamiento de la inflamación o una enfermedad inflamatoria en un sujeto. La inflamación puede estar asociada a una enfermedad inflamatoria o una enfermedad en la que la inflamación contribuye a la enfermedad. Las enfermedades inflamatorias pueden surgir donde hay una inflamación del tejido corporal. Estas incluyen respuestas inflamatorias locales e inflamación sistémica. Los ejemplos de dichas enfermedades incluyen, pero sin limitación: rechazo de trasplante de órgano; lesión por reoxigenación como consecuencia de un trasplante de órganos (véase Grupp *et al.*, *J. Mol. Cell Cardiol.* 31: 297-303 (1999)) que incluye, pero sin limitación, el trasplante de los siguientes órganos: corazón, pulmón, hígado y riñón; enfermedades inflamatorias crónicas de las articulaciones, que incluyen artritis, artritis reumatoide, artrosis y enfermedades óseas asociadas a una mayor resorción ósea; enfermedades inflamatorias del intestino tales como ileítis, colitis ulcerosa, síndrome de Barrett y enfermedad de Crohn; enfermedades pulmonares inflamatorias tales como asma, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias y fibrosis quística; enfermedades inflamatorias del ojo que incluyen distrofia corneal, tracoma, oncocercosis, uveítis, 20 oftalmítis simpática y endoftalmítis; enfermedades inflamatorias crónicas de la encía, que incluyen gingivitis y periodontitis; enfermedades inflamatorias del riñón que incluyen complicaciones urémicas, glomerulonefritis y nefrosis; enfermedades inflamatorias de la piel que incluyen esclerodermatitis, soriasis y eccema; enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central, incluyendo enfermedades desmielinizantes crónicas del sistema nervioso, esclerosis múltiple, neurodegeneración relacionada con el SIDA y enfermedad de Alzheimer, meningitis infecciosa, encefalomielititis, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y encefalitis viral o autoinmune. Enfermedad metabólica tal como diabetes mellitus de tipo II; la prevención de la diabetes de tipo I; dislipedemia; hipertrigliceridemia; complicaciones diabéticas, que incluyen, pero sin limitación, glaucoma, retinopatía, edema macular, nefropatía tal como microalbuminuria y nefropatía diabética progresiva, polineuropatía, neuropatía diabética, arteriopatía coronaria aterosclerótica, enfermedad arterial periférica, coma hiperglucémico hiperosmolar no cetósico, mononeuropatías, neuropatía autonómica, problemas articulares y una complicación de la piel o la membrana mucosa, tal como una infección, una espinilla, una infección por *Candida* o necrobiosis lipóidica diabetorum; vasculitis del complejo inmune, lupus eritematoso sistémico; enfermedades inflamatorias del corazón tales como cardiomiopatía, hipercolesterolemia de la cardiopatía isquémica y aterosclerosis; así como otras varias 45 enfermedades que pueden tener componentes inflamatorios significativos, incluyendo la preeclampsia; insuficiencia hepática crónica, traumatismo cerebral y medular, y cáncer. La enfermedad inflamatoria también puede ser una inflamación sistémica del organismo, ilustrada por choque gram-positivo o gram-negativo, choque hemorrágico o anafiláctico, o choque inducido por quimioterapia de cáncer en respuesta a citocinas proinflamatorias, por ejemplo, choque asociado a citocinas proinflamatorias. Dicho choque puede ser inducido, por ejemplo, por un agente quimioterapéutico que se administra como un tratamiento para el cáncer. Otros trastornos incluyen depresión, obesidad, enfermedades alérgicas, eventos cardiovasculares agudos, arritmia, prevención de la muerte súbita, enfermedades de desgaste muscular tales como distrofia muscular de Duchenne, miopatías inflamatorias tales como dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión y polimiositis y caquexia por cáncer. También se puede tratar con el Compuesto de la invención la inflamación producida por una cirugía y un traumatismo.

55 En algunas realizaciones, se administra al sujeto una cantidad eficaz de un Compuesto de la invención.

La invención también incluye composiciones farmacéuticas útiles para tratar o prevenir una enfermedad inflamatoria o para inhibir una enfermedad inflamatoria, o más de una de estas actividades. Las composiciones pueden ser adecuadas para su uso interno y comprender una cantidad eficaz de un Compuesto de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los Compuestos de la invención son especialmente útiles en tanto en cuanto demuestran una toxicidad periférica muy baja o ninguna toxicidad periférica.

Los Compuestos de la invención se pueden administrar cada uno en cantidades que sean suficientes para tratar o prevenir una enfermedad inflamatoria o una enfermedad de reperusión y/o prevenir el desarrollo de las mismas en sujetos.

La administración de los Compuestos de la invención se puede realizar a través de cualquier modo de administración de agentes terapéuticos. Estos modos incluyen la administración sistémica o local, tales como los modos de administración oral, nasal, parenteral, transdérmica, subcutánea, vaginal, bucal, rectal o tópica.

5 Dependiendo del modo de administración pretendido, las composiciones pueden estar en forma farmacéutica sólida, semisólida o líquida, tal como, por ejemplo, inyectables, comprimidos, supositorios, píldoras, cápsulas de liberación prolongada, elixires, tintes, emulsiones, jarabes, polvos, líquidos, suspensiones o similares, a veces en dosis unitarias y coherentes con las prácticas farmacéuticas convencionales. Del mismo modo, también se pueden administrar en forma intravenosa (tanto en bolo como en infusión), intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, usando todas ellas formas bien conocidas por los expertos en las técnicas farmacéuticas.

15 Las composiciones farmacéuticas ilustrativas son comprimidos y cápsulas de gelatina que comprenden un Compuesto de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como: a) un diluyente, por ejemplo, agua purificada, aceites de triglicéridos tales como aceite vegetal hidrogenado o parcialmente hidrogenado, o mezclas de los mismos, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceites de pescado tales como EPA o DHA, o sus ésteres o triglicéridos, o mezclas de los mismos, ácidos grasos omega-3 o sus derivados, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa, sodio, sacarina, glucosa y/o glicina; b) un lubricante, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o de calcio, oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y/o polietilenglicol; también para comprimidos; c) un aglutinante, por ejemplo, silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, carbonato de magnesio, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, tragacanto de sodio, ceras y/o polivinilpirrolidona, si se desea; d) un disgregante, por ejemplo, almidones, agar, metilcelulosa, bentonita, goma de xantano, ácido alginico o su sal sódica, o mezclas efervescentes; e) absorbente, colorante, saborizante y edulcorante; f) un agente emulsionante o dispersante tal como Tween 80, Labrasol, HPMC, DOSS, caproil 909, labrafac, labrafil, peceol, transcutool, capmul MCM, capmul PG-12, captex 355, gelucire, vitamina E TGPS u otro emulsionante aceptable; y/o g) un agente que mejore la absorción del compuesto tal como ciclodextrina, hidroxipropilciclodextrina, PEG400, PEG200.

30 Las composiciones líquidas, en particular, inyectables, se pueden preparar, por ejemplo, mediante disolución, dispersión, etc. Por ejemplo, el Compuesto de la invención se disuelve en o se mezcla con un disolvente farmacéuticamente aceptable tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares, para formar de este modo una solución o suspensión isotónica inyectable. Se pueden usar proteínas tales como albúmina, partículas de quilomicrones o proteínas séricas para disolver los Compuestos de la invención.

35 Los Compuestos de la invención también se pueden formular en forma de un supositorio que se puede preparar a partir de emulsiones o suspensiones grasas; usando polialquilenglicoles tales como propilenglicol, como vehículo.

40 Los Compuestos de la invención también se pueden administrar en forma de sistemas de administración de liposomas tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas pueden formarse a partir de varios fosfolípidos que contienen colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas. En algunas realizaciones, se hidrata una película de componentes lipídicos con una solución acuosa de fármaco para formar una capa lipídica que encapsule el fármaco, según lo descrito en la patente de EE.UU. n.º 5.262.564.

45 Los Compuestos de la invención también se pueden administrar mediante el uso de anticuerpos monoclonales como vehículos individuales a los que se acoplan los Compuestos de la invención. Los Compuestos de la invención también pueden acoplarse con polímeros solubles como vehículos de fármacos dirigibles. Dichos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamida-fenol, polihidroxietilspanamidofenol o polietilenoxydepolilisina sustituida con restos de palmitoilo. Además, los Compuestos de la invención se pueden acoplar a una clase de polímeros biodegradables útiles para conseguir la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, poliépsilon caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros de bloques reticulados o anfipáticos de hidrogeles. En una realización, los Compuestos de la invención no están unidos covalentemente a un polímero, por ejemplo, un polímero de ácido policarboxílico o un poliacrilato.

60 La administración inyectable parenteral se usa, en general, para las inyecciones e infusiones subcutáneas, intramusculares o intravenosas. Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, bien como soluciones o suspensiones líquidas, o en formas sólidas adecuadas para la disolución en un líquido antes de la inyección.

65 Las composiciones se pueden preparar de acuerdo con métodos convencionales de mezcla, granulación o recubrimiento, respectivamente, y las presentes composiciones farmacéuticas pueden contener del aproximadamente 0,1 % al aproximadamente 99 %, del aproximadamente 5 % al aproximadamente 90 % o del aproximadamente 1 % al aproximadamente 20 % del Compuesto de la invención en peso o volumen.

La pauta posológica que utiliza el Compuesto de la invención se selecciona de acuerdo con varios factores incluyendo el tipo, la especie, la edad, el peso, el sexo y el estado médico del paciente; la gravedad de la afección que se va a tratar; la vía de administración; la función renal o hepática del paciente; y el Compuesto de la invención empleado en particular. Un médico o veterinario experto habitual en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz del fármaco necesaria para prevenir, contrarrestar o detener el progreso de la afección.

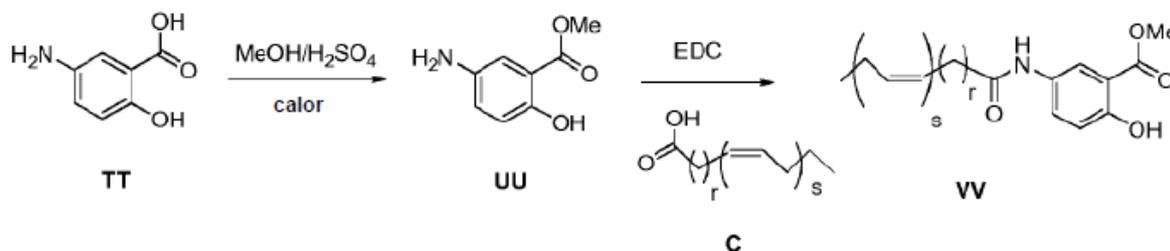
Las cantidades de dosis eficaces de la presente invención, cuando se usan para los efectos indicados, varían de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 5.000 mg del Compuesto de la invención al día. Las composiciones para el uso *in vivo* o *in vitro* pueden contener aproximadamente 20, 50, 75, 100, 150, 250, 500, 750, 1.000, 1.250, 2.500, 3.500 o 5.000 mg del Compuesto de la invención. En una realización, las composiciones están en forma de un comprimido que se puede marcar. Los niveles eficaces en plasma del Compuesto de la invención pueden variar de aproximadamente 0,002 mg a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal al día. Las dosis apropiadas de los Compuestos de la invención se pueden determinar como se establece en L. S. Goodman, *et al.*, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 201-26 (5ª ed.1975).

Los Compuestos de la invención se pueden administrar en una sola dosis diaria, o la dosis diaria total se puede administrar en dosis divididas de dos, tres o cuatro veces al día. Además, los Compuestos de la invención se pueden administrar en forma intranasal mediante el uso tópico de vehículos intranasales adecuados o por vías transdérmicas, usando las formas de parches para la piel transdérmicos bien conocidas por los expertos habituales en la materia. Para su administración en forma de un sistema de administración transdérmico, la administración de la dosis puede ser continua en lugar de intermitente durante toda la pauta posológica. Otros preparados tópicos ilustrativos incluyen cremas, pomadas, lociones, aerosoles y geles, en los que la concentración del Compuesto de la invención varía del aproximadamente 0,1 % al aproximadamente 15 %, p/p o p/v.

#### Métodos de preparación de los derivados de aminosalicilatos acetilados de ácidos grasos

En los siguientes ejemplos y, en general, en los **Esquemas 15-18**, se exponen ejemplos de vías sintéticas útiles para la fabricación de los derivados de aminosalicilatos acetilados de ácidos grasos de Fórmula III.

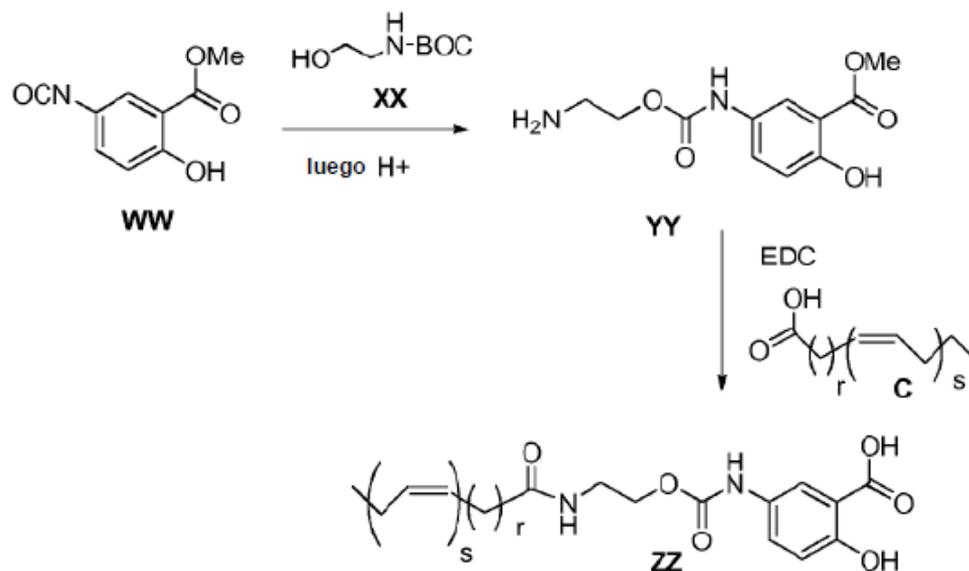
#### Esquema 15



en la que r y s son como se han definido para la Fórmula III.

El compuesto **TT** puede esterificarse en presencia de un catalizador ácido y un alcohol adecuado, por ejemplo, metanol, para dar el éster **UU**. La activación del compuesto **UU** con un reactivo de acoplamiento tal como, por ejemplo, DCC, CDI o EDC, opcionalmente, con una base de amina terciaria y/o catalizador, por ejemplo, DMAP, seguido de la adición de un ácido graso de Fórmula C produce compuestos de Fórmula **VV**. La saponificación de los ésteres de Fórmula **VV** con una base adecuada, tal como, por ejemplo, NaOH, puede proporcionar el ácido graso de los compuestos de Fórmula **VV**. Como alternativa, el compuesto **TT** puede esterificarse con bromuro de bencilo en presencia de una base, por ejemplo, CsCO<sub>3</sub>, y luego someterse a las etapas restantes del Esquema 1. La hidrogenólisis del éster de bencilo derivado de **TT**, por ejemplo usando Pd/C y H<sub>2</sub>, puede producir el ácido libre de los compuestos de Fórmula **VV**. Los compuestos diacilados de la invención se pueden preparar sometiendo el compuesto **TT** al procedimiento anterior.

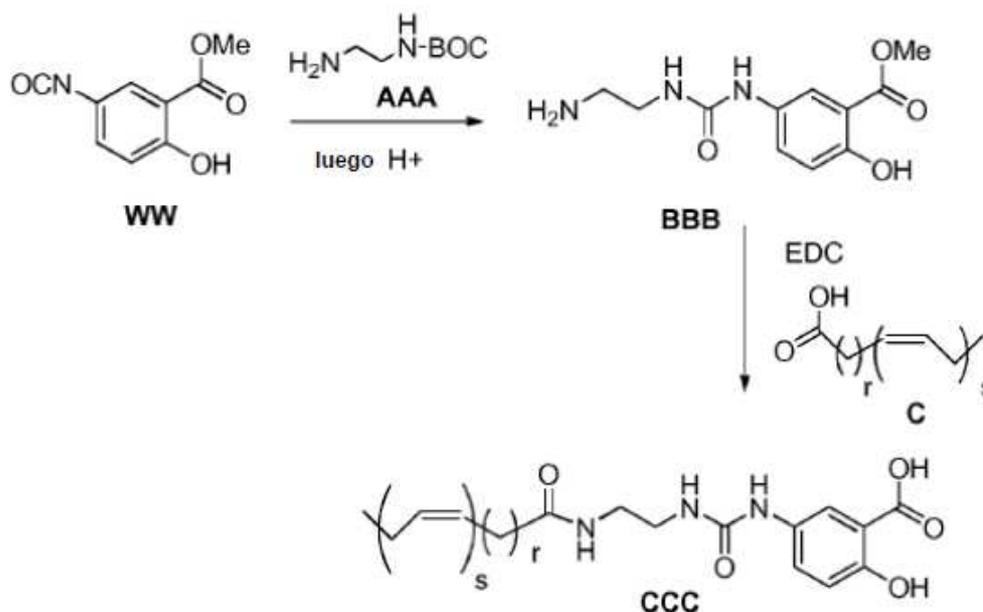
Esquema 16



en la que r y s son como se han definido para la Fórmula III.

- 5 El isocianuro **WW** se puede condensar con una etanolamina **XX** enmascarada con amino, que, tras el tratamiento con ácido, da el compuesto de aminocarbamato **YY** sin enmascarar. La activación del compuesto **YY** con un reactivo de acoplamiento tal como, por ejemplo, DCC, CDI o EDC, opcionalmente, con una base de amina terciaria y/o un catalizador, por ejemplo, DMAP, seguida de la adición de un ácido graso de Fórmula **C** proporciona compuestos de Fórmula **ZZ**. El éster se puede desproteger usando métodos desvelados en Greene, *et al.* "Projecting Groups in Organic Chemistry". 4ª ed. Wiley & Sons, Hoboken, NJ (2007). Véase, por ejemplo, el Capítulo 5 del mismo.
- 10

Esquema 17

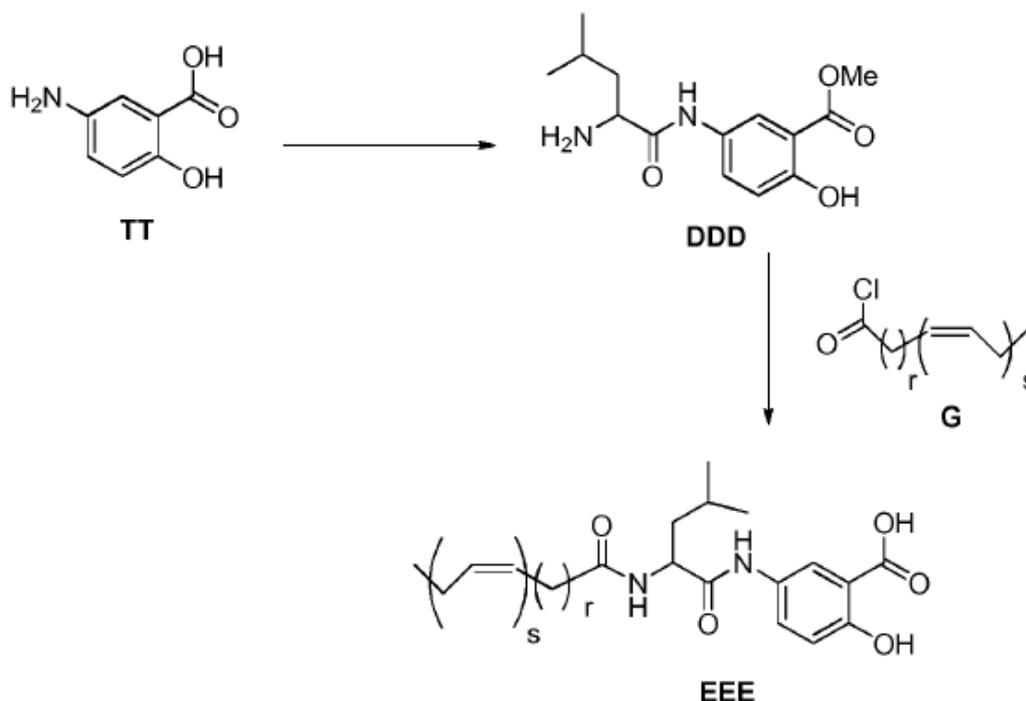


en la que r y s son como se han definido para la Fórmula III.

15

El isocianuro **WW** se puede condensar con una etilendiamina **AAA** enmascarada con monoamino, que, tras el tratamiento con ácido, da el compuesto de urea **BBB** sin enmascarar. La activación del compuesto **BBB** con un reactivo de acoplamiento tal como, por ejemplo, DCC, CDI o EDC, opcionalmente, con una base de amina terciaria y/o un catalizador, por ejemplo, DMAP, seguida de la adición de un ácido graso de Fórmula **C** proporciona compuestos de Fórmula **CCC**. El éster se puede desproteger usando métodos desvelados en Greene, *et al.* "Projecting Groups in Organic Chemistry". 4ª ed. Wiley & Sons, Hoboken, NJ (2007). Véase, por ejemplo, el Capítulo 5 del mismo.

### Esquema 18



en la que  $r$  y  $s$  son como se han definido para la Fórmula III.

El compuesto **TT** puede esterificarse en presencia de un catalizador ácido y un alcohol protector adecuado, tal como, por ejemplo, metanol, seguido del acoplamiento a un aminoácido activado, dando el compuesto **DDD**. La condensación del compuesto de amino **DDD** con un cloruro de ácido graso de Fórmula **G** proporciona compuestos de Fórmula **EEE**. El éster se puede desproteger usando métodos desvelados en Greene, *et al.* "Projecting Groups in Organic Chemistry". 4ª ed. Wiley & Sons, Hoboken, NJ (2007). Véase, por ejemplo, el Capítulo 5 del mismo.

### 7. Ejemplos

La divulgación se ilustra además mediante los siguientes ejemplos. Se ha de entender que los ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertas realizaciones y que no se pretende limitar el alcance de la divulgación mediante los mismos. Los ejemplos que no pertenecen al alcance de las reivindicaciones son únicamente a efectos ilustrativos.

#### Ejemplo 1: Efecto de los compuestos ilustrativos de la invención sobre la actividad inflamatoria en el tejido adiposo en ratones

La demostración de la capacidad de los compuestos ilustrativos de la invención para mediar las concentraciones de adiponectina en suero en un modelo de obesidad de roedores se mostró usando los métodos descritos en Itoh, M., *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007 27(9):1918-25. Se adquirieron ratones macho ob/ob C57BL/6J y sus compañeros de camada de tipo silvestre (WT) en Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Los animales se alojan en jaulas individuales en una sala con temperatura, humedad y luz controladas (ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) y se les permite el libre acceso a agua y dieta exenta de harina de pescado (F1 exenta de harina de pescado). (Funabashi Farm, Chiba, Japón) suplementada con: 362 kcal/100 g, 4,4 % de energía en forma de grasa).

Ratones ob/ob macho de seis semanas y compañeros de camada WT tienen acceso ilimitado a la dieta exenta de harina de pescado (grupo de control) o dieta exenta de harina de pescado suplementada con EPA al 5 % (p/p) (grupo tratado con EPA) durante 4 semanas (n = 10 a 14). En el protocolo de administración a corto plazo, se tratan ratones ob/ob macho de 8 semanas de vida con el Compuesto de la invención durante 2 semanas (n = 7 a 8). Todas las dietas se cambian todos los días y se sirven con un alimentador no metálico para evitar la oxidación de los ácidos grasos. Al finalizar los experimentos, se sacrifican los ratones tras 5 horas de inanición bajo anestesia con pentobarbital intraperitoneal (30 mg/kg). La glucosa en sangre y las concentraciones en suero de triglicérido (TG) y ácido graso libre (FFA) se miden como se describe en Kouyama R, *et al.*, *Endocrinology*, 146: 3481-3489, 2005. Las concentraciones en suero de ácidos grasos y salicilatos se miden mediante cromatografía de gases.

#### **Ejemplo 2: Efectos *in vivo* de los Compuestos de la invención en ratas grasas Zucker y ratones ob/ob**

Se da a ratas fa/fa macho Zucker de 12 semanas y a ratones ob/ob (Lepob/ob) y ob/1 de 8 semanas libre acceso a comida y agua. Se administra un Compuesto de la invención (120 mg/kg/día) por vía oral mediante sonda una vez al día. Para los ensayos de tolerancia a la glucosa, se administra glucosa (2,0 g/kg) por sonda oral (ratas) o inyección intraperitoneal (ratones) tras un ayuno nocturno. Se determinan las concentraciones de glucosa en sangre y de insulina en suero durante los ensayos de tolerancia oral a la glucosa en ratas fa/fa Zucker o ratas fa/1. Para los ensayos de tolerancia a la insulina, se inyecta insulina (2,0 U/kg) por vía intraperitoneal después de un ayuno nocturno. Se miden las concentraciones de colesterol, triglicéridos, FFA de cadena larga y en sueros de ratas fa/fa Zucker en ayunas.

#### **Ejemplo 3: Efectos de los Compuestos de la invención sobre la señalización de la insulina en adipocitos 3T3-L1**

se privan de suero adipocitos 3T3-L1 durante 16 horas y se tratan o no con aspirina 5 mM durante 2 horas y bien mTNF $\alpha$  6,0 nM (20 min) o el inhibidor de fosfatasa calcicolina A (Axxora, San Diego, EE. UU.) (a 2,0 nM durante 30 minutos) como se describe en Yuan, M., *et al.*, *Science*, 293, 1673-1677, 2001. Tras una estimulación de 5 minutos con insulina 10 nM, se enfrían las células y se disuelven, y las proteínas se inmunoprecipitan con anti-IR o anti-IRS 1. Las proteínas se separan por SDS-PAGE y se identifican mediante transferencia Western con anti-pY, anti-IR o anti-IRS1.

#### **Ejemplo 4: Efectos de los Compuestos de la invención sobre los niveles de IL-10 en adipocitos 3T3-L1**

Se mide la producción de IL-10 en adipocitos 3T3-L1 usando una modificación del método descrito por Bradley *et al.*, *Obesity* (2008) 16, 938-944. Se privan de suero adipocitos 3T3-L1 completamente diferenciados durante 18 horas en DMEM que contiene albúmina sérica bovina exenta de ácidos grasos al 0,2 % (BSA) y piruvato 0,1 mM. Se prepara una reserva de compuesto de ensayo 5 mM en etanol al 100 % y luego se diluye 1:100 en BSA exenta de ácido graso al 2 % en DMEM (con piruvato 0,1 mM), produciendo una solución de compuesto 50  $\mu$ M. Se retiran los medios de inanición de las células y se reemplazan por la solución de compuesto 50  $\mu$ M en DMEM o vehículo (etanol al 0,1 %, BSA exenta de ácido graso al 0,2 % en DMEM con piruvato 0,1 mM). Se incuba el compuesto de ensayo o vehículo con células durante 48 horas. Posteriormente, se purifica el ARN de las células y se transcribe de forma inversa a ADNc. A continuación, se miden los niveles de mensaje IL-10 mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Applied Biosystems Step-One) usando cebadores oligonucleotídicos específicos de genes y sonda marcada fluorescentemente. Los niveles de IL-10 se normalizan al gen constitutivo GAPDH, que se midió usando el mismo método. Los niveles de IL-10 en las muestras tratadas con el Compuesto de la Invención se expresan como un aumento frente a los niveles de IL-10 en muestras tratadas con vehículo. (\*\*p < 0,005 por prueba t de 2 colas). En la Figura 1, se presenta un gráfico de muestra que muestra los datos obtenidos usando uno de los Compuestos de la invención descritos anteriormente en el Ejemplo 4.

#### **Ejemplo 5: Efectos de los Compuestos de la invención en células de hepatoma Fao**

Se privan de suero células Fao durante 16 horas, seguido de incubaciones de 2 horas a 37 °C con 5 mM-25 mM de un Compuesto de la invención de acuerdo con el método descrito en Yuan, M., *et al.*, *Science*, 293, 1673-1677, 2001. A continuación, se estimulan las células secuencialmente con mTNF $\alpha$  6,0 nM durante 20 min e insulina 10 nM durante 5 min. Se enfrían las células y se disuelven, y se inmunoprecipitan entonces las proteínas con anti-IR y se detectan mediante transferencia Western usando anti-pY. La fosforilación se cuantifica por densitometría.

#### **Ejemplo 6: Ensayo de liberación de TNF $\alpha$ en macrófagos RAW 264.7**

El propósito de este ensayo es medir la capacidad de moléculas pequeñas para inhibir la secreción de TNF $\alpha$  en macrófagos cultivados estimulados con lipopolisacárido (LPS). El tratamiento de los macrófagos con LPS activa las vías de las citocinas inflamatorias principalmente a través del eje de señalización TLR4-NF $\kappa$ B. Los Compuestos de la invención inhiben la activación de la transcripción de NF $\kappa$ B y, de este modo, disminuyen la producción y la liberación de TNF $\alpha$ . La dexametasona, un potente agonista del receptor de glucocorticoides, se usa como un control positivo para la inhibición de la liberación de TNF $\alpha$ .

Día 1: se siembran macrófagos RAW 264.7 en placas de cultivo de 96 pocillos. Se retiran los medios de cultivo del crecimiento de células RAW 264.7 en un matraz de cultivo tisular de 75 mm<sup>2</sup> (las células deben estar a una confluencia del ~70 %), y se añaden 10 ml de medio de crecimiento completo calentado (DMEM + FBS al 10 % + 1 x pen/etapa). Se raspan las células en suspensión usando un raspador de placa estéril y se homogenizan pipeteando hacia arriba y hacia abajo con una pipeta serológica de 10 ml. Se determina la concentración celular usando un hematocitómetro clínico. A continuación, se diluyen las células a 150.000 células por ml en medio de crecimiento. Entonces, se transfieren las células diluidas a un depósito de reactivo estéril y se pipetean 100 µl de suspensión celular en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos usando una pipeta multicanal (15.000 células/pocillo). A continuación, se incuban las placas a 37 °C en condiciones normales de crecimiento de cultivo de tejidos (37 °C, cámara de CO<sub>2</sub> humidificado).

Día 2: se prepara la placa de muestra del compuesto de ensayo. Se preparan los compuestos de ensayo en medios de crecimiento. Se administran los compuestos a los medios de las reservas x 1.000 en DMSO al 100 % (por ejemplo, para una concentración final de 10 µM del compuesto de ensayo, se administran 2 µl de compuesto de ensayo 10 mM a 2 ml de medio). Se añaden al menos 150 µl de 1 x compuesto en medio a una placa de muestra de 96 pocillos. Nota: los pocillos perimetrales de la placa de 96 pocillos no se usan para evitar los efectos de borde. Se preparan doce pocillos de muestra con medio más DMSO al 0,1 % (estas muestras servirán como controles del vehículo; se usa dexametasona 10 µM estimulada y no estimulada con LPS como control positivo). Las placas de cultivo se devuelven entonces a la incubadora de crecimiento durante 2 horas. Tras ello, se estimulan las células añadiendo 25 µl de 50 ng/ml de LPS a cada pocillo (excepto los 6 pocillos de control no estimulados del vehículo: concentración final de 10 ng/ml de LPS. Se devuelven las placas a la incubadora de crecimiento durante 3 horas. Tras ello, se retiran 100 µl del sobrenadante del medio y se transfieren a una placa de muestra con fondo en V de 96 pocillos. Se centrifuga la placa sobrenadante del medio durante 5 minutos a 1.000 rpm en una centrífuga de cubeta oscilante, sedimentando cualquier residuo celular que pueda permanecer en el sobrenadante. Se retiran 80 µl de sobrenadante de la placa de muestra y se transfieren a una placa de 96 pocillos con fondo en V reciente. Se mide la viabilidad celular usando el kit Celltiter-glo. Al medir la viabilidad celular, los efectos de un compuesto dado sobre la secreción de TNFα pueden determinar si los efectos se deben a la citotoxicidad o a la verdadera inhibición de la señalización inflamatoria. Se añaden 100 µl de reactivo Celltiter-glo a cada pocillo de la placa de cultivo celular y luego se mide la señal de luminiscencia (CPS) de la placa con el lector de placas Victor 5 (lectura de 0,3 segundos, agitación de la placa de 60 segundos antes de la lectura). La viabilidad celular de un compuesto dado a una concentración dada se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Viabilidad celular} = \text{Muestra de CPS}/(\text{media de los controles sin estimulación de CPS}) * 100$$

Se usan 20 µl de sobrenadante de medios por pocillo para el ELISA de TNFα. Se sigue el protocolo del fabricante Invitrogen/Biosource para el ELISA de TNFα de ratón. El desarrollo cromogénico normalmente se realiza durante 20-30 minutos según se describe en el protocolo del fabricante. Tras la adición de la solución de parada, se mide la DO 450 nm usando el lector de placa Victor 5 (0,1 segundos/barrido del pocillo). Se determina el porcentaje de secreción de TNFα del control. La siguiente fórmula se usa para determinar el porcentaje de secreción de TNFα del control.

$$100 \times (\text{Muestra X a DO 450 nm}) - (\text{media de los controles de vehículo sin estimulación a DO 450 nm}) / (\text{Media de los controles de vehículo con estimulación de LPS a DO 450 nm}) - (\text{media de los controles de vehículo sin estimulación a DO 450 nm})$$

Para cada compuesto de ensayo, se puede representar el porcentaje de secreción de TNFα del control en función de la concentración del compuesto usando una ecuación de ajuste de curva de dosis-respuesta de cuatro parámetros (Modelo XLFIT n.º 205):

$$\text{fit} = (A + ((B - A) / (1 + ((C/x)^D))))$$

$$\text{inv} = (C / (((B - A) / (y - A)) - 1)^{(1/D)})$$

$$\text{res} = (y - \text{fit})$$

Para los compuestos que causan una inhibición superior al 50 % de la secreción de TNFα, se determina la CI<sub>50</sub> (concentración del compuesto que causa el 50 % de inhibición de la secreción de TNFα). En la Figura 2, se presenta un gráfico de muestra que muestra los datos obtenidos usando uno de los Compuestos de la invención en el procedimiento descrito anteriormente en el Ejemplo 6.

Como se ve en la Figura 2, el salicilato solo, el ácido graso solo y la combinación simple de salicilato y ácido graso administrados conjuntamente no inhiben apreciablemente la producción de TNF $\alpha$ . Por el contrario, el salicilato acetilado de ácidos grasos inhibe significativamente la producción de TNF $\alpha$ . Esto demuestra que el salicilato acetilado de ácidos grasos es la especie responsable de la inhibición de la producción de TNF $\alpha$  y no cualquiera de los componentes individuales solos o en combinación simple.

En la siguiente Tabla 1, se presenta una tabla de muestra que presenta los datos obtenidos usando Compuestos de la invención adicionales en el procedimiento descrito anteriormente en el Ejemplo 6.

Tabla 1

Número de compuesto	Secreción de TNF $\alpha$ , CI <sub>50</sub> uM
Ia-1	69,2
III-1	145,6
Ic-1	NT
Ic-10	15,0
5ASA	>100
Ic-11	NT
DHA	>100
III-6	65,3
I-1	Inhibición del 24,4 % a 6,2 uM

**Ejemplo 7: Efectos *in vivo* de los Compuestos de la invención en modelo de ratones de TNF $\alpha$  con exposición a LPS**

Para medir los efectos de los compuestos sobre la secreción de TNF $\alpha$  *in vivo*, se administraron a ratones Swiss Webster macho (n = 10 animales por grupo) mediante sonda oral cada compuesto de ensayo. Todos los compuestos están formulados en una solución acuosa de carboximetilcelulosa al 0,5 % y TWEEN-80 al 0,05 % (vehículo). Una hora después de la dosificación del compuesto, se tratan los animales con 0,2 mg/kg de LPS (lipopolisacárido) mediante inyección intraperitoneal (IP). Noventa minutos después de la exposición a LPS, se anestesian los ratones y se sangran mediante punción cardíaca en tubos separadores de suero (con heparina sódica). Se dejan coagular las hemorragias a temperatura ambiente durante 2 horas, y se centrifugan los tubos durante 20 minutos a 2000 xg. Se recoge el suero de los tubos (100-150  $\mu$ l por animal) y se congela a -70 °C. Se miden los niveles de TNF $\alpha$  en suero usando kits de ELISA de TNF $\alpha$  disponibles en el mercado (\* p < 0,05 usando una prueba t de 2 colas). En la Figura 3, se presenta un gráfico de muestra que enseña los datos obtenidos usando algunos de los Compuestos de la invención en el procedimiento descrito anteriormente en el Ejemplo 7.

**Ejemplo 8: Efectos de los Compuestos de la invención sobre los niveles de NF $\kappa$ B en macrófagos RAW 264.7**

Se cultivan las células RAW 264.7 transfectadas con un indicador de luciferasa dirigido por NF $\kappa$ B en placas de 96 pocillos. Se tratan las células con vehículo (etanol al 0,1 %) o compuestos de ensayo durante 2 horas. Como control positivo para la inhibición de la señalización de NF $\kappa$ B, se tratan 6 pocillos con dexametasona 10  $\mu$ M. Después, se estimulan las células con 200 ng/ml de LPS durante 3 horas en presencia de compuestos de ensayo. Un subconjunto de pocillos tratados con vehículo permanece sin estimulación con LPS para determinar la señal basal del ensayo. La actividad de luciferasa dirigida por NF $\kappa$ B se desarrolla mediante la adición del kit de luciferasa BriteLite (Perkin-Elmer) y se mide usando un lector de placas Victor V. La actividad de NF $\kappa$ B (actividad de luciferasa) para cada tratamiento se normalizó en pocillos de vehículos tratados con LPS (% de respuesta de NF $\kappa$ B). Se usó AlamarBlue para controlar la viabilidad celular con el fin de garantizar que la inhibición de la señal de luciferasa no se debiera a la citotoxicidad del compuesto.

En la siguiente Tabla 2, se presenta una tabla de muestra que presenta los datos obtenidos usando Compuestos de la invención adicionales en el procedimiento descrito anteriormente en el Ejemplo 8.

Tabla 2

Número de compuesto	Actividad inhibidora de NF $\kappa$ B, CI <sub>50</sub> $\mu$ M
Ia-1	-
III-1	++++

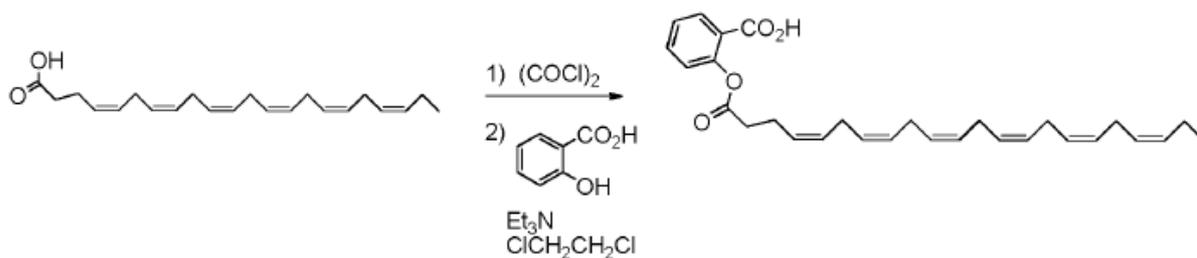
3	+++
Ic-1	-
Ic-10	++++
Ic-11	-
III-6	++
I-1	++++
9	+++
10	++
11	+++
12	+++
13	++++
14	++++
15	+++
16	-
17	++
18	-
19	-
20	-
21	-
22	+++
23	-
24	++
5-ASA	-
DHA	-
DHA + SA	-
SA	-

A - indica que el compuesto no mostró actividad inhibidora. A + indica que el compuesto mostró actividad inhibidora. Un mayor número de + indica un nivel más alto de actividad inhibidora.

## 5 Compuestos

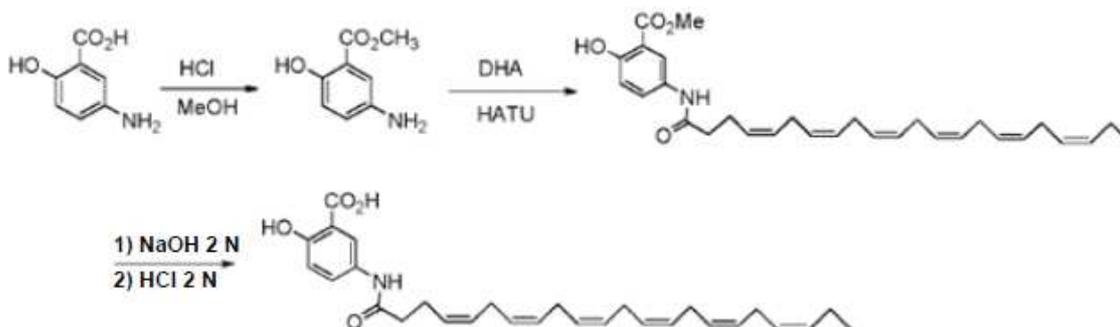
Los siguientes ejemplos de compuestos no limitantes sirven para ilustrar realizaciones adicionales de los compuestos de la invención.

### 10 Ejemplo de referencia 9: Preparación de ácido 2-((4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoiloxi)benzoico (Ia-1)



A una mezcla de DHA (6,0 g, 18,3 mmol) en dicloroetano (30 ml) y DMF (0,05 ml), se añadió lentamente cloruro de oxalilo (5,0 ml, 56,9 mmol). Se agitó la mezcla de reacción (TA, 2 h) y se concentró a presión reducida, obteniéndose DHA-Cl como un líquido amarillo. A una mezcla de ácido salicílico (3,78 g, 27,4 mmol) y  $\text{NEt}_3$  (3,80 ml, 27,5 mmol) en dicloroetano (35 ml) a 0 °C, se añadió lentamente el DHA-Cl en dicloroetano (35 ml). Se agitó la mezcla de reacción (TA, 16 h), se lavó con HCl 1 N y salmuera, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se concentró a presión reducida. El material en bruto se purificó por cromatografía en sílice (PE-EtOAc, 19:1) para proporcionar ácido 2-(docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoiloxi)benzoico (5,83 g, 71 %) como un aceite amarillo claro. Masa calculada para  $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_4 = 448,59$ ; encontrada:  $[\text{M}-\text{H}]^+ = 447,7$ .

10 **Ejemplo 10: Preparación de ácido 5-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-2-hidroxibenzoico (III-1)**

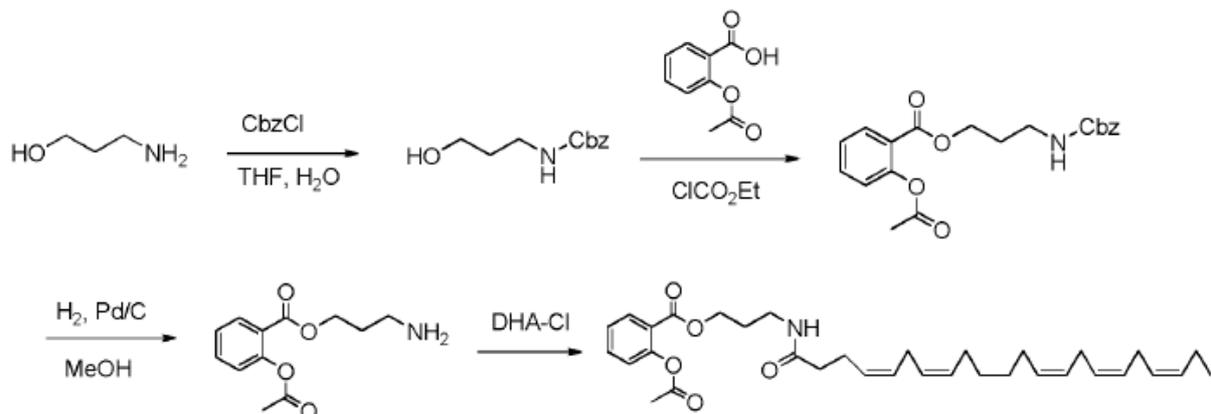


15 A una solución de HCl saturado en  $\text{CH}_3\text{OH}$  (20 ml) a TA, se añadió lentamente ácido 5-amino-2-hidroxibenzoico (2 g, 13,06 mmol). Se agitó la mezcla resultante a (TA, 16 h) y luego se calentó (reflujo, 24 h). Se enfrió la mezcla y se eliminó el disolvente a presión reducida. Se diluyó el residuo con EtOAc (50 ml) y se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  acuoso saturado. Se secó la solución orgánica sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró, se concentró a presión reducida, proporcionando 5-amino-2-hidroxibenzoato de metilo en forma de un sólido amarillo pálido (1,72 g, 78,5 %). Masa calculada para  $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_3 = 167,16$ ; encontrada:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 168,2$ .

20 A una mezcla de 5-amino-2-hidroxibenzoato de metilo (52,9 mg, 0,317 mmol), DHA (100 mg, 0,305 mmol) y  $\text{Et}_3\text{N}$  (61,7 mg, 0,61 mmol) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (2 ml), se añadió HATU (120 mg, 0,260 mmol). Se agitó la mezcla (TA, 4,5 h). Se eliminó el disolvente a presión reducida y se extrajo el residuo con EtOAc (4 x 20 ml). Se lavó la capa orgánica combinada con HCl ac. 1 N, agua,  $\text{NaHCO}_3$  al 5 %, agua, y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . Se eliminó el disolvente a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en sílice (EtOAc: PE, 1:10 a 2:3), proporcionando 5-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-2-hidroxibenzoato de metilo (3) en forma de un aceite amarillo claro (104,5 mg, 72,1 %). Masa calculada para  $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{NO}_4 = 477,63$ ; encontrada:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 478,5$ .

30 Se agitó una mezcla de 5-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-2-hidroxibenzoato de metilo (0,1 g, 0,2 mmol) en NaOH 2 N (5 ml) y  $\text{CH}_3\text{OH}$  (2,5 ml) (50 °C, 24 h). Se enfrió la mezcla y se acidificó a pH 1 con HCl ac. 2 N, luego se extrajo con EtOAc (3 x 10 ml). Se lavó la capa orgánica con salmuera, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en sílice ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -EtOAc, 20:1 a 1:1), proporcionando ácido 5-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-2-hidroxibenzoico en forma de un sólido blanco (90,4 mg, rendimiento: 90 %). Masa calculada para  $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{NO}_4 = 463,61$ ; encontrada:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 464,3$ .

35

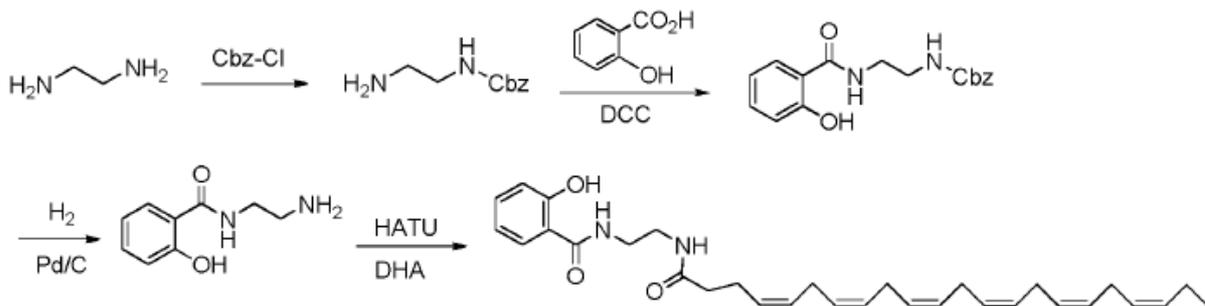
**Ejemplo de referencia 11: Preparación de 2-acetoxibenzoato de 3-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-propilo (Ic-1)**

5 A una mezcla de 3-aminopropan-1-ol (5,0 g, 67 mmol),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (8,8 g, 83 mmol) en THF (40 ml) y  $\text{H}_2\text{O}$  (130 ml) a 0 °C se añadió Cbz-Cl (14,8 g, 87 mmol). Se agitó la mezcla de reacción (TA, 1 h). Se añadieron agua (500 ml) y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (500 ml), y se separaron las capas. Se secó la capa orgánica sobre  $\text{MgSO}_4$  y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en sílice (PE:EA, 5:1), proporcionando 3-hidroxi-propilcarbamato de bencilo en forma de un sólido blanco (12,6 g, 90,5 %).

10 A una solución de ácido 2-acetoxibenzoico (2,0 g, 11,1 mmol) y trietilamina (1,8 ml, 11,1 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 ml) a 0 °C, se añadió lentamente  $\text{ClCO}_2\text{Et}$  (1,1 ml, 167 mmol). Se agitó la mezcla de reacción (0 °C, 2 h) y se filtró. Se añadió el filtrado a una solución de 3-hidroxi-propilcarbamato de bencilo (2,1 g, 10,0 mmol) y trietilamina (15 ml) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 ml). Se agitó la mezcla de reacción (TA, 4 h) y se inactivó con  $\text{H}_2\text{O}$  (50 ml). Se lavó la capa orgánica con HCl 1 M,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  saturado (30 ml) y  $\text{H}_2\text{O}$  (50 ml). Se secó la solución orgánica sobre  $\text{MgSO}_4$  y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía de sílice, (PE-EtOAc, 5:1), proporcionando 3-(benciloxicarbonilamino)propil-2-acetoxibenzoato (2,0 g, 54 %) en forma de un aceite incoloro. Masa calculada para  $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_6 = 371,38$ ; encontrada:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 372,3$ .

20 Se agitó una mezcla de 3-(benciloxicarbonilamino)propil-2-acetoxibenzoato (2,0 g, 5,4 mmol), Pd/C al 10 % (0,2 g) y  $\text{CH}_3\text{OH}$  (50 ml) en atmósfera de  $\text{H}_2$  (TA, 16 h). Se filtró la mezcla y se concentró a presión reducida, proporcionando un aceite incoloro. La purificación por cromatografía de sílice proporcionó 3-aminopropil-2-acetoxibenzoato en forma de un aceite incoloro. Masa calculada para  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_4 = 237,25$ ; encontrada:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 238,3$ .

25 A una solución de DHA (500 mg, 1,52 mmol) en  $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$  (10 ml) y una gota de DMF a 0 °C, se añadió lentamente cloruro de oxalilo (0,3 ml, 3,42 mmol). Se agitó la mezcla de reacción (TA, 2 h) y se concentró a presión reducida. Se trató el residuo con tolueno (5 ml) y se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniéndose el cloruro de ácido de DHA en forma de un líquido amarillo. A una solución de 3-aminopropil-2-acetoxibenzoato (360 mg, 1,52 mmol) y  $\text{NEt}_3$  (0,36 g, 3,56 mmol) en  $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$  (10 ml) a 0 °C, se añadió una solución de cloruro de ácido de DHA en  $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ . Se agitó la mezcla de reacción (0 °C, 2 h, luego se calentó a TA, 12 h). La purificación por cromatografía en sílice proporcionó 3-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-propil-2-acetoxibenzoato. Masa calculada para  $\text{C}_{34}\text{H}_{45}\text{NO}_5 = 547,72$ ; encontrada:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 548,3$ .

**Ejemplo de referencia 12: Preparación de N-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamidoetil)-2-hidroxibenzamida (Ic-10)**

40 Se disuelve etilendiamina (1,0 g, 16,7 mmol) en agua (3,0 ml) que contiene verde bromoaresal como indicador. Se añadió ácido metanosulfónico (2,8 g, 31 mmol) en agua (3,0 ml) hasta que se alcanzó una transición del color azul al

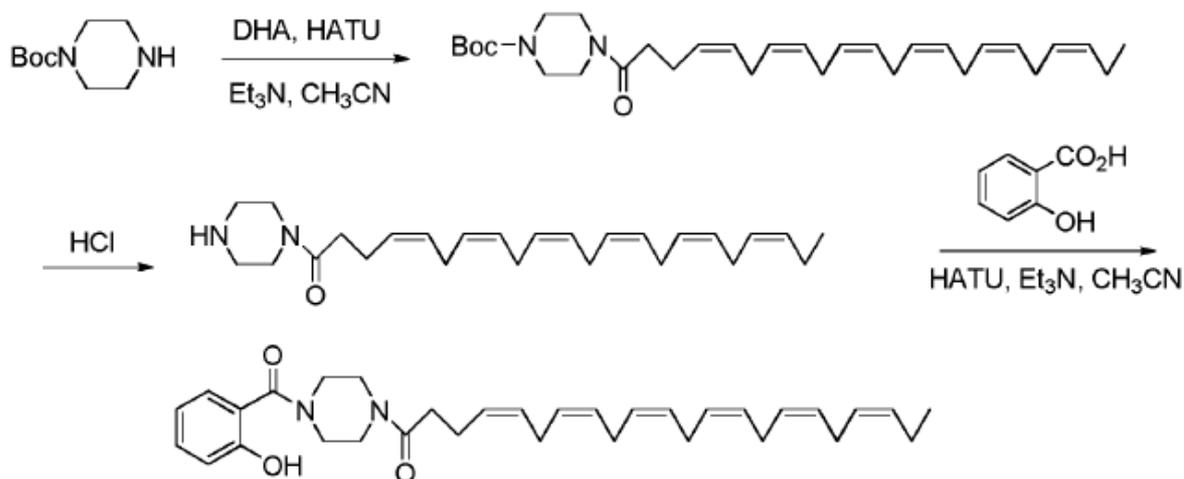
amarillo pálido. Se diluyó la solución con etanol (8,0 ml) y se agitó vigorosamente. A la mezcla, se añadió la solución de Cbz-Cl (2,8 g, 16,7 mmol) en dimetoxietano (4 ml) y AcOK acuoso al 50 % p/v (10 ml) a 20 °C simultáneamente para mantener el color amarillo pálido-verdoso del indicador. Una vez completadas las adiciones, se agitó la mezcla (TA, 1 h) y se concentró a baja temperatura al vacío para eliminar las sustancias volátiles. Se agitó el residuo con agua (20 ml) y se filtró. A continuación, se lavó la fracción filtrada con tolueno (3 x 50 ml), se basificó con exceso de NaOH acuoso al 40 % y se extrajo con tolueno (3 x 50 ml). Se lavó la capa orgánica con salmuera (50 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó, dando 2-aminoetilcarbamato de bencilo en forma de un aceite (1,65 g, 51 %). Masa calculada para C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 194,23; encontrado: [M-H]<sup>+</sup> = 193,3.

A una mezcla de 2-aminoetilcarbamato de bencilo (1,65 g, 8,5 mmol), imidazol (0,58 g, 8,5 mmol), ácido salicílico (1,73 g, 8,5 mmol) en acetato de etilo (30 ml), se añadió una solución de DCC (1,75 g, 8,5 mmol) en acetato de etilo (50 ml). Se agitó la mezcla (TA, 16 h) y se filtró. Se concentró la solución a presión reducida y el producto en bruto se purificó por cromatografía en sílice (EtOAc:PE, 0-50 %), proporcionando 2-(2-hidroxi-benzamido)etilcarbamato de bencilo en forma de un sólido blanco (1,84 g, 66 %). Masa calculada para C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> = 314,34; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 315,2.

Se agitó una mezcla de 2-(2-hidroxi-benzamido)etilcarbamato de bencilo (1,84 g, 5,86 mmol) y Pd/C (0,18 g) en MeOH (30 ml) en una atmósfera de H<sub>2</sub> (16 h). Se filtró la mezcla y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en sílice (EtOAc-MeOH-NH<sub>3</sub>OH (5:1: 0,01), proporcionando N-2-(aminoetil)-2-hidroxi-benzamida en forma de un polvo blanco (0,68 g, 65 %). Masa calculada para C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 180,20; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 181,2.

A una mezcla de N-2-(aminoetil)-2-hidroxi-benzamida (58 mg, 0,32 mmol), DHA (100 mg, 0,3 mmol) y Et<sub>3</sub>N (0,1 ml, 0,7 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (2 ml), se añadió HATU (115 mg, 0,3 mmol). Se agitó la mezcla (TA, 24 h) y se concentró a presión reducida. El residuo se trató con salmuera (15 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con HCl 1 M, salmuera, NaHCO<sub>3</sub> al 5 % y salmuera. Se secó la solución orgánica sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en sílice (EtOAc: PE, 1:1), proporcionando N-(2-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamidoetil)-2-hidroxi-benzamida (94 mg, 64 %) en forma de un aceite amarillo claro. Masa calculada para C<sub>31</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 490,68; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 491,4.

**Ejemplo de referencia 13: Preparación de (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-1-(4-(2-hidroxi-benzoil)piperazin-1-il)docosa-4,7,10,13,16,19-hexaen-1-ona (lc-11)**



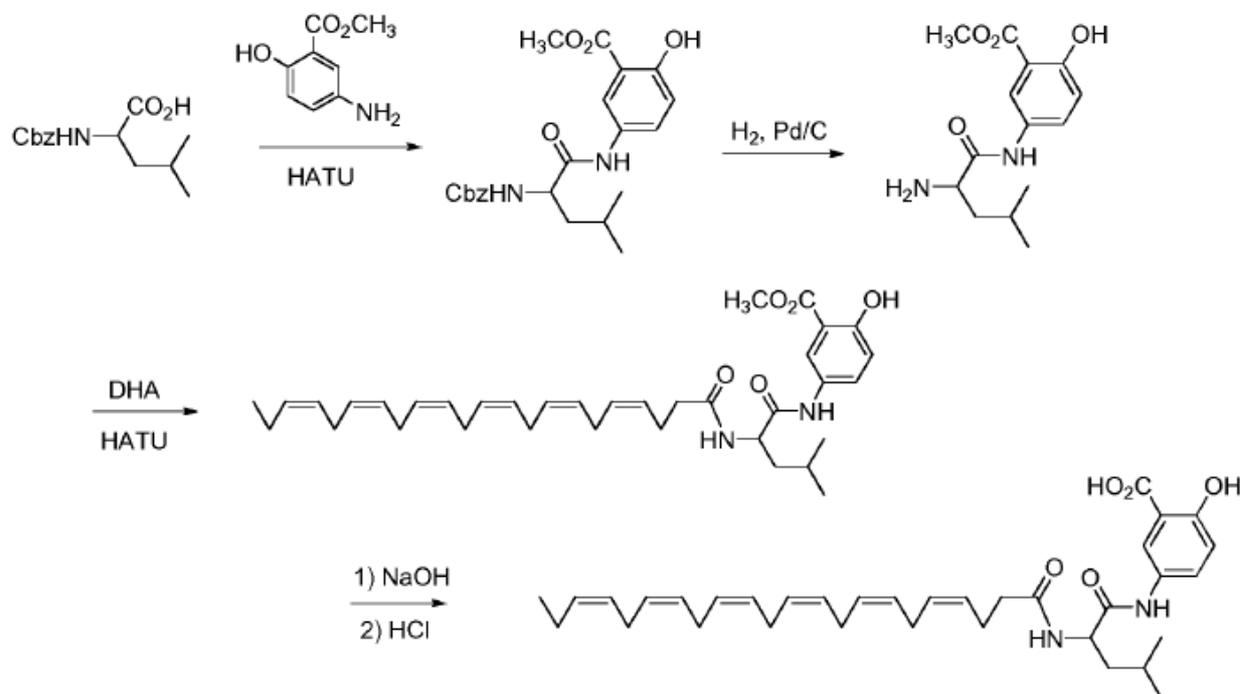
A una mezcla de *tert*-butilpiperazin-1-carboxilato (0,57 g, 3,05 mmol), DHA (1 g, 3,05 mmol) y Et<sub>3</sub>N (0,61 g, 6,1 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (20 ml), se añadió HATU (1,16 g, 3,05 mmol). Se agitó la mezcla (TA, 16 h). Se eliminó el disolvente a presión reducida y se extrajo el residuo con EtOAc (4 x 30 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas sucesivamente con HCl acuoso 1 N, agua, NaHCO<sub>3</sub> al 5 % y agua, y se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. Se eliminó el disolvente a presión reducida y el producto en bruto se purificó por cromatografía en sílice (EA-PE, 1:10 a 1:1), proporcionando *tert*-butil-4-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoilpiperazin-1-carboxilato (1,5 g, 99 %) en forma de un aceite incoloro. Masa calculada para C<sub>31</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 496,72; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 497,6.

A una mezcla de *tert*-butil-4-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoilpiperazin-1-carboxilato (1,5 g, 3 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml) a 0 °C, se añadió CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H (7 ml, 91 mmol). Se agitó la solución de mezcla (0 °C, 2 h) y luego se añadió Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10 % para ajustar el pH = 10. La mezcla se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 30 ml). Se secaron las capas orgánicas combinadas sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en sílice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH, 20: 1), proporcionando 1-(piperazin-1-il)docosa-4,7,10,13,16,19-hexaen-1-

ona (1,17 g, 97,5 %) en forma de un aceite incoloro. Masa calculada para  $C_{26}H_{40}N_2O = 396,61$ ; encontrada:  $[M+H]^+ = 396,7; 398,2$ .

5 A una mezcla de 1-(piperazin-1-il)docosa-4,7,10,13,16,19-hexen-1-ona (1,17 g, 2,95 mmol), ácido salicílico (0,61 g, 4,43 mmol) y  $Et_3N$  (0,89 g, 8,85 mmol) en  $CH_3CN$  (10 ml), se añadió HATU (1,68 g, 4,43 mmol). Se agitó la mezcla (TA, 16 h). Se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo se extrajo con  $EtOAc$  (4 x 50 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas sucesivamente con  $HCl$  acuoso 1 N, agua,  $NaHCO_3$  al 5 % y agua, y se secaron sobre  $MgSO_4$ . Se eliminó el disolvente a presión reducida. La purificación del producto en bruto mediante HPLC preparativa dio lugar a 1-(4-(2-hidroxibenzoil)piperazin-1-il)docosa-4,7,10,13,16,19-hexen-1-ona (300 mg, 19,6 %) en forma de un aceite amarillo claro. Masa calculada para  $C_{33}H_{44}N_2O_3 = 516,71$ ; encontrada:  $[M+H]^+ = 517,6$ .

**Ejemplo 14: Preparación de ácido 5-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-4-metilpentanamido)-2-hidroxibenzoico (III-6)**



15 Se disolvió una mezcla de ácido 2-(benciloxycarbonilamino)-4-metilpentanoico (1 g, 3,8 mmol), 5-amino-2-hidroxibenzoato de metilo (0,66 g, 3,95 mmol) y  $Et_3N$  (0,76 g, 7,6 mmol) en  $CH_3CN$  (10 ml) y HATU (1,503 g, 3,95 mmol). Se agitó la mezcla (TA, 16 h). Se eliminó el disolvente a presión reducida. Se añadió salmuera (50 ml) al residuo resultante, y se extrajo la mezcla con  $EtOAc$  (3 x 50 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas sucesivamente con  $HCl$  ac. 2 N (3 x 50 ml), salmuera (5 ml),  $NaHCO_3$  al 5 % (50 ml x 3), salmuera (50 ml), se secó sobre  $MgSO_4$ , se filtró y se concentró a presión reducida. El material en bruto se purificó por cromatografía en sílice sobre  $(CH_2Cl_2)$ , dando 5-(2-(benciloxycarbonilamino)-4-metilpentanamido)-2-hidroxibenzoato de metilo en forma de un sólido blanco (0,81 g, 51,8 %).

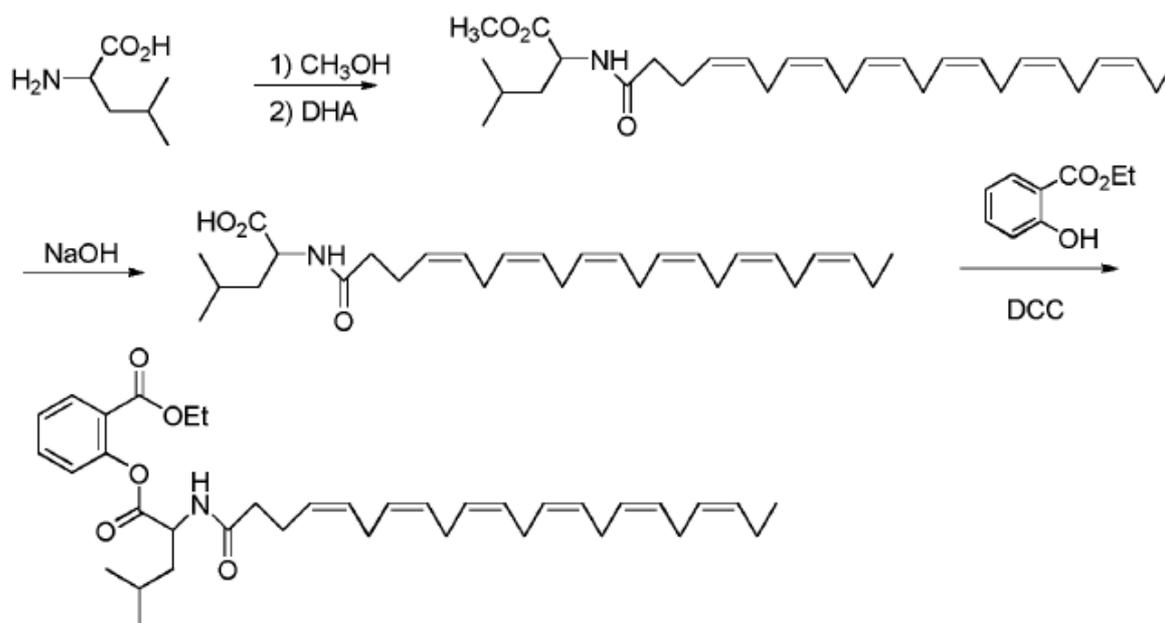
25 Se agitó la mezcla de 5-(2-(benciloxycarbonilamino)-4-metilpentanamido)-2-hidroxibenzoato (0,81 g, 1,9 mmol) y 0,1 g de  $Pd/C$  en  $MeOH$  (15 ml) en  $H_2$  (TA, 16 h). Se filtró la mezcla y la fracción filtrada se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en sílice ( $MeOH/DCM$ , del 0 al 5 %), proporcionando 5-(2-amino-4-metilpentanamido)-2-hidroxibenzoato de metilo en forma de un sólido blanco (0,53 g, 90 %). Masa calculada para  $C_{14}H_{20}N_2O_4 = 280,32$ ; encontrada:  $[M+H]^+ = 281,2$ .

30 A una solución de 5-(2-amino-4-metilpentanamido)-2-hidroxibenzoato de metilo (85 mg, 0,30 mmol), DHA (100 mg, 0,30 mmol),  $Et_3N$  (0,1 ml, 0,71 mmol) en  $CH_3CN$  (2 ml), se añadió HATU (114 mg, 0,30 mmol). Se agitó la mezcla (TA, 16 h) y se eliminó el disolvente a presión reducida. Se diluyó el residuo con salmuera (20 ml) y se extrajo con acetato de etilo (50 ml). Se lavó la capa orgánica combinada con  $HCl$  1 M (20 ml), salmuera (2 ml),  $NaHCO_3$  acuoso al 5 % (20 ml) y salmuera (20 ml), se secaron sobre  $MgSO_4$  y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en sílice ( $EtOAc/DCM$ , del 0 al 10 %), proporcionando 5-(2-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-4-metilpentanamido)-2-hidroxibenzoato de metilo en forma de un aceite amarillo claro (155 mg, 87 %). Masa calculada para  $C_{36}H_{50}N_2O_5 = 590,79$ ; encontrada:  $[M+H]^+ = 591,6$ .

40 A una solución de 5-(2-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-4-metilpentanamido)-2-hidroxibenzoato de metilo (155 mg, 0,26 mmol) en  $MeOH$  (3 ml), se añadió  $NaOH$  2 M (5 ml). Se calentó la mezcla (45-50 °C, 16 h) y luego se enfrió

a TA. Se añadió HCl 2 M gota a gota para ajustar a pH = 1. Entonces, se extrajo la mezcla con EA (3 x 20 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en sílice (MeOH/DCM, 0-10 %), proporcionando ácido 5-(2-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-4-metilpentanamido)-2-hidroxibenzoico en forma de un aceite amarillo claro (92 mg, 61 %). Masa calculada para C<sub>15</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> = 576,77; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 577,3.

**Ejemplo de referencia 15: Preparación de 2-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-4-metilpentanoiloxi)benzoato de etilo (I-1)**

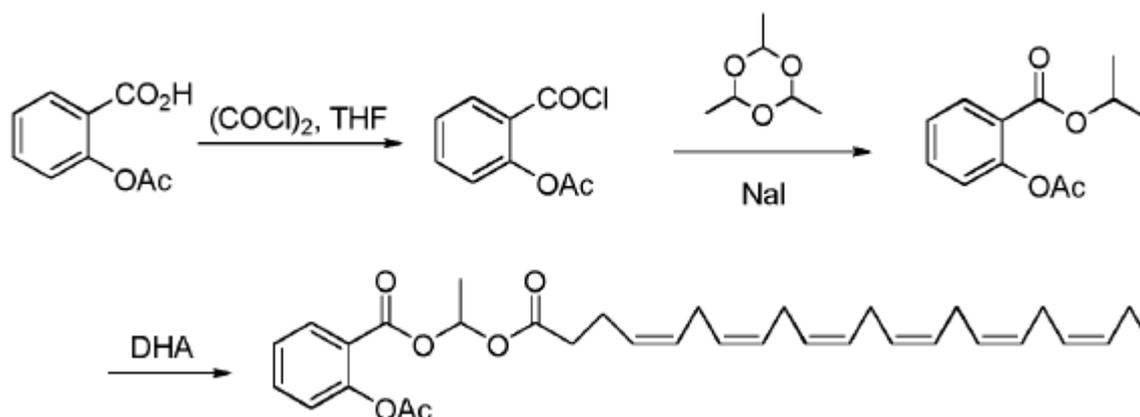


Se añadió 2-amino-4-metilpentanoico (5,0 g 38,2 mmol) lentamente a HCl/MeOH sat. (50 ml). Se agitó la mezcla (TA, 5 h) y luego se calentó a reflujo (16 h). Después de la reacción, se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se diluyó con agua (50 ml), luego se añadió NaHCO<sub>3</sub> para ajustar el pH = 7. La mezcla se extrajo después con DCM (3 x 50 ml), se secaron las capas orgánicas combinadas sobre MgSO<sub>4</sub>, se concentraron a presión reducida, proporcionando 2-amino-4-metilpentanoato de metilo en forma de un líquido incoloro (5,3 g, 96 %). Masa calculada para C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub> = 145,20; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 145,9. El producto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

A una solución de 2-amino-4-metilpentanoato de metilo (250 mg, 1,6 mmol), DHA (510 mg, 1,5 mmol), Et<sub>3</sub>N (0,42 ml, 3 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (20 ml) a temperatura ambiente, se añadió HATU (570 mg, 1,5 mmol). Se agitó la mezcla (TA, 16 h) y se eliminó el disolvente a presión reducida. Se diluyó el residuo con salmuera y se extrajo con EtOAc. Se lavó la capa orgánica con HCl 1 M (50 ml), salmuera (50 ml), NaHCO<sub>3</sub> al 5 % (50 ml) y salmuera (50 ml). Se secó la solución orgánica sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en sílice (EtOAc:PE, 0-25 %), proporcionando 2-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-4-metilpentanoato de metilo (0,61 g, 85 %) en forma de un aceite amarillo claro. Masa calculada para C<sub>29</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>3</sub> = 455,67; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 456,2.

A una solución de 2-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-4-metilpentanoato de metilo (610 mg, 1,34 mmol) en MeOH (15 ml), se añadió NaOH 2 M (30 ml). Se calentó la mezcla de reacción (50 °C, 16 h), se enfrió (TA) y se acidificó con HCl 2 M a pH = 1. La mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en sílice, (MeOH: DCM, 0-10 %), proporcionando ácido 2-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-4-metilpentanoico (0,51 g, 89 %) en forma de un sólido amarillo claro. Masa calculada para C<sub>28</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>3</sub> = 441,65; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 442,1.

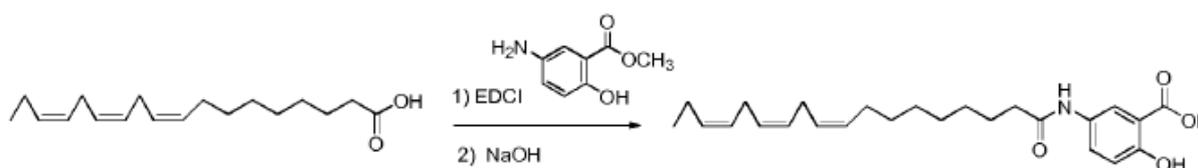
A una solución de ácido 2-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-4-metilpentanoico (50 mg, 0,11 mmol) y 2-hidroxibenzoato de etilo (19 mg, 0,11 mmol) en CH<sub>3</sub>CN/THF (1:1, 0,5 ml) a -10 °C, se añadió DCC (12 mg, 0,11 mmol) y DMAP (1 mg). Se agitó la mezcla (TA, 16 h), se filtró y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en sílice (EtOAc:PE, 0-20 %), proporcionando 2-(2-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-4-metilpentanoiloxi)benzoato de etilo (40 mg, 67 %) como aceite incoloro. Masa calculada para C<sub>37</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>5</sub> = 589,80; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 590,4.

**Ejemplo de referencia 16: Preparación de 1-((4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoiloxi)etil-2-acetoxibenzoato (9)**

5 A una solución del compuesto ácido 2-acetoxibenzoico (1,0 g, 5,5 mmol) en THF (30 ml), se añadió  $(\text{COCl})_2$  (0,8 ml, 9,1 mmol) a 0 °C. Se calentó la mezcla (a reflujo, 1,5 h) y se concentró a presión reducida, proporcionando acetato de 2-(clorocarbonilo)fenilo.

10 A una mezcla de 2,4,6-trimetil-1,5,5-trioxano (245 mg, 1,85 mmol) y NaI (0,972 g, 6,48 mmol) en DCM (15 ml), se añadió una solución de acetato de 2-(clorocarbonilo)fenilo en DCM (5 ml, 0 °C). Se dejó la mezcla resultante en agitación (TA, 16 h). Se filtró la mezcla y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en sílice (EtOAc-PE, 0-10 %), proporcionando 1-yodoetil-2-acetoxibenzoato (0,75 g, 40 %) en forma de un aceite amarillo claro.

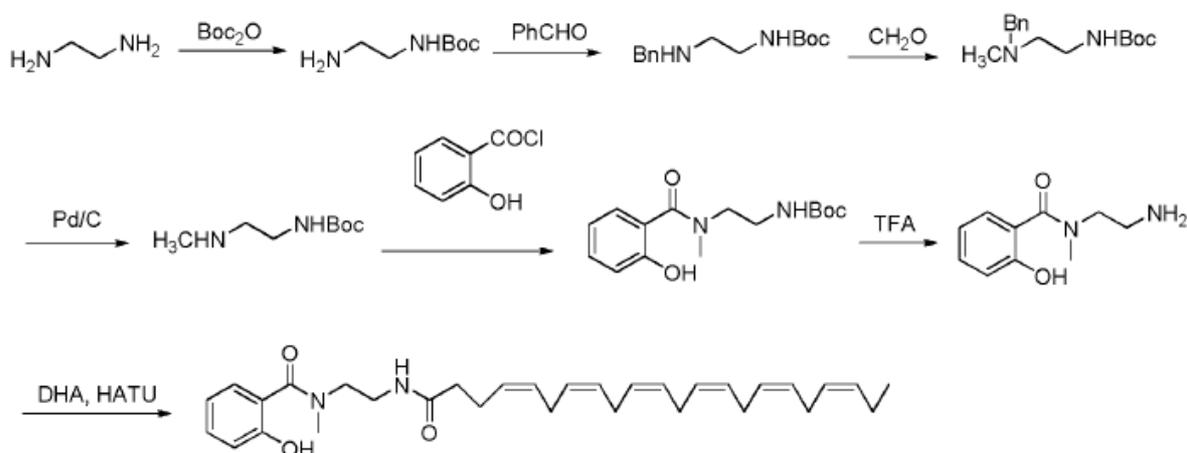
15 A una solución de DHA (0,1 g, 0,3 mmol) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (1 ml), se añadió  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (41,4 mg, 0,3 mmol) seguido de  $\text{Bu}_4\text{NBr}$  (96,6 mg, 0,3 mmol). Se agitó la mezcla (TA, 0,5 h) y se enfrió a 0 °C. A esto, se añadió 1-yodoetil-2-acetoxibenzoato (0,1 g, 0,3 mmol) y se agitó la mezcla (TA, 16 h). Se filtró la mezcla, se lavó con salmuera y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en sílice (PE: EtOAc, 20:1-15:1), proporcionando 1-(docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoiloxi)etil-2-acetoxibenzoato (85,3 mg, 53,3 %) en forma de un aceite amarillo claro. Masa calculada para  $\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{O}_6$  = 534,68; encontrada:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  = 557,2.

**Ejemplo 17: Preparación de ácido 2-hidroxi-5-(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienamidobenzoico (III-7)**

25 A una solución de ácido (9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoico (1,66 g, 5,98 mmol) y 5-amino-2-hidroxibenzoato de metilo (1 g, 5,98 mmol) en cloruro de metileno (100 ml), se añadieron clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (1,16 g, 6,0 mmol) y dimetilaminopiridina (100 mg). Se agitó la mezcla en  $\text{N}_2$  (14 h), y luego se diluyó con cloruro de metileno (100 ml) y se lavó sucesivamente con HCl 3 N, solución saturada de bicarbonato sódico y solución saturada de cloruro sódico. Se secó la capa orgánica se sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró, dando la amida correspondiente, 2,0 gramos.

35 A la amida, se añadieron NaOH 2 N (100 ml) y metanol (100 ml), y se calentó la suspensión resultante a 40 °C, y tras 12 horas, se añadieron 500 mg más de NaOH, y se agitó la reacción a 40 °C (12 horas). Se enfrió la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente, se acidificó con HCl 3 N y se extrajo con acetato de etilo (300 ml). Se lavó la fase orgánica sucesivamente con agua y cloruro sódico sat., se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró, dando el producto de ácido 2-hidroxi-5-(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienamidobenzoico (1,5 gramos, 61 %). Masa calculada para  $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{NO}_4$  = 413,55; encontrada:  $[\text{M}-\text{H}]^+$  = 412,3.

40

**Ejemplo de referencia 18: Preparación de N-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamidoetil)-2-hidroxi-N-metilbenzamida (11)**

5 A una solución de etilendiamina (20 ml, 0,28 mol) en  $\text{CHCl}_3$  (300 ml) a  $0^\circ\text{C}$ , se añadió lentamente una solución de  $\text{BoC}_2\text{O}$  (6,2 g, 0,028 mol) en  $\text{CHCl}_3$  (150 ml). La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de 16 h, se filtró la solución y se lavó con salmuera (6 x 100 ml) y agua (100 ml). Se secó la solución orgánica sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se concentró a presión reducida, proporcionando 2-aminoetilcarbamato de *terc*-butilo (3,7 g, 78 %) en forma de un aceite incoloro.

10 A una solución de 2-aminoetilcarbamato de *terc*-butilo (3,7 g, 22,3 mmol), benzaldehído (2,36 g, 22,3 mmol) y  $\text{MgSO}_4$  (1,33 g) en 1,2-dicloroetano (300 ml) y  $\text{Et}_3\text{N}$  (3,1 ml, 22,3 mmol) a TA, se añadió  $\text{NaHB}(\text{AcO})_3$ . Se agitó la mezcla (TA, 16 h) y se filtró. Se lavó la solución con  $\text{NaHCO}_3$  saturado (200 ml), se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con  $\text{MeOH-DCM}$  (0-10 %), proporcionando 2-(bencilamino)etilcarbamato de *terc*-butilo (1,4 g, 23 %). Masa calculada para  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2 = 250,34$ ; encontrada:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 251,3$ .

15 A una mezcla de 2-(bencilamino)etilcarbamato de *terc*-butilo (2,8 g, 11,2 mmol) y  $\text{CH}_2\text{O}$  acuoso al 37 % (1,0 ml, 11,2 mmol) en 1, 2-dicloroetano (35 ml) a temperatura ambiente, se añadió  $\text{NaHB}(\text{AcO})_3$  (3,7 g, 11,2 mmol). Se agitó la mezcla (TA, 16 h), se diluyó con  $\text{NaHCO}_3$  acuoso saturado (400 ml) y se extrajo con EA (3 x 300 ml). Se secó la capa orgánica sobre  $\text{MgSO}_4$  y se concentró a presión reducida, proporcionando 2-(bencil(metil) amino)etilcarbamato de *terc*-butilo (1,38 g, 46,8 %). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,25 (m, 5H, CH), 3,5 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,3 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,48 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,2 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,4 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ).

20 Se agitó una mezcla de 2-(bencil(metil)amino)etilcarbamato de *terc*-butilo (1,20 g, 4,54 mmol), Pd/C al 10 % (0,90 g) y MeOH (60 ml) en una atmósfera de  $\text{H}_2$  (0,8 MPa, TA, 16 h). Se filtró la mezcla y se concentró a presión reducida. El material en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con  $\text{NH}_3$  saturado en  $\text{MeOH-DCM}$  (0-10 %), proporcionando 2-(metilamino)etilcarbamato de *terc*-butilo en forma de un aceite incoloro (0,54 g, 68,3 %). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3,25 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,7 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,49 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,49 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ).

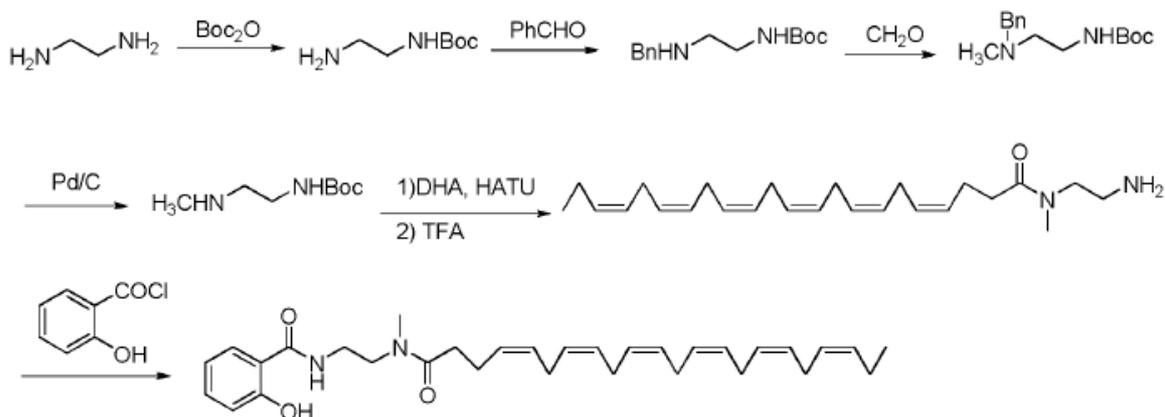
25 A una mezcla de 2-(metilamino)etilcarbamato de *terc*-butilo (0,368 g, 2 mmol), cloruro de 2-hidroxibenzoílo (0,276 g, 2 mmol) e imidazol (0,136 g, 2 mmol) en acetato de etilo (8 ml) a  $0^\circ\text{C}$ , se añadió lentamente una solución de DCC (0,412 g, 2 mmol) en acetato de etilo (2 ml). Se agitó la mezcla (TA, 16 h), se filtró y se concentró a presión reducida. El material en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo/éter de petróleo (20-50 %), proporcionando 2-(2-hidroxi-N-metilbenzamido)etilcarbamato de *terc*-butilo (0,2 g, 34 %) en forma de un aceite incoloro. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,5 (m, 2H, CH), 7,0 (d, 1H, CH), 6,8 (d, 1H, CH), 3,7 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,48 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,2 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,5 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ).

30 A una solución de 2-(2-hidroxi-N-metilbenzamido)etilcarbamato de *terc*-butilo (0,2 g, 0,68 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 ml) a  $0^\circ\text{C}$ , se añadió ácido trifluoroacético (1,8 ml, 23,4 mmol). Se agitó la mezcla ( $0^\circ\text{C}$ , 16 h), se concentró a presión reducida y se neutralizó con  $\text{NH}_3$  saturado en  $\text{CH}_3\text{OH}$ . La mezcla se concentró a presión reducida, proporcionando N-(2-aminoetil)-2-hidroxi-N-metilbenzamida en forma de un aceite incoloro (0,5 g). Este compuesto se usó en la siguiente etapa sin más purificación. Masa calculada para  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 = 194,23$ ; encontrada:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 195,1$ .

35 A una mezcla de la N-(2-aminoetil)-2-hidroxi-N-metilbenzamida en bruto, DHA (100 mg, 0,3 mmol) y  $\text{Et}_3\text{N}$  (92,3 mg, 0,9 mmol) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (2 ml) a TA, se añadió HATU (115,8 mg, 0,3 mmol). Se agitó la mezcla (TA, 16 h) y se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con 50 ml de acetato de etilo, se lavó con salmuera, HCl 1 N,  $\text{NaHCO}_3$  saturado y salmuera. Se secó la capa orgánica sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se concentró a presión reducida. El

residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-EA (1:1), proporcionando N-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamidoetil)-2-hidroxi-N-metilbenzamida (40 mg, 26 %) en forma de un aceite amarillo claro. Masa calculada para C<sub>12</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 504,70; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 505,5.

5 **Ejemplo de referencia 19: Preparación de 2-hidroxi-N-(2-((4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-N-metildocosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido)etil)benzamida (12)**

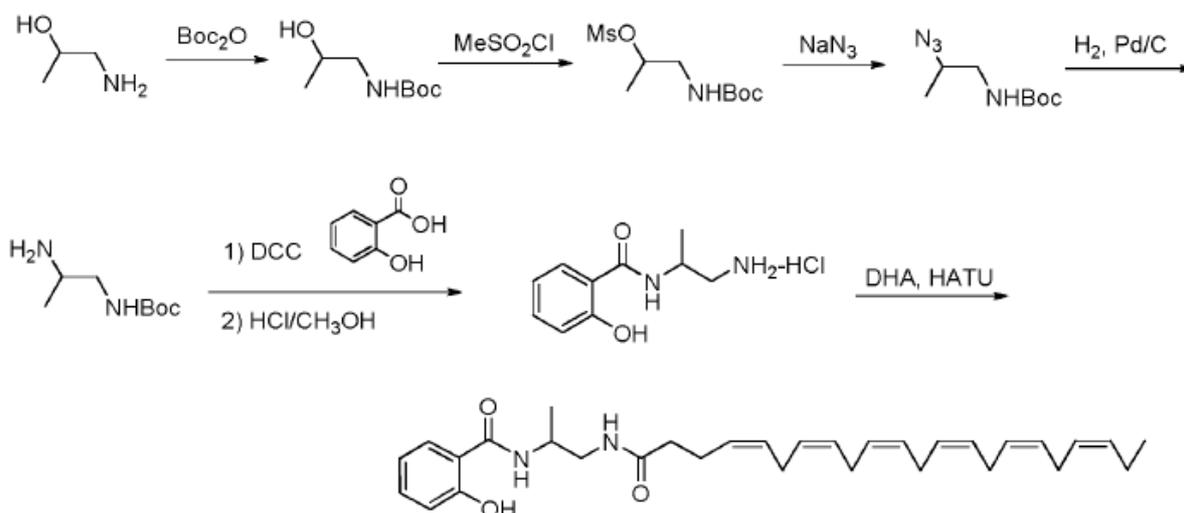


10 A una solución de 2-(metilamino)etilcarbamato de *tert*-butilo (0,82 g, 4,7 mmol), preparado como se ha descrito previamente, DHA (1,55 g, 4,7 mmol) y Et<sub>3</sub>N (1,32 ml, 9,4 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (40 ml), se añadió HATU (1,79 g, 4,7 mmol). Se agitó la mezcla (TA, 16 h) y se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con salmuera (150 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 150 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con NaHCO<sub>3</sub> saturado (150 ml) y salmuera (15 ml), se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con EA-PE (0-50 %), proporcionando 2-((4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-N-metildocosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido)etilcarbamato (1,71 g, 77 %) en forma de un aceite amarillo claro. Masa calculada para C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 484,71; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 485,6.

20 A una solución de 2-((4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-N-metildocosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido)etilcarbamato de *tert*-butilo (1,71 g, 3,5 mmol) en diclorometano (50 ml) a 0 °C, se añadió lentamente TFA (17 ml). Se agitó la mezcla (0 °C, 2 h), se basificó a pH 10 con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acuoso saturado y se extrajo con EA (3 x 150 ml). Se secaron las capas orgánicas combinadas sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentraron a presión reducida, proporcionando (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-N-(2-aminoetil)-N-metildocosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamida (1,31 g, 97 %) en forma de un aceite amarillo claro.

25 A una solución de (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-N-(2-aminoetil)-N-metildocosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamida (104 mg, 0,27 mmol), cloruro de 2-hidroxibenzoilo (37 mg, 0,27 mmol) e imidazol (19 mg, 0,27 mmol) en EA (4 ml) a 0 °C, se añadió gota a gota una solución de DCC (0,57 g, 0,27 mmol) en EA (4 ml). Se agitó la mezcla (TA, 16 h), se filtró y se concentró a presión reducida. El material en bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con EA-PE (1:3), proporcionando 2-hidroxi-N-(2-((4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-N-metildocosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido)etil)benzamida (100 mg, 73 %) en forma de un aceite incoloro. Masa calculada para C<sub>32</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 504,70; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 505,5.

30

**Ejemplo de referencia 20: Preparación de N-(1-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido)propan-2-il)-2-hidroxibenzamida (13)**

5 A una solución de 1-aminopropan-2-ol (7,5 g, 0,1 mol) en THF-H<sub>2</sub>O (1:1, 150 ml) a TA, se añadió lentamente una solución de Boc<sub>2</sub>O (21,8 g, 0,1 mol) en THF (50 ml). Se agitó la mezcla (TA, 2 h) y se concentró a presión reducida. El residuo se extrajo con EA (2 x 100 ml), y se lavaron las capas orgánicas combinadas con ácido cítrico (0,5 M, 2 x 100 ml) y salmuera (100 ml). Se secó la solución orgánica sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a presión reducida, proporcionando 2-hidroxipropilcarbamato de *tert*-butilo (15,3 g, 87,4 %) en forma de un aceite incoloro. Masa calculada para C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub> = 175,23; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 176,3.

15 A una solución de 2-hidroxipropilcarbamato de *tert*-butilo (14,3 g, 81,7 mmol) y Et<sub>3</sub>N (35,6 ml, 245,1 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (250 ml) a 0 °C, se añadió lentamente una solución de cloruro de metanosulfonilo (9,5 ml, 122,6 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (250 ml). Se agitó la mezcla a 0 °C durante 2 h, se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 ml) y se lavó con agua, HCl 1 N, NaHCO<sub>3</sub> al 5 % y salmuera. Se secó la capa orgánica sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron a presión reducida, proporcionando metanosulfonato de 1-(*tert*-butoxicarbonilamino)propan-2-ilo (19,5 g, 94 %) en forma de un aceite amarillo claro. Masa calculada para C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>S = 253,32; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 254,2.

20 A una solución de metanosulfonato de 1-(*tert*-butoxicarbonilamino)propan-2-ilo (10,0 g, 39,5 mmol) en DMF (100 ml) a TA, se añadió NaN<sub>3</sub> (7,7 g, 118,5 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 85 °C durante 24 h, se enfrió a TA, se diluyó con agua fría (300 ml) y se extrajo con éter dietílico (3 x 300 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con NaHCO<sub>3</sub> saturado (2 x 200 ml) y salmuera (200 ml), se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron a presión reducida, proporcionando 2-azidopropilcarbamato de *tert*-butilo (7,0 g, 88,6 %) en forma de un aceite amarillo claro. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 3,6 (m, 1H, CH), 3,25 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2,9 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 1,49 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1,2 (d, 3H, CH<sub>3</sub>).

30 Se agitó una mezcla de 2-azidopropilcarbamato de *tert*-butilo (7,0 g, 3,6 mmol) proporcionado y Pd/C (0,7 g) en MeOH (250 ml) en una atmósfera de H<sub>2</sub> (1 atm) (TA, 16 h). Se filtró la mezcla y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con NH<sub>3</sub> saturado en MeOH-DCM (0-10 %), proporcionando 2-aminopropilcarbamato de *tert*-butilo (5,1 g, 83,7 %) en forma de un aceite amarillo claro. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 4,9 (s a, 1H, NH), 3,15 (m, 1H, CH), 3,0 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2,8 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 1,7 (s a, 2H, NH<sub>2</sub>), 1,5 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1,0 (d, 3H, CH<sub>3</sub>).

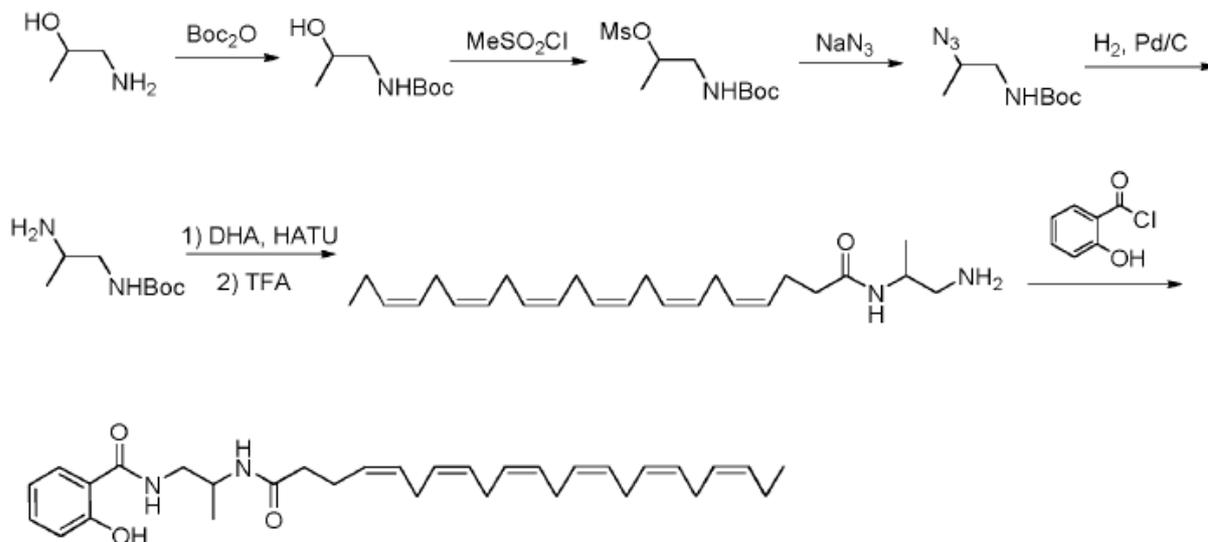
35 A una solución de 2-aminopropilcarbamato de *tert*-butilo (3,6 g, 20,6 mmol), ácido 2-hidroxibenzoico (2,79 g, 20,6 mmol) e imidazol (1,41 g, 20,6 mmol) en EtOAc (100 ml) a 0 °C, se añadió lentamente una solución de DCC (4,26 g, 20,6 mmol) en EtOAc (50 ml). Se agitó la mezcla de reacción (TA, 16 h), se filtró y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre sílice, EtO Ac/éter de petróleo (0-20 %), proporcionando 2-(2-hidroxibenzamido)propilcarbamato de *tert*-butilo (2,4 g, 40 %) en forma de un sólido blanco.

40 Se agitó una mezcla de 2-(2-hidroxibenzamido)propilcarbamato de *tert*-butilo (2,4 g, 8,16 mmol) en HCl-MeOH saturado (50 ml) (TA, 2 h) y se concentró a presión reducida, proporcionando N-(1-aminopropan-2-il)-2-hidroxibenzamida (1,8 g, 96 %) en forma de un sólido blanco. Masa calculada para C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 194,23; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 195,2.

45 A una solución de N-(1-aminopropan-2-il)-2-hidroxibenzamida (1,7 g, 7,3 mmol), DHA (2,0 g, 6,1 mmol) y Et<sub>3</sub>N (3,1 ml, 21,9 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (50 ml) a 0 °C, se añadió HATU (2,77 g, 7,3 mmol). Se dejó calentar la mezcla a TA, se

agitó durante 16 h, y se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con salmuera (150 ml) y se extrajo con EA (2 x 200 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con HCl 1 N (2 x 150 ml), NaHCO<sub>3</sub> saturado (2 x 150 ml) y salmuera (150 ml), se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con EA-PE (0-25 %), proporcionando el producto en bruto, que se purificó adicionalmente mediante HPLC prep., proporcionando N-(1-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido)propan-2-il)-2-hidroxi-benzamida (1,31 g, 42,6 %) en forma de un aceite amarillo claro. Masa calculada para C<sub>32</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 504,70; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 505,5.

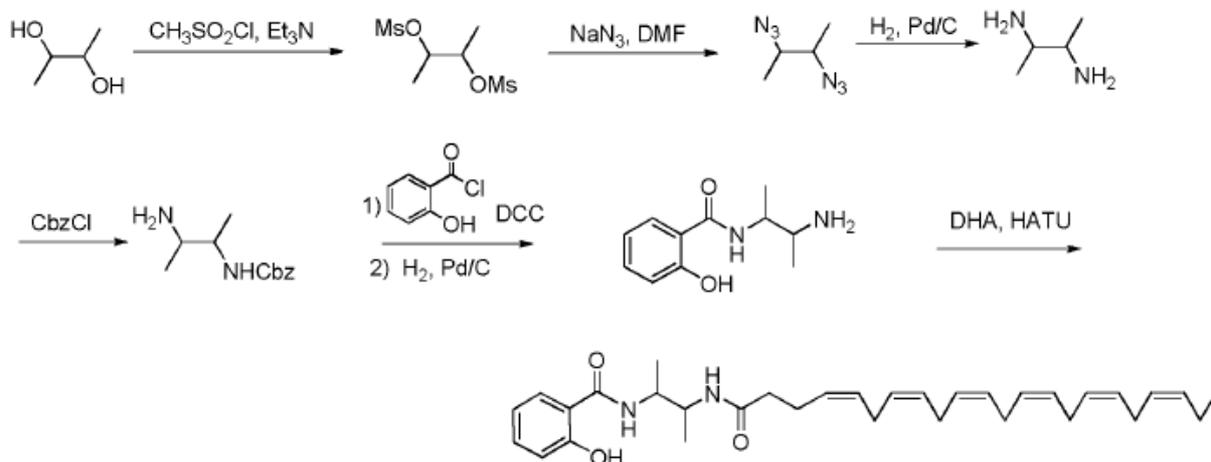
**Ejemplo de referencia 21: Preparación de N-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido)propil)-2-hidroxi-benzamida (14)**



A una solución de 2-aminopropilcarbamato de *tert*-butilo (1,06 g, 6,09 mmol, preparado como se ha descrito previamente), DHA (2,0 g, 6,09 mmol) y Et<sub>3</sub>N (1,7 ml, 12,8 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (40 ml) a 0 °C, se añadió HATU (2,31 g, 6,09 mmol). Se agitó la mezcla (TA, 16 h) y se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con salmuera (100 ml) y se extrajo con EA (2 x 100 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con NaHCO<sub>3</sub> saturado (100 ml) y salmuera (100 ml), se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con EA-PE (0-25 %), proporcionando 2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido)propilcarbamato de *tert*-butilo (2,1 g, 70 %) en forma de un aceite amarillo claro. Masa calculada para C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 484,71; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 485,6.

A una solución de 2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido)propilcarbamato de *tert*-butilo (2,10 g, 4,34 mmol) en DCM (100 ml) a 0 °C, se añadió lentamente TFA (30 ml). Se agitó la mezcla (0 °C, 2 h), se calentó a TA y se agitó (16 h). La mezcla se basificó a pH = 10 con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acuoso saturado y se extrajo con EA (2 x 200 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron a presión reducida, proporcionando (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-N-(1-aminopropan-2-il)docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamida (1,60 g, 98 %) en forma de un aceite amarillo claro. Masa calculada para C<sub>25</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O = 384,6; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 385,2.

A una solución de (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-N-(1-aminopropan-2-il)docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamida (1,60 g, 4,2 mmol), ácido 2-hidroxi-benzoico (0,57 g, 4,2 mmol) e imidazol (0,29 g, 4,2 mmol) en EA (40 ml) a 0 °C, se añadió una solución de DCC (0,87 g, 4,2 mmol) en EA (40 ml). Se dejó calentar la mezcla hasta la TA, se agitó (16 h) y se filtró. Se eliminó el disolvente a presión reducida y el producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con EA-PE (0-50 %), proporcionando N-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido)propil)-2-hidroxi-benzamida (1,07 g, 50,5 %) en forma de un aceite amarillo claro. Masa calculada para C<sub>32</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 504,70; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 505,5.

**Ejemplo de referencia 22: Preparación de N-(3-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido)butan-2-il)-2-hidroxibenzamida (15)**

5 A una solución de 2,3-diol de butano (15 g, 0,166 mol) y  $\text{Et}_3\text{N}$  (57,7 ml, 0,415 mol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (150 ml) a 0 °C, se añadió lentamente una solución de  $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$  (32,1 ml, 0,415 mol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (75 ml). Se agitó la mezcla a 0 °C durante 2 h y se diluyó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La mezcla se lavó con agua, HCl 1 N,  $\text{NaHCO}_3$  acuoso al 5 % y salmuera. Se secó la capa orgánica sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se concentró a presión reducida, proporcionando dimetanosulfonato de butano-2,3-diilo (40 g, 98 %) en forma de un aceite amarillo claro. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4,9 (m, 2H, CH), 3,05 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 1,4 (m, 6H,  $\text{CH}_3$ ).

10 A una solución de dimetanosulfonato de butano-2,3-diilo (15,0 g, 63,7 mmol) en DMF (150 ml) a TA, se añadió  $\text{NaN}_3$  (19,6 g, 301,5 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 85 °C durante 24 h, se enfrió a TA, se diluyó con agua fría (100 ml) y se extrajo con éter dietílico (4 x 100 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con  $\text{NaHCO}_3$  saturado (2 x 100 ml) y salmuera (100 ml), se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice, eluyendo con PE:EA (5:1), proporcionando 2,3-diazidobutano (6,10 g, 68 %) en forma de un aceite incoloro.

20 Se agitó una mezcla de 2,3-diazidobutano (9,0 g, 64,3 mmol) y Pd/C al 10 % (0,90 g) en MeOH (300 ml) en atmósfera de  $\text{H}_2$  (TA, 16 h). Se filtró la mezcla y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con  $\text{NH}_3$  saturado en MeOH-DCM (0-20 %), proporcionando butano-2,3-diamina (4,8 g, 85 %) en forma de un aceite amarillo. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,8 (m, 1H, CH), 2,6 (m, 1H, CH), 1,65 (s, 4H,  $\text{NH}_2$ ), 1,0 (d, 6H,  $\text{CH}_3$ ).

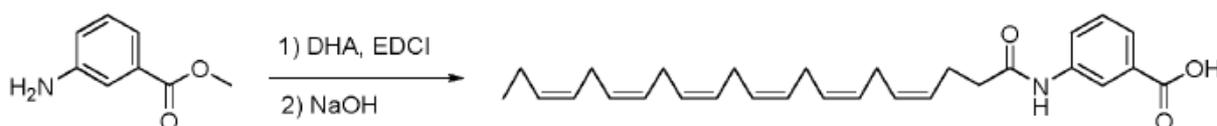
25 A una mezcla de butano-2,3-diamina (4,8 g, 54,5 mmol) en agua (50 ml) que contiene verde de bromocresol como indicador, se añadió lentamente una solución de ácido metanosulfónico (10,46 g) en agua (50 ml) hasta que se observó una transición del color azul al amarillo. Se diluyó la mezcla con etanol (100 ml) y se añadió una solución de Cbz-Cl (7,61 g, 45,5 mmol) en DME (50 ml) y AcOK acuoso (p/v = 50 %) para mantener el color verde pálido. Se agitó la mezcla de reacción (TA, 1 h), se concentró a presión reducida, se trató con agua y se filtró. Se lavó la solución con tolueno, se basificó con NaOH acuoso al 40 % y se extrajo con tolueno (4 x 100 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con salmuera, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtraron y se concentraron a presión reducida, proporcionando 3-aminobutan-2-ilcarbamato de bencilo (4,2 g, 35 %) en forma de un aceite incoloro. Masa calculada para  $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$  = 222,28; encontrada:  $[\text{M}-\text{H}]^+$  = 221,2.

35 A una mezcla de 3-aminobutan-2-ilcarbamato de bencilo (5,3 g, 23,8 mmol), ácido 2-hidroxibenzoico (3,28 g, 23,8 mmol) e imidazol (1,62 g, 23,8 mmol) en EtOAc (180 ml) a 0 °C, se añadió lentamente una solución de DCC (4,90 g, 23,8 mmol) en EtOAc (20 ml). Se agitó la mezcla de reacción (TA, 16 h), se filtró y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con PE:EA (5:1), proporcionando 3-(2-hidroxibenzamido)butan-2-ilcarbamato de bencilo (3,2 g, 40 %) en forma de un aceite incoloro. Masa calculada para  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$  = 342,39; encontrada:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  = 343,2.

45 Se agitó una mezcla de 3-(2-hidroxibenzamido)butan-2-ilcarbamato de bencilo (3,2 g, 9,36 mmol) y Pd/C al 10 % (0,32 g) en MeOH (120 ml) en una atmósfera de  $\text{H}_2$  (101,325 kPa) (TA, 16 h). Se filtró la mezcla y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con MeOH-DCM (0-20 %), proporcionando N-(3-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido)butan-2-il)-2-hidroxibenzamida (1,67 g, 86 %) en forma de un aceite amarillo.

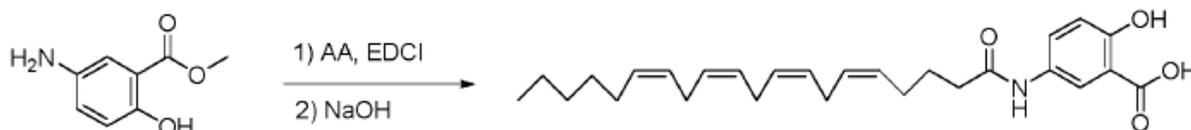
A una solución de N-(3-aminobutan-2-il)-2-hidroxibenzamida (1,52 g, 7,3 mmol), DHA (2 g, 6,0 mmol) y Et<sub>3</sub>N (1,21 g, 12,0 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (50 ml) a 0 °C se añadió HATU (2,37 g, 6,24 mmol). Se agitó la mezcla (TA, 16 h) y se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con salmuera (50 ml) y se extrajo con EA (3 x 50 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con HCl 1 N (2 x 50 ml), NaHCO<sub>3</sub> saturado (2 x 50 ml) y salmuera (50 ml), se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con EA-PE (0-25 %), proporcionando N-(3-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-2-il)-2-hidroxibenzamida (1,08 g, 34,3 %) en forma de un aceite amarillo claro. Masa calculada para C<sub>33</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 518,73; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 519,6.

10 **Ejemplo de referencia 23: Preparación de ácido 3-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-2-il)-2-hidroxibenzamida (17)**



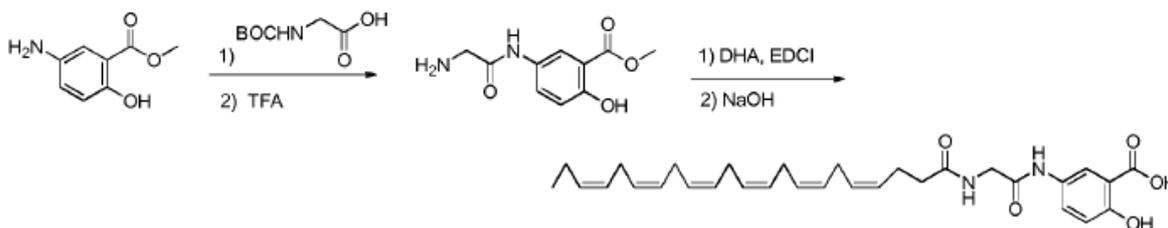
15 A una solución de DHA (0,10 g, 0,3 mmol) en diclorometano (3 ml), se añadió 3-aminobenzoato de metilo (0,046 g, 0,3 mmol), EDCI (0,064 g, 0,3 mmol) y dimetilaminopiridina (4 mg, 0,03 mmol). Se agitó la mezcla de reacción (TA, 2 h) y luego se repartió entre CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y agua. Se extrajo la capa acuosa con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y se lavaron las fracciones orgánicas extraídas con HCl al 10 %, salmuera y se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. El material en bruto se purificó por cromatografía en sílice (acetato de etilo al 0-30 %/pentano), proporcionando 3-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-2-il)-2-hidroxibenzamida. Masa calculada para C<sub>302</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>3</sub> = 461,64; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 462,3. Se disolvió esto entonces en MeOH (10 ml) y NaOH 5 N (2 ml). Se agitó la mezcla a reflujo (4 h) y luego se concentró. La solución acuosa se acidificó a pH 3 con HCl, y el producto se extrajo con acetato de etilo. Se lavó la capa orgánica con agua, salmuera y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. El producto en bruto se purificó por cromatografía de sílice (acetato de etilo al 0-30 %/pentano), proporcionando 0,066 g de ácido 3-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-2-il)-2-hidroxibenzamida en forma de un sólido blanquecino. Masa calculada para C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>3</sub> = 447,61; encontrada: [M-H]<sup>+</sup> = 446,2.

**Ejemplo 24: Preparación de ácido 2-hidroxi-5-(5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14-tetraenamido-2-il)-2-hidroxibenzamida (18)**



30 A una solución de 5-amino-2-hidroxibenzoato de metilo (0,27 g, 1,6 mmol) en diclorometano (10 ml), se añadió ácido araquidónico (0,5 g, 1,6 mmol), EDCI (0,32 g, 1,7 mmol) y dimetilaminopiridina (0,020 g, 0,2 mmol). Se agitó la reacción (TA, 2 h) y luego se repartió entre CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y salmuera. Se extrajo la capa acuosa con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y se lavaron las capas orgánicas combinadas con HCl 1 N, agua, NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado y agua, y luego se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. El producto en bruto se purificó por cromatografía en sílice (MeOH al 0-5 %/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), proporcionando 0,6 g de 2-hidroxi-5-(5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14-tetraenamido-2-il)-2-hidroxibenzamida en forma de un aceite marrón. Masa calculada para C<sub>28</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>4</sub> = 453,61; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 454,3.

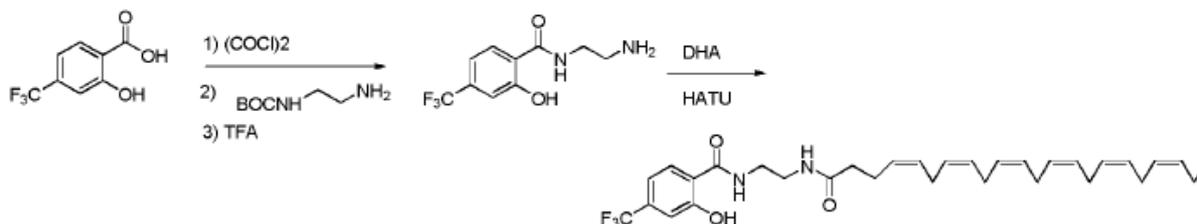
35 A continuación, se disolvió el 2-hidroxi-5-(5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14-tetraenamido-2-il)-2-hidroxibenzamida en THF (15 ml) y NaOH 3 N (5 ml). La mezcla se calentó (60 °C, 2 h) y luego se concentró y se acidificó a pH 3 con HCl 2 N. Se extrajo el producto con acetato de etilo, y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera y se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. El producto en bruto se purificó por cromatografía en sílice (0-15 % de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), proporcionando 0,3 g de 2-hidroxi-5-(5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14-tetraenamido-2-il)-2-hidroxibenzamida en forma de un sólido naranja. Masa calculada para C<sub>27</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>4</sub> = 439,59; encontrada: [M-H]<sup>+</sup> = 438,3.

**Ejemplo 25: Preparación de ácido 5-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamidoacetamido)-2-hidroxibenzoico (19)**

5 A una solución de 5-amino-2-hidroxibenzoato de metilo (1,5 g, 9,0 mmol) en diclorometano (50 ml), se añadieron BOC-glicina (1,57 g, 9,0 mmol), EDCI (1,89 g, 9,9 mmol) y dimetilaminopiridina (0,11 g, 0,9 mmol). Se agitó la reacción (TA, 2,5 h), y luego se repartió entre  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y salmuera. Se extrajo la capa acuosa con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se lavaron las capas orgánicas combinadas con salmuera y se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$ . El producto en bruto se purificó por cromatografía en sílice (MeOH al 0-5 %/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), dando 1,37 g de 5-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)acetamido)-2-hidroxibenzoato de metilo. Masa calculada para  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6 = 324,33$ ; encontrada:  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 347,2$ .

10 Se disolvió el 5-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)acetamido)-2-hidroxibenzoato de metilo (1,3 g, 4,0 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 ml) y TFA (8 ml). Se agitó la reacción (TA, 2,5 h) y luego se concentró, proporcionando 5-(2-aminoacetamido)-2-hidroxibenzoato de metilo en forma de un aceite transparente.  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 225,1$ . Se disolvió el aceite en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 ml) y, a esto, se añadió DHA (1,3 g, 4,0 mmol), EDCI (0,84 g, 4,4 mmol) y trietilamina (2,0 g, 20,0 mmol). Se agitó la reacción (TA, 4 h) y luego se repartió entre  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y salmuera. Se extrajo la capa acuosa con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se secaron las capas orgánicas combinadas sobre  $\text{MgSO}_4$ . El material en bruto se purificó por cromatografía en sílice (MeOH al 0-5 %/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), proporcionando 0,9 g de 5-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamidoacetamido)-2-hidroxibenzoato de metilo en forma de un sólido de color tostado. Masa calculada para  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4 = 534,69$ ; encontrada:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 535,4$ .

15 Se disolvió el 5-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamidoacetamido)-2-hidroxibenzoato de metilo (0,9 g, 1,7 mmol) en THF (15 ml) y NaOH 1 N (8 ml). Se agitó la reacción (50 °C, 5 h), y luego se acidificó a pH 3 con HCl 2 N. Se extrajo el producto con acetato de etilo, y se lavaron los extractos orgánicos combinados con agua, salmuera y se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$ . El material en bruto se purificó por cromatografía en sílice (MeOH al 0-5 %/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), proporcionando 0,4 g de ácido 5-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamidoacetamido)-2-hidroxibenzoico en forma de un sólido amarillo.  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 521,3$ . Masa calculada para  $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_5 = 520,66$ ; encontrada:  $[\text{M}-\text{H}]^+ = 519,2$ .

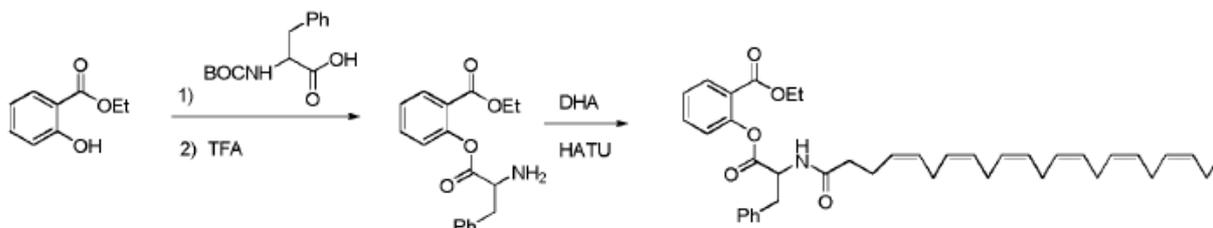
**Ejemplo de referencia 26: Preparación de N-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamidoetil)-2-hidroxi-4-(trifluorometil)benzamida (21)**

35 A una solución de ácido 2-hidroxi-4-(trifluorometil)benzoico (0,5 g, 2,4 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8 ml), se añadió cloruro de oxalilo (0,46 g, 3,6 mmol) y 2 gotas de DMF. La reacción se agitó (TA, 2h) y luego se concentró. El residuo resultante se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8 ml) y se añadieron 2-aminoetilcarbamato de *tert*-butilo (0,39 g, 2,4 mmol) y diisopropiletilamina (0,41 g, 3,2 mmol). Se agitó la reacción (TA, 16 h) y luego se repartió entre  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y salmuera. Se extrajo la capa acuosa con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se secaron las fracciones orgánicas combinadas extraídas sobre  $\text{MgSO}_4$ . El material en bruto se purificó por cromatografía en sílice (MeOH al 0-10 %/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), proporcionando 0,55 g de 2-(2-hidroxi-4-(trifluorometil)benzamido)etilcarbamato de *tert*-butilo. Masa calculada para  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4 = 348,32$ ; encontrada:  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 371,1$ . Esto se disolvió luego en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml) y TFA (4 ml). Se agitó la reacción (TA, 3 h) y se concentró y se secó, proporcionando 0,7 g de N-(2-aminoetil)-2-hidroxi-4-(trifluorometil)benzamida en forma de un aceite transparente. Masa calculada para  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2 = 248,20$ ; encontrada:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 249,1$ .

45 Se disolvió la N-(2-aminoetil)-2-hidroxi-4-(trifluorometil)benzamida (0,7 g, 1,5 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml) y, a esto, se añadió DHA (0,48 g, 1,5 mmol), HATU (0,67 g, 1,8 mmol) y trietilamina (0,59 g, 5,9 mmol). Se agitó la reacción (TA,

16 h) y luego se repartió entre  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y salmuera. Se extrajo la capa acuosa con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se secaron los extractos orgánicos combinados sobre  $\text{MgSO}_4$ . El material en bruto se purificó por cromatografía en sílice ( $\text{MeOH}$  al 0-10 %/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), proporcionando 0,28 g de N-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamidoetil)-2-hidroxi-4-(trifluorometil)benzamida en forma de un aceite amarillo. Masa calculada para  $\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3 = 558,67$ ; encontrada:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 559,3$ .

**Ejemplo de referencia 27: Preparación de 2-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-3-fenilpropanoiloxi)benzoato de etilo (22)**



A una solución de 2-hidroxibenzoato de etilo (0,5 g, 3,0 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8 ml), se añadió ácido 2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-fenilpropanoico (0,8 g, 3,0 mmol), EDCI (0,63 g, 3,3 mmol) y dimetilaminopiridina (0,037 g, 0,3 mmol). Se agitó la reacción (TA, 3 h) y luego se repartió entre  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y salmuera. Se extrajo la capa acuosa con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se secaron las fracciones orgánicas combinadas extraídas sobre  $\text{MgSO}_4$ . El material en bruto se purificó por cromatografía en sílice ( $\text{MeOH}$  al 0-10 %/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), proporcionando 1,2 g de 2-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-fenilpropanoiloxi)benzoato de etilo. Masa calculada para  $\text{C}_{235}\text{H}_{27}\text{NO}_6 = 413,46$ ; encontrada:  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 437,1$ .

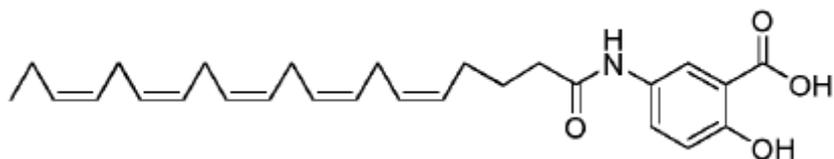
Se disolvió el 2-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-3-fenilpropanoiloxi)benzoato de etilo (1,2 g, 2,9 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml) y TFA (4 ml). Se agitó la reacción (TA, 3 h) y luego se concentró. El material en bruto se purificó mediante cromatografía de sílice ( $\text{MeOH}$  al 0-10 %/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), proporcionando 0,63 g de 2-(2-amino-3-fenilpropanoiloxi)benzoato de etilo. Masa calculada para  $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_4 = 313,35$ ; encontrada:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 314,1$ .

Se combinaron 2-(2-amino-3-fenilpropanoiloxi)benzoato de etilo (0,24 g, 0,8 mmol) y DHA (0,25 g, 0,8 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml) y, a esto, se añadieron HATU (0,35 g, 0,9 mmol) y diisopropiletilamina (0,30 g, 2,3 mmol). La reacción se agitó (TA, 3 h) y luego se repartió entre  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y salmuera. Se extrajo la capa acuosa con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se secaron las fracciones orgánicas combinadas extraídas sobre  $\text{MgSO}_4$ . El material en bruto se purificó por cromatografía en sílice ( $\text{MeOH}$  al 0-10 %/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), proporcionando 2-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-3-fenilpropanoiloxi)benzoato de etilo en forma de un sólido de color tostado. Masa calculada para  $\text{C}_{40}\text{H}_{49}\text{NO}_5 = 623,82$ ; encontrada:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 624,2$ .

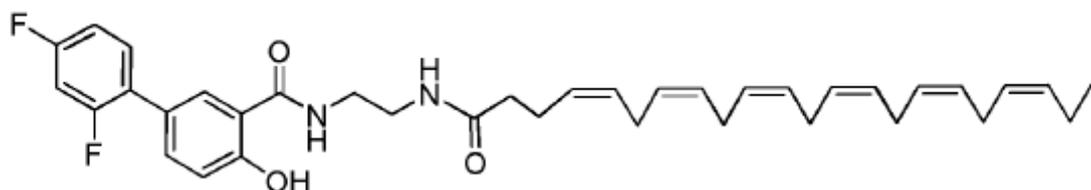
**Ejemplo de referencia 28: Preparación de ácido 5-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-3-fenilpropanamido)-2-hidroxisenzoico (23)**



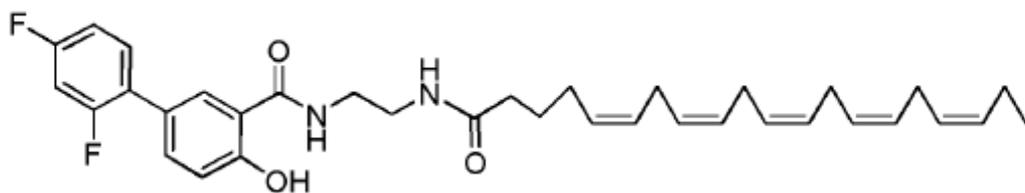
El ácido 5-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-3-fenilpropanamido)-2-hidroxisenzoico se preparó de una manera similar al ácido 5-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-4-metilpentanamido)-2-hidroxisenzoico, usando el material de partida de fenilalanina apropiado. Masa calculada para  $\text{C}_{38}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_5 = 610,78$ ; encontrada:  $[\text{M}-\text{H}]^+ = 609,3$ .

**Ejemplo 29: Preparación de ácido 2-hidroxi-5-(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaenamidoibenzoico (24)**

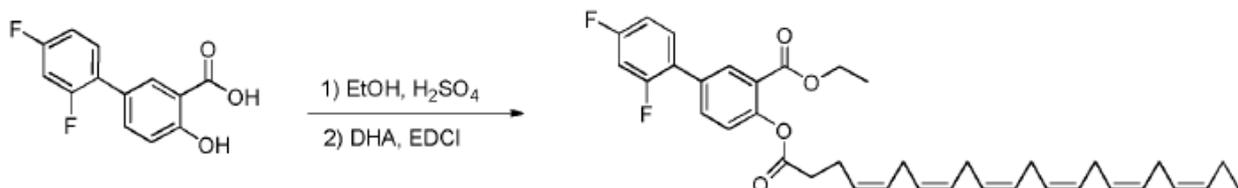
5 El ácido 2-hidroxi-5-(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaenamidoibenzoico se preparó de una manera similar al ácido 5-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-2-hidroxibenzoico, usando el material de partida de EPA apropiado. Masa calculada para  $C_{27}H_{35}NO_4 = 437,57$ ; encontrada:  $[M-H]^+ = 436,2$ .

**10 Ejemplo de referencia 30: Preparación de N-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamidoetil)-2',4'-difluoro-4-hidroxibifenil-3-carboxamida (25)**

15 La N-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamidoetil)-2',4'-difluoro-4-hidroxibifenil-3-carboxamida se preparó de una manera similar a la N-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamidoetil)-2-hidroxibenzamida, usando el material de partida de ácido 2',4'-difluoro-4-hidroxibifenil-3-carboxílico apropiado. Masa calculada para  $C_{37}H_{44}F_2N_2O_3 = 602,75$ ; encontrada:  $[M+H]^+ = 603,3$ .

**20 Ejemplo de referencia 31: Preparación de 2',4'-difluoro-4-hidroxi-N-(2-(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaenamidoetil)-bifenil-3-carboxamida (26)**

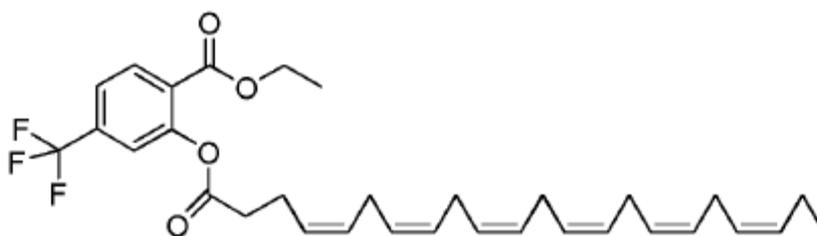
25 La 2',4'-difluoro-4-hidroxi-N-(2-(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaenamidoetil)-bifenil-3-carboxamida se preparó de una manera similar a la N-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamidoetil)-2-hidroxibenzamida, usando los materiales de partida de ácido 2',4'-difluoro-4-hidroxibifenil-3-carboxílico y EPA apropiados. Masa calculada para  $C_{35}H_{42}F_2N_2O_3 = 576,72$ ; encontrada:  $[M+H]^+ = 577,3$ .

**30 Ejemplo de referencia 32: Preparación de 4-((4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoiloxi)-2',4'-difluorobifenil-3-carboxilato de etilo (27)**

Se disolvió el ácido 2',4'-difluoro-4-hidroxibifenil-3-carboxílico (1,0 g, 4,0 mmol) en etanol (30 ml) y ácido sulfúrico (8 ml). Se agitó la solución (80 °C, 18 h) y luego se concentró. El residuo se disolvió en acetato de etilo y se lavó con agua, salmuera y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. La evaporación del disolvente proporcionó 1,0 g de 2',4'-difluoro-4-hidroxibifenil-3-carboxilato de etilo. Masa calculada para C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>F<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 278,25; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 279,1.

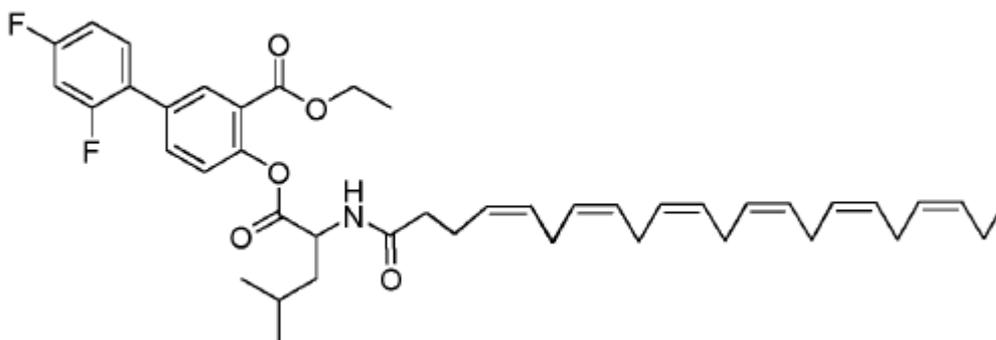
5 Se disolvió 2',4'-difluoro-4-hidroxibifenil-3-carboxilato de etilo (0,3 g, 1,1 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml), y se añadió DHA (0,35 g, 1,1 mmol), EDCI (0,23 g), 1,2 mmol) y dimetilaminopiridina (0,13 g, 0,1 mmol). Se agitó la reacción (TA, 3 h) y luego se repartió entre CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y salmuera. Se extrajo la capa acuosa con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se secaron las fracciones orgánicas combinadas extraídas sobre MgSO<sub>4</sub>. El material en bruto se purificó por cromatografía en sílice (acetato de etilo al 0-40 %/pentano), proporcionando 0,1 g de 4-((4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoiloxi)2',4'-difluorobifenil-3-carboxilato de etilo. Masa calculada para C<sub>37</sub>H<sub>42</sub>F<sub>2</sub>O<sub>4</sub> = 588,72; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 589,3.

15 **Ejemplo de referencia 33: Preparación de 2-((4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoiloxi)-4-(trifluorometil)benzoato de etilo (28)**



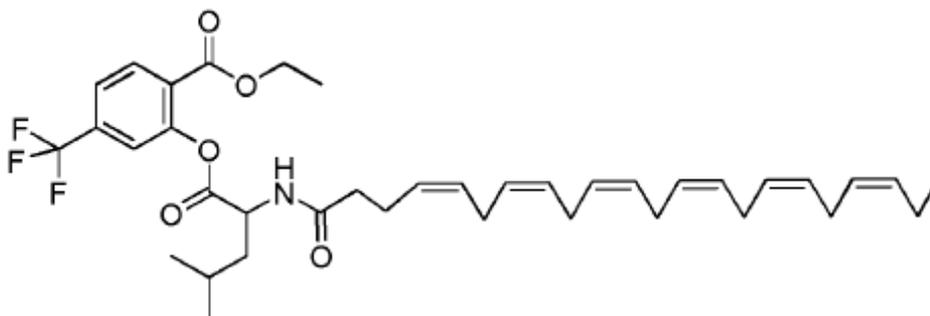
20 El 2-((4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoiloxi)-4-(trifluorometil)benzoato de etilo se preparó de una manera similar al 4-((4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoiloxi)2',4'-difluorobifenil-3-carboxilato de etilo, usando el material de partida de ácido 2-hidroxi-4-(trifluorometil)benzoico apropiado. Masa calculada para C<sub>32</sub>H<sub>39</sub>F<sub>3</sub>O<sub>4</sub> = 544,64; encontrada: [M+Na]<sup>+</sup> = 567,3.

25 **Ejemplo de referencia 34: Preparación de 4-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-4-metilpentanoiloxi)2',4'-difluorobifenil-3-carboxilato de etilo (29)**



30 El 4-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-4-metilpentanoiloxi)2',4'-difluorobifenil-3-carboxilato de etilo se preparó como se ha descrito para el 2-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-4-metilpentanoiloxi)benzoato de etilo, usando el material de partida de ácido 2',4'-difluoro-4-hidroxibifenil-3-carboxílico apropiado. Masa calculada para C<sub>43</sub>H<sub>53</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>5</sub> = 701,88; encontrada: [M+H]<sup>+</sup> = 702,4.

**Ejemplo de referencia 35: Preparación de 2-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-4-metilpentanoiloxi)-4-(trifluorometil)benzoato de etilo (30)**



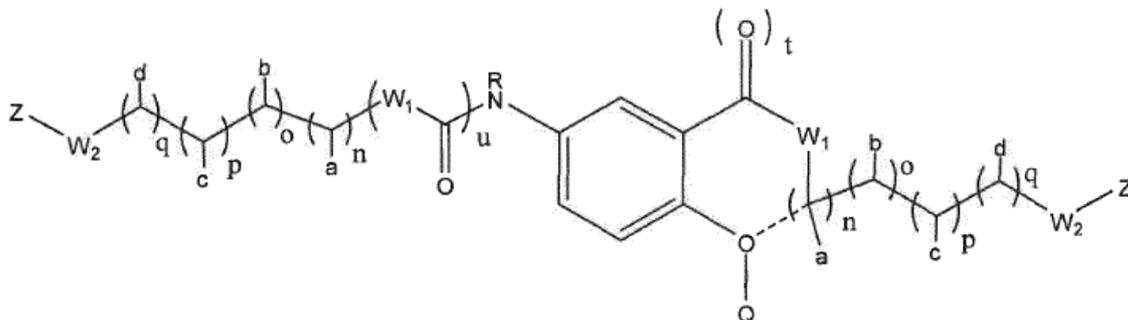
5 El 2-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-4-metilpentanoiloxi)-4-(trifluorometil)benzoato de etilo se preparó como se ha descrito para el 2-(2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenamido-4-metilpentanoiloxi)benzoato de etilo, usando el material de partida de ácido 2-hidroxi-4-(trifluorometil)benzoico apropiado. Masa calculada para  $C_{38}H_{50}F_3NO_5$  = 657,80; encontrada:  $[M+H]^+$  = 658,4.

10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula III:

5



Fórmula III

10

o una sal, un hidrato, un solvato, un enantiómero o un estereoisómero farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que:

15

cada  $W_1$  y  $W_2$  son independientemente nulos, O o NH, o cuando  $W_1$  y  $W_2$  son ambos NH, entonces tanto  $W_1$  como  $W_2$  se pueden tomar conjuntamente para formar una fracción de piperazina;

- - - - representa un enlace opcional que cuando está presente, es necesario que Q sea nulo;

cada a y c son independientemente H,  $CH_3$ ,  $-OCH_3$ ,  $-OCH_2CH_3$  o  $C(O)OH$ ;

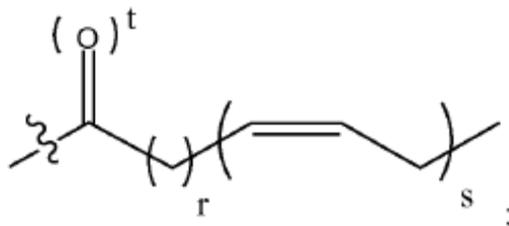
cada b es H,  $CH_3$ ,  $C(O)OH$  u O-Z;

cada d es H o  $C(O)OH$ ;

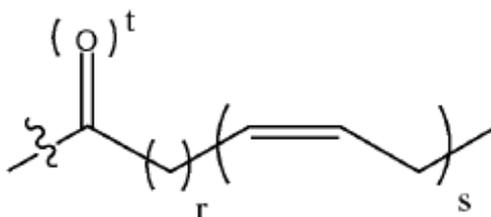
cada n, o, p y q es independientemente 0 o 1;

20

cada Z es H o



con la condición de que al menos haya un



25

en el compuesto;

30

cada r es independientemente 2,3 o 7;

cada s es independientemente 3, 5 o 6;

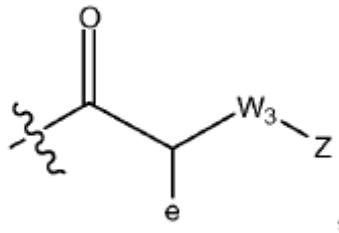
cada t es 1;

u es 0 o 1;

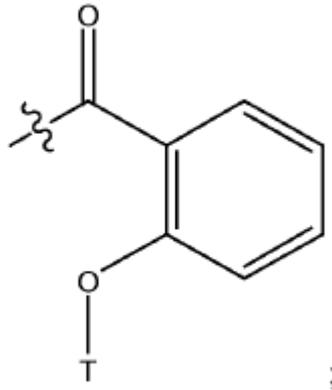
35

con la condición de que cuando r sea 7, s sea 3;

Q es nulo,  $C(O)CH_3$ , Z



o



5

e es H o una cualquiera de las cadenas laterales de los aminoácidos naturales;  
 W<sub>3</sub> es nulo, -O- o -N(R)-;  
 R es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; y  
 T es H, C(O)CH<sub>3</sub> o Z.

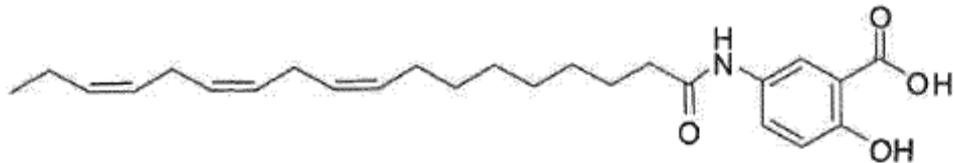
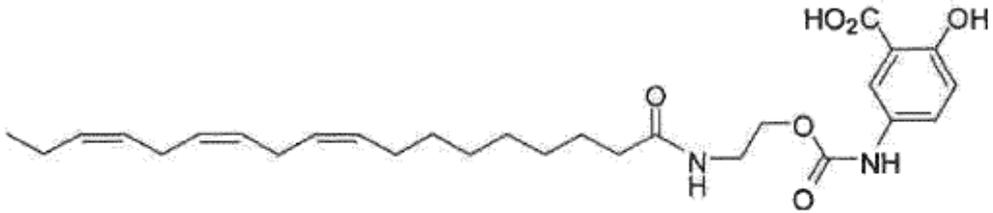
10

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que W<sub>1</sub> es O y Q es H.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es

15





5 4. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es



10 5. El compuesto de la reivindicación 1, en el que al menos un  $W_1$  es NH y Q es H.

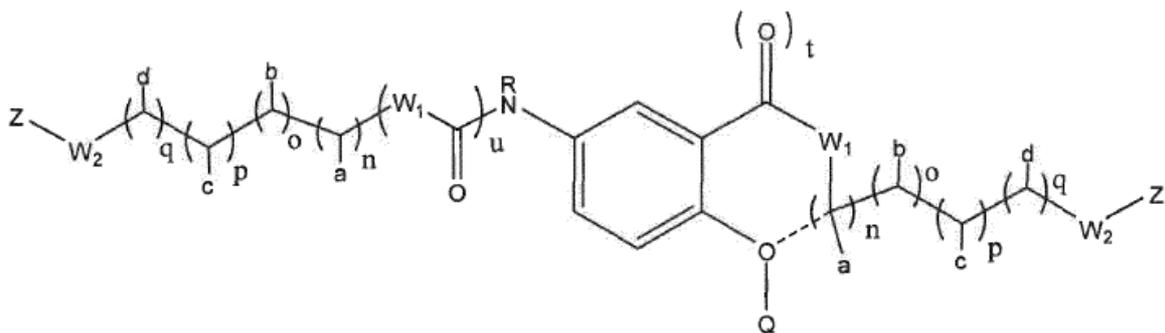
10

6. El compuesto de la reivindicación 5, en el que Q es H.

7. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15

8. Un compuesto para su uso en el tratamiento de una inflamación que está asociada a un trastorno metabólico, una enfermedad intestinal inflamatoria, un trastorno neurodegenerativo o un trastorno de desgaste muscular, compuesto que es un compuesto de Fórmula III:



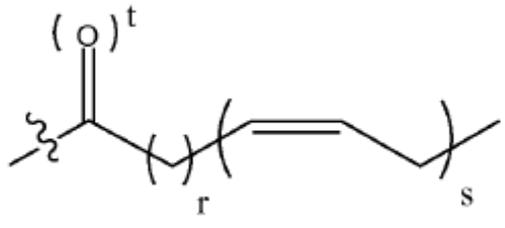
20

Fórmula III

o una sal, un hidrato, un solvato, un enantiómero o un estereoisómero farmacéuticamente aceptables del mismo,

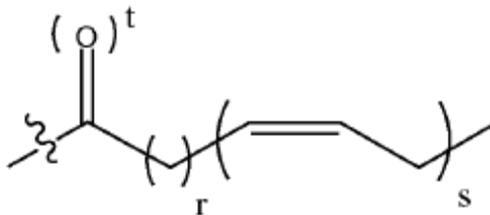
en la que:

- 5 cada  $W_1$  y  $W_2$  son independientemente nulos, O o NH, o cuando  $W_1$  y  $W_2$  son ambos NH, entonces tanto  $W_1$  como  $W_2$  se pueden tomar conjuntamente para formar una fracción de piperazina;  
 - - - - representa un enlace opcional que cuando está presente, es necesario que Q sea nulo;  
 cada a y c son independientemente H,  $CH_3$ ,  $-OCH_3$ ,  $-OCH_2CH_3$  o  $C(O)OH$ ;  
 cada b es H,  $CH_3$ ,  $C(O)OH$  u O-Z;  
 cada d es H o  $C(O)OH$ ;  
 10 cada n, o, p y q es independientemente 0 o 1;  
 cada Z es H o



con la condición de que al menos haya un

15



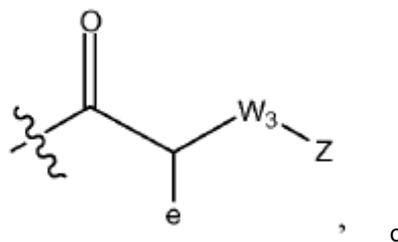
en el compuesto;

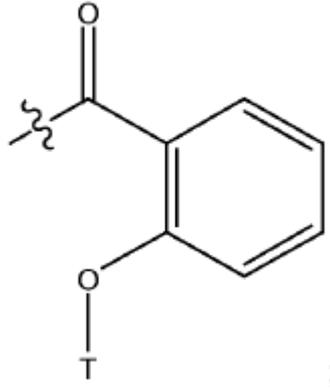
20

- cada r es independientemente 2,3 o 7;  
 cada s es independientemente 3, 5 o 6;  
 cada t es 1;  
 u es 0 o 1;

25

con la condición de que cuando r sea 7, s sea 3;  
 Q es nulo,  $C(O)CH_3$ , Z





e es H o una cualquiera de las cadenas laterales de los aminoácidos naturales;  
 W<sub>3</sub> es nulo, -O- o -N(R)-;  
 5 R es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; y  
 T es H, C(O)CH<sub>3</sub> o Z.

9. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la inflamación está asociada a un trastorno o a una enfermedad que se seleccionan de diabetes de tipo II, enfermedad cardiovascular de resistencia a la insulina, arritmia, aterosclerosis, enfermedad de las arterias coronarias, hipertrigliceridemia, dislipidemia, retinopatía, nefropatía, neuropatía, edema macular, ileítis, colitis ulcerosa, síndrome de Barrett, enfermedad de Crohn, neurodegeneración, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, enfermedad de Huntington, meningitis infecciosa, encefalomielititis, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, encefalitis, distrofia muscular, dermatomiositis, miositis de cuerpos de inclusión, polimiositis o caquexia.
10. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la inflamación está asociada a distrofia muscular.
11. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la inflamación está asociada a diabetes de tipo II.
12. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la inflamación está asociada a enfermedad intestinal inflamatoria.
13. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la inflamación está asociada a colitis ulcerosa.
14. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la inflamación está asociada a enfermedad de Crohn.
15. El compuesto para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-14, en donde el compuesto es como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

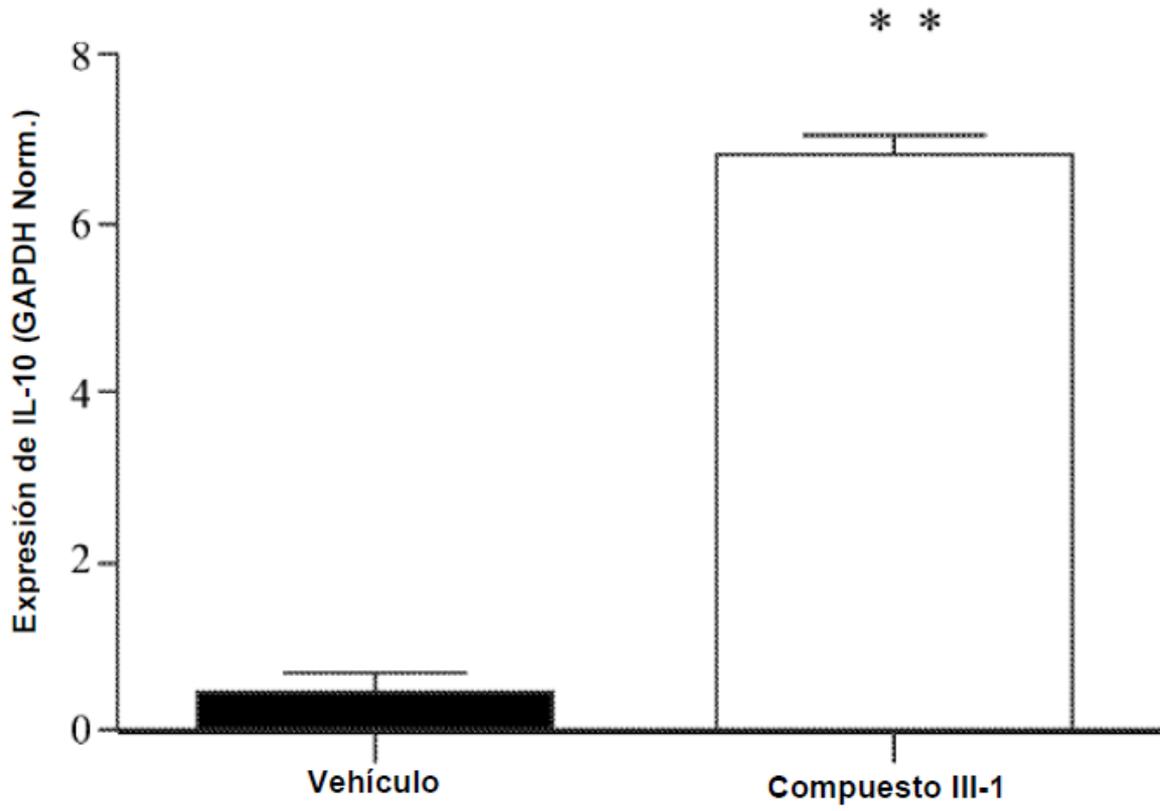


FIG. 1

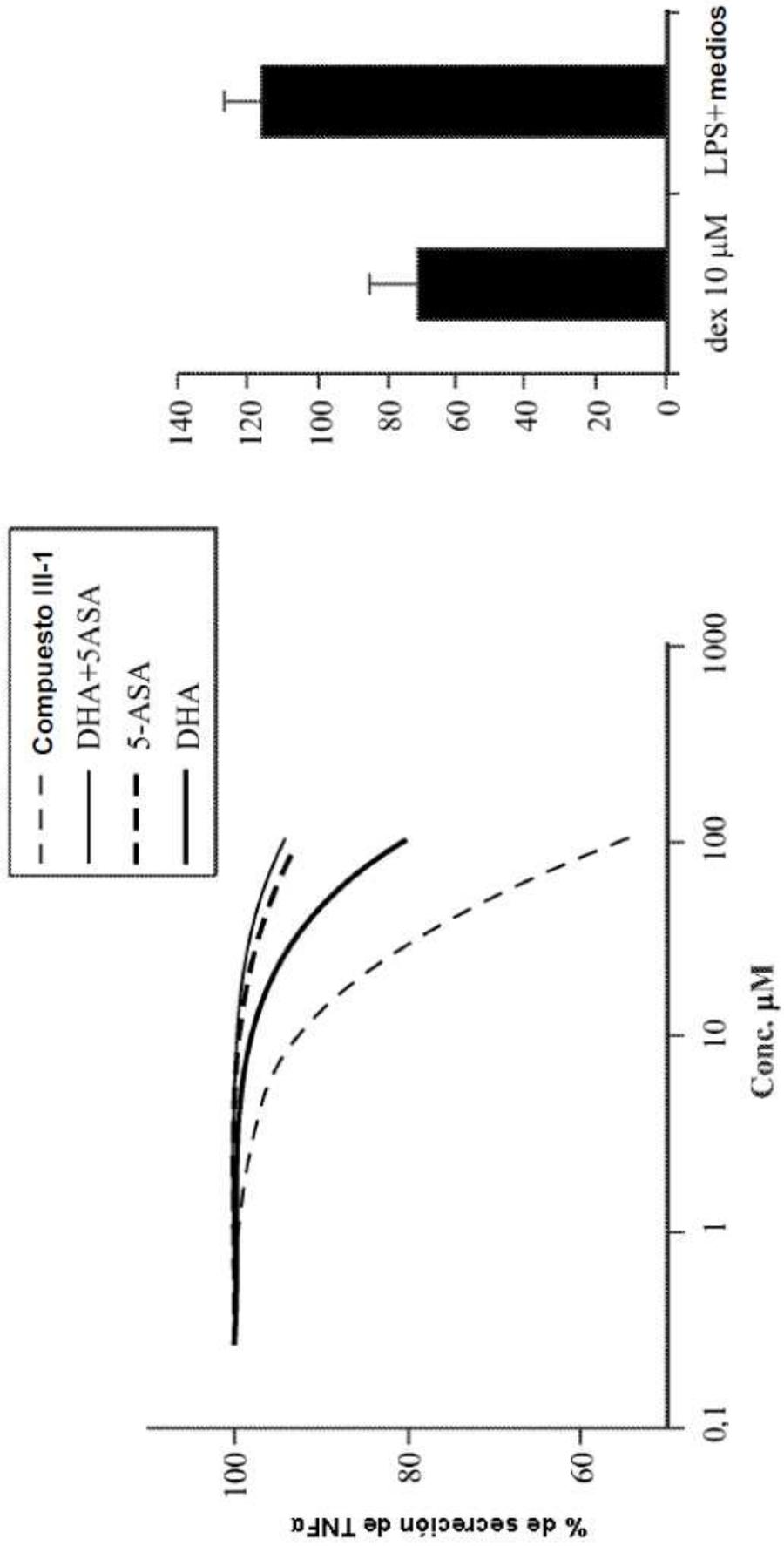


FIG. 2

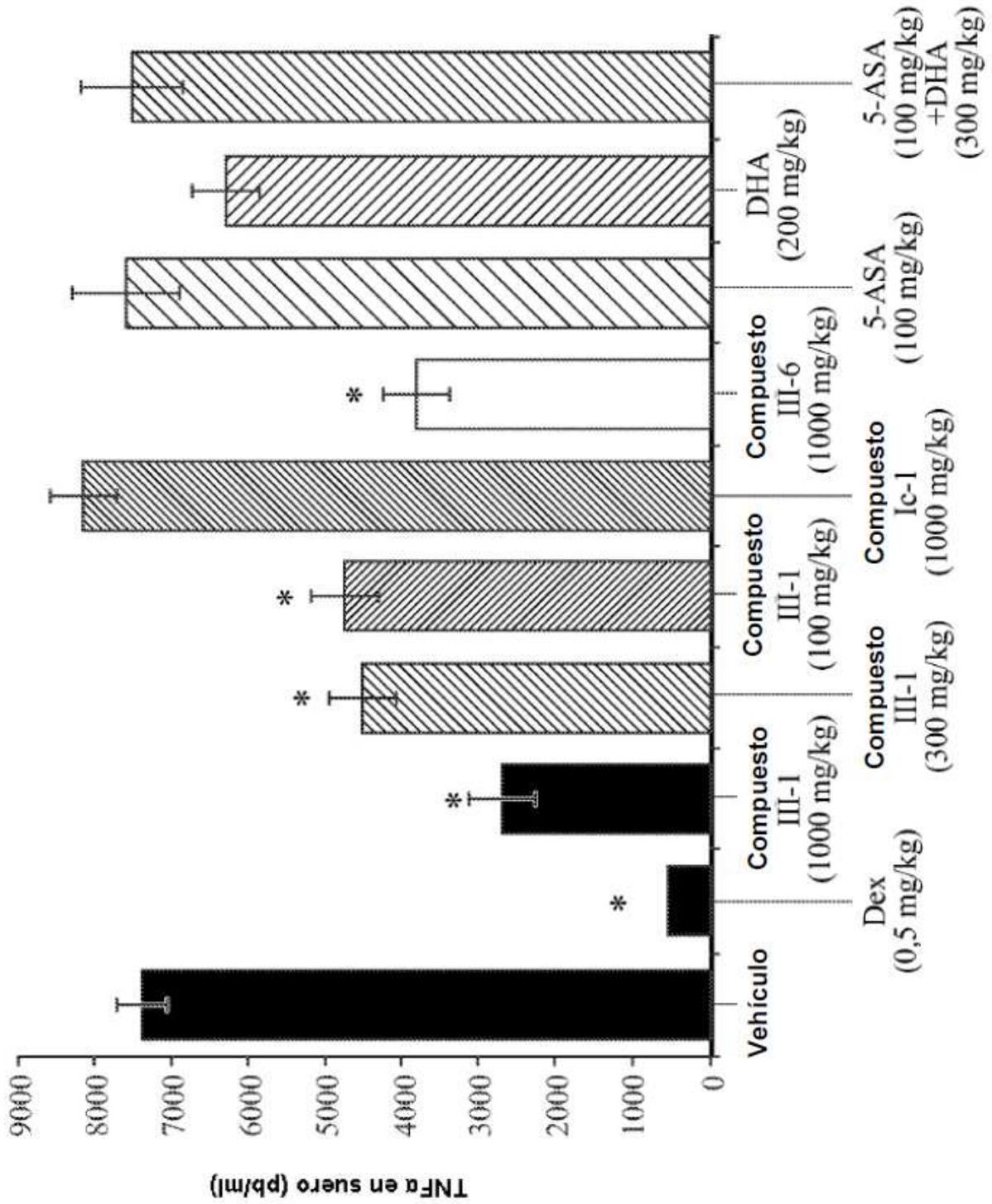


FIG. 3