

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 885**

51 Int. Cl.:

G01N 33/98 (2006.01)

C07F 9/10 (2006.01)

G01N 24/08 (2006.01)

C07F 9/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2014 PCT/SE2014/050543**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14178787**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2014 E 14791832 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2992334**

54 Título: **Fosfatidilalcanoles novedosos y composiciones de los mismos**

30 Prioridad:

03.05.2013 SE 1330045
23.01.2014 SE 1430005

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2018

73 Titular/es:

PETHMARK AB (100.0%)
RedHot Diagnostics AB Biovation Park Södertälje
Forskargatan 20J
SE-151 36 Södertälje, SE

72 Inventor/es:

WENSBO POSARIC, DAVID y
BERGQUIST, KARL-ERIK

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 688 885 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

Fosfatidilalcanoles novedosos y composiciones de los mismos

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a composiciones, en particular a composiciones miscibles en agua, que comprenden fosfatidilalcanoles, en particular homólogos de fosfatidiletanol (homólogos de PEth), en que la concentración del constituyente de fosfatidilalcanol puede determinarse mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear cuantitativa (RMNC).

Antecedentes

El consumo alto y prolongado de alcohol (etanol) puede conducir a graves enfermedades relacionadas con el alcohol y a alcoholismo en el hombre. Por otra parte, se acepta comúnmente que un consumo de bajo a moderado está asociado con un riesgo reducido de cardiopatía coronaria, debido posiblemente a un efecto antiaterogénico del etanol. Con el fin de poder clasificar el hábito de consumo de alcohol de una persona, o dirigir de manera más precisa investigaciones médicas en la investigación de una causa subyacente de uno o varios síntomas observados, son sumamente útiles los biomarcadores de eliminación lenta de etanol como mediciones objetivo del consumo de alcohol histórico de la persona. El fosfatidiletanol (PEth), un fosfolípido no natural formado por etanolisis catalizada por la fosfolipasa D *in vivo* de fosfatidilcolina principalmente endógena, ha adquirido recientemente gran interés como biomarcador de eliminación lenta de este tipo. En la actualidad, las técnicas analíticas basadas en CL-EM se usan comúnmente para la cuantificación de PEth en muestras de sangre humana. Habitualmente se cuantifican uno o algunos homólogos de PEth, tales como PEth-16:0/18:1 y/o PEth-16:0/18:2, y se usan como medida representativa del nivel total de PEth.

Nalesso *et al.* (Journal of Chromatography, 2011, 8423-8431) describen el desarrollo de un método basado en CL-EMAR novedoso para el perfilado cuantitativo de especies moleculares de PEth en sangre humana de bebedores empedernidos y sociales. Se usaron disoluciones de cloroformo disponibles comercialmente de la sal de sodio de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanol (PEth-16:0/16:0), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanol (PEth-18:1/18:1) y 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfobutanol (PBut-18:1/18:1) como materiales de referencia y patrón interno, respectivamente, para la determinación cualitativa y/o cuantitativa de diversos homólogos de PEth.

Zheng *et al.* (Clinica Chimica Acta, 2011, 1428-1435) describe un método de CL-ESI-EM(/EM) para la determinación cualitativa y cuantitativa simultáneas de formas de PEth en muestras de sangre completa. Se usaron PEth-16:0/18:1, PEth-16:0/18:2, PEth-16:0/18:1 marcado con deuterio, PEth-16:0/18:2 marcado con deuterio y fosfatidilpropanol (PProp-18:1/18:1) disponibles comercialmente o producidos sintéticamente como materiales de referencia o patrones internos para la determinación cualitativa y/o cuantitativa de diversos homólogos de PEth.

El documento WO2012005680 A1 da a conocer métodos para la evaluación de la exposición a etanol previa obteniendo una razón entre uno o varios bioprecusores de PEth y uno o varios homólogos de PEth en una muestra. También se dan a conocer métodos que comprenden la etapa de retirada de los residuos de ácido carboxílico de PEth mediante hidrólisis selectiva o transesterificación selectiva, seguida por cuantificación de los productos respectivos resultantes.

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear cuantitativa (RMNC) está ampliamente aceptada como herramienta analítica cualitativa y cuantitativa. La RMNC puede usarse como técnica alternativa o complementaria a métodos analíticos tradicionales, tales como por ejemplo métodos que se basan en la separación cromatográfica de compuestos orgánicos, para la cuantificación de uno o varios compuestos de interés. Una ventaja principal de la RMNC, en comparación con la mayoría de los métodos analíticos tradicionales, es la falta de necesidad de material de referencia patrón idéntico para la determinación cuantitativa de un compuesto orgánico de interés en disolución. Los núcleos útiles para la determinación cuantitativa empleando técnicas de RMNC incluyen ^1H (^1H -RMNC), ^{31}P (^{31}P -RMNC) y ^{19}F (^{19}F -RMNC), de las que la primera es generalmente la más útil debido a una amplia presencia en combinación con señales generalmente fuertes, a partir de las cuales pueden recogerse datos sin procesar precisos y exactos deseados.

El documento JPH11174139 A1 da a conocer un método para la determinación cuantitativa de una mezcla que comprende un agente tensioactivo utilizando ^1H -RMNC mediante el empleo de un patrón interno.

El análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) de los núcleos de ^1H (^1H -RMN) y ^{13}C (^{13}C -RMN) de lípidos lipófilos, incluyendo PEth, su bioprecursor principal menos lipófilo fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE) relacionada estructuralmente, se realiza lo más comúnmente en disolventes lipófilos que solubilizan grasa, normalmente cloroformo deuterado (CDCl_3), con un aditivo opcional de metanol deuterado (CD_3OD) como componente minoritario en el caso de, por ejemplo, la PC.

Kihara *et al.* (Chem. Pharm. Bull., 1994, 289-292) usaron CDCl_3 como disolvente para el análisis mediante ^1H -RMN

de PE-16:0/18:2 (compuesto 12) y la sal de sodio de 1-palmitoil-2-linoleoilfosfatidilmetanol (compuesto 13), siendo este último altamente similar de manera estructural y fisicoquímica a PEth-16:0/18:2.

5 Willmann *et al.* (Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2011, 1-8) usaron una mezcla 2:1 de CDCl_3 y metanol deuterado (CD_3OD) para el análisis de ^1H - y ^{13}C -RMN de diversas fosfatidilcolinas (PC).

10 Lehnhardt *et al.* (RMN Biomed. 2001, 307-317) usaron agua deuterada (D_2O) como disolvente y ácido 3-(trimetilsilil)propiónico como patrón interno en la determinación cuantitativa mediante ^1H -RMNC de diversos fosfolípidos, aunque sin incluir PEth ni cualquier otro análogo de alquilo del mismo. En ese documento también se describe la determinación cuantitativa de tales lípidos empleando ^{31}P -RMNC en una matriz que comprende una mezcla 8:2 de agua y D_2O , colato de Na y EDTA, usando fosfono-metil-glicerol como referencia interna.

15 Vysotski *et al.* (Lipids, 2009, 381-389) describen la determinación cuantitativa de diversos lípidos, incluyendo PEth y análogos de alquilo, empleando ^{31}P -RMNC en una matriz que comprende una matriz 8:2 de agua y D_2O , colato de Na y EDTA, usando fosfonometilglicina como referencia interna.

20 Lancée-Hermkens *et al.* (Biochimica et Biophysica Acta, 1977, 141-151) describen el análisis mediante ^{13}C -RMN de bicapas de PC de diferente composición de ácidos grasos y esteroides. Se obtuvieron espectros de RMN en una matriz basada en D_2O . Se observó que el colesterol interactuaba con la PC, interacción que generalmente se manifiesta por sí misma en un aumento de la ampliación de línea de las señales de ^{13}C -RMN de la parte hidrófoba de la PC. Este resultado sugiere que las señales de ^1H -RMN de lípidos similares, por ejemplo PEth, pueden ampliarse en presencia de otros componentes anfífilos, tales como por ejemplo colato de Na o similares, en un disolvente polar.

25 Actualmente, todos los métodos basados en CL-EM empleados para la determinación cuantitativa de fosfatidilalcanoles, tales como por ejemplo PEth, en muestras de sangre, incluyendo los mencionados anteriormente en el presente documento, se basan en disoluciones de referencias analíticas, normalmente disoluciones que comprenden un solo fosfatidilalcohol o análogo en que se conoce la concentración del mismo, para el desarrollo de curvas patrón para la cuantificación y/o la calibración instrumental cuantitativa. La técnica de laboratorio convencional, usada para la preparación de tales disoluciones de referencia, implica el pesaje preciso del compuesto de referencia, seguido por la adición de un volumen preciso de un disolvente adecuado. El error en la concentración final de la referencia depende de factores incluyendo por ejemplo, errores de pesaje, errores en la suposición de la pureza del material de referencia, error en la medición del volumen de disolvente y errores relacionados con la disolución incompleta del material de referencia. Además y lo que es más importante, el error en la concentración final de la referencia se traduce en un error en la concentración determinada del fosfatidilalcohol, tal como por ejemplo PEth, en la muestra analizada.

40 Por tanto, se desean composiciones mejoradas que comprenden fosfatidilalcanoles, tal como por ejemplo una disolución de referencia mejorada de un fosfatidilalcohol, para una determinación simplificada, más precisa y/o más exacta de fosfatidilalcanoles, tal como por ejemplo PEth, en muestras, tales como por ejemplo muestras de sangre humana. Además, también se necesitan métodos de producción regio y estereoselectivos mejorados de tales homólogos y/o derivados de PEth novedosos y/o conocidos actualmente.

45 Wheeler *et al.*, J. Med Chem, Am. Chem. Soc., EE.UU., Vol 37, 1994, páginas 4118-4129, dan a conocer una composición que comprende 1,2-bis(hexanoiloxi)-1-propil-metilfosfato y un disolvente aprótico polar deuterado, tal como CDCl_3 .

50 Petersen *et al.*, Chemistry and Physics of Lipids, Limerick, IR, Vol 162, n.º 1-2, 2009, páginas 53-61, dan a conocer una composición que comprende un compuesto de fórmula (I) en un disolvente polar aprótico deuterado disolvente (CDCl_3) y sales de amonio del mismo.

55 O.P. Bondar *et al.*, Biophysical Journal, Vol 71, n.º 3, 1996, páginas 1440-1449, dan a conocer PPPEth y DMPPEth y estos ácidos de fosfatidilo como sal de sodio y su uso como bioindicadores para el consumo excesivo de alcohol así como par la biomonitorización de fosfatidiletanoles tales como DMPPEth mediante ^{31}P -RMNP con agua como disolvente.

Sumario

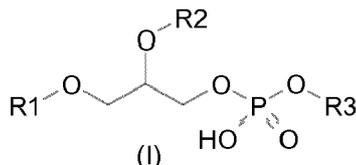
60 Un objeto de la presente invención, teniendo en cuenta las desventajas mencionadas anteriormente, es proporcionar una composición que comprende un fosfatidilalcohol, en que la concentración del mismo puede determinarse mediante una técnica que no se basa en el pesaje preciso de ese fosfatidilalcohol en la producción de la composición.

65 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición que comprende un fosfatidilalcohol, en que la concentración del mismo puede determinarse mediante una técnica que no se basa en el conocimiento de la pureza precisa de ese fosfatidilalcohol antes de la producción de la composición.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición que comprende un fosfatidilalcohol, composición que es miscible con agua o disoluciones acuosas para permitir la preparación mediante dilución de disoluciones de referencias analíticas acuosas con una concentración conocida del fosfatidilalcohol, sin necesidad de retirar un disolvente que no es miscible con agua.

También se describen en el presente documento compuestos que pueden usarse como materiales de referencia analíticos para permitir la determinación mejorada del consumo de etanol histórico de una persona.

Estos y otros objetos, que aparecerán a partir de la siguiente descripción, se han logrado ahora mediante una composición, según un aspecto de la presente invención, que comprende un compuesto de fórmula I



o cualquier sal, diastereómero, enantiómero, mezcla racémica, mezcla escalémica o forma isotópicamente enriquecida del mismo y un disolvente polar aprótico deuterado, para la determinación de la concentración del compuesto de fórmula I mediante ^1H -RMNC, en la que R1 se selecciona del grupo que consiste en $-\text{C}(=\text{O})$ -alquilo lineal C2-25 y $-\text{C}(=\text{O})$ -alquenilo lineal C2-25:1-6, R2 se selecciona del grupo que consiste en $-\text{C}(=\text{O})$ -alquilo lineal C2-25 y $-\text{C}(=\text{O})$ -alquenilo lineal C2-25:1-6, R3 es alquilo C1-6; la suma del compuesto de fórmula I y cualquier forma de sal, diastereómero, enantiómero, mezcla racémica, mezcla escalémica y forma isotópicamente enriquecida del mismo supera 0,05 $\mu\text{mol/g}$ de la composición; y el disolvente deuterado es miscible con agua en cualquier proporción a una temperatura de 20 a 25°C y comprende menos del 5% de isótopos ^1H residuales.

La concentración del compuesto de fórmula I de la presente composición puede determinarse ventajosamente mediante RMNC, incluyendo ^1H -RMNC y ^{31}P -RMNC. Además, tales técnicas de RMNC permiten la monitorización periódica no destructiva de la concentración, sin tener que abrir siquiera el recipiente en que se almacena la composición, siempre que este recipiente sea un tubo de RMN adecuado. Por tanto, el químico analítico puede comprobar fácilmente sus disoluciones de referencias analíticas cuando están en forma de la presente composición.

Según otro aspecto de la presente invención, el compuesto de fórmula I puede estar enriquecido isotópicamente con deuterio, o cualquier otro isótopo pesado adecuado, tal como se conoce en la técnica.

El peso molecular de un compuesto de fórmula I enriquecido isotópicamente de ese tipo es mayor que el del compuesto correspondiente que no está enriquecido isotópicamente, por lo que se permite la diferenciación analítica mediante el empleo de por ejemplo CL-EM(EM). Por tanto, un compuesto de fórmula I enriquecido isotópicamente de ese tipo, por ejemplo, puede usarse ventajosamente como referencia analítica mediante la adición conocida de muestras, en que está cuantificándose el compuesto de fórmula I no enriquecido isotópicamente, con una cantidad conocida.

Según aún otro aspecto de la presente invención, el disolvente deuterado puede tener un punto de ebullición que supera los 100°C a presión atmosférica.

Un punto de ebullición relativamente alto de este tipo da como resultado ventajosamente una evaporación espontánea relativamente baja del disolvente deuterado a partir de la composición cuando se almacena en un recipiente abierto a temperatura ambiental. Por tanto, se minimiza el cambio en la concentración del compuesto de fórmula I en la composición, por ejemplo, con la apertura y el cierre repetidos del recipiente de almacenamiento cuando se retiran alícuotas para su uso por ejemplo en la calibración cuantitativa de instrumentos analíticos.

Según aún otro aspecto de la presente invención, la composición puede comprender además un aditivo anfífilo en una cantidad que supera 1 mg/g de la composición. El aditivo anfífilo puede ser un detergente seleccionado del grupo que consiste en detergentes aniónicos, catiónicos, no iónicos y zwitteriónicos.

Las ventajas de la presencia de un aditivo anfífilo en la presente composición incluyen el aumento en la solubilidad del compuesto de fórmula I. Por tanto, la composición puede comprender una concentración relativamente alta del compuesto de fórmula I, por lo que se facilita la determinación de la concentración por ejemplo mediante RMNC y puede realizarse con mayor precisión. Además, se minimiza el riesgo de precipitación del compuesto de fórmula I con la adición de la composición a una matriz acuosa debido a la interacción química del aditivo anfífilo.

Según aún otro aspecto de la presente invención, la composición puede comprender además una referencia interna, en la que la referencia interna: está presente en una cantidad para permitir la detección mediante RMN en un periodo de tiempo que es esencialmente igual a o menor que el periodo de tiempo necesario para la detección

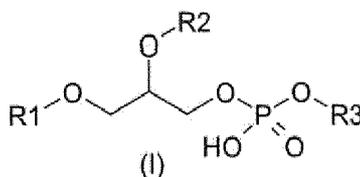
mediante RMN del compuesto de fórmula I; y origina al menos una señal de RMN relacionada con un núcleo investigado, señal de RMN que es adecuada para la integración y que está separada esencialmente de todas las señales de RMN del compuesto de fórmula I relacionadas con el mismo núcleo investigado, con la generación de un espectro de RMN de la composición.

5 Las ventajas de una referencia interna incluyen la fácil disponibilidad comercial de referencias internas adecuadas que están validadas para su uso en RMNC. Por tanto, no es necesaria la validación separada de otro componente de la composición que origina al menos una señal de RMN de referencia adecuada.

10 Según aún otro aspecto de la invención, la composición puede comprender además un aditivo seleccionado del grupo que consiste en disolventes fuertes, modificadores polares, antioxidantes, conservantes, agentes de ajuste del pH, colorantes y agentes de secado.

15 Un aditivo de este tipo, en particular disolventes fuertes y modificadores polares, puede cambiar ventajosamente de manera ligera el desplazamiento o mejorar la resolución o forma de línea de las señales de RMN de compuestos de fórmula I, de modo que pueden recogerse integrales de las mismas con una mayor precisión en aplicaciones de RMNC. Un aditivo de este tipo, en particular antioxidantes, conservantes, agentes de ajuste del pH, colorantes y agentes de secado, puede aumentar adicionalmente la estabilidad del compuesto de fórmula I, por lo que se minimiza la disminución en la concentración a lo largo del tiempo.

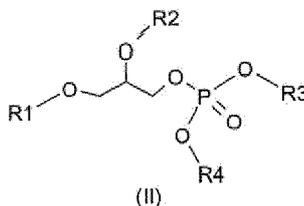
20 En el presente documento también se da a conocer una sal de un compuesto de fórmula I



25 o cualquier diastereómero, enantiómero, mezcla racémica, mezcla escalémica o forma isotópicamente enriquecida del mismo, en la que R1 se selecciona del grupo que consiste en -C(=O)-alquilo lineal C2-25, -C(=O)-alqueno lineal C2-25:1-6 y -C(=O)-A-Q; R2 se selecciona del grupo que consiste en -C(=O)-alquilo lineal C2-25, -C(=O)-alqueno lineal C2-25:1-6 y -C(=O)-A-Q; R3 es etilo; A es un grupo de unión que comprende de 2 a 20 átomos de carbono; Q es un resto detectable espectrofotométrica o fluorométricamente que comprende al menos un carbociclo o heterociclo aromático; y la sal se selecciona del grupo que consiste en sales de amonio, sales de alquilamonio, sales de dialquilamonio en que los grupos alquilo son grupos alquilo seleccionados independientemente y sales de trialquilamonio en que los grupos alquilo son grupos alquilo seleccionados independientemente.

35 Tales sales tienen, a diferencia de la forma protonada original de los compuestos de fórmula I, que tienden a existir en forma de jarabes espesos, pegajosos, una mayor tendencia a existir en forma amorfa o cristalina sólida que es más fácil de manejar en la preparación de, por ejemplo, la presente composición.

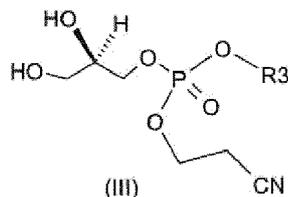
40 Según aún otro aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto según la fórmula II o cualquier diastereómero, enantiómero, mezcla racémica, mezcla escalémica o forma isotópicamente enriquecida del mismo,



45 en la que R1 es C(=O)-alquilo lineal C13-25 o C(=O)-alquilo lineal C13-25, comprendiendo C(=O)-alquilo lineal C13-25 al menos un doble enlace carbono-carbono; R2 se selecciona del grupo que consiste en H, C(=O)-alquilo lineal C13-25 y C(=O)-alquilo lineal C13-25, comprendiendo C(=O)-alquilo lineal C13-25 al menos un doble enlace carbono-carbono; R1 es C(=O)-alquilo lineal C13-25 cuando R2 es C(=O)-alquilo lineal C13-25; R2 es H o C(=O)-alquilo lineal C13-25 cuando R1 es C(=O)-alquilo lineal C13-25; R3 es etilo o CD₂CD₃; R4 es H, HN(R₅)₃ o CH₂CH₂CN; R5 se selecciona independientemente de H y alquilo C1-6; y R1 es C(=O)-alqueno lineal C13-25 cuando R4 es H.

50 Las ventajas de tales compuestos incluyen, por ejemplo, la capacidad de uso mejorada como materiales de referencia analíticos en comparación con compuestos relacionados de la técnica anterior. También se da a conocer en el presente documento un método para la producción de un compuesto de la invención, que comprende la etapa de usar un compuesto de fórmula III o racemato del mismo, en el que R3 es por ejemplo etilo o CD₂CD₃, como

producto intermedio químico



5 Las ventajas de uso de un compuesto de este tipo como producto intermedio químico incluyen, por ejemplo, el rendimiento mejorado en la producción de compuestos de fórmula I o II en comparación con métodos de la técnica anterior que se dirigen al mismo tipo de productos.

10 Según aún otro aspecto, puede usarse 2-cianoetoxi-(1,1,2,2,2-pentadeuteroetoxi)-(N,N-diisopropilamino)fosfina como reactivo químico en la síntesis de compuestos de fórmula I, II o III. Las ventajas de uso de un compuesto de este tipo como reactivo químico incluyen, por ejemplo, el rendimiento mejorado en la producción en comparación con métodos de la técnica anterior que se dirigen al mismo tipo de productos. Además, un reactivo de este tipo permite el uso de una gran variedad de materiales de partida para la introducción del grupo de 1,1,2,2,2-pentadeuteroetoxilo, en comparación con métodos de la técnica anterior restringidos al uso de fosfatidilcolinas como material de partida.

15 Según aún otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de producción de la composición, que comprende las etapas de: (i) tratar el compuesto de fórmula I con un disolvente polar aprótico deuterado, hasta que todo o una parte del compuesto de fórmula I se disuelve en el disolvente deuterado, para obtener una primera composición intermedia; y (ii) si la primera composición intermedia comprende cualquier materia heterogénea, retirar opcionalmente la materia heterogénea mediante filtración o decantación.

20 Este método de preparación da como resultado ventajosamente una composición que tiene una baja posibilidad de sobresaturarse con respecto al compuesto de fórmula I. Por tanto, se minimiza el riesgo de precipitación posterior de una parte del compuesto de fórmula I, por lo que disminuye la concentración del compuesto de fórmula I en la composición.

25 También se da a conocer en el presente documento un método de producción de la composición, que comprende las etapas de: (i) tratar el compuesto de fórmula I con un disolvente fuerte hasta que todo o una parte del compuesto de fórmula I se disuelve en el disolvente fuerte, para obtener una segunda composición intermedia; (ii) mezclar la segunda composición intermedia con el disolvente deuterado, preferiblemente un disolvente polar aprótico deuterado, para obtener una tercera composición intermedia; (iii) retirar más del 95% del disolvente fuerte de la tercera composición intermedia mediante destilación o evaporación, para obtener una cuarta composición intermedia; y (iv) si la cuarta composición intermedia comprende cualquier materia heterogénea, retirar opcionalmente la materia heterogénea mediante filtración o decantación, en el que el disolvente fuerte tiene un punto de ebullición de al menos 20°C menos que el punto de ebullición de dicho disolvente deuterado y en que la solubilidad del compuesto de fórmula I es al menos 1 mg/ml del disolvente fuerte a una temperatura de 25°C.

30 Este método de producción ventajosamente es relativamente rápido, en comparación con otros métodos que dependen de las cinéticas de disolución del compuesto de fórmula I en el disolvente deuterado. Además, las cantidades traza de disolvente fuerte residual residente en la composición final dan como resultado un desplazamiento de campo bajo de las señales de ¹H-RMN de los protones más adyacentes al átomo de fósforo de los compuestos de fórmula I. Este desplazamiento de campo bajo puede dar como resultado ventajosamente una integración más fácil de estas señales en aplicaciones de ¹H-RMNC en comparación con el caso sin cantidades traza del disolvente fuerte presente.

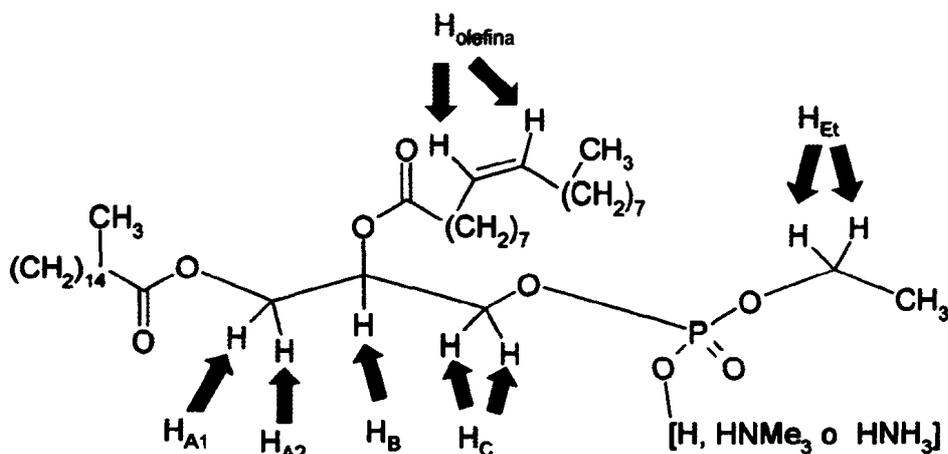
35 Según aún otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para la determinación de la concentración de un compuesto de fórmula I en la composición mediante RMNC, que comprende las etapas de: (i) recoger al menos dos señales de RMN relacionadas con un núcleo investigado de la composición; (ii) recoger la integral de al menos una señal de RMN aislada originada por el compuesto de fórmula I y al menos una señal de RMN aislada originada por un componente determinante; y (iii) calcular la concentración del compuesto de fórmula I basándose en las integrales recogidas en la etapa (ii), en el que se conoce la cantidad del componente determinante o la concentración del componente determinante en la composición; seleccionándose dicho componente determinante del grupo que consiste en disolvente protonado residual en disolvente polar aprótico deuterado, un aditivo anfífilo, la referencia interna, una referencia externa y el aditivo.

40 La determinación de la concentración mediante el empleo de técnicas de RMNC permite la monitorización periódica no destructiva de la concentración, sin tener que abrir siquiera el recipiente en que se almacena la composición, siempre que este recipiente sea un tubo de RMN adecuado. Por tanto, el químico analítico puede comprobar fácilmente sus disoluciones de referencias analíticas cuando están en forma de la presente composición.

Características adicionales de la invención y sus realizaciones se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

En las figuras 1 a 11 a continuación se representan regiones de interés particular de espectros ^1H -RMN obtenidos en un espectrómetro de 400 MHz de PEth-16:0/18:1, un compuesto de fórmula I, en su forma protonada original, en su forma de sal de trimetilamina, o en su forma de sal de amonio, en diversos disolventes y con o sin aditivos anfífilos y/o referencia internas. Las señales que se originan a partir de diversos átomos de hidrógeno de PEth-16:0/18:1 están marcadas en las figuras 1 a 11, tal como se indica en los dibujos a continuación, y las que se originan a partir de un aditivo anfílico o referencia interna como H_{add} y H_{ref} , respectivamente. Las señales marcadas con H_{add} representan señales del aditivo anfílico que pueden usarse como señales de referencia de ^1H -RMNC para la cuantificación del compuesto de fórmula I, en particular cuando se separan de todas las señales del compuesto de fórmula I, según diversas realizaciones de la invención. Las señales marcadas en las figuras 1 a 11 tal como se indica en los dibujos a continuación representan señales que pueden usarse como señales representativas de ^1H -RMNC de los compuestos de fórmula I para la cuantificación del compuesto de fórmula I, en particular cuando se separan del resto de las señales de la composición, según diversas realizaciones de la invención. A menos que se indique de otro modo, la referencia interna para la que la señal correspondiente (H_{ref}) se indica en las figuras 1 a 11, es dimetilsulfona (n.º CAS: 67-71-0).



Grupos de protones indicados de la forma protonada, la forma de sal de trimetilamina y la forma de sal de amonio de PEth-16:0/18:1.

Otros aspectos, características y ventajas de la invención resultarán evidentes y se aclararán a partir de la siguiente descripción de realizaciones no limitativas de la presente invención, haciéndose referencia a las figuras adjuntas, en que

la figura 1 muestra espectros de ^1H -RMN de la forma protonada original de PEth-16:0/18:1 en: (A) una mezcla de CDCl_3 (n.º CAS: 865-49-6) y CD_3OD (n.º CAS: 811-98-3) (4:1, v:v), y (B) CDCl_3 a una concentración de 10 mg/ml, (C) CDCl_3 a una concentración de 1 mg/ml;

la figura 2 muestra espectros de ^1H -RMN de la forma protonada original de PEth-16:0/18:1 en: (A) DMSO-d_6 (n.º CAS: 2206-27-1) con trazas de CDCl_3 a una concentración de aproximadamente 3 mg/ml preparado retirando mediante destilación a vacío más del 95% del CDCl_3 de una disolución de la forma protonada original de PEth-16:0/18:1 en una mezcla de DMSO-d_6 y CDCl_3 (1:2, v:v), según una realización, (B) DMSO-d_6 a una concentración de aproximadamente 2 mg/ml, y (C) una mezcla de DMSO-d_6 y CD_3OD (4:1, v:v) a una concentración de aproximadamente 2 mg/ml;

la figura 3 muestra espectros de ^1H -RMN de la forma protonada original de PEth-16:0/18:1 en: (A) acetona- d_6 (n.º CAS: 666-52-4) a una concentración de aproximadamente 3 mg/ml, y (B) una mezcla de acetona- d_6 y CD_3OD (4:1, v:v) a una concentración de aproximadamente 2 mg/ml;

la figura 4 muestra espectros de ^1H -RMN de la forma protonada original de PEth-16:0/18:1 en: (A) una disolución de SDS (n.º CAS: 151-21-3) (16 mg/ml) en DMSO-d_6 con trazas de CDCl_3 preparado retirando mediante destilación a vacío más del 95% del CDCl_3 de una disolución de la forma protonada original de PEth-16:0/18:1 y SDS en una mezcla de DMSO-d_6 y CDCl_3 (1:2, v:v), según una realización, y (B) una disolución de SDS (5 mg/ml) en una mezcla de DMSO-d_6 y CDCl_3 (1:2, v:v);

la figura 5 muestra espectros de ^1H -RMN de la forma protonada original de PEth-16:0/18:1 en: (A) una mezcla de DMF-d7 (n.º CAS: 4472-41-7) y CD_3OD (4:1, v:v), (B) una mezcla de MeCN-d3 (n.º CAS: 2206-26-0) y CD_3OD (3:1, v:v), (C) una mezcla de acetona-d6 y THF-d8 (n.º CAS: 1693-74-9) (1:1, v:v), y (D) THF-d8 a una concentración de aproximadamente 4 mg/ml;

5 la figura 6 muestra espectros de ^1H -RMN de formas de sal diferentes de PEth-16:0/18:1: (A) la forma de sal de amonio en CDCl_3 a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml, y (B) la forma de sal de trimetilamonio en CDCl_3 a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml;

10 la figura 7 muestra el espectro de ^1H -RMN de una disolución de la forma de sal de trimetilamonio de PEth-16:0/18:1 en DMSO-d6 (aproximadamente 3 mg/ml) obtenida agitando un exceso de la forma de sal de trimetilamonio de PEth-16:0/18:1 en DMSO-d6 a 38°C durante 15 min, seguido por enfriamiento hasta 22°C y decantación, según una realización;

15 la figura 8 muestra espectros de ^1H -RMN de formas de sal diferentes de PEth-16:0/18:1: (A) la forma de sal de amonio en una disolución de SDS (34 mg/ml) en DMSO-d6, (B) la forma de sal de trimetilamonio en una disolución de SDS (6 mg/ml) en DMSO-d6 con trazas de CH_2Cl_2 preparado retirando mediante destilación a vacío más del 95% del CH_2Cl_2 de una disolución de la forma de sal de trimetilamonio de PEth-16:0/18:1 y SDS en una mezcla de DMSO-d6 y CH_2Cl_2 (1:4, v:v), según una realización; (C) la forma de sal de trimetilamonio en una disolución de SDS (6 mg/ml) en DMSO-d6 obtenida agitando un exceso de la forma de sal de trimetilamonio de PEth-16:0/18:1 con SDS en DMSO-d6 at 38°C durante 15 min, seguido por enfriamiento hasta 22°C y decantación, según una realización, y (D) la forma de sal de trimetilamonio en una disolución de SDS (29 mg/ml) en DMSO-d6 con trazas de CH_2Cl_2 preparado retirando mediante destilación a vacío más del 95% del CH_2Cl_2 de una disolución de la forma de sal de trimetilamonio de PEth-16:0/18:1 y SDS en una mezcla de DMSO-d6 y CH_2Cl_2 (1:4, v:v), según una realización;

la figura 9 muestra espectros de ^1H -RMN de disoluciones de la forma de sal de trimetilamonio de PEth-16:0/18:1 en DMSO-d6 con trazas de CH_2Cl_2 en presencia de diversos aditivos anfífilos obtenidos retirando mediante destilación a vacío más del 95% del CH_2Cl_2 de una disolución de la forma de sal de trimetilamonio de PEth-16:0/18:1 y el aditivo anfílico en una mezcla de DMSO-d6 y CH_2Cl_2 (1:4, v:v), según realizaciones diferentes: (A) el aditivo anfílico es Na-AOT (n.º CAS: 577-11-7) con una concentración de 80 mg/ml, (B) el aditivo anfílico es Triton-X 100 (n.º CAS: 9002-93-1) con una concentración de 46 mg/ml, y (C) el aditivo anfílico es Tween 20 (n.º CAS: 9005-64-5) con una concentración de 42 mg/ml;

35 la figura 10 muestra espectros de ^1H -RMN de formas de sal diferentes de PEth-16:0/18:1: (A) la forma de sal de trimetilamonio en acetona-d6, (B) la forma de sal de trimetilamonio en una mezcla de acetona-d6 y CD_3OD (5:1, v:v), y (C) la forma de sal de amonio en una mezcla de acetona-d6 y CD_3OD (32:1, v:v); y

40 la figura 11 muestra el espectro de ^1H -RMN de una disolución de la forma de sal de trimetilamonio de PEth-16:0/18:1 en THF-d8 a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml.

Descripción detallada

Definiciones

45 Se pretende que el término "sal de adición" o "sal" signifique sales formadas mediante la reacción con una base o mediante el intercambio con otro catión, en que una forma cargada negativamente del compuesto original se une a una forma cargada positivamente de la base o el catión. El término "sal de adición" o "sal" también comprende hidratos y formas de adición de disolvente, tales como hidratos y alcoholatos, así como complejos, tales como complejos con aminas en su forma neutra o protonada cargada positivamente.

50 Tal como se usa en el presente documento, se pretende que "alquilo" usado solo o como sufijo o prefijo, incluya grupos hidrocarbonados alifáticos saturados tanto de cadena ramificada como lineal que tienen desde 1 hasta 25 átomos de carbono, o si se proporciona un número especificado de átomos de carbono, entonces se propone ese número específico. Por ejemplo "alquilo C1-6" indica alquilo que tiene 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 átomos de carbono. Cuando el número específico que indica el grupo alquilo es el número entero 0 (cero), se propone un átomo de hidrógeno como sustituyente en la posición del grupo alquilo. Por ejemplo, "N(alquilo C0)2" es equivalente a "NH2" (amino).

60 Los ejemplos de alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, sec-butilo, t-butilo, pentilo y hexilo.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que "alquilo lineal" usado solo o como sufijo o prefijo, incluya grupos hidrocarbonados alifáticos saturados de cadena lineal que tienen desde 1 hasta 25 átomos de carbono, si se proporciona un número especificado de átomos de carbono, entonces se propone ese número específico. Por ejemplo "alquilo lineal C1-6" indica alquilo que tiene 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 átomos de carbono.

Los ejemplos de alquilo lineal incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo y n-octilo.

5 Tal como se usa en el presente documento, se pretende que “alquenilo” usado solo o como sufijo o prefijo, incluya grupos hidrocarbonados olefínicos tanto de cadena ramificada como lineal que tienen desde 2 hasta 25 átomos de carbono y al menos un doble enlace, o si se proporcionan números especificados de átomos de carbono y dobles enlaces, entonces se propone ese número específico. Por ejemplo “alquenilo C17-19:1-4” indica alquenilo que tiene 17, 18 ó 19 átomos de carbono y 1, 2, 3 ó 4 dobles enlaces.

10 Tal como se usa en el presente documento, se pretende que “alquenil lineal” usado solo o como sufijo o prefijo, incluya grupos hidrocarbonados olefínicos de cadena lineal que tienen desde 2 hasta 25 átomos de carbono y al menos un doble enlace, en los que los dobles enlaces son independientemente de configuración cis (configuración Z) o configuración trans (configuración E) y una pluralidad los mismos están separados entre sí mediante un átomo de carbono entre medias, o si se proporcionan números especificados de átomos de carbono y dobles enlaces, entonces se propone ese número específico. Por ejemplo “alquenilo lineal C17-19:1-4” indica alquenilo de cadena lineal que tiene 17, 18 ó 19 átomos de carbono y 1, 2, 3 ó 4 dobles enlaces que pueden ser cada uno independientemente de configuración E o Z.

20 Tal como se usa en el presente documento, se pretende que “alquenilo Z lineal” usado solo o como sufijo o prefijo, incluya grupos hidrocarbonados olefínicos de cadena lineal que tienen desde 2 hasta 25 átomos de carbono y al menos un doble enlace, en el que todos los dobles enlaces son de configuración cis (configuración Z) y una pluralidad de los mismos están separados entre sí mediante un átomo de carbono entre medias, o si se proporcionan números especificados de átomos de carbono y dobles enlaces, entonces se propone ese número específico. Por ejemplo “alquenilo Z lineal C17-19:1-4” indica alquenilo de cadena lineal que tiene 17, 18 ó 19 átomos de carbono y 1, 2, 3 ó 4 dobles enlaces Z.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “arilo” o “carbociclo aromático” se refiere a una estructura de anillo, que comprende al menos un anillo aromático, compuesto por desde 5 hasta 14 átomos de carbono. Estructuras de anillo que contienen 5, 6, 7 y 8 átomos de carbono serían grupos aromáticos de anillo individual, por ejemplo fenilo. Estructuras de anillo que contienen 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14 átomos de carbono serían policíclicas, por ejemplo naftilo. El anillo aromático puede estar sustituido en una o más posiciones del anillo. El término “arilo” o “carbociclo aromático” también incluye sistemas de anillo policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes (los anillos son “anillos condensados”) en los que al menos uno de los anillos es aromático.

35 Tal como se usa en el presente documento, “heteroarilo”, “hetarilo” o “heterociclo” se refiere a un heterociclo aromático, que tiene al menos un anillo con carácter aromático, (por ejemplo 6 electrones deslocalizados) o al menos dos anillos conjugados con carácter aromático, (por ejemplo $4n + 2$ electrones deslocalizados donde “n” es un número entero), y que comprende hasta aproximadamente 14 átomos de carbono, y que tiene al menos un miembro de anillo heteroátomo tal como azufre, oxígeno o nitrógeno. Los grupos heteroarilo, hetarilo o heterociclo incluyen sistemas monocíclicos y bicíclicos (por ejemplo, que tienen 2 anillos condensados). El anillo aromático del grupo heteroarilo, hetarilo o heterociclo puede estar sustituido en una o más posiciones del anillo.

45 Los ejemplos de grupos heteroarilo o hetarilo incluyen sin limitación, piridilo (es decir, piridinilo), pirimidinilo, pirazinilo, piridazinilo, triazinilo, furilo (es decir, furanilo), quinolilo, tetrahydroquinolilo, isoquinolilo, tetrahydroisoquinolilo, tienilo, imidazolilo, tiazolilo, indolilo, pirrilo, oxazolilo, benzofurilo, benzotienilo, benzotiazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, indazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, isotiazolilo, benzotienilo, bencimidazolilo, indolinilo, y similares.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “sustituible” se refiere a un átomo al que puede unirse covalentemente un hidrógeno, y en el que puede estar presente otro sustituyente en lugar del hidrógeno. Un ejemplo no limitativo de átomos sustituibles incluye los átomos de carbono de un grupo etilo.

55 Tal como se usa en el presente documento, el término “enriquecido isotópicamente” se refiere a un compuesto o grupo en que está presente un isótopo de uno o varios de los átomos de composición en una cantidad que es significativamente mayor que la cantidad correspondiente que se produce de manera natural. Los ejemplos no limitativos de compuestos y grupos enriquecidos isotópicamente incluyen, por ejemplo, CDCl_3 , dimetilsulfóxido-d6 y $-\text{DHCH}_3$, en que uno o varios de los átomos sustituibles portan el isótopo de hidrógeno ^2H en lugar del isótopo ^1H más común que se produce de manera natural.

60 Realizaciones de la invención

65 A continuación se describirán en más detalle realizaciones de la presente invención con referencia a las figuras adjuntas con el fin de que los expertos en la técnica puedan llevar a cabo la invención. Sin embargo, la invención puede realizarse de muchas formas diferentes y no debe considerarse limitada a las realizaciones expuestas en el presente documento. Más bien, estas realizaciones se proporcionan de modo que esta divulgación será exhaustiva y

completa, y transmitirá completamente el alcance de la invención a los expertos en la técnica. Las realizaciones no limitan la invención, sino que la invención sólo está limitada por las reivindicaciones de patente adjuntas. Además, no se pretende que la terminología usada en la descripción detallada de las realizaciones particulares ilustradas en los dibujos adjuntos sea limitativa de la invención.

5

Ahora se describirán realizaciones de la presente invención con referencia a las figuras 1 a 11.

10

15

La composición de la invención comprende esencialmente un fosfatidilalcanol y un disolvente deuterado polar miscible en agua, normalmente un disolvente polar aprótico deuterado. Se descubrió sorprendentemente que las señales de RMN, en particular pero sin limitarse a las señales de ^1H -RMN, generalmente son más adecuadas para RMNC que composiciones correspondientes de la técnica anterior basadas en disolventes lipófilos, tales como por ejemplo CDCl_3 , como constituyente principal. Señales de particular interés, es decir señales preferibles, de fosfatidilalcanoles para ^1H -RMNC, son aquellas que son relativamente insensibles a contaminantes esperados, es decir que se separan de las señales de los contaminantes, que pueden formarse tras la descomposición del fosfatidilalcanol. Tales señales incluyen, pero no se limitan a:

20

- Señales olefinicas (en el presente documento denominadas " $\text{H}_{\text{olefina}}$ ") y señales alílicas de cadenas laterales de ácidos grasos insaturados del fosfatidilalcanol, que generalmente se separan bien de por ejemplo contaminantes que resultan de la oxidación alílica de los mismos inducida por luz y oxígeno.

25

- Señales que se originan a partir de hidrógenos unidos al esqueleto de glicerol (en el presente documento denominadas " H_{A1} ", " H_{A2} ", " H_{B} " y " H_{C} "), de las que al menos una generalmente se separa bien de los contaminantes que resultan de la retirada hidrolítica de uno o ambos de las cadenas laterales de ácidos grasos o el fosfato o grupo alcanol portado por el fosfato.

30

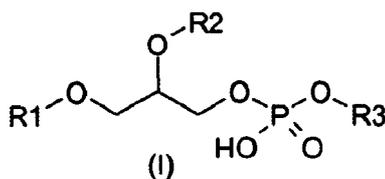
- Señales que se originan a partir de hidrógenos unidos al grupo alcanol, en particular los adyacentes al resto de P-O (en el presente documento denominado " H_{Et} "), que generalmente se separan bien de los contaminantes de alcanol que resultan de la retirada hidrolítica del fosfato o grupo alcanol portado por el fosfato.

35

El mismo razonamiento es válido para otros núcleos detectables de RMN, tales como por ejemplo ^{31}P y ^{13}C . El deuterio de la presente composición puede usarse ventajosamente, por ejemplo, para bloquear el espectrómetro de RMN cuando se configura para registrar ^1H , ^{31}P y ^{13}C . Las ventajas de la presente composición incluyen, por ejemplo, separación y aislamiento de al menos tres de las señales " $\text{H}_{\text{olefina}}$ ", " H_{A1} ", " H_{A2} ", " H_{B} " y " H_{C} ", hasta un grado mediante el cual puede realizarse integración adecuada para cuantificación mediante RMNC. Además, la forma de línea y resolución de desdoblamiento fino de al menos una de estas señales generalmente están mejoradas en comparación con composiciones comparables de la técnica anterior, lo que conduce a una cuantificación mediante RMNC mejorada (por ejemplo, compárese la figura 1C con la 2B; o la 1B o la 1C con la 4A).

40

Según una realización, la composición puede comprender un compuesto de fórmula I



45

o cualquier sal, diastereómero, enantiómero, mezcla racémica, mezcla escalémica o forma isotópicamente enriquecida del mismo y un disolvente polar aprótico deuterado. R1 puede seleccionarse del grupo que consiste en $-\text{C}(=\text{O})$ -alquilo lineal C2-25 y $-\text{C}(=\text{O})$ -alqueno lineal C2-25:1-6; R2 puede seleccionarse del grupo que consiste en $-\text{C}(=\text{O})$ -alquilo lineal C2-25 y $-\text{C}(=\text{O})$ -alqueno lineal C2-25:1-6; R3 puede ser $-\text{alquilo}$ C1-6, tal como por ejemplo metilo o etilo.

50

La suma del compuesto de fórmula I y cualquier forma de sal, diastereómero, enantiómero, mezcla racémica, mezcla escalémica y forma isotópicamente enriquecida del mismo puede superar $0,05 \mu\text{mol/g}$, tal como estar en el intervalo de $0,5 \mu\text{mol/g}$ a $10 \mu\text{mol/g}$, de dicha composición. Un intervalo de este tipo es óptimo con respecto a la ^1H -RMNC simultánea fácil y el riesgo minimizado de precipitación del compuesto de fórmula I. El disolvente polar aprótico deuterado puede ser miscible con agua en cualquier proporción a una temperatura tal como 20 a 25°C . Puede comprender menos del 5% de isótopos ^1H residuales tal como menos del 1, el 0,5 o el 0,1% de isótopos ^1H residuales, por ejemplo para permitir mediciones de ^1H -RMNC fáciles.

55

60

Según una realización, R3 puede ser etilo y R1 y R2 pueden representar la forma esterificada de ácidos carboxílicos endógenos seleccionados independientemente del grupo que consiste en ácidos grasos saturados, ácidos grasos insaturados ω -3, ácidos grasos insaturados ω -6, ácidos grasos insaturados ω -7 y ácidos grasos insaturados ω -9.

Según una realización, el compuesto de fórmula I puede representar homólogos de PEth endógenos, tales como los producidos en el ser humano tras la exposición a etanol, tal como se conoce bien en la técnica.

Según una realización, el compuesto de fórmula I puede estar enriquecido isotópicamente con deuterio o cualquier otro isótopo adecuado, tal como se conoce bien en la técnica. Un compuesto enriquecido de este tipo puede usarse ventajosamente como material de referencia en aplicaciones analíticas de, por ejemplo, EM o EM/EM. Los ejemplos no limitativos de compuestos de fórmula I enriquecidos isotópicamente incluyen compuestos en que el grupo alcohol, por ejemplo un grupo etanol, está completamente deuterado y compuestos que comprenden una pluralidad de isótopos ^{13}C .

Según una realización, el disolvente deuterado puede ser un disolvente polar aprótico. Los ejemplos no limitativos de tales disolventes incluyen acetona-d6, acetonitrilo-d3, dimetilsulfóxido-d6, N,N-dimetilformamida-d7 (DMF-d7), N-metil-2-pirrolidona-d9, tetrahidrofurano-d8, piridina-d5, 1,4-dioxano-d8 y diglima-d14. Se conocen bien en la técnica disolventes polares apróticos deuterados adecuados adicionales y pueden seleccionarse por el experto basándose en la información dada a conocer en el presente documento.

Según una realización, el disolvente polar aprótico deuterado, puede ser una mezcla de disolventes apróticos polares deuterados.

Según una realización, el disolvente polar aprótico deuterado, puede tener un punto de ebullición de al menos 80°C, tal como al menos de 100°C a 150°C, de manera preferible al menos 150°C, a presión atmosférica.

Según una realización, el disolvente polar aprótico deuterado, puede ser un disolvente fácilmente disponible y relativamente económico, tal como por ejemplo dimetilsulfóxido-d6 (DMSO-d6), DMF-d7 o acetona-d6.

Según una realización, la presente composición puede comprender además un aditivo anfífilo. Un aditivo anfífilo de este tipo tiene el objetivo principal de ayudar en la disolución del compuesto de fórmula I en una matriz acuosa u orgánica polar. Los ejemplos no limitativos de aditivos anfífilos incluyen detergentes seleccionados del grupo que consiste en detergentes aniónicos, catiónicos, no iónicos y zwitteriónicos. Los aditivos anfífilos adecuados seleccionados de estos grupos, u otros aditivos anfífilos adecuados, pueden seleccionarse por el experto basándose principalmente en las siguientes propiedades:

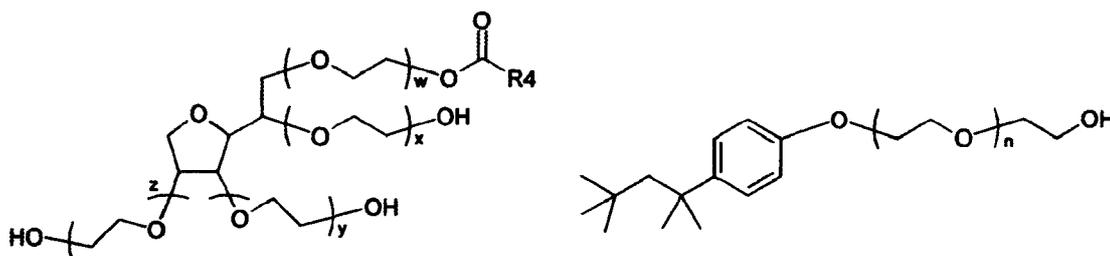
- Capacidad para ayudar en la disolución de un compuesto lipófilo en un entorno polar sin formación de gel o formación de, desde la perspectiva de la RMN, formación inadecuada de micelas.

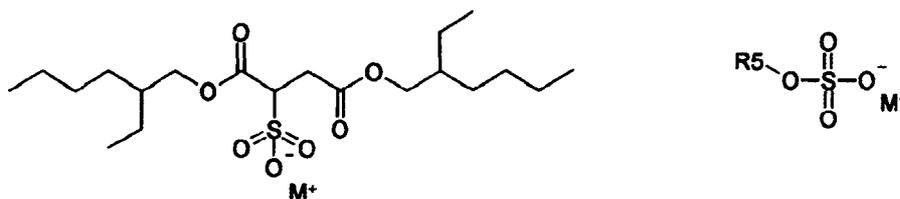
- Señales de alteración mínimas en el espectro de RMN correspondiente.

- Comportamiento de alteración mínima en aplicaciones de EM y/o EM/EM.

La presente composición puede comprender un aditivo anfífilo en una cantidad que supera 1 mg/g de la composición, tal como de 5 a 80 mg/ml de la composición. Los ejemplos no limitativos de aditivos anfífilos adecuados incluyen SDS, Na-AOT, Triton-X 100, Tween 20. Los aditivos anfífilos adecuados adicionales incluyen análogos y

La presente composición puede comprender un aditivo anfífilo en una cantidad que supera 1 mg/g de la composición, tal como de 5 a 80 mg/ml de la composición. Los ejemplos no limitativos de aditivos anfífilos adecuados incluyen SDS, Na-AOT, Triton-X 100, Tween 20. Los aditivos anfífilos adecuados adicionales incluyen análogos y homólogos de los aditivos anfífilos mencionados anteriormente, tal como se representa en el esquema en el presente documento, en el que la suma de w, x, y y z, de los que cada uno representa un número entero, puede estar en el intervalo de 15 a 25, el número entero n puede estar en el intervalo de 5 a 15, R4 puede ser alquilo C8-25, R5 puede ser alquilo C8-25 y M+ puede ser un catión metálico alcalino o amonio.

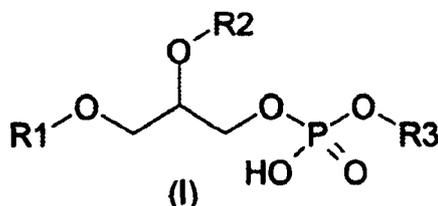




- 5 Según una realización, la presente composición puede comprender SDS, o un análogo u homólogo correspondiente tal como se menciona en el presente documento, como aditivo anfífilo, en un intervalo de concentraciones seleccionado de 5 a 60, tal como de 5 a 51 o preferiblemente de 25 a 35 mg/ml de la composición. Un intervalo de este tipo es óptimo con respecto a un equilibrio de la capacidad para realizar ^1H -RMNC y la solubilidad del compuesto de fórmula I.
- 10 Según una realización, la presente composición puede comprender Na-AOT, o un análogo u homólogo correspondiente tal como se menciona en el presente documento, como aditivo anfífilo, en un intervalo de concentraciones seleccionado de 5 a 100, tal como de 19 a 80 o preferiblemente de 25 a 50 mg/ml de la composición. Un intervalo de este tipo es óptimo con respecto a un equilibrio de la capacidad para realizar ^1H -RMNC y la solubilidad del compuesto de fórmula I.
- 15 Según una realización, la presente composición puede comprender Triton-X 100, o un análogo u homólogo correspondiente tal como se menciona en el presente documento, como aditivo anfífilo, en un intervalo de concentraciones seleccionado de 5 a 80, tal como de 8 a 46 o preferiblemente de 20 a 40 mg/ml de la composición. Un intervalo de este tipo es óptimo con respecto a un equilibrio de la capacidad para realizar ^1H -RMNC y la solubilidad del compuesto de fórmula I.
- 20 Según una realización, la presente composición puede comprender Tween 20, o un análogo u homólogo correspondiente tal como se menciona en el presente documento, como aditivo anfífilo, en un intervalo de concentraciones seleccionado de 5 a 80, tal como de 5 a 42 o preferiblemente de 20 a 40 mg/ml de la composición. Un intervalo de este tipo es óptimo con respecto a un equilibrio de la capacidad para realizar ^1H -RMNC y la solubilidad del compuesto de fórmula I.
- 25 Según una realización, la presente composición puede comprender además una referencia interna, con el fin de que sirva como referencia de RMNC cuantitativa. La referencia interna puede estar presente en una cantidad para permitir la detección mediante RMN en un periodo de tiempo que es esencialmente igual a o menor que el periodo de tiempo necesario para la detección mediante RMN del compuesto de fórmula I. La referencia interna puede originar además al menos una señal de RMN relacionada con un núcleo investigado, señal de RMN que es adecuada para la integración y que está separada esencialmente de todas las señales de RMN del compuesto de fórmula I relacionadas con el mismo núcleo investigado, con la generación de un espectro de RMN de la composición. La selección de una referencia interna adecuada la realiza fácilmente el experto, que puede elegir un compuesto que preferiblemente está disponible comercialmente y validado para aplicaciones de RMNC, que da una señal adecuada para la integración en una región libre de los espectros de RMN y señal que no está muy separada de al menos una de las señales de interés del compuesto de fórmula I.
- 30 Según una realización, la presente composición puede comprender además un disolvente adicional. Un disolvente adicional de este tipo generalmente es lipófilo y puede cambiar el desplazamiento de una o varias de las señales de RMN de interés hacia una región más adecuada para la integración, así como aumentar la resolución y el desdoblamiento fino de las mismas (por ejemplo, compárese la figura 2A con la figura 2B o la figura 8B con la figura 8C). Los ejemplos no limitativos de disolventes adicionales adecuados incluyen CH_2Cl_2 , CD_2Cl_2 , CHCl_3 y CDCl_3 . El experto puede seleccionar disolventes adicionales adecuados basándose en la lipofilidad y la alteración mínima de los espectros de RMN, y con el fin de la facilidad de preparación de una composición de este tipo, también basándose en el punto de ebullición. La concentración del disolvente adicional en la composición puede ajustarse de manera fina con el fin de lograr un efecto óptimo. Un intervalo de concentración adecuado puede ser de 0,1 a 10, tal como de 0,7 a 3,5 o preferiblemente de 0,5 a 5 mg/ml de la composición.
- 45 Según una realización, la presente composición puede comprender además un modificador polar. Un modificador polar de este tipo generalmente es un disolvente prótico polar y puede cambiar el desplazamiento de una o varias de las señales de RMN de interés hacia una región más adecuada para la integración, así como aumentar la resolución y el desdoblamiento fino de las mismas (por ejemplo, compárese la figura 2C con la figura 1A o la 2B, o la 10B con la 10A). Los ejemplos no limitativos de disolventes fuertes adecuados incluyen alcoholes alifáticos cortos, tales como metanol, preferiblemente en una forma deuterada. La concentración del modificador polar en la composición puede ajustarse de manera fina con el fin de lograr un efecto óptimo. Un intervalo de concentración adecuado puede ser del 1 al 50, tal como del 3 al 25 o preferiblemente del 10 al 20% en volumen de la composición.
- 50 Según una divulgación adicional, la presente composición puede comprender además un aditivo protector. Un aditivo protector de este tipo puede proteger el compuesto de fórmula I de la descomposición, tal como de la
- 60

descomposición mediada por aire y/o luz y/o de la descomposición hidrolítica. Los ejemplos no limitativos de aditivos protectores incluyen antioxidantes tales como por ejemplo BHT o sesamol, conservantes, agentes de ajuste del pH, colorantes y agentes de secado.

5 En el presente documento también se describe una sal de un compuesto de fórmula I



10 o cualquier diastereómero, enantiómero, mezcla racémica, mezcla escalémica o forma isotópicamente enriquecida del mismo. La forma de sal puede seleccionarse del grupo que consiste en sales de amonio, por ejemplo la sal de amonio, sales de alquilamonio, tales como por ejemplo la sal de metilamonio o etilamonio, sales de dialquilamonio en que los grupos alquilo son grupos alquilo seleccionados independientemente, tal como por ejemplo la sal de dimetil-, diisopropil- o dietilamonio, y sales de trialquilamonio en que los grupos alquilo son grupos alquilo seleccionados independientemente, tal como por ejemplo la sal de trimetil-, diisopropilmetil- o trietilamonio. La sal también puede ser una sal de tetraalquilamonio cuaternario. R1 puede seleccionarse del grupo que consiste en -C(=O)-alquilo lineal C2-25 y -C(=O)-alquenilo lineal C2-25:1-6; R2 puede seleccionarse del grupo que consiste en -C(=O)-alquilo lineal C2-25 y -C(=O)-alquenilo lineal C2-25:1-6; R3 puede ser -alquilo C1-6, tal como por ejemplo metilo o etilo.

20 Según una realización, la presente composición puede comprender la sal de un compuesto de fórmula I y un disolvente deuterado, tal como disolventes como polares y lipófilos ejemplificados mediante DMSO-d6 o acetona-d6 o THF-d8 y CDCl₃, respectivamente. Se encontró inesperadamente que una forma de sal de este tipo dio espectros de ¹H-RMN mejorados en comparación con composiciones de la técnica anterior (por ejemplo, compárese la figura 7 con la 1B o la 2B, la 10A con la 1B o la 4A, la 11 con la 1A o la 5D, y la 1C con la 6A o la 6B).

25 Según una realización, se proporciona un método de producción de la composición, que comprende las etapas de: (i) tratar el compuesto de fórmula I con un disolvente polar aprótico deuterado hasta que todo o una parte del compuesto de fórmula I se disuelve en el disolvente polar aprótico deuterado, para obtener una primera composición intermedia; y (ii) si la primera composición intermedia comprende cualquier materia heterogénea, retirar opcionalmente la materia heterogénea mediante filtración o decantación.

30 También se da a conocer en el presente documento un método de producción de la composición, que comprende las etapas de: (i) tratar el compuesto de fórmula I con un disolvente fuerte hasta que todo o una parte del compuesto de fórmula I se disuelve en el disolvente fuerte, para obtener una segunda composición intermedia; (ii) mezclar la segunda composición intermedia con un disolvente polar aprótico deuterado, para obtener una tercera composición intermedia; (iii) retirar más del 95% del disolvente fuerte, tal como hasta que el disolvente fuerte constituye menos de 10 mg/ml, de la tercera composición intermedia mediante destilación o evaporación, para obtener una cuarta composición intermedia; y (iv) si la cuarta composición intermedia comprende cualquier materia heterogénea, retirar opcionalmente la materia heterogénea mediante filtración o decantación, en el que el disolvente fuerte tiene un punto de ebullición de al menos 20°C menos que el punto de ebullición del disolvente polar aprótico deuterado y en que la solubilidad del compuesto de fórmula I es de al menos 1 mg/ml, tal como más de 5 mg/ml, del disolvente fuerte a temperatura de 25°C.

45 Según una realización, se proporciona un método para la determinación de la concentración de un compuesto de fórmula I en la composición mediante ¹H-RMNC que comprende las etapas de: (i) recoger al menos dos señales de RMN relacionadas con un núcleo investigado de la composición; (ii) recoger la integral de al menos una señal de RMN aislada originada por el compuesto de fórmula I y al menos una señal de RMN aislada originada por un componente determinante; y (iii) calcular la concentración del compuesto de fórmula I basándose en las integrales recogidas en la etapa (ii), en el que puede conocerse la cantidad del componente determinante o la concentración del componente determinante en la composición; pudiendo seleccionarse el componente determinante del grupo que consiste en disolvente protonado residual en disolvente polar aprótico deuterado, un aditivo anfífilo, la referencia interna, una referencia externa y el aditivo.

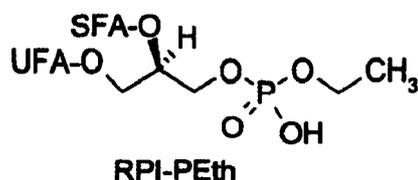
50 Según una realización, la presente composición puede usarse para la producción de una disolución patrón analítica. La composición puede diluirse, por ejemplo, en una disolución acuosa, tal como por ejemplo la mezcla inicial usada en CL-EM(/EM) en gradiente, hasta una concentración deseada, mediante lo cual se obtiene tal disolución patrón.

En la tabla en el presente documento se enumeran combinaciones preferidas, que representan cada una, una realización de la invención, de la forma de un compuesto de fórmula I, el disolvente deuterado, la referencia interna,

el disolvente fuerte, el modificador polar y el aditivo anfífilo de la composición de la invención (realización n.º 1 a 29).

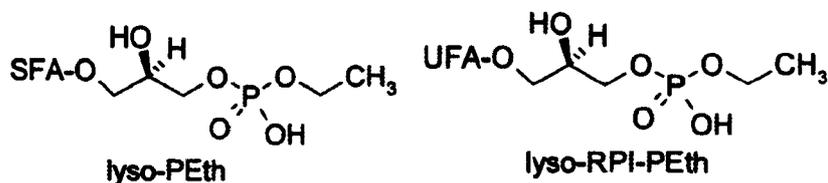
Reali- zación n.º	Forma de compuesto de fórmula (H: forma original protonada; NH3: sal de amonio; NMe3: sal de trimetilamonio)	Disolvente deuterado	Referencia interna	Disolvente fuerte	Concentración de disolvente fuerte (mg/ml)	Modificador polar	Concentración de modificador polar (% en volumen)	Aditivo anfílico	Concentración de aditivo anfílico (mg/ml)
1	H	DMSO-d6	dimetilsulfona	ninguno	N.D.	ninguno	N.D.	Triton-X 100	de 20 a 40
2				CH ₂ Cl ₂ , CD ₂ Cl ₂ , CHCl ₃ o CCl ₄	de 0,5 a 5				
3	NMe3							SDS	de 25 a 35
4									
5							de 10 a 20		
6				ninguno	N.D.				
7								Triton-X 100	de 20 a 40
8									
9								SDS	de 25 a 35
10	NH3								
11				CR ₂ Cl ₂ , CO ₂ Cl ₂ , CHCl ₃ o CCl ₄	de 0,5 a 5				
12							de 10 a 20		
13									
14				ninguno	N.D.				
15		acetona-d6	ninguna o adecuada					Triton-X 100	de 20 a 40
16									
17							de 10 a 20		
18								SDS	de 25 a 35
19	NMe3		dimetilsulfona				de 10 a 20		
20								ninguno	N.D.
21			ninguna o adecuada					SDS	de 25 a 35
22									
23	H							Triton-X 100	de 20 a 40
24		DMF-d7							
25				CH ₂ Cl ₂ , CD ₂ Cl ₂ , CHCl ₃ o CCl ₄	de 0,5 a 5			SDS	de 25 a 35
26				ninguno	N.D.				
27							de 10 a 20		
28	NH3							ninguno	N.D.
29	NMe3							SDS	de 25 a 35

Se ha encontrado que están presentes isómeros de PEth posicionales inversos (RPI-PEth) como equivalentes minoritarios para diversos homólogos de PEth, por ejemplo, PEth-16:0/18:1 y PEth-16:0/18:2, en diversas muestras, por ejemplo muestras de referencia que comprenden PEth presentes de la técnica anterior y muestras de sangre humana. La estructura de un RPI-PEth genérico típico se muestra a continuación (estructura marcada como "RPI-PEth"), en la que "UFA" representa un residuo de ácido graso insaturado con al menos un doble enlace C-C, por ejemplo -C(=O)-alquenoilo lineal C2-25:1-6, y "SFA" representa un residuo de ácido graso saturado sin dobles enlaces, por ejemplo -C(=O)-alquilo lineal C2-25.



Sin querer restringirse a la teoría, los inventores creen que tales RPI-PEth se originan a partir de las RPI-PC correspondientes, a partir de las cuales puede sintetizarse PEth de manera endógena o biomimética mediante el empleo de PLD. Se conoce previamente que se producen diversas cantidades de RPI-PC para varias PC en diferentes sistemas biológicos, como por ejemplo en seres humanos. Las propiedades cromatográficas y espectrales similares, así como los pesos moleculares idénticos, hacen que RPI-PEth sea difícil de diferenciar analíticamente del PEth correspondiente. De manera análoga a los pares isoméricos correspondientes entre las PC, se encontró que las intensidades relativas de fragmentos secundarios estudiados comúnmente de RPI-PEth en aplicaciones de EM/EM son diferentes de los PEth correspondientes. Por tanto, se introduce un error desconocido en la cuantificación mediante CL-EM/EM de homólogos de PEth individuales cuando esta cuantificación se basa en tales intensidades de segundo fragmento, a menos que se tenga en cuenta la distribución isomérica. En el presente documento se dan a conocer RPI-PEth novedosos útiles como referencias analíticas. Estas referencias pueden usarse, por ejemplo, en composiciones que comprenden una cantidad apropiada del PEth correspondiente para una calibración más precisa de, por ejemplo, instrumentos de CL-EM/EM para imitar la distribución isomérica natural de PEth/RPI-PEth en las especies de interés, por ejemplo el ser humano.

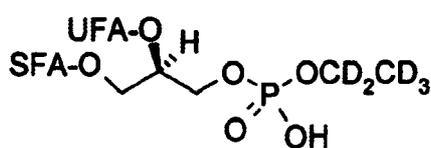
La actividad fosfolipasa endógena puede dar como resultado la formación de metabolitos de lyso-PEth mediante la escisión del residuo de ácido carboxílico en sn-2 de PEth original. La estructura de un lyso-PEth genérico típico se muestra a continuación (estructura marcada como "lyso-PEth"). La estructura correspondiente en que los residuos de SFA y UFA tienen sitios intercalados representa un lyso-RPI-PEth típico, tal como se ilustra a continuación. En las realizaciones dadas a conocer en el presente documento, ha de entenderse que los ejemplos y el razonamiento relacionados con lyso-PEth son aplicables al lyso-RPI-PEth correspondiente, tal como entiende fácilmente el experto. Lyso-PEth también puede formarse mediante biosíntesis a partir de lyso-PC. Lyso-PEth no sólo puede servir como biomarcador de etanol *per-se*, sino que la relación entre los niveles de lyso-PEth y el PEth correspondiente puede facilitar información adicional relativa al hábito de consumo de alcohol de una persona. Por ejemplo, si el PEth y el lyso-PEth correspondiente tienen semividas diferentes *in vivo*, la relación entre los niveles correspondientes permite que el experto diferencie entre los dos casos siguientes, que pueden dar como resultado niveles similares de PEth: a) la persona ha consumido una cantidad relativamente grande de etanol hace relativamente mucho tiempo, y b) la persona ha consumido una cantidad relativamente pequeña de etanol hace relativamente poco tiempo.



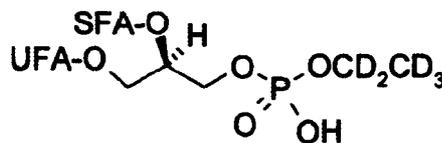
En el presente documento se dan a conocer lyso-PEth y lyso-RPI-PEth novedosos útiles como referencias analíticas. Estas referencias pueden usarse, por ejemplo, como referencias en la calibración de instrumentos analíticos, por ejemplo instrumentos de CL-EM/EM, para la cuantificación de lyso-PEth en la sangre de una persona. La comparación de los niveles de lyso-PEth y PEth correspondiente puede permitir que el experto difiera entre los casos a) y b) anteriores.

d5-PEth (es decir PEth penta-deuterado) tienen un peso molecular que es aproximadamente 5 unidades mayor que los lípidos no marcados correspondientes. Esta diferencia permite el uso de d5-PEth como patrón interno en aplicaciones analíticas basadas en, por ejemplo, técnicas de CL-EM/(EM). A continuación se muestra la estructura de un d5-PEth genérico típico (estructura marcada como "d5-PEth"). La estructura correspondiente en que los residuos de SFA y UFA tienen sitios intercalados representa un d5-RPI-PEth típico, tal como se ilustra a continuación. En las realizaciones dadas a conocer en el presente documento, ha de entenderse que los ejemplos y el razonamiento relacionados con d5-PEth son aplicables al d5-RPI-PEth correspondiente, tal como entiende

fácilmente el experto.

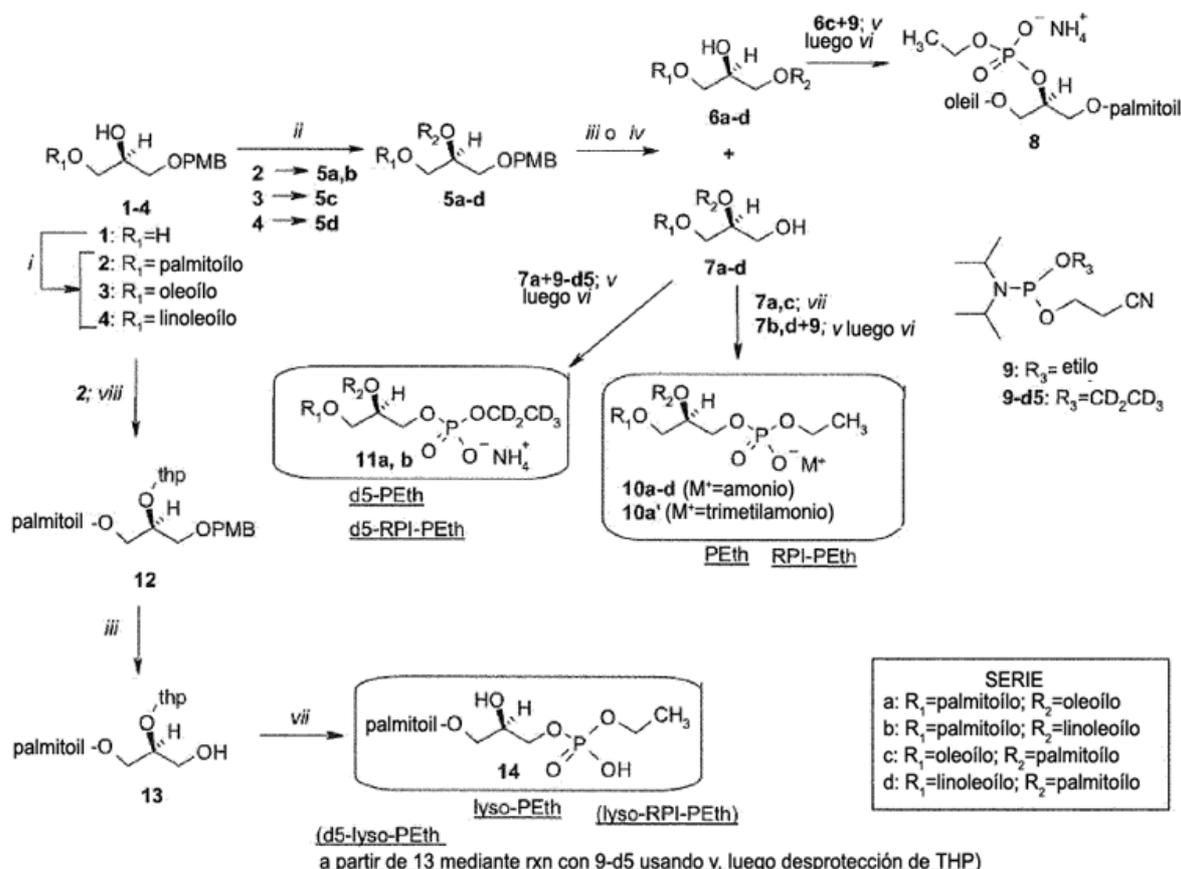


d5-PEth

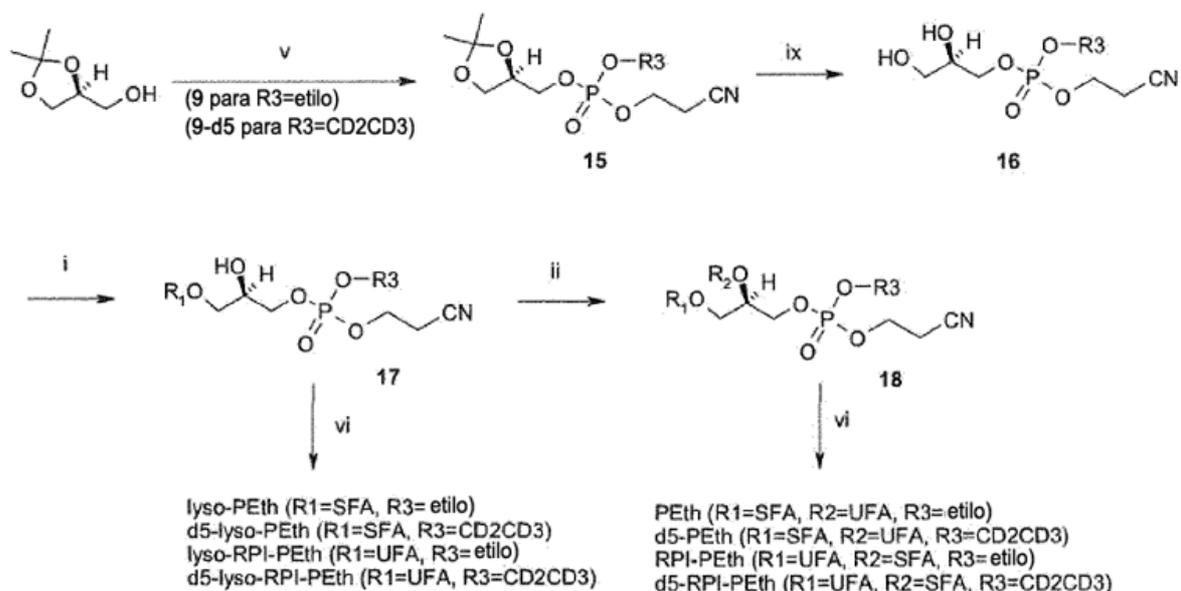


d5-RPI-PEth

- 5 En el presente documento se dan a conocer d5-PEth y/o d5-RPI-PEth novedosos útiles como referencias analíticas. Estas referencias pueden usarse, por ejemplo, como referencias, tales como por ejemplo referencias internas, en la calibración de o cuando se usan instrumentos analíticos, por ejemplo instrumentos de CL-EM/EM, para la cuantificación de PEth o RPI-PEth, respectivamente, en la sangre de una persona.
- 10 Los compuestos de fórmula I y II pueden prepararse a partir de derivados de glicerol fácilmente disponibles que portan un grupo protector adecuado en el grupo hidroxilo, que finalmente se unen al átomo de fósforo en el compuesto final de fórmula I o II, según una realización. Por ejemplo, puede usarse para-metoxibencilo (PMB) como grupo protector de este tipo, tal como se ilustra en el esquema de síntesis a modo de ejemplo en el presente documento para la síntesis de PEth, d5-PEth, RPI-PEth, lyso-PEth, d5-RPI-PEth, lyso-RPI-PEth y d5-lyso-RPI-PEth, perteneciendo cada uno al grupo de compuestos representados por los compuestos de fórmula I o II. En el/los
- 15 esquema(s) de síntesis, un SFA se ejemplifica como palmitoílo y un UFA como oleoílo o linoleoílo, según una realización. Sin embargo, estas ejemplificaciones no han de entenderse como limitativas, sino más bien que sirven como ejemplos adecuados para ayudar al experto a entender completamente la invención. Los siguientes reactivos y condiciones pueden usarse para facilitar los rendimientos indicados de los productos deseados: (i) SFA o UFA (1,05 eq.), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 1,05 eq.), 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 0,05 eq.), DCM, de 0°C a ta (del 35 al 45%), (ii) SFA o UFA (1,4 eq.), DCC (1,4 eq.), DMAP (0,1 eq.), diclorometano (DCM), ta (del 91 al 99,6%), (iii) 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ, 1,05 eq.), DCM:H2O (96:4, v:v), ta (el 29% de 7a, el 77% de 6c), (iv) nitrato cérico-amónico (CAN, 10 eq.), acetonitrilo:H2O (9:1, v:v), ta (del 13 al 89% de 7b-d), (v) 9 (para 8, 10b y 10d) o 9-d5 (para 11) (2,0 eq.), tetrazol (2,2 eq.), acetonitrilo:THF (1:2,6, v:v), ta, entonces H2O2 (el 30% ac., 8 eq.), (vi) THF:amoníaco ac. al 25% (9:1, v:v), ta (del 25 al 58%, dos etapas), (vii) diclorofosfato de etilo (EDCP, 2,5 eq.), trietilamina (5,2 eq.), DCM, de 0°C a ta (del 16 al 22%), (viii) 3,4-dihidro-2H-pirano (2,0 eq.), p-toluenosulfonato de piridinio (0,2 eq.), DCM, ta (cuant.). Pueden formarse cantidades minoritarias de subproductos 2-acilados y 1,2-
- 20 diacilados en la etapa i, pero estos pueden separarse fácilmente de los monoésteres 2, 3 y 4 1-acilados deseados mediante cromatografía sobre gel de sílice. Se prefieren las condiciones y los reactivos (iv) con respecto a los (iii) para la síntesis de 7a-d debido a una menor tendencia de migración de acilo y formación por tanto de 6a-d no deseado. Generalmente se prefiere la fosforilación empleando el reactivo 9 o 9-d5 con respecto a la fosforilación empleando EDCP debido a los mayores rendimientos de los productos deseados. El grupo protector tetrahidropiraniolo (THP) de 13 se escindió simultáneamente durante la fosforilación empleando EDCP (condiciones vii) en la síntesis de lyso-PEth 14. Lyso-PEth, por ejemplo 14, y los d5-lyso-PEth correspondientes pueden prepararse a partir de 13, o derivados correspondientes que portan otros residuos de ácidos grasos excepto palmitoílo, mediante fosforilación empleando el reactivo 9 y 9-d5, respectivamente, seguido por desprotección ácida suave del grupo de thp y retirada básica del grupo cianoetilo, tal como se conoce bien en la técnica. Las formas de sal deseadas de compuestos de la invención, por ejemplo 10a-d, 10a', 11 y 14, pueden obtenerse mediante la elección apropiada del sistema de eluyentes en la purificación cromatográfica sobre gel de sílice de los materiales en bruto. Con el fin de obtener la forma protonada original en el caso de lyso-PEth, por ejemplo 14, y d5-lyso-PEth, puede usarse el sistema de gradiente tolueno:acetona:ácido acético:agua (de 6:4:0:0 a 55:36:7:2). Para la recuperación de las sales de amonio y trimetilamonio, como por ejemplo en el caso de 8, 10a-d, 11a,b y 10a', pueden usarse los sistemas de gradiente DCM:tolueno:etanol abs.:amoníaco ac. al 25% (de 80:9:10:1 a 74:8:17:1) y DCM:tolueno:etanol abs.:trimetilamina al 13% en THF (de 79:9:10:2 a 70:8:20:2) o
- 35 DCM:tolueno:metanol:trimetilamina ac. al 28% (de 87,5:9:3:0,5 a 77:12:10:1), respectivamente.
- 40
- 45



Los compuestos de fórmula I, II y III pueden prepararse a partir de derivados de glicerol disponibles fácilmente mediante la introducción inicial o temprana del resto que contiene fósforo en una forma protegida, según una realización y tal como se ejemplifica a continuación. Por ejemplo, 1,2-isopropiliden-*sn*-glicerol puede fosforilarse inicialmente (condiciones v) mediante el empleo de 9 o 9-d5. El grupo protector 1,2-isopropilideno del producto 15 protegido con cianoetilo obtenido simultáneamente puede retirarse mediante tratamiento ácido suave (condiciones ix), tal como por ejemplo mediante tratamiento a temperatura ambiental o reflujo en ácido acético acuoso a del 5 al 30% en volumen, tal como el 10% en volumen, o HCl ac. de 0,5 a 2 M a temperatura ambiental, con o sin la presencia de un codisolvente orgánico, tal como por ejemplo dioxano o THF a del 10 al 70% en volumen, o mediante cualquier método bien conocido en la técnica que no afecte gravemente al grupo cianoetilo, para producir diol 16 (representantes del grupo de compuestos de fórmula III). La introducción regioselectiva de un residuo de ácido carboxílico, por ejemplo un SFA o un UFA, en el hidroxilo en *sn*-1 puede llevarse a cabo entonces por ejemplo en las condiciones i, para producir el producto intermedio 17. Con el fin de obtener compuestos seleccionados del grupo que consiste en lyso-PEth, d5-lyso-PEth, lyso-RPI-PEth y d5-lyso-RPI-PEth, puede retirarse el grupo cianoetilo de un 17 sustituido de manera adecuada mediante tratamiento en condiciones básicas adecuadas, tal como según las condiciones vi, o mediante tratamiento en cualquier otra condición adecuada usadas para retirar un grupo cianoetilo, tal como se conoce bien en la técnica. Con el fin de obtener compuestos seleccionados del grupo que consiste en PEth, d5-PEth, RPI-PEth y d5-RPI-PEth, puede llevarse a cabo entonces la introducción de un residuo de ácido carboxílico, por ejemplo un SFA o un UFA, en el hidroxilo en *sn*-2 para obtener un producto intermedio 18 sustituido de manera adecuada, antes de retirar el grupo cianoetilo tal como se describe.



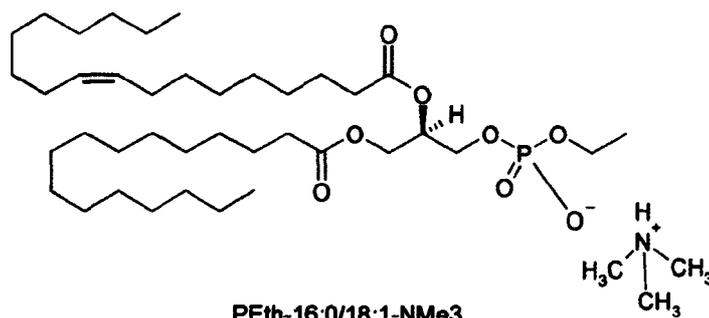
Pueden usarse grupos protectores alternativos, tal como se conoce bien en la técnica, en lugar del grupo protector 1,2-isopropilideno del compuesto 15 protegido simultáneamente con cianoetilo. El experto entenderá que será necesario retirar un grupo protector de este tipo en condiciones que no afecten significativamente al resto del compuesto 15, por ejemplo al grupo cianoetilo. Los ejemplos no limitativos de tales grupos protectores incluyen grupos basados en sililo, por ejemplo TBDMS, y bencilo. El primero puede retirarse con reactivos que contienen F suaves, y el segundo mediante hidrogenación en presencia de un catalizador de metal de transición, por ejemplo paladio sobre carbono. Los ejemplos adicionales de los grupos protectores adecuados incluyen grupos acilo, por ejemplo acetilo y acetilo sustituidos con grupos electroattractores, por ejemplo tricloroacetilo.

PEth y d5-PEth de la invención que portan un UFA sensible a la oxidación que comprende más de un doble enlace, por ejemplo linoleoilo, en la posición sn-2, pueden sintetizarse a partir de productos intermedios que portan un SFA en la posición sn-1, un THP en la posición sn-2 y un grupo protector de tipo bencilo escindible oxidativamente en la posición sn-3, como por ejemplo el compuesto 12. El grupo protector en sn-3 puede escindirse en primer lugar en condiciones oxidativas, como por ejemplo las condiciones iii o iv. El hidroxilo libre resultante puede fosforilarse entonces mediante el empleo de 9 o 9-d5, seguido por la retirada del grupo thp en condiciones ácidas suaves bien conocidas en la técnica para revelar un hidroxilo en sn-2 libre. El UFA sensible a la oxidación puede introducirse entonces en el hidroxilo en sn-2 antes de la retirada final del grupo cianoetilo, siendo ambas etapas por ejemplo según los métodos descritos en el presente documento. Mediante el modo descrito de llevar a cabo la escisión oxidativa del grupo protector en sn-3 antes de la introducción del UFA sensible, se evitan ventajosamente los productos secundarios no deseados que resultan de reacciones mediadas por oxidación del UFA.

Ejemplos de compuestos

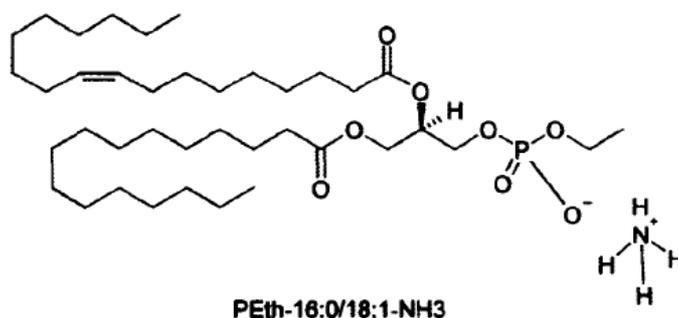
Una realización de la invención se refiere a un procedimiento para preparar sales de un compuesto según la fórmula I mediante cromatografía del compuesto de fórmula I correspondiente en su forma original protonada o en cualquier forma de sal mediante el uso de un eluyente que comprende una base libre volátil de la sal correspondiente que va a obtenerse. Otras realizaciones de la invención se refieren a formas de sal específicas de los compuestos de fórmula I, tales como por ejemplo formas de sal de amonio, alquilamonio, dialquilamonio y trialquilamonio de los mismos, tal como se ejemplifica en el presente documento mediante ejemplos específicos no limitativos.

Ejemplo de compuesto 1 - La sal de trimetilamonio de PEth-16:0/18:1, ejemplo de un compuesto de la invención



Se configuró una columna de gel de sílice de forma cilíndrica, con una altura de 85 mm y con un diámetro de 50 mm permitiendo que una suspensión de gel de sílice en una primera mezcla de CH₂Cl₂, tolueno, etanol abs. y trimetilamina al 13% en peso en THF (79:9:10:2, v:v:v:v) sedimentara por gravedad en ella. Entonces se aplicaron 400 mg de la forma original protonada de PEth-16:0/18:1 (PEth-16:0/18:1-H) a la parte superior de la columna. A continuación se realizó la elución empleando un gradiente que comenzaba con la primera mezcla y que finalizaba con una segunda mezcla que consistía en CH₂Cl₂, tolueno, etanol abs. y trimetilamina al 13% en peso en THF (70:8:20:2, v:v:v:v). Se monitorizaron las fracciones recogidas (50 ml) mediante CCF usando la segunda mezcla para elución y una mezcla de 4-anisaldehído (1 ml), H₂SO₄ conc. (1 ml) y ácido acético (0,5 ml) en etanol abs. (30 ml) para desarrollar las manchas. Se recogieron las fracciones que comprendían el compuesto del título, tal como se consideró mediante el uso de PEth-16:0/18:1-H como referencia de CCF, y se concentraron a vacío para producir 362 mg de PEth-16:0/18:1-NMe3 como un sólido blanquecino. Los ejemplos de espectros de ¹H-RMN en diversas matrices del PEth-16:0/18:1-NMe3 obtenido se muestran en las figuras 6B, 7, 8B, 8C, 8D, 9A, 9B, 9C, 10A, 10B y 11.

Ejemplo de compuesto 2 - La sal de amonio de PEth-16:0/18:1



Se configuró una columna de gel de sílice de forma cilíndrica, con una altura de 50 mm y con un diámetro de 50 mm, permitiendo que una suspensión de gel de sílice en una primera mezcla de CH₂Cl₂, tolueno, etanol abs. y amoniaco acuoso al 25% en peso (80:9:10:1, v:v:v:v) sedimentara por gravedad en ella. Entonces se aplicaron 70 mg de PEth-16:0/18:1-NMe3 en la parte superior de la columna. A continuación se realizó la elución empleando un gradiente que comenzaba con la primera mezcla y que finalizaba con una segunda mezcla que consistía en CH₂Cl₂, tolueno, etanol abs. y amoniaco acuoso al 25% en peso (74:8:17:1, v:v:v:v). Se monitorizaron las fracciones recogidas (50 ml) mediante CCF usando la segunda mezcla para elución y una mezcla de 4-anisaldehído (1 ml), H₂SO₄ conc. (1 ml) y ácido acético (0,5 ml) en etanol abs. (30 ml) para desarrollar las manchas. Se recogieron las fracciones que comprendían el compuesto del título, tal como se consideró mediante el uso de PEth-16:0/18:1-NMe3 como referencia de CCF, y se concentraron a vacío para producir 38 mg de PEth-16:0/18:1-NH3 como un sólido ceroso blanquecino. Los ejemplos de espectros de ¹H-RMN en diversas matrices del PEth-16:0/18:1-NH3 obtenido se muestran en las figuras 6A, 8A y 10C.

Divulgaciones específicas se refieren a compuestos de fórmula II, a compuestos de fórmula III y a métodos para la producción de compuestos de fórmula II y/o III, tal como se ejemplifica en el presente documento mediante ejemplos específicos no limitativos.

Ejemplo de compuesto 3 - 1-Palmitoil-3-(4-metoxibencil)-sn-glicerol (2), ejemplo de producto intermedio de síntesis

A una mezcla fría (0°C) de 3-(4-metoxibencil)-sn-glicerol 1 (4,245 g, 20,0 mmol), ácido palmítico (5,385 g, 21,0 mmol) y DMAP (122 mg, 1,0 mmol) en DCM seco (100 ml) se le añadió mientras se agitaba a lo largo de 14 h, mediante el empleo de una bomba de jeringa, una disolución de DCC en DCM seco (0,874 M, 24,0 ml, 21,0 mmol). Entonces se permitió que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiental a lo largo de 12 h y se retiró el precipitado formado mediante filtración. Se lavó el filtrado con DCM (3 X 50 ml) antes de la concentración de las

porciones combinadas de DCM y la purificación del material en bruto obtenido mediante cromatografía sobre gel de sílice (gradiente desde *n*-heptano hasta *n*-heptano:acetato de etilo:*i*-PrOH 67,5:30:2,5) para producir 4,096 g (rendimiento del 45%) del compuesto del título como un sólido ceroso incoloro. También se obtuvo una fracción de elución más lenta (2,49 g, rendimiento del 28%) que comprendía una mezcla 9:1 del compuesto del título y el subproducto 2-palmitoil-3-(4-metoxibencil)-*sn*-glicerol, tal como resulta evidente por la presencia de un pentente independiente a 5,04 ppm y un multiplete independiente a de 3,59 a 3,68 ppm (¹H-RMN, 400 MHz, cloroformo-*d*).

Ejemplo de compuesto 4 - 1-Oleoil-3-(4-metoxibencil)-sn-glicerol (3), ejemplo de producto intermedio de síntesis

Se preparó el compuesto del título según el procedimiento para la preparación de 2 a partir de 3-(4-metoxibencil)-*sn*-glicerol 1 (5,00 g, 23,56 mmol), ácido oleico (6,32 g, 22,38 mmol), DMAP (280 mg, 2,36 mmol) y DCC en DCM seco (1,031 M, 24,0 ml, 24,74 mmol) para producir 5,08 g (rendimiento del 48%) del compuesto del título como un sólido ceroso incoloro.

Ejemplo de compuesto 5 - 1-Palmitoil-2-oleoil-3-(4-metoxibencil)-sn-glicerol (5a), ejemplo de producto intermedio de síntesis

Se agitaron el compuesto 2 (2,398 g, 5,32 mmol), ácido oleico (1,65 g, 5,85 mmol), DCC (1,208 g, 5,85 mmol) y DMAP (65 mg, 0,53 mmol) en DCM (100 ml) a temperatura ambiental durante 16 h. Entonces se añadió otra porción de cada uno de ácido oleico (451 mg, 1,60 mmol) y DCC (329 mg, 1,60 mmol), seguido por agitación durante otras 16 h antes de la retirada del precipitado formado mediante filtración. Se lavó el filtrado con DCM (3 X 50 ml) antes de la concentración de las porciones de DCM combinadas y la purificación del material en bruto obtenido mediante cromatografía sobre gel de sílice (gradiente desde *n*-heptano hasta *n*-heptano:acetato de etilo 9:1) para producir 3,465 g (rendimiento del 91%) del compuesto del título como un jarabe incoloro que cristalizó lentamente.

Ejemplo de compuesto 6 - 1-Oleoil-2-palmitoil-3-(4-metoxibencil)-sn-glicerol (5c), ejemplo de producto intermedio de síntesis

Se preparó el compuesto del título según el procedimiento para la preparación de 5a a partir de 3 (2,89 g, 6,22 mmol) y ácido palmítico (1,75 g, 6,84 mmol) para producir 4,42 g (rendimiento del 99,3%) del compuesto del título como un jarabe incoloro que cristalizó lentamente.

Ejemplo de compuesto 7 - 1-Oleoil-3-palmitoil-sn-glicerol (6c), ejemplo de producto intermedio de síntesis

A una mezcla con agitación de 5c (3,29 g, 4,60 mmol) y agua (3,0 ml) en DCM (75 ml) se le añadió 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (1,09 g, 4,83 mmol) en una porción. Tras agitar a temperatura ambiental durante 7 h, se filtró la mezcla de reacción a través de un filtro corto de celite® y se concentró. Se purificó el residuo obtenido mediante cromatografía sobre gel de sílice (gradiente desde DCM hasta DCM:*i*-PrOH 97,5:2,5). Además de las fracciones que eluyen más lentamente, que contenían diversas cantidades del compuesto del título y 1-oleoil-2-palmitoil-*sn*-glicerol 7c, se obtuvieron 2,107 g (rendimiento del 77%) del compuesto del título en forma pura como un sólido blanco.

Ejemplo de compuesto 8 - 1-Palmitoil-2-linoleoil-sn-glicerol (7b), ejemplo de producto intermedio de síntesis

A una mezcla agitada rápidamente de 1-palmitoil-2-linoleoil-3-(4-metoxibencil)-*sn*-glicerol 5b (668 mg, 0,936 mmol) y agua (1,0 ml) en acetonitrilo (9,0 ml) se le añadió CAN (5,13 g, 9,36 mmol). Se continuó la agitación a temperatura ambiental durante 3 h antes de vertido sobre salmuera (50 ml) y extracción con DCM (50 + 3x20 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio y se concentraron para facilitar el material en bruto. La purificación mediante cromatografía sobre gel de sílice (*n*-heptano:acetato de etilo 9:1) dio 115 mg (rendimiento del 21%) del compuesto del título como un aceite incoloro.

Ejemplo de compuesto 9 - 1-Linoleoil-2-palmitoil-sn-glicerol (7d), ejemplo de producto intermedio de síntesis

Se preparó el compuesto del título según el procedimiento para la preparación de 7b a partir de 1-linoleoil-2-palmitoil-3-(4-metoxibencil)-*sn*-glicerol 5d (1,409 g, 1,976 mmol) para producir 150 mg (rendimiento del 13%) del compuesto del título como un aceite incoloro.

Ejemplo de compuesto 10 - 2-Cianoetoxi-(etoxi)-(N,N-diisopropilamino)fosfina (9), ejemplo de producto intermedio de síntesis

A una disolución fría (0°C) y agitada de 2-cianoetil-N,N-diisopropilclorofosforamidita (892 µl, 4,0 mmol) en DCM seco (20 ml) se le añadió, en orden consecutivo, trietilamina (586 µl, 4,2 mmol) y etanol abs. (245 µl, 4,2 mmol). Entonces se permitió que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiental y se agitó durante otros 50 min antes de la concentración a vacío. Se trató el residuo con dietil éter (10 + 2x5 ml) seguido por filtración para retirar sólidos a través de un filtro de jeringa. Se concentró la disolución filtrada mediante una corriente lenta de nitrógeno para facilitar 911 mg (rendimiento del 93%) del compuesto del título en bruto como un aceite amarillento. Este aceite se

disolvió en THF seco (15,2 ml) para proporcionar una disolución (60 mg/ml) que se usó directamente como reactivo en reacciones adicionales descritas en el presente documento.

Ejemplo de compuesto 11 - 2-Cianoetoxi-(1,1,2,2,2-pentadeuteroetoxi)-(N,N-diisopropilamino)fosfina (9-d5), ejemplo de un compuesto de la invención

Se preparó el compuesto del título según el procedimiento usado para la preparación de 9, con la única excepción de que se usó etanol deuterado seco (etanol-d5) en lugar de etanol abs., para facilitar 945 mg (rendimiento del 94%) del compuesto del título como un aceite amarillento. ¹H-RMN (400 MHz, cloroformo-d) δ ppm 1,19 (dd, J=6,7, 4,2Hz, 12H), 2,65 (t, J=6,6Hz, 2H), 3,54-3,68 (m, 2H), 3,76-3,92 (m, 2H).

Ejemplo de compuesto 12 – Sal de amonio de 1-oleoil-2-etoxihidroxifosfinil-3-palmitoil-sn-glicerol (8)

A 6c (297 mg, 0,50 mmol) se le añadió una disolución de 9 en THF seco (60 mg/ml, 4,1 ml, 1,0 mmol) mientras se agitaba a temperatura ambiental. Entonces se añadió una disolución de tetrazol en acetonitrilo (0,45 M, 2,55 ml, 1,15 mmol) y se continuó la agitación durante otras 2 h antes de la adición de peróxido de hidrógeno acuoso (el 35% en peso, 387 μl, 4,5 mmol). Entonces se agitó la mezcla de reacción durante otros 30 min antes del reparto entre agua (50 ml) y DCM (25 ml). Se extrajo la fase acuosa con DCM (3x20 ml), se lavaron las fases orgánicas combinadas con hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado y se secaron sobre de sulfato de sodio antes de la concentración a vacío, para proporcionar 422 mg del producto intermedio protegido con cianoetilo en bruto como un aceite incoloro. Entonces se agitó este aceite en una mezcla de THF (4,5 ml) y amoniaco acuoso (25% en peso, 0,5 ml) a temperatura ambiental durante 24 h antes de la concentración a vacío y la purificación del residuo obtenido mediante cromatografía sobre gel de sílice (DCM:tolueno:etanol abs.:amoniaco acuoso al 25% en peso, gradiente desde 80:9:10:1 hasta 74:8:17:1). Se obtuvo el compuesto del título (Rf=0,4 usando DCM:tolueno:metanol:amoniaco acuoso al 25% en peso, 75:12:12:1, como eluyente analítico) como un sólido blanco (208 mg, rendimiento del 58%).

Ejemplo de compuesto 13 – Sal de amonio de 1-linoleoil-2-palmitoil-3-etoxihidroxifosfinil-sn-glicerol (10d), ejemplo de un compuesto de la invención

Se preparó el compuesto del título según el procedimiento usado para la preparación de 8 a partir de 7d (75,5 mg, 0,1273 mmol), para facilitar 40,4 mg (rendimiento del 39,5%) del compuesto del título como un sólido blanco. ¹H-RMN (400MHz, acetona-d6: metanol-d4 97:3) δ ppm 0,85-0,92 (m, 6H), 1,21 (t, J=7,1Hz, 3H), 1,24-1,42 (m, 38H), 1,61 (sex, J=7,0Hz, 4H), 2,05-2,12 (m, 4H), 2,32 (q, J=7,6Hz, 4H), 2,80 (t, J=6,4Hz, 2H), 3,88 (q, J=7,2Hz, 2H), 3,96 (t, J=5,8Hz, 2H), 4,18 (dd, J=12,0, 6,8Hz, 1H), 4,41 (dd, J=12,0, 3,4Hz, 1H), 5,17-5,24 (m, 1H), 5,28-5,43 (m, 4H) ¹³C-RMN (acetona-d6:metanol-d4 97:3) δ ppm 14,45, 16,93, 17,00, 23,43, 25,75, 25,78, 27,92, 29,97, 30,17, 30,19, 30,23, 30,40, 30,54, 30,59, 32,33, 32,75, 34,61, 34,82, 48,42, 48,63, 48,84, 49,05, 49,27, 61,17, 61,83, 63,31, 64,18, 64,23, 71,44, 71,53, 130,61, 130,69, 173,37, 173,60; EM (CL-EM-ESI-) m/z 699,5 (M-H).

Ejemplo de compuesto 14 – Sal de trimetilamonio de 1-palmitoil-2-oleoil-3-etoxihidroxifosfinil-sn-glicerol (10a'), ejemplo de un compuesto de la invención

A una disolución fría (0°C) de diclorofosfato de etilo (401 mg, 2,46 mmol) en DCM seco se le añadió trietilamina (0,512 g, 5,12 mmol) mientras se agitaba. Entonces se añadió una disolución de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol 7a (586 mg, 0,984 mmol) en DCM seco (2,0 ml) a lo largo de un periodo de 5 min. Entonces se permitió que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiental y se agitó durante 1 h antes de la extinción vertiendo sobre hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado (10 ml). Entonces le siguió extracción con DCM (10 + 3x5 ml) y concentración a vacío para proporcionar un producto en bruto que se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (DCM:tolueno:etanol abs.: 13% en peso, trimetilamina en THF, gradiente desde 79:9:10:2 hasta 70:8:20:2). Se obtuvo el compuesto del título (Rf=0,3 usando DCM:tolueno:metanol:amoniaco acuoso al 25% en peso, 75:12:12:1, como eluyente analítico) como un sólido blanco (134 mg, rendimiento del 18%). ¹H-RMN (400MHz, acetona-d6:metanol-d4 97:3) δ ppm 0,85-0,92 (m, 6H), 1,23 (t, J=7,1Hz, 3H), 1,24-1,42 (m, 44H), 1,61 (sex, J=7,0Hz, 4H), 2,05-2,08 (m, 4H), 2,32 (q, J=7,6Hz, 4H), 3,92 (q, J=7,2Hz, 2H), 4,00 (dd, J=6,5, 5,4Hz, 2H), 4,18 (dd, J=12,0, 6,8Hz, 1H), 4,40 (dd, J=12,0, 3,4Hz, 1H), 5,18-5,26 (m, 1H), 5,30-5,40 (m, 2H), 5,77 (s, 9H).

Ejemplo de compuesto 15 - 1-Palmitoil-2-(2-tetrahidropiranyl)-3-(4-metoxibencil)-sn-glicerol (12), ejemplo de producto intermedio de síntesis

Se agitó una mezcla de 2 (0,901 g, 2,0 mmol), 3,4-dihidro-2H-pirano (0,336 g, 4,0 mmol) y p-toluenosulfonato de piridinio (0,100 g, 0,40 mmol) en DCM seco (10 ml) a temperatura ambiental durante 14 h. Entonces se retiró la materia volátil mediante una corriente de nitrógeno y se purificó el residuo obtenido mediante cromatografía sobre gel de sílice (gradiente desde n-heptano hasta n-heptano:acetato de etilo:i-PrOH 80:18:2) para producir 1,05 g (rendimiento del 98%) del compuesto del título como un aceite incoloro.

Ejemplo de compuesto 16 - 1-Palmitoil-2-(2-tetrahidropiranyl)-sn-glicerol (13), ejemplo de producto intermedio de síntesis

5 Se preparó el compuesto del título según el procedimiento usado para la preparación de 6c a partir de 12 (1,03 g, 1,926 mmol), con la única excepción de que se usó un gradiente desde n-heptano hasta n-heptano:acetato de etilo:i-PrOH 80:18:2 en la purificación sobre gel de sílice, para facilitar 0,511 g (rendimiento del 62%) del compuesto del título como un sólido blanco.

Ejemplo de compuesto 17 - 1-Palmitoil-3-etoxihidroxifosfinil-sn-glicerol (14), ejemplo de un compuesto de la invención

10 Se preparó el compuesto del título según el procedimiento usado para la preparación de 10a' a partir de 13 (266 mg, 0,642 mmol), con la única excepción de que se usó un gradiente desde tolueno:acetona 6:4 hasta tolueno:acetona:ácido acético:agua 55:36:7:2 en la purificación sobre gel de sílice, para facilitar 63 mg (rendimiento del 22%) del compuesto del título como un vidrio. ¹H-RMN (400 MHz, cloroformo-d) δ ppm 0,88 (t, J=6,8Hz, 3H), 1,23-1,34 (m, 27H), 1,59 (s a, 2H), 2,25-2,38 (m, 2H), 3,45-3,68 (m, 7H); EM (CL-EM-ESI-) m/z 437,3 (M-H).

15

Ejemplos de composiciones

Ejemplo de composición 1 - Preparación a partir de disolución mediante concentración a vacío

20 Se cargó un matraz de 10 ml con un fondo en forma de flecha con el compuesto de fórmula I PEth-16:0/18:1-H (7,5 g), la referencia interna dimetilsulfona (1,3 mg), el aditivo anfífilo (0 mg), seguido por adición del disolvente fuerte CDCl₃ (1,5 ml). Tras agitar la mezcla hasta la disolución, se añadió el disolvente deuterado DMSO-d₆ (0,75 ml) y se aplicó el matraz a un evaporador rotatorio que operaba a 200 rpm a vacío, a 22°C durante la noche. Se transfirió la disolución obtenida a un tubo de RMN mediante decantación, seguido por registro de ¹H-RMN para
25 facilitar el espectro mostrado en la figura 2A.

30 Se llevaron a cabo los ejemplos de composición 1 a 11 en analogía al ejemplo de composición 1 descrito anteriormente en el presente documento, tal como se resume en la tabla en el presente documento. Se realizó la estimación de la concentración final del compuesto de fórmula I y la concentración del disolvente fuerte residente en el disolvente deuterado mediante la comparación de las integrales de ¹H-RMN de los mismos con la integral de ¹H-RMN de la referencia interna.

Ejemplo de composición n.º	Compuesto de fórmula I	Disolvente fuerte	Disolvente deuterado	Referencia interna	Aditivo anfifílico/concentración final (mg/ml) sin aditivo	Espectro de ¹ H-RMN	Concentración estimada de disolvente fuerte residual en disolución final (mg/ml)	Concentración estimada de compuesto de fórmula I en disolución final (mg/ml)
1	Peth-16:0/18:1-H	CDCl ₃	DMSO-d ₆	dimetilsulfona		Figura 2A		3
2	-	-	-	-	SDS/16	Figura 4A		6
3	-	-	-	-	SDS/24			7
4	Peth-16:0/18:1-NMe ₃	CH ₂ Cl ₂	-	-	sin aditivo		0,7	3
5	-	-	-	-	SDS/6	Figura 8B		5
6	-	-	-	-	SDS/29	Figura 8D	3,3	4
7	-	-	-	-	Na-AOT/19		1,3	8
8	-	-	-	-	Na-AOT/80	Figura 9A	3,1	4
9	-	-	-	-	Triton-X100/8		1	8
10	-	-	-	-	Triton-X100/46	Figura 9B	1,3	7
11	-	-	-	-	Tween 20/42	Figura 9C	3,5	7

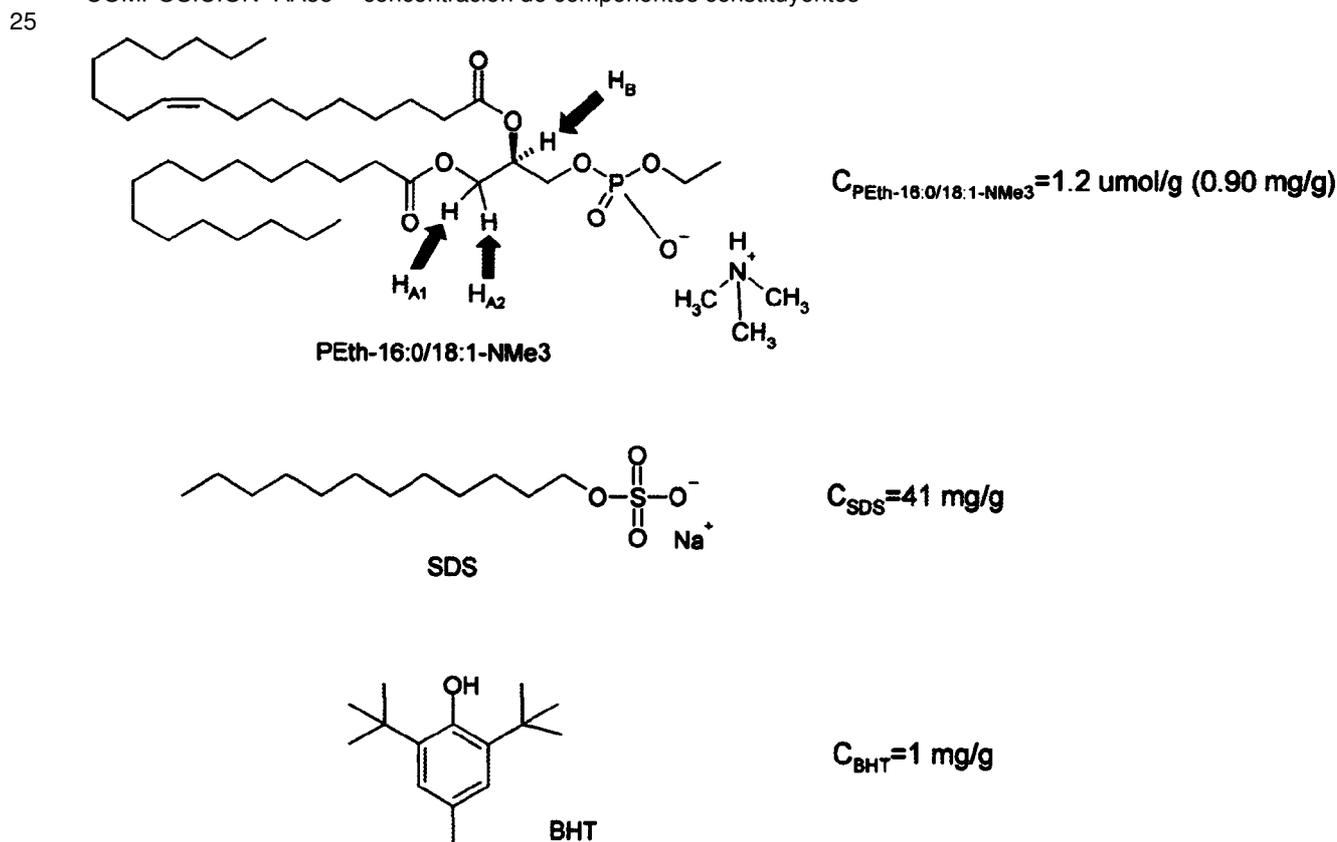
Los ejemplos de composiciones 1 a 11 indican claramente que la presencia de un aditivo anfífilo aumenta la solubilidad de los compuestos de fórmula I en el disolvente deuterado en comparación con el caso cuando tal aditivo está ausente.

5

Ejemplo de composición 12 - Preparación de composición "AA55" mediante agitación

A un matraz de 15 ml cargado con SDS (505,6 mg) se le añadió DMSO-d6 (10 ml), seguido por disolución mediante agitación. El peso total de la disolución (disolución A) fue de 11,7894 g. Entonces se añadieron PEth-16:0/18:1-NMe3 (30 mg) y el antioxidante BHT (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol, n.º CAS: 128-37-0, 1,7 mg) a la disolución A, seguido por cierre del matraz y agitación suave durante 4 h a temperatura ambiental (22°C). Se decantó la disolución resultante de la materia heterogénea y se filtró a través de un filtro de algodón para producir una composición denominada "AA55" de la invención, que comprende PEth-16:0/18:1-NMe3, el detergente SDS y el antioxidante BHT en el disolvente deuterado DMSO-d6. Se barrió AA55 con N₂ y se almacenó en la oscuridad a temperatura ambiental. Se encontró que era estable en estas condiciones durante un tiempo prolongado a lo largo de varias semanas. Se tomaron cinco alícuotas (en el intervalo de 460,3 a 475,4 mg) de AA55 y se mezclaron individualmente con cinco disoluciones preparadas individualmente en DMSO-d6 de dimetilsulfona disponible comercialmente verificada mediante RMNC (Sigma-Aldrich, n.º 8012968580; de 238,5 a 239,1 mg; de 0,523 a 0,544 mg/g). Se recogieron los espectros de ¹H-RMNC para cada una de las mezclas resultantes. Se integraron las señales relacionadas con PEth-16:0/18:1-NMe3 a 5,06-5,12 ppm (H_B), 4,26-4,31 ppm (H_{A1}) y 4,06-4,12 ppm (H_{A2}), y la señal relacionada con dimetilsulfona a 2,99 ppm. La lista resultante de las integrales se usó para calcular la concentración de PEth-16:0/18:1-NMe3 en "AA55", tal como se resumen en los dibujos en el presente documento.

COMPOSICIÓN "AA55" - concentración de componentes constituyentes



Ejemplo de composición 13 - Preparación mediante agitación y calentamiento

30 Se agitó una mezcla de PEth-16:0/18:1-NMe3 (15 mg), dimetilsulfona (0,4 mg) y DMSO-d6 (0,75 ml) a 38°C durante 15 min. Entonces se permitió que la mezcla alcanzara la temperatura ambiental (22°C) y se mantuvo a esa temperatura durante 1 h. Entonces se separó la disolución de un precipitado vítreo mediante decantación y se transfirió a un tubo de RMN. Se estimó que la concentración de PEth-16:0/18:1-NMe3 en la disolución era de aproximadamente 3 mg/ml mediante la comparación de integrales de ¹H-RMN en el espectro de ¹H-RMN (figura 7) de señales de PEth-16:0/18:1-NMe3 con la señal de dimetilsulfona.

35

Tal como resulta evidente a partir de la comparación de la concentración final de PEth-16:0/18:1-NMe3 en la

composición resultante del ejemplo de composición 12, con la composición resultante del ejemplo de composición 13, calentar la mezcla con agitación da como resultado una concentración final mayor en comparación con el caso cuando la mezcla agitada no se calienta, ni siquiera en algunos casos en que la mezcla no calentada comprende un detergente. Puede suponerse que la concentración obtenida con el empleo del procedimiento de calor-frío (ejemplo de composición 13) refleja el límite de solubilidad controlado termodinámicamente, mientras que la concentración obtenida mediante el empleo del procedimiento de agitación sencillo (ejemplo de composición 13) está limitado cinéticamente.

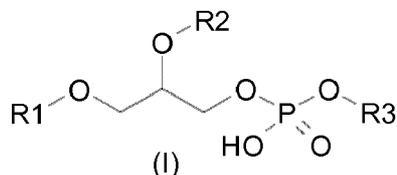
Ejemplo de composición 14 - Preparación mediante agitación y calentamiento

Se agitó una mezcla de PEth-16:0/18:1-NMe3 (15 mg), dimetilsulfona (0,4 mg), SDS (4,5 mg) y DMSO-d6 (0,75 ml) a 38°C durante 15 min. Entonces se permitió que la mezcla alcanzara la temperatura ambiental (22°C) y se mantuvo a esa temperatura durante 1 h. Entonces se separó la disolución de un precipitado vítreo mediante decantación y se transfirió a un tubo de RMN. En la figura 8C se muestra una ampliación en la región del espectro de ¹H-RMN.

En las reivindicaciones, el término “comprende/que comprende” no excluye la presencia de otros elementos o etapas. Además, aunque se enumeran individualmente, pueden implementarse una pluralidad de medios, elementos o etapas de método por ejemplo mediante una sola unidad o procesador. Además, aunque pueden incluirse características individuales en reivindicaciones diferentes, estas pueden combinarse posiblemente de manera ventajosa, y la inclusión en diferentes reivindicaciones no implica que no sea factible y/o ventajosa una combinación de características. Además, las referencias en singular no excluyen una pluralidad. Los términos “un”, “una”, “primero”, “segundo”, etc., no excluyen una pluralidad. Los signos de referencia en las reivindicaciones se facilitan meramente como ejemplo aclaratorio y no deben considerarse como limitativos del alcance de las reivindicaciones en modo alguno.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un compuesto de fórmula I



o cualquier sal, diastereómero, enantiómero, mezcla racémica, mezcla escalémica o forma isotópicamente enriquecida del mismo y un disolvente polar aprótico deuterado para la determinación de la concentración de dicho compuesto de fórmula I mediante ^1H -RMNC, en la que

R1 se selecciona del grupo que consiste en $-\text{C}(=\text{O})$ -alquilo lineal C2-25 y $-\text{C}(=\text{O})$ -alqueno lineal C2-25:1-6;

R2 se selecciona del grupo que consiste en $-\text{C}(=\text{O})$ -alquilo lineal C2-25 y $-\text{C}(=\text{O})$ -alqueno lineal C2-25:1-6;

R3 es alquilo C1-6;

la suma de dicho compuesto de fórmula I y cualquier forma de sal, diastereómero, enantiómero, mezcla racémica, mezcla escalémica y forma isotópicamente enriquecida del mismo supera 0,05 $\mu\text{mol/g}$ de dicha composición; y

dicho disolvente polar aprótico deuterado es miscible con agua en cualquier proporción a una temperatura de 20 a 25°C y comprende menos del 5% de isótopos ^1H residuales.

2. Composición según la reivindicación 1, en la que

R3 es etilo; y

R1 y R2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en ácidos grasos saturados, ácidos grasos insaturados ω -3, ácidos grasos insaturados ω -6, ácidos grasos insaturados ω -7 y ácidos grasos insaturados ω -9.

3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho compuesto de fórmula I está enriquecido isotópicamente con deuterio.

4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho disolvente polar aprótico deuterado es un disolvente polar aprótico seleccionado del grupo que consiste en acetona- d_6 , acetonitrilo- d_3 , dimetilsulfóxido- d_6 , N,N-dimetilformamida- d_7 , N-metil-2-pirrolidona- d_9 , tetrahidrofurano- d_8 , piridina- d_5 , 1,4-dioxano- d_8 y diglima- d_{14} .

5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un aditivo anfífilo en una cantidad que supera 1 mg/g de dicha composición, siendo dicho aditivo anfífilo un detergente seleccionado del grupo que consiste en detergentes aniónicos, catiónicos, no iónicos y zwitteriónicos.

6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una referencia interna, en la que dicha referencia interna:

está presente en una cantidad para permitir la detección mediante ^1H -RMN en un periodo de tiempo que es esencialmente igual a o menor que el periodo de tiempo necesario para la detección mediante ^1H -RMN de dicho compuesto de fórmula I; y

origina al menos una señal de ^1H -RMN, señal de ^1H -RMN que es adecuada para la integración y que está separada esencialmente de todas las señales de ^1H -RMN de dicho compuesto de fórmula I, con la generación de un espectro de ^1H -RMN de dicha composición.

7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho compuesto de fórmula I es un PEth pentadeuterado.

8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el compuesto de fórmula I es PEth-16:0/18:1 o PEth-16:0/18:2.

9. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha sal se selecciona del grupo que consiste en sal de amonio, sales de alquilamonio, sales de dialquilamonio en que los grupos alquilo son grupos alquilo seleccionados independientemente, sales de trialquilamonio en que los grupos alquilo son grupos alquilo seleccionados independientemente y sal de tetraalquilamonio cuaternario.

10. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha sal se selecciona del grupo que consiste en metilamonio, etilamonio, dimetilamonio, diisopropilamonio, dietilamonio, trimetilamonio, diisopropilmetilamonio o trietilamonio.
- 5 11. Método de producción de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende las etapas de:
- 10 (i) tratar dicho compuesto de fórmula I con dicho disolvente polar aprótico deuterado hasta que todo o parte de dicho compuesto de fórmula I se disuelve en dicho disolvente polar aprótico deuterado, para obtener una primera composición intermedia; y
- (ii) si dicha primera composición intermedia comprende cualquier materia heterogénea, retirar opcionalmente dicha materia heterogénea mediante filtración o decantación.
- 15 12. Método para la determinación de la concentración de un compuesto de fórmula I en una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 mediante ¹H-RMNC, que comprende las etapas de:
- 20 (i) recoger al menos dos señales de ¹H-RMN de dicha composición;
- (ii) recoger la integral de al menos una señal de ¹H-RMN aislada originada por dicho compuesto de fórmula I y al menos una señal de ¹H-RMN aislada originada por un componente determinante; y
- (iii) calcular una concentración del compuesto de fórmula I basándose en las integrales recogidas en la etapa (ii),
- 25 en el que se conoce la cantidad del componente determinante o la concentración de dicho componente determinante en dicha composición;
- seleccionándose dicho componente determinante del grupo que consiste en disolvente protonado residual en un disolvente polar aprótico deuterado, un aditivo anfífilo, una referencia interna, una referencia externa y un aditivo.
- 30 13. Método según la reivindicación 12, en el que el disolvente polar aprótico deuterado es dimetilsulfóxido-d6 (DMSO-d6), DMF-d7 o acetona-d6, el aditivo se selecciona de detergente aniónico, catiónico, no iónico y zwitteriónico, el aditivo anfífilo se selecciona de SDS, Na-AOT, Triton-X 100, Tween 20, el patrón interno se selecciona de fosfono-metil-glicerol, fosfonometilglicina, dimetilsulfona.
- 35 14. Uso de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para la producción de una disolución patrón analítica.

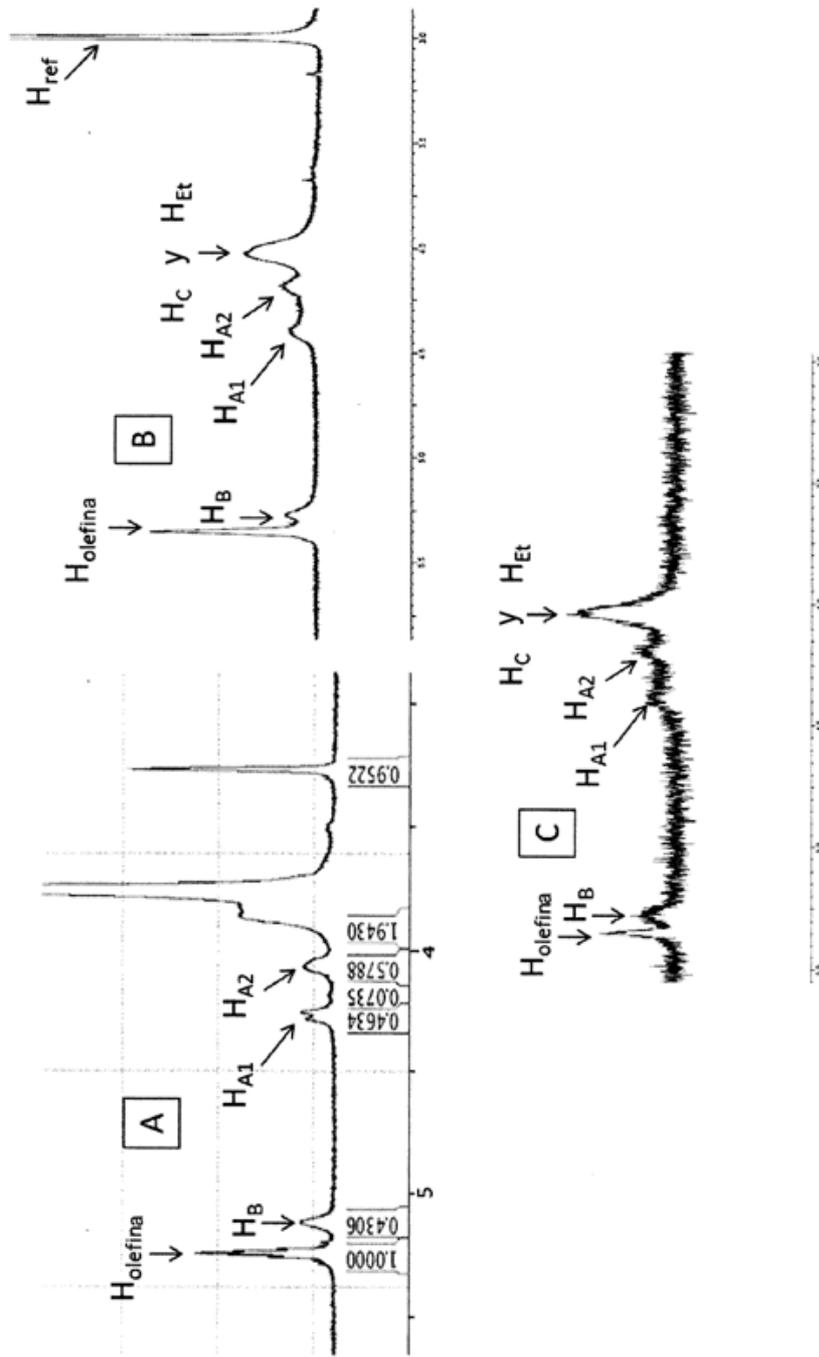


Fig. 1

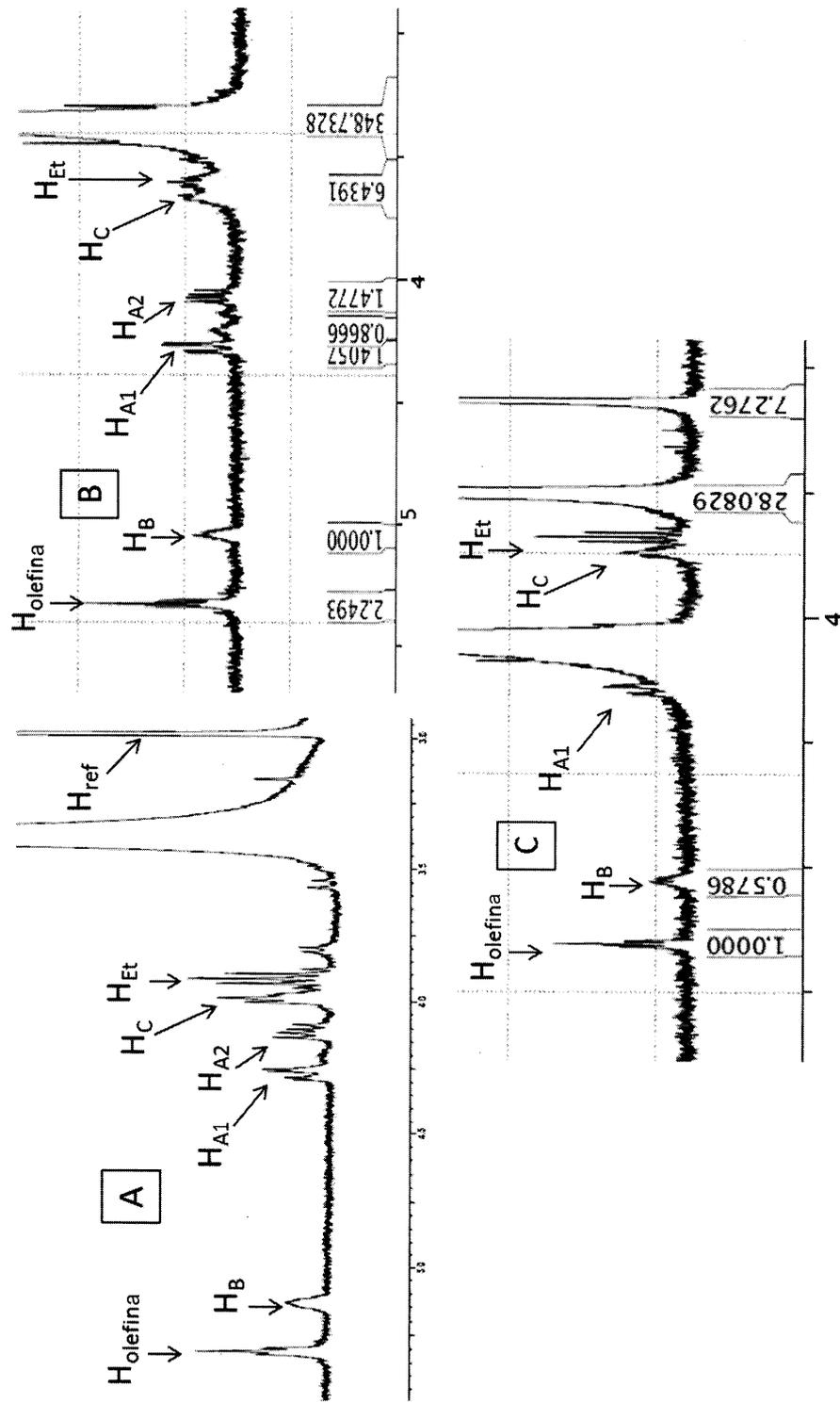


Fig. 2

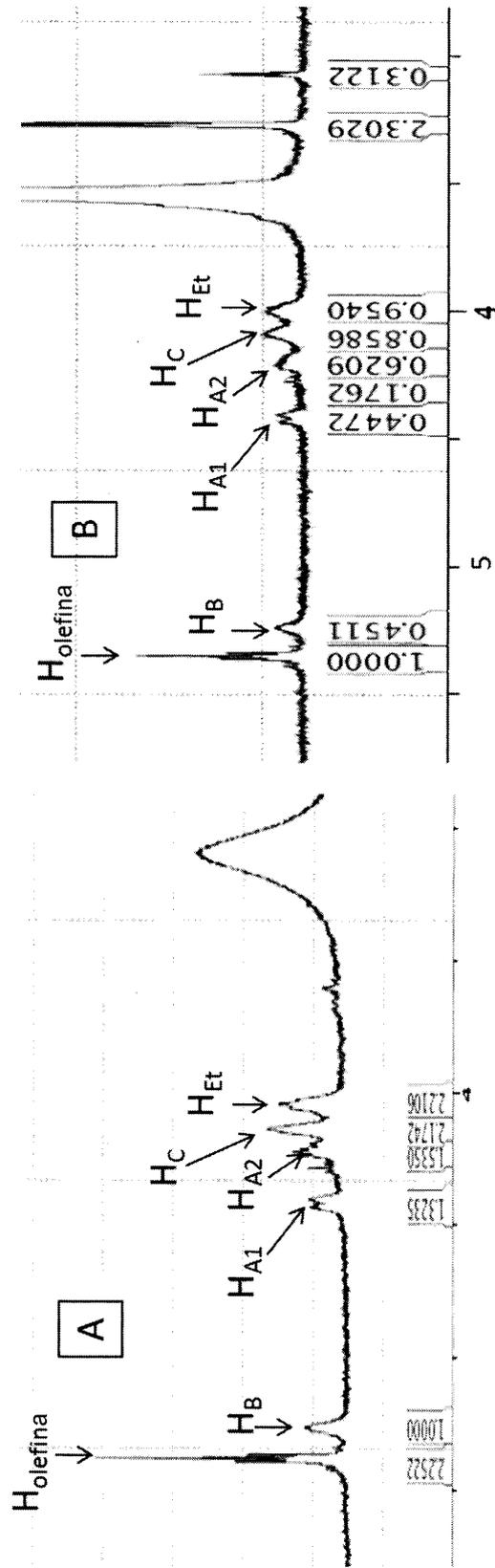


Fig. 3

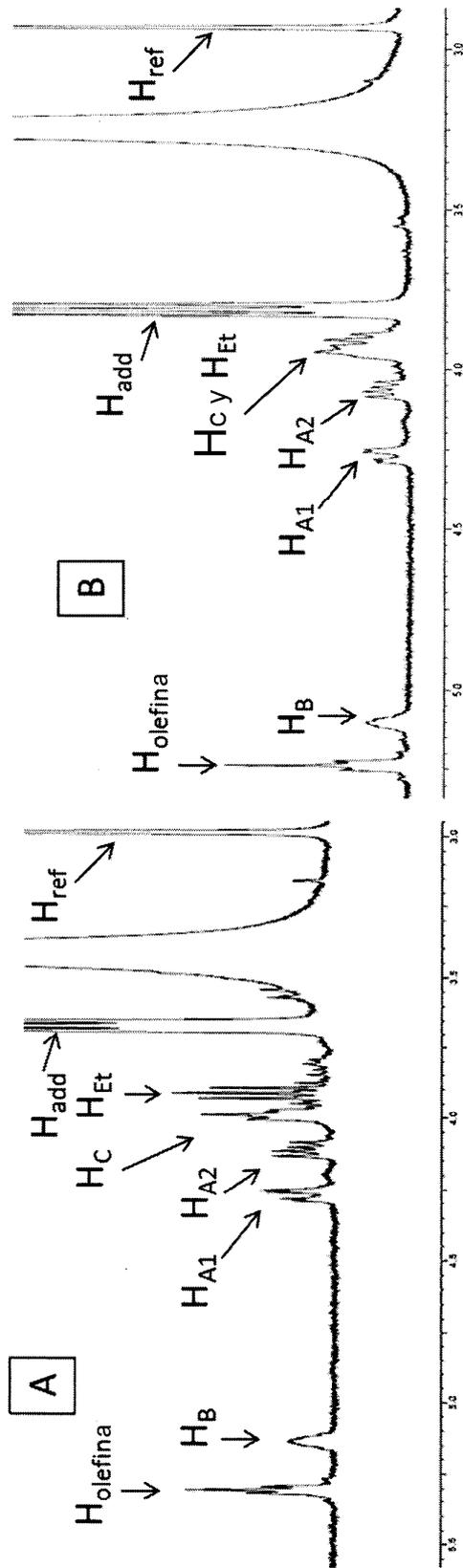


Fig. 4

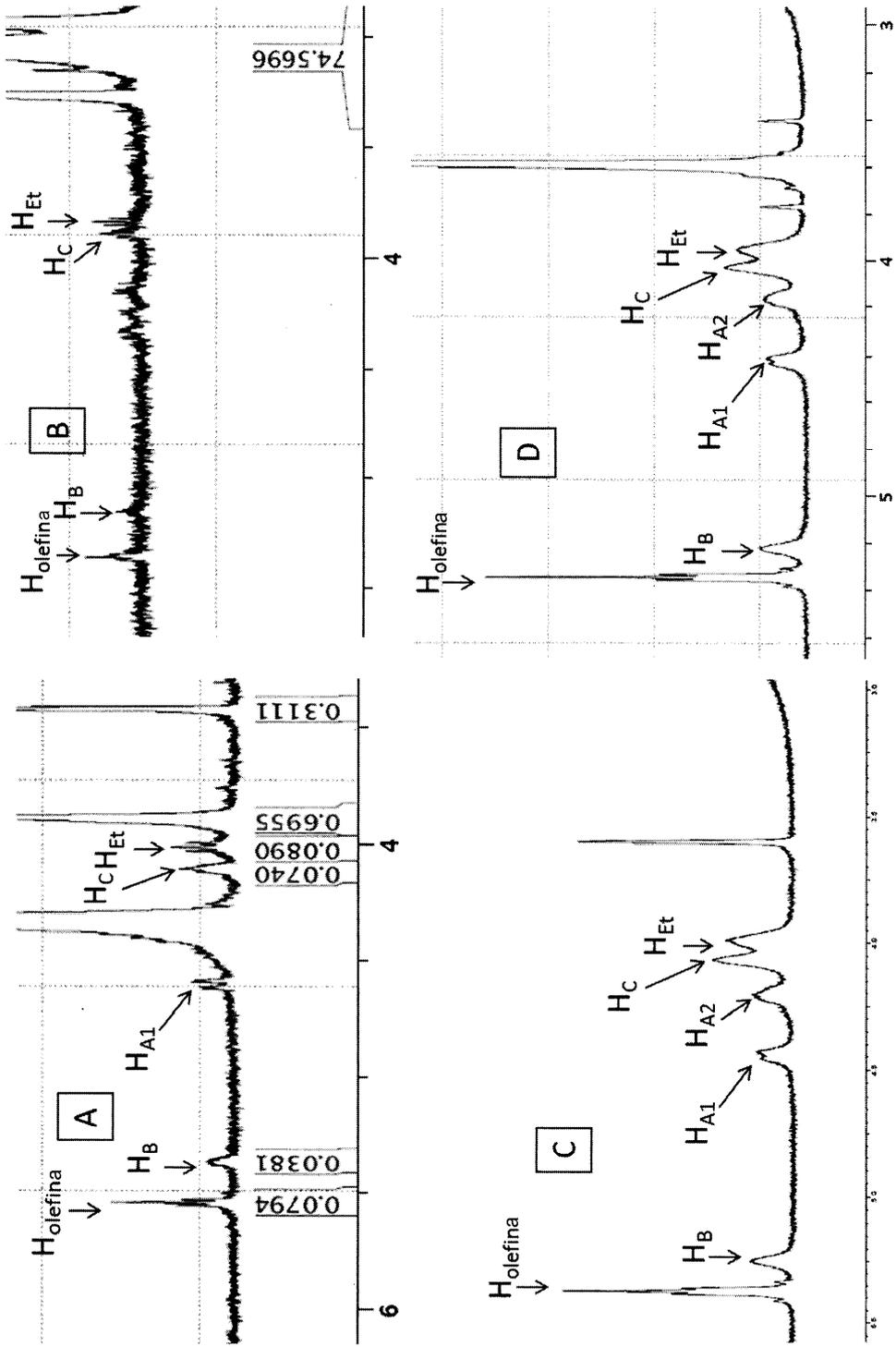


Fig. 5

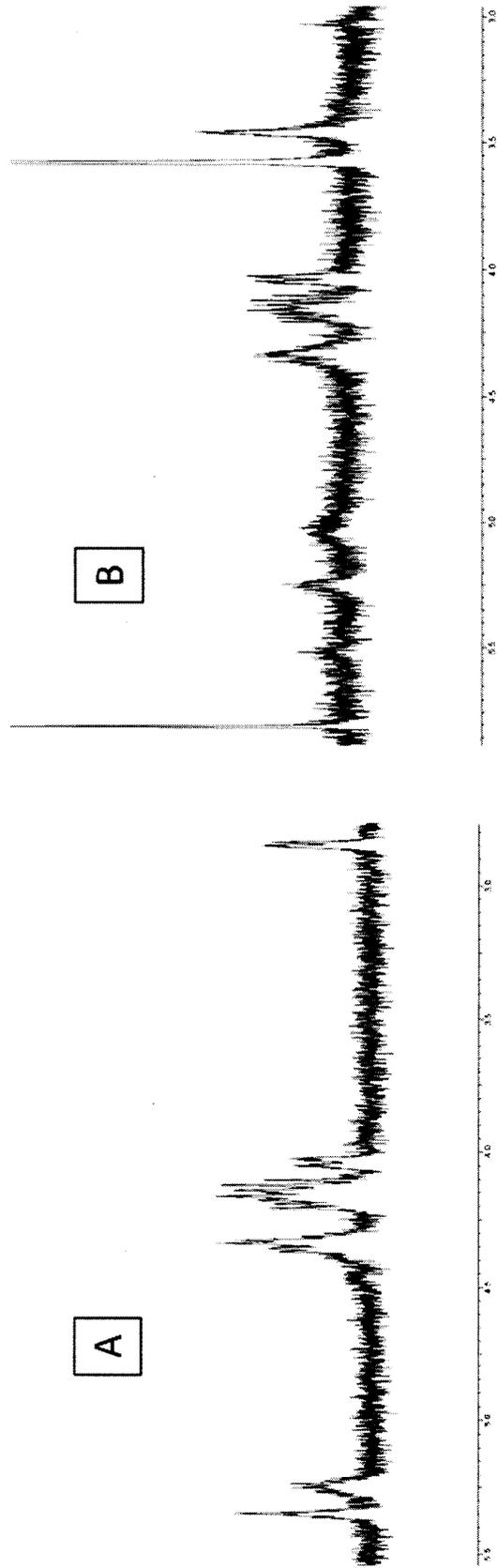


Fig. 6

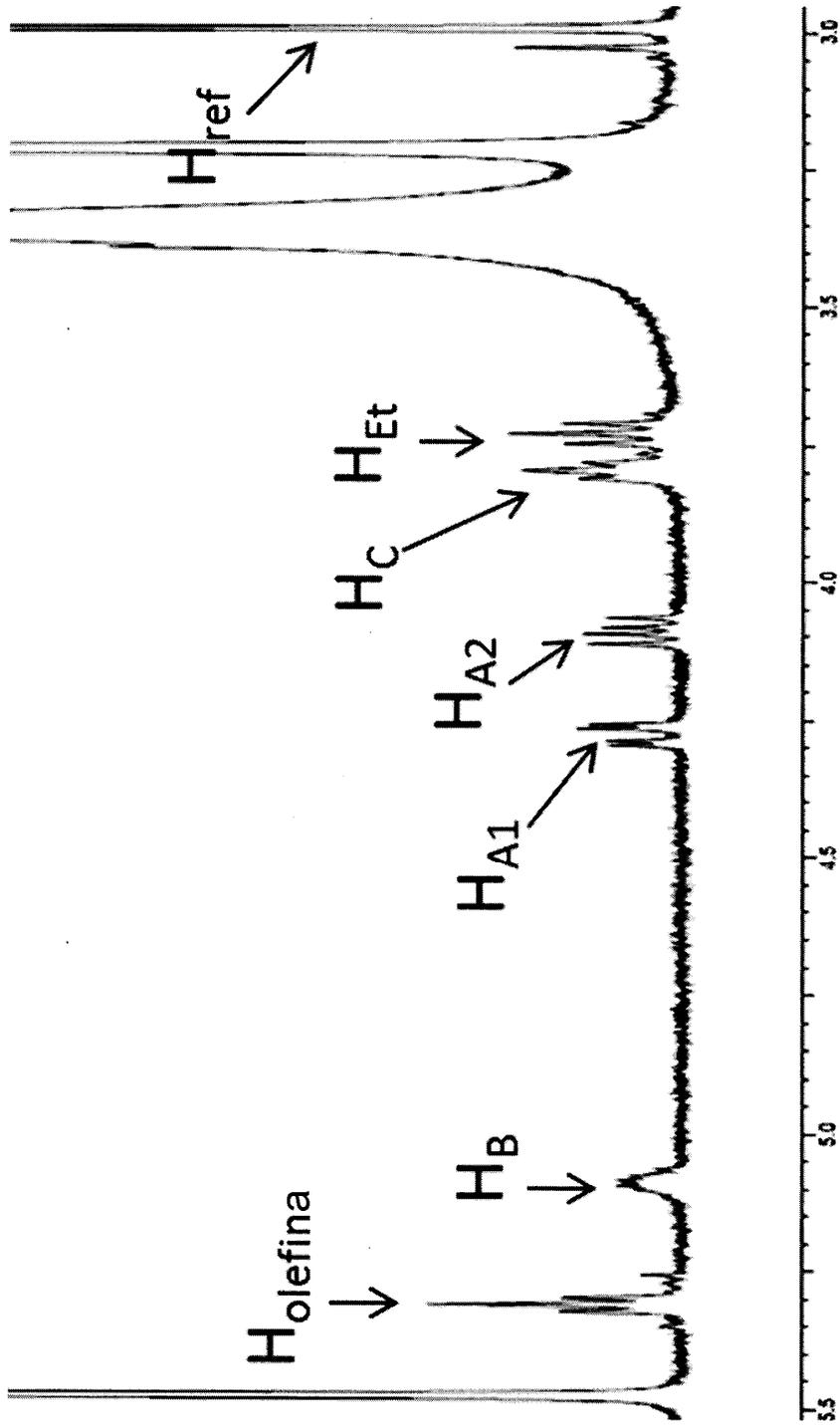


Fig. 7

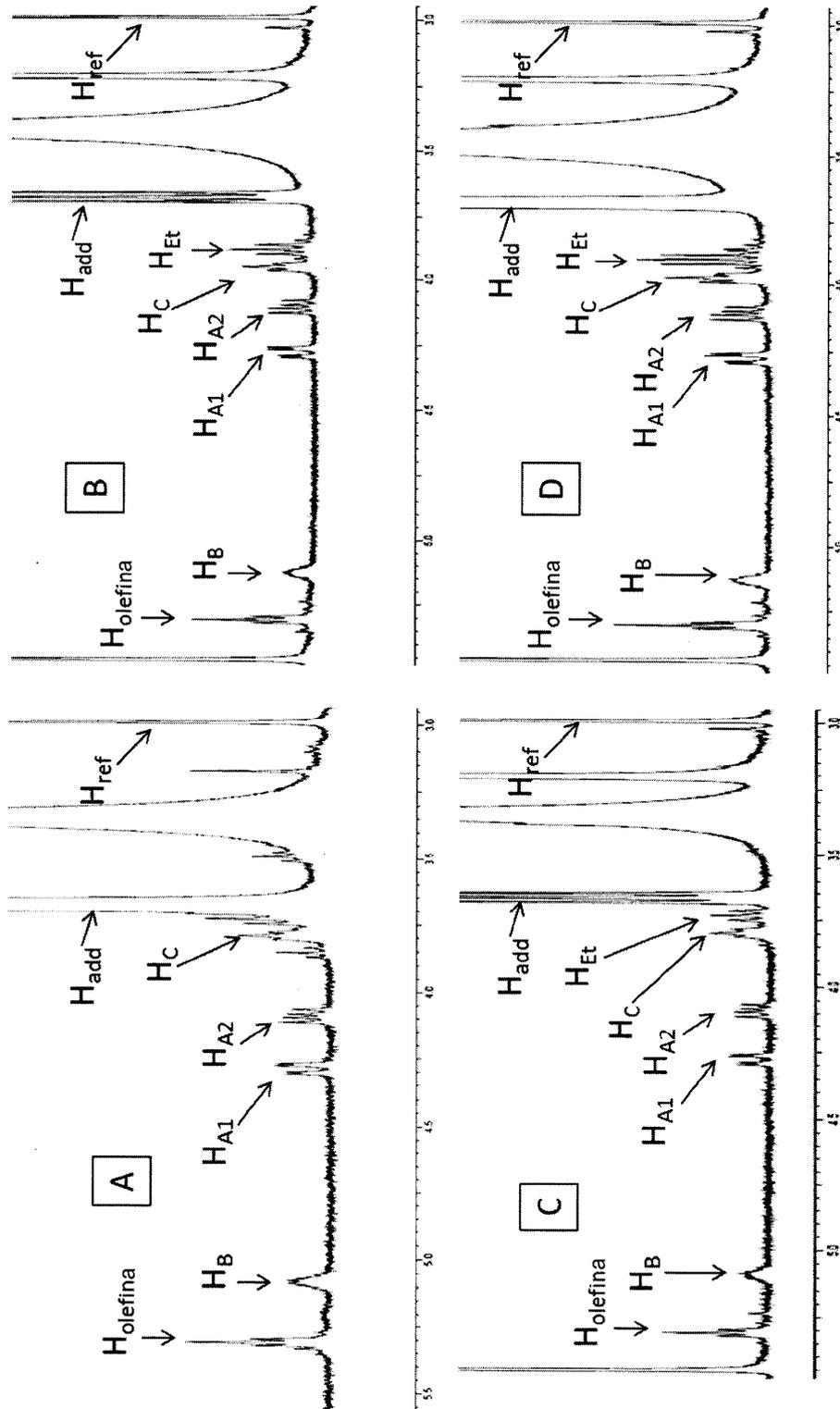


Fig. 8

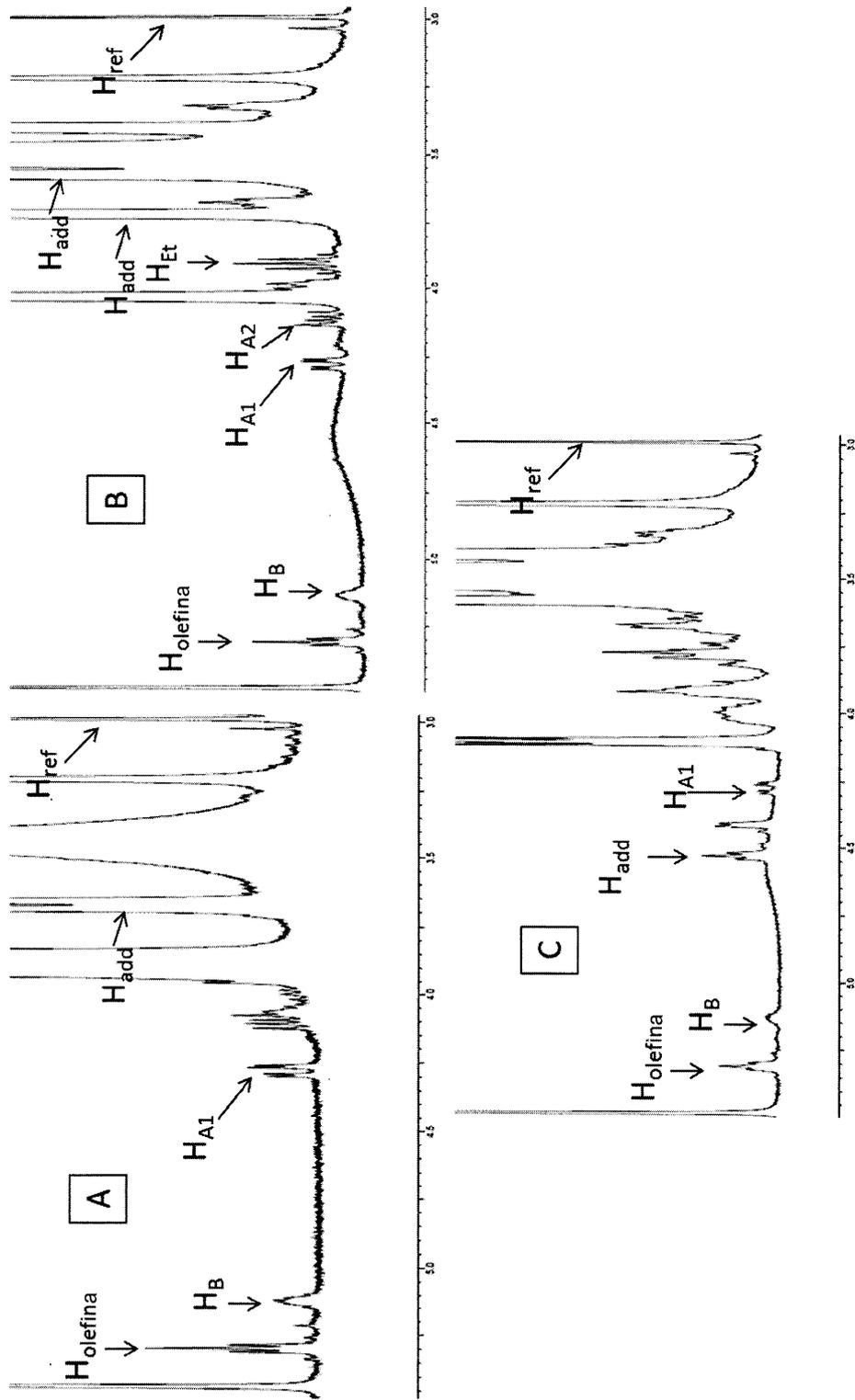


Fig. 9

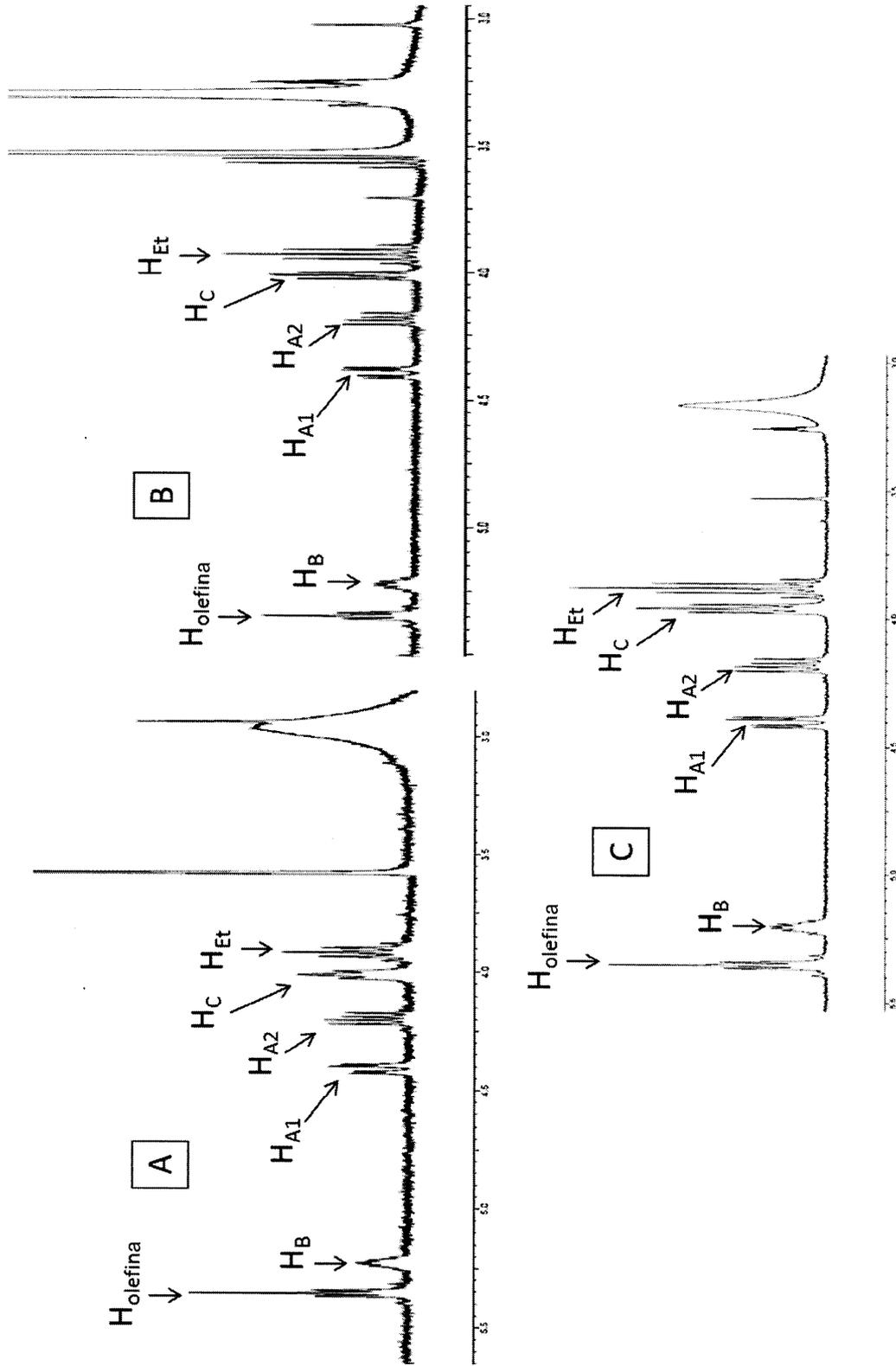


Fig. 10

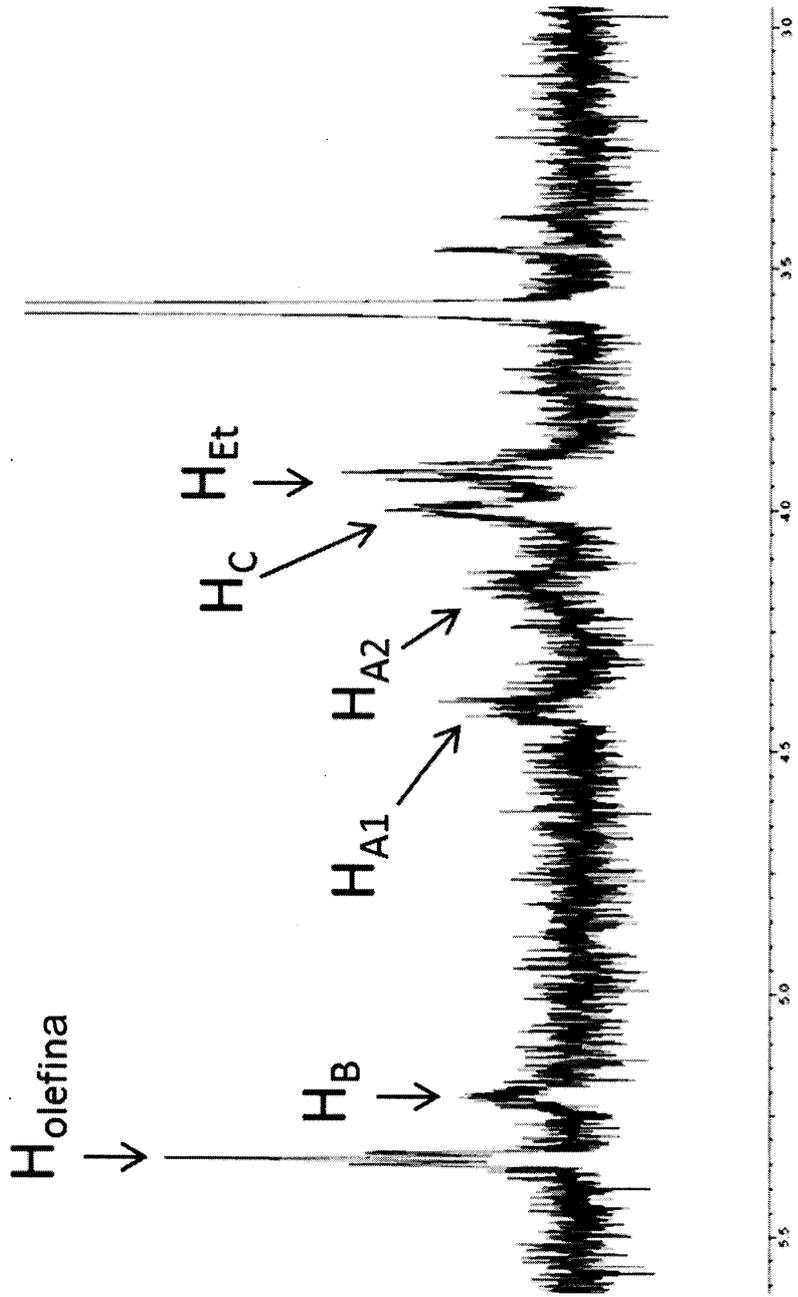


Fig. 11