

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 877 647**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/685** (2006.01)

**A61K 31/704** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2018 PCT/CZ2018/050015**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2018 WO18184604**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2018 E 18719029 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.05.2021 EP 3606534**

54 Título: **Derivados de fosfolípidos y su uso como medicamentos**

30 Prioridad:

**03.04.2017 CZ 20170190**

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

**17.11.2021**

73 Titular/es:

**USTAV MOLEKULARNI GENETIKY AKADEMIE  
VED CR, V.V.I. (50.0%)**

**Videnska 1083**

**142 20 Praha, CZ y**

**SMART BRAIN S.R.O. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DVORAK, MICHAL;**

**DVORAKOVA, MARTA;**

**KARAFIAT, VIT;**

**STURSA, JAN;**

**WERNER, LUKAS y**

**JANECKOVA, LUCIE**

74 Agente/Representante:

**ZUAZO ARALUZE, Alexander**

ES 2 877 647 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

Derivados de fosfolípidos y su uso como medicamentos

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a compuestos a base de lisofosfolípidos, y a su uso como medicamentos.

10 **Técnica anterior**

10 Los fosfolípidos son un componente clave de todas las membranas biológicas (forman la base de la bicapa de la membrana junto con proteínas, glicolípidos y derivados del colesterol). Confieren a las membranas sus propiedades semipermeables específicas. Los lípidos de las yemas de huevo de gallina contienen una cantidad significativa (20%) de fosfolípidos. Los fosfolípidos dominantes de la yema de huevo son la fosfatidilcolina (75%) y la fosfatidiletanolamina (20% de todos los fosfolípidos de la yema de huevo). Además, las yemas contienen pequeñas cantidades de fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, esfingomielina y otros en cantidades traza.

20 Al ingerir alimentos, los lípidos se emulsionan en el intestino con sales biliares, se absorben y se procesan por las células del revestimiento intestinal, los enterocitos. La primera etapa en la digestión de los fosfolípidos es su escisión con fosfolipasa A2, que se secreta por los enterocitos del intestino delgado, formando lisofosfolípidos y ácidos grasos libres. Estas sustancias se absorben entonces por los enterocitos, que se metabolizan y se incorporan en partículas de lipoproteínas (por ejemplo, quilomicrones) que sirven como vehículos para transportar estas sustancias a través del sistema linfático y el torrente sanguíneo a las células de otros tejidos.

25 Se producen lisofosfolípidos a base de glicerol en organismos no solo como productos intermedios en la síntesis de diversos fosfolípidos, sino que, tal como se ha mostrado recientemente, también tienen sus propias funciones reguladoras significativas. Apenas hay información sobre la actividad biológica de 1-acil-lisofosfatidilcolina o de una mezcla de 1-acil-lisofosfolípidos preparada a partir de una mezcla natural de fosfolípidos usando fosfolipasa A2 y sobre su posible uso terapéutico. Parece que 1-acil lisoPC está implicado indirectamente en la regeneración de órganos y la cicatrización de heridas (1, 2) y posiblemente pueda usarse para tratar enfermedades autoinmunitarias y degenerativas (3-7), y quizás podría ser útil en el tratamiento de la diabetes (8, 9). En suero sanguíneo, la lisofosfatidilcolina es el lisofosfolípido más abundante. Es un sustrato de la enzima autotaxina. En los fluidos corporales, la autotaxina, que es una fosfolipasa D, escinde el grupo colina de la lisofosfatidilcolina para formar ácido lisofosfatídico (LPA). El LPA es una sustancia relativamente bien estudiada debido a sus efectos biológicos significativos. El LPA activa la proliferación celular y la angiogénesis y tiene efectos proinflamatorios y protumorales. Las rutas de señalización controladas por este ácido a través de receptores de LPA desempeñan un papel importante en la carcinogénesis, la invasividad de células tumorales y el potencial metastásico. La señalización por LPA parece estar implicada en la resistencia de algunos tipos de cáncer a la terapia (10-12).

40 Aunque puede esperarse que la 1-acil-lisofosfatidilcolina, debido a su conversión en un LPA protumoral, presentará efectos protumorales *in vivo*, se ha encontrado en el marco de la presente invención que inhibe el desarrollo de tumores hepáticos experimentales en pollos y tumores subcutáneos e intraperitoneales inducidos por células tumorales singénicas en ratones, así como el crecimiento de tumores gastrointestinales espontáneos en ratones APC/Min.

45 Esta sorprendente observación es la base de la presente invención.

**Bibliografía:**

- 50 1. Gendaszewska-Darmach E.: Acta Biochim. Pol. 55, 227 (2008).
2. Benesch M.G., Ko Y.M., McMullen T.P., Brindley D.N.: FEBS Lett. (2014)
3. Abramowski P., Otto B., Martin R.: PLoS One 9, e91970 (2014).
- 55 4. Mamatha B.S., Baskaran. V.: Nutrition 27, 960 (2011)
5. Riederer M., Ojala P.J., Hrzenjak A., Graier W.F., Malli R., Tritscher M., Hermansson M. *et al.*: J. Lipid Res. 51, 2957 (2010).
- 60 6. Grimm M.O., Grosgen S., Reimenschneider M., Tanila H., Grimm H.S., Hartmann T.: J. Chromatogr A 1218, 7713 (2011).
7. Jin M.C., Hung N.D., Yoo J.M., Kim M.R., Sok D.: J. Lipid. Sci. Technol. 114, 114 (2012).
- 65 8. Yea K., Kim J., Yoon J.H., Kwon T., Kim J.H., Lee H.J., Kim J.I. *et al.*: J. Biol. Chem. 284, 33833 (2009).

9. Overton H.A., Fyfe M.C.T., Reynet C.: Br. J. Pharmacol. 153, 76 (2008.).

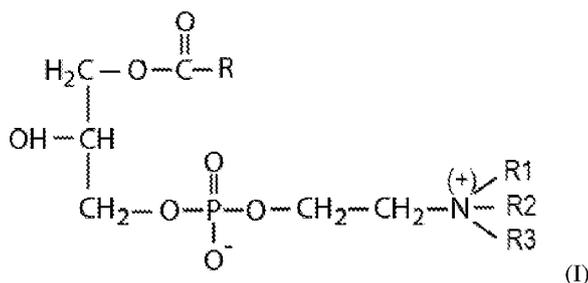
10. Mills GB, Moolenaar WH. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. Nat Rev Cancer. 2003;3(8):582-91.

11. Mari Gotoh a ost. Controlling cancer through the autotaxin-lysophosphatidic acid receptor axis. Biochem Soc Trans. Febrero de 2012; 40(1): 31-36. doi: 10,1042/BST20110608.

12. Houben AJ, Moolenaar WH. Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer. Cancer Metastasis Rev. 2011;30(3-4):557-65.).

### **Divulgación de la invención**

La presente invención se refiere a derivados de 1-acil-lisofosfatidilo de fórmula general I,



en la que

R es una cadena de hidrocarbilo alifática C4 a C30,

R1 se selecciona de H o alquilo C1 a C10, preferiblemente alquilo C1 a C6,

R2 se selecciona de H, acilo C10 a C30 o alquilo C1 a C10 (preferiblemente alquilo C1 a C6),

R3 se selecciona de H o alquilo C1 a C10, preferiblemente alquilo C1 a C6, o R3 no está presente.

Preferiblemente R se selecciona del grupo que consiste en alquenoilo o alquilo C5 a C10 lineal, ramificado o cíclico o que contiene ciclos, tal como pentilo o 3,5,5-trimetilpentilo, ciclopentiletilo; o alquenoilo o alquilo C13 a C30, preferiblemente C13 a C20 lineal o ramificado, en particular alquenoilo o alquilo lineal C15, C16, C17, C18 o C19. Los alquenoilos contienen uno o más dobles enlaces.

Preferiblemente, R2 se selecciona del grupo que consiste en acilos C10-C30, preferiblemente C10-C20, que contienen cadenas lineales saturadas o insaturadas, tales como decanoílo, palmitoílo, estearoílo, oleoílo, linoleoílo, elaidoílo.

Cuando una molécula o una parte de la misma porta una carga eléctrica, la carga se compensa mediante un contraión. Los contraiones adecuados incluyen cationes de metales alcalinos, aniones de halógenos o aniones derivados de ácidos inorgánicos u orgánicos. Alternativamente, la carga puede compensarse mediante la formación de una sal interna (betaína).

El átomo de nitrógeno porta una carga positiva cuando está presente R3.

En una realización preferida, al menos uno de R1, R2, R3 es metilo. En una realización particular, R1, R2 y R3 son metilo.

En una realización particular, R1 y R2 son H, y R3 no está presente.

En una realización particular, R1 es H y R2 es acilo C10-C20 que contiene cadenas lineales saturadas o insaturadas, y R3 no está presente.

Los compuestos de la presente invención muestran efectos citotóxicos sobre células tumorales, suprimiendo por tanto el crecimiento de células tumorales. El objeto de la presente invención es por tanto los compuestos de fórmula general (I) para su uso en el tratamiento de cáncer seleccionado de melanoma y hepatocarcinoma. Se ha mostrado dentro del marco de la presente invención que los compuestos de fórmula general (I) son potentes inhibidores del crecimiento de diversas células tumorales en cultivo tisular así como inhibidores del crecimiento de tumores experimental en modelos animales.

Los compuestos de fórmula (I) pueden prepararse mediante desacilación selectiva de los respectivos fosfolípidos,

opcionalmente fosfolípidos modificados. Los fosfolípidos de partida pueden incluir fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, sus derivados por sustitución en un átomo de nitrógeno, o mezclas naturales de fosfolípidos, opcionalmente modificados por sustitución en un átomo de nitrógeno. Las mezclas naturales de fosfolípidos pueden incluir, por ejemplo, fosfolípidos de yema de huevo. La desacilación selectiva puede lograrse mediante procedimientos de síntesis conocidos por los expertos en la técnica o enzimáticamente.

Tras la desacilación selectiva, puede realizarse también una acilación posterior para proporcionar un compuesto que porta el radical acilo deseado R. La acilación llevada a cabo tras la desacilación debe ser selectiva (esto puede lograrse, por ejemplo, protegiendo el grupo -OH mediante grupos protectores bien conocidos por los expertos en la técnica).

El compuesto de fórmula I puede aislarse tras la desacilación de la mezcla de reacción o bien solo o bien en mezcla con el ácido graso libre. La presencia de ácido graso no influye en los efectos citotóxicos de los compuestos de fórmula I.

El objeto de la presente invención es además una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) y al menos un portador, diluyente o carga. La composición farmacéutica puede contener además otros auxiliares adecuados tales como lubricantes, agentes que facilitan la formación de comprimidos, emulsionantes, recubrimientos, etc. La composición farmacéutica puede estar en forma, por ejemplo, de cápsulas, comprimidos, pomadas, cremas, suspensiones, emulsiones, disoluciones. Puede estar preferiblemente en una forma destinada para administración oral o intravenosa.

Un objeto adicional de la presente invención es al menos un derivado de 1-acil-lisofosfatidilo de fórmula general (I) para su uso en un método de tratamiento de cáncer seleccionado de un hepatocarcinoma y un melanoma, en el que además se administra un fármaco anticancerígeno. Según la invención, el cáncer es un tumor sólido, seleccionado de un hepatocarcinoma, o un melanoma. Preferiblemente, el fármaco anticancerígeno es doxorubicina. Dentro del marco de la presente invención, se encontró que los derivados de 1-acil-lisofosfatidilo muestran un efecto de potenciación sinérgica de los efectos de los fármacos anticancerígenos establecidos. La coadministración del derivado de 1-acil-lisofosfatidilo de fórmula (I) con un fármaco anticancerígeno conduce a una reducción de la dosis del fármaco anticancerígeno y de ese modo a una eficacia creciente al tiempo que se disminuye la toxicidad del fármaco y los efectos secundarios no deseados de los fármacos anticancerígenos. La coadministración del derivado de 1-acil-lisofosfatidilo de fórmula (I) con un fármaco anticancerígeno se realiza preferiblemente en la proporción de al menos 20:1, preferiblemente al menos 50:1, más preferiblemente al menos 100:1, incluso más preferiblemente al menos 180:1 o al menos 200:1. Las sustancias pueden administrarse juntas o en el plazo de 12 horas entre sí, preferiblemente en el plazo de 6 horas entre sí, más preferiblemente 2 horas entre sí.

### **Ejemplos para llevar a cabo la invención**

#### Abreviaturas:

PC - fosfatidilcolina

PE - fosfatidiletanolamina

E-DAPL - mezcla de 1-acil-lisofosfolípidos de yema de huevo, obtenida usando fosfolipasa A2

CCF - cromatografía en capa fina

FA - ácidos grasos

DMAP - dimetilaminopiridina

DCC - N,N'-diciclohexilcarbodiimida

#### **Ejemplo 1: Aislamiento de una mezcla que se produce de manera natural de fosfolípidos a partir de yemas de huevo**

Se mezclaron 20 yemas de huevo durante 10 minutos a 30°C con 1200 ml de etanol al 96% que contenía 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol 0,01 mM. Se filtró la mezcla a través de un papel de filtro Whatman 1 y se evaporó el filtrado en un evaporador rotatorio a vacío. Se disolvió el residuo en 200 ml de n-hexano (25°C) y se eliminó la fracción insoluble mediante centrifugación durante 10 minutos a 3000 xg, 25°C. Se enfrió el sobrenadante transparente hasta 4°C, se mezcló con 2 volúmenes de acetona (4°C) y se dejó durante la noche a 4°C. Se lavó el precipitado tres veces con n-hexano:acetona (1:2) y se secó en un desecador a presión reducida. Los fosfolípidos así purificados se usaron o bien para aislar fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina o bien para preparar una mezcla de lisofosfolípidos. El contenido de fosfolípidos se determinó midiendo la cantidad de fósforo.

**Ejemplo 2: Aislamiento de fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE)**

Se disolvieron los fosfolípidos totales purificados (1,2 g) en un pequeño volumen de mezcla de cloroformo:metanol:agua (66:33:2) y se cargaron sobre una columna de gel de sílice de 100 ml equilibrada en la misma mezcla de disolventes. Se eluyó la columna con la misma mezcla de disolventes. Se analizó una muestra de cada fracción mediante CCF.

Se evaporaron las fracciones combinadas que contenían o bien PE o bien PC y se usaron para preparar 1-acil-lisofosfatidiletanolamina (1-acil-lisoPE), 1-acil-lisofosfatidilcolina (1-acil-lisoPC) y N-acil-lisofosfatidiletanolaminas. Pequeñas alícuotas de las fracciones de PE y PC combinadas se analizaron usando MALDI-TOF, RMN y CCF junto con los patrones. Estos métodos verificaron que las fracciones contenían prácticamente solo PE o PC.

El análisis estructural de fosfatidilcolina (PC) indicó diésteres del ácido palmítico y oleico como componente principal y ésteres minoritarios con un conjunto de ácidos grasos que se producen de manera natural.

EM calculada: 760,5851; hallada: 760,5853 (M+).

IR: 3384 (m), 3007(m), 2853(m), 1738 (s), 1602(s), 1467(m), 1419(m), 1378(m), 1346(m), 1249(s), 1174(m), 1092(s), 1064(s), 969(s), 925(s), 874(s), 821(m), 761(m), 721(s), 579(m), 506(m), 461(m)cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, metanol-d<sub>4</sub>) δ 5,35 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 5,25 (d, J = 3,8 Hz, 1H), 4,44 (dd, J = 12,0, 3,1 Hz, 1H), 4,32 - 4,23 (m, 2H), 4,17 (dd, J = 12,0, 6,9 Hz, 1H), 4,00 (t, J = 6,1 Hz, 2H), 3,68 - 3,60 (m, 2H), 3,23 (s, 9H), 2,33 (dt, J = 14,3, 7,4 Hz, 4H), 2,11 - 1,94 (m, 4H), 1,67 - 1,50 (m, 4H), 1,46 - 1,23 (m, 44H), 0,99 - 0,82 (m, 6H).

<sup>13</sup>C-RMN (126 MHz, metanol-d<sub>4</sub>) δ 173,49, 173,15, 129,44 (d, J = 20,1 Hz), 127,69 (d, J = 14,5 Hz), 70,40 (d, J = 7,9 Hz), 66,08 (dd, J = 7,2, 3,4 Hz), 63,47 (d, J = 5,1 Hz), 62,30, 59,07 (d, J = 4,9 Hz), 53,33, 53,30, 53,27, 33,70, 33,55, 31,69, 29,47, 29,42, 29,28, 29,24, 29,08, 28,99, 28,88, 28,85, 28,80, 26,79, 24,63, 22,36, 13,09.

Señales minoritarias:

<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, metanol-d<sub>4</sub>) δ 3,61 (d, J = 6,9 Hz), 3,35 (s), 2,89 - 2,72 (m), 2,40 (d, J = 3,2 Hz), 2,14 (d, J = 6,7 Hz), 1,74 - 1,65 (m), 1,18 (t, J = 7,0 Hz), 0,98 (t, J = 7,5 Hz).

<sup>13</sup>C-RMN (126 MHz, metanol-d<sub>4</sub>) δ 172,97, 172,49, 129,82, 129,56, 129,43, 128,93, 128,58, 128,09, 127,82, 127,43 (d, J = 16,2 Hz), 70,51, 48,45, 33,09, 31,29, 26,15, 25,20 (d, J = 3,0 Hz), 24,54, 22,26.

El análisis estructural de fosfatidiletanolamina (PE) indicó diésteres del ácido palmítico y oleico como componente principal y ésteres minoritarios con un conjunto de ácidos grasos que se producen de manera natural.

IR: 3374(m), 2956(m), 2925(s), 2854(m), 1741(s), 1653(m), 1490(m), 1467(m), 1457(m), 1378(m), 1227(s), 1051(m), 722(m) cm<sup>-1</sup>.

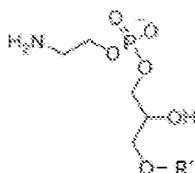
<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, metanol-d<sub>4</sub>) δ 5,43 - 5,31 (m, 5H), 5,23 (d, J = 3,4 Hz, 1H), 4,58 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 4,44 (dd, J = 12,0, 3,2 Hz, 1H), 4,24 - 4,14 (m, 1H), 4,04 (dd, J = 5,2, 2,7 Hz, 2H), 4,02 - 3,97 (m, 2H), 3,16 (t, J = 4,9 Hz, 2H), 2,92 - 2,78 (m, 4H), 2,33 (dt, J = 12,9, 8,5 Hz, 4H), 2,11 - 2,00 (m, 4H), 1,65 - 1,57 (m, 4H), 1,38 - 1,24 (m, 38H), 0,95 - 0,86 (m, 6H).

Señales minoritarias:

<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, metanol-d<sub>4</sub>) δ 5,18 - 5,14 (m), 3,67 - 3,58 (m), 3,50 - 3,43 (m), 3,35 (s), 3,23 (s), 2,78 (t, J = 6,7 Hz), 2,40 (d, J = 3,9 Hz), 2,17 - 2,11 (m), 1,69 (td, J = 7,3, 4,4 Hz), 0,98 (t, J = 7,6 Hz).

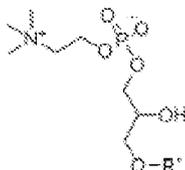
No fue posible la discriminación entre señales para el componente principal (PE) y otros componentes de la mezcla. Se enumeran todas las señales.

<sup>13</sup>C-RMN (126 MHz, metanol-d<sub>4</sub>) δ 174,94, 174,59, 174,39, 131,22, 130,96, 130,84 (d, J = 19,8 Hz), 130,84, 130,34, 130,03 - 129,94 (m), 129,48, 129,27, 129,22, 129,17, 129,15, 129,10, 129,06 - 129,03 (m), 128,93, 128,84 (d, J = 16,2 Hz), 72,03 - 72,00 (m), 71,95 - 71,91 (m), 71,89 - 71,84 (m), 71,79, 65,03 - 64,76 (m), 63,82 - 63,52 (m), 63,21 - 62,76 (m), 41,69 (d, J = 6,3 Hz), 35,10, 34,93, 34,49, 33,09, 32,69, 30,86, 30,80, 30,64, 30,49, 30,47, 30,38, 30,26, 30,23, 30,20, 28,23, 28,17, 27,55, 26,61, 26,03, 25,93, 23,75, 14,46.

**Ejemplo 3: Preparación de 1-acil-lisofosfatidiletanolamina (1-acil-lisoPE)**

R' = mezcla de acilos, el componente principal es palmitoilo.

- 5 PE purificada mediante cromatografía ultrarrápida o PE adquirida de Sigma Aldrich a una concentración del 10% (p/v) se agitaron repetidamente con vórtex y se sonicaron a 43°C en Tris-HCl 50 mM (pH 8,0, KCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 8 mM) hasta que los fosfolípidos se dispersaron completamente. Entonces se digirieron los fosfolípidos con fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4) a una proporción de 2 unidades de enzima/mg de fosfolípido a 43°C y se monitorizó la reacción mediante cromatografía en capa fina de gel de sílice (CCF), eluida con cloroformo:metanol:agua 20:10:1. Tras la escisión
- 10 completa, se detuvo la reacción mediante la adición de EDTA hasta una concentración de 10 mM y se almacenó a 0-4°C. Se marcó el producto resultante como PE/E-DAPL+FA (1-acil-lisofosfatidiletanolamina digerida con enzima en una mezcla con ácidos grasos). La fosfatidiletanolamina natural porta normalmente el residuo de ácido palmítico, ácido oleico o ácido esteárico como acilo.

**Ejemplo 4: Preparación de 1-acil-lisofosfatidilcolina (1-acil-lisoPC)**

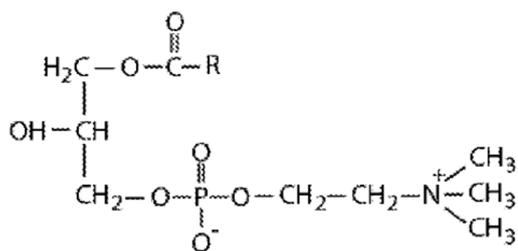
R' = mezcla de acilos, el componente principal es palmitoilo.

- 20 PC purificada mediante cromatografía ultrarrápida a una concentración del 10% (p/v) se agitó repetidamente con vórtex y se sonicó a 43°C en Tris-HCl 50 mM (pH 8,0, KCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 8 mM) hasta que los fosfolípidos se dispersaron completamente. Entonces se digirió PC con fosfolipasa A2 a una proporción de 2 unidades de enzima/mg de fosfolípido a 43°C y se monitorizó la reacción mediante cromatografía en capa fina de gel de sílice (CCF), eluida con cloroformo:metanol:agua 20:10:1. Tras la escisión completa, se detuvo la reacción mediante la adición de EDTA hasta una concentración de 10 mM y se almacenó a 0-4°C. Se marcó el producto resultante como PC/E-DAPL+FA (1-acil-lisofosfatidilcolina digerida con enzima en una mezcla con ácidos grasos). La fosfatidilcolina natural porta normalmente el residuo de ácido palmítico, ácido oleico o ácido esteárico como acilo.
- 25

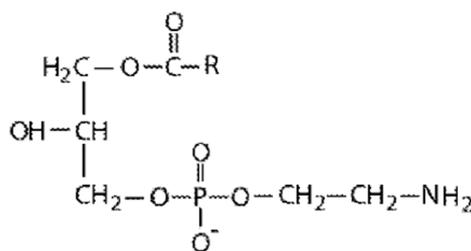
**Ejemplo 5: Preparación de una mezcla de 1-acil-lisofosfolípidos**

- Método A: Los fosfolípidos purificados totales del ejemplo 1 a una concentración del 10% (p/v) se agitaron repetidamente con vórtex y se sonicaron a 43°C en Tris.HCl 50 mM, pH 8,0, KCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 8 mM hasta que los fosfolípidos se dispersaron perfectamente. Entonces se digirieron los fosfolípidos con fosfolipasa A2 a una proporción
- 35 de 2 unidades de enzima/mg de fosfolípido a 43°C y se monitorizó la reacción mediante CCF, eluida con una mezcla de cloroformo:metanol:agua 20:10:1. Tras la escisión completa, se detuvo la reacción mediante la adición de EDTA hasta una concentración de 10 mM y se almacenó durante un corto tiempo a 0-4°C. Método B: Los fosfolípidos purificados secados totales del ejemplo 1 se agitaron repetidamente con vórtex y se sonicaron a 43°C en desoxicolato de sodio 83 mM en Tris.Cl 50 mM, pH 8,0, KCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 8 mM. La concentración final de fosfolípidos fue también de 83 mM (en relación con PC). Entonces se digirieron los fosfolípidos con fosfolipasa A2 a una tasa de 0,2 unidades de enzima/mg de fosfolípidos a 43°C y se monitorizó la reacción mediante CCF eluida con una mezcla de cloroformo:metanol:agua 20:10:1. Tras 120 minutos, se detuvo la reacción mediante la adición de EDTA hasta una concentración de 10 mM, el pH de la mezcla se ajustó a pH = 3 con HCl 1 M, el ácido desoxicólico precipitado se eliminó mediante centrifugación y se neutralizó el sobrenadante con NaOH 5 M hasta pH = 7. La mezcla de reacción se almacenó durante un corto tiempo a 0-4°C. Los productos obtenidos mediante los métodos A y B se designaron E-DAPL+FA.
- 40
- 45

- La mezcla E-DAPL+FA contiene en particular 1-acil-lisoPC y 1-acil-lisoPE, que pueden caracterizarse mediante las fórmulas mostradas a continuación, en las que R es principalmente ácido palmítico. La mezcla también contiene el ácido graso liberado de la escisión enzimática, principalmente ácido oleico.
- 50



1-acil-lisofosfatidilcolina



1-acil-lisofosfatidiletanolamina

El espectro de la 1-acil-lisofosfatidilcolina purificada:

5  $^1\text{H-RMN}$  (600 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$  5,44 - 5,32 (m, 2H), 4,40 - 4,26 (m, 2H), 4,23 - 4,11 (m, 2H), 4,03 - 3,96 (m, 1H), 3,98 - 3,87 (m, 2H), 3,69 - 3,65 (m, 2H), 3,25 (s, 9H), 2,44 - 2,33 (m, 2H), 2,15 - 2,00 (m, 2H), 1,70 - 1,59 (m, 2H), 1,45 - 1,27 (m, 20H), 0,98 - 0,89 (m, 3H).

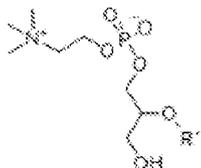
10  $^{13}\text{C-RMN}$  (151 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$  175,71 - 175,03 (m), 130,83 (d,  $J = 15,5$  Hz), 129,07 (d,  $J = 9,9$  Hz), 69,84 (d,  $J = 7,6$  Hz), 67,85, 67,81, 67,49 (dd,  $J = 6,9, 3,4$  Hz), 66,24, 60,43 (d,  $J = 5,1$  Hz), 54,69 (d,  $J = 7,6$  Hz), 34,90, 33,05, 30,83, 30,81, 30,60, 30,43, 30,33, 30,31, 30,21, 30,20, 28,14 (d,  $J = 5,2$  Hz), 26,00 (d,  $J = 5,3$  Hz), 23,73, 14,45.

Señales minoritarias:

15  $^1\text{H-RMN}$  (600 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$  5,05 - 4,98 (m), 4,07 - 4,02 (m), 3,80 (dd,  $J = 5,7, 4,5$  Hz), 3,75 - 3,70 (m), 3,65 - 3,56 (m), 3,37 (d,  $J = 1,5$  Hz), 3,13 (s), 2,91 - 2,83 (m), 2,82 - 2,78 (m), 2,44 (dd,  $J = 5,6, 3,9$  Hz), 2,34 (t,  $J = 7,4$  Hz), 2,20 - 2,14 (m), 2,13 - 2,08 (m), 1,75 - 1,68 (m), 1,00 (t,  $J = 7,6$  Hz).

20  $^{13}\text{C-RMN}$  (151 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$  175,14, 175,09, 174,94, 131,19, 130,93, 130,85, 130,27, 130,01, 129,90, 129,45, 129,16 (d,  $J = 1,5$  Hz), 128,89, 128,76, 79,20 (d,  $J = 6,1$  Hz), 75,77 (d,  $J = 5,8$  Hz), 74,69 (d,  $J = 8,1$  Hz), 72,48 (d,  $J = 7,5$  Hz), 66,34, 64,73 (d,  $J = 5,4$  Hz), 64,55 (d,  $J = 5,0$  Hz), 63,78, 63,46 (d,  $J = 4,5$  Hz), 63,02 (d,  $J = 4,2$  Hz), 35,10, 34,81, 34,31, 32,66, 30,75, 30,71, 30,47, 30,17, 30,13, 27,55, 26,59 - 26,50 (m), 26,02, 25,89, 23,62.

## 25 Ejemplo 6: Preparación de 2-acil-lisofosfatidilcolina



R" = mezcla de acilos, el componente principal es oleoilo.

30 A partir de la fosfatidilcolina aislada mediante el procedimiento del ejemplo 2, se eliminó enzimáticamente el residuo del ácido graso en la posición sn-1. La PC en una concentración del 10% (p/v) se agitó repetidamente con vórtex y se sonicó a 43°C en Tris.HCl 50 mM, pH 8,0, KCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 8 mM hasta que se dispersó completamente. Entonces se digirió la PC con fosfolipasa A1 en una proporción de 2 unidades de enzima/mg de fosfolípidos a 37°C y se monitorizó la reacción mediante CCF, eluida con una mezcla de cloroformo:metanol:agua 20:10:1. Tras la escisión completa, se añadió EDTA hasta una concentración de 10 mM y se almacenó la mezcla durante un corto tiempo a 0-4°C. El análisis por  $^1\text{H-RMN}$  del producto indicó un 15-20% de migración de acilo a partir de sn-1 para dar 1-acil-lisofosfatidilcolina como subproducto minoritario (véase el ejemplo 5).

40 El espectro de 2-acil-lisofosfatidilcolina:

45  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$  5,42 - 5,27 (m, 2H), 5,05 - 4,97 (m, 1H), 4,35 - 4,22 (m, 2H), 4,01 (p, 2H), 3,75 - 3,68 (m, 2H), 3,66 (dd,  $J = 5,5, 3,4$  Hz, 2H), 3,24 (s, 9H), 2,83 (m, 1H), 2,37 (t,  $J = 8,6, 6,5$  Hz, 2H), 2,10 - 1,99 (m, 2H), 1,63 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 1,41 - 1,24 (m, 18H), 0,92 (t,  $J = 6,9, 3,5$  Hz, 2H).

$^{13}\text{C-RMN}$  (126 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$  174,95, 130,83 (d,  $J = 12,1$  Hz), 74,68 (d,  $J = 8,5$  Hz), 64,73 (d,  $J = 5,5$  Hz), 61,24, 60,42 (d,  $J = 5,3$  Hz), 54,72, 54,69, 54,66, 35,09, 30,83, 30,60, 30,44, 30,33, 30,21, 28,13, 25,97, 23,73, 14,46.

Señales minoritarias:

50  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$  7,91 (s), 4,58 (s), 4,22 - 4,08 (m), 3,91 (q,  $J = 6,3, 5,6$  Hz), 3,77 (d,  $J = 14,4$  Hz),

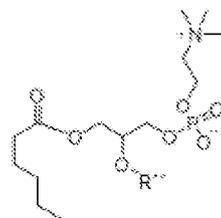
3,36 (s), 3,09 (s), 2,94 - 2,73 (m), 2,24 - 2,09 (m), 1,71 (s), 1,19 (t, J = 7,0 Hz), 0,99 (t, J = 7,6 Hz). <sup>13</sup>C-RMN (126 MHz, metanol-d<sub>4</sub>) δ 175,33, 131,20, 130,93, 130,25 (d, J = 4,6 Hz), 129,96 (d, J = 18,2 Hz), 129,46, 129,17, 128,83 (d, J = 16,1 Hz), 73,34 (d, J = 84,0 Hz), 70,87, 69,82 (d, J = 7,7 Hz), 67,82 (d, J = 5,7 Hz), 67,48 (dt, J = 6,8, 3,2 Hz), 66,23, 64,73 (d, J = 5,5 Hz), 64,14, 61,53, 34,90, 33,06, 30,83, 30,78, 30,47, 30,44, 26,55.

5

### Ejemplo 7: Preparación de 1,2-diacilfosfolípidos específicos de 1-acilo

A partir de la fosfatidilcolina aislada según el ejemplo 2, se eliminó enzimáticamente el residuo de ácido graso sn-1 del ejemplo 6, que se reemplazó por el radical acilo R' (véase la tabla a continuación) con una reacción de esterificación orgánica. La 2-acil-lisofosfatidilcolina de partida del ejemplo 6 (1 eq.) se disolvió en diclorometano seco (0,06 M), se enfrió la disolución hasta 4°C y el cloruro de ácido graso apropiado (hexanoico, esteárico, trimetilhexanoico, ciclopentanopropiónico) (3 eq.). Se calentó además la mezcla de reacción hasta 10°C y luego se añadieron lentamente gota a gota piridina (5 eq.) y una cantidad catalítica de DMAP (0,05 eq.). Se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente. Se monitorizó el transcurso de la reacción mediante CCF (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O en una proporción de 75/22,5/2,5). Se extinguió la reacción extrayendo la mezcla de reacción en diclorometano y NaCl acuoso al 50%. Se obtuvo el producto final mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (20% de (MeOH + el 10% de H<sub>2</sub>O) en cloroformo, + 1% por minuto). El producto resultante está contaminado con el producto de acilación de 1-acil-lisofosfatidilcolina (15-20%) resultante del mecanismo de transacilación como subproducto del ejemplo 6.

### Ejemplo 8: Preparación de 1-hexanoil-fosfatidilcolina



R' = mezcla de acilos, el componente principal es oleoil.

25

Se preparó 1-hexanoil-fosfatidilcolina mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 7, en el rendimiento del 43%.

EM: calculada: 619,4213; hallada: 619,4215.

IR: 3373(m), 3004(w), 2925(s), 2855(m), 1737(s), 1490(sh), 1467(m), 1380(m), 1246(s), 1051(m), 928(m), 726(w) cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-RMN (600 MHz, metanol-d<sub>4</sub>) δ 5,44 - 5,32 (m, 2H), 5,32 - 5,24 (m, 1H), 4,46 (dd, J = 12,1, 3,1 Hz, 1H), 4,36 (dd, J = 6,5, 3,4 Hz, 2H), 4,21 (dd, J = 12,1, 7,0 Hz, 1H), 4,06 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 3,82 - 3,68 (m, 2H), 3,30 (s, 9H), 2,36 (dt, J = 15,1, 7,4 Hz, 4H), 2,16 - 1,97 (m, 4H), 1,64 (t, J = 7,4 Hz, 4H), 1,42 - 1,26 (m, 22H), 0,98 - 0,88 (m, 6H).

35

<sup>13</sup>C-RMN (151 MHz, metanol-d<sub>4</sub>) δ 174,93, 174,62, 130,81 (d, J = 27,4 Hz), 129,07 (d, J = 18,3 Hz), 71,81 (d), 67,55 - 67,22 (m), 65,03 (d, J = 4,5 Hz), 63,70, 60,70 (d, J = 4,9 Hz), 54,79, 54,76, 54,74, 34,96 (d, J = 33,0 Hz), 33,03, 32,39, 30,81, 30,72, 30,57, 30,45, 30,42, 30,33, 30,31, 30,29, 30,22, 30,21, 30,18, 30,16, 30,14, 28,12, 26,57, 26,54, 25,83 (d, J = 52,5 Hz), 23,55 (d, J = 47,9 Hz), 14,37 (d, J = 23,1 Hz).

40

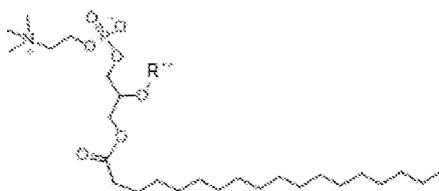
Señales minoritarias:

<sup>1</sup>H-RMN (600 MHz, metanol-d<sub>4</sub>) δ 5,16 (d, J = 3,7 Hz), 4,63 - 4,57 (m), 4,52 (d, J = 7,8 Hz), 4,32 - 4,28 (m), 3,88 (dd, J = 11,9, 1,6 Hz), 3,83 - 3,79 (m), 3,71 (s), 2,92 - 2,83 (m), 2,80 (t, J = 6,7 Hz), 2,16 (t, J = 6,4 Hz), 1,76 - 1,70 (m), 1,48 - 1,44 (m), 1,11 - 0,98 (m).

45

<sup>13</sup>C-RMN (151 MHz, metanol-d<sub>4</sub>) δ 131,20, 130,93, 130,80, 130,37, 129,95 (d, J = 14,7 Hz), 129,47, 129,21, 128,80 (d, J = 18,3 Hz), 98,15, 93,89, 77,99, 76,25, 74,83, 73,75, 72,97, 64,07, 62,73 (d, J = 17,4 Hz), 60,99, 35,04, 34,88, 34,48, 32,65, 32,36, 30,81, 30,72, 30,57, 30,45, 30,42, 30,33, 30,31, 30,29, 30,22, 30,21, 30,18, 30,16, 30,14, 28,15, 27,50, 25,96, 25,69, 23,61, 14,37 (d, J = 23,1 Hz).

50

**Ejemplo 9: Preparación de 1-estearoil-fosfatidilcolina**

R'' = mezcla de acilos, el componente principal es oleoilo.

5 Se preparó 1-estearoil-fosfatidilcolina mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 7, en el rendimiento del 54%.

EM: calculada: 810,5983; hallada: 810,5989 (M+Na<sup>+</sup>).

10 IR: 3408(m), 30012(w), 2957(m), 2925(s), 2852(m), 1737(s), 1490(m), 1488(sh), 1467(m), 1378(m), 1251(s), 1063(m), 926(m), 721(m) cm<sup>-1</sup>.

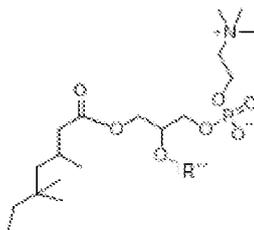
15 <sup>1</sup>H-RMN (600 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>) δ 5,43 - 5,31 (m, 2H), 5,27 - 5,23 (m, 1H), 4,44 (dd, *J* = 12,1, 3,0 Hz, 1H), 4,29 (t, *J* = 4,6 Hz, 2H), 4,18 (dd, *J* = 12,0, 7,0 Hz, 1H), 4,01 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 3,72 - 3,63 (m, 2H), 3,24 (s, 9H), 2,33 (dt, *J* = 16,4, 7,4 Hz, 4H), 2,11 - 1,96 (m, 4H), 1,65 - 1,55 (m, 4H), 1,42 - 1,17 (m, 24H), 0,97 - 0,81 (m, 6H).

20 <sup>13</sup>C-RMN (151 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>) δ 175,01, 174,66, 130,84 (d, *J* = 25,4 Hz), 129,08 (d, *J* = 18,5 Hz), 71,83 (d, *J* = 8,1 Hz), 67,46 (dt, *J* = 7,1, 3,1 Hz), 64,90 (d, *J* = 5,2 Hz), 63,73, 60,53 (d, *J* = 5,0 Hz), 54,79, 54,76, 54,74, 35,04 (d, *J* = 23,6 Hz), 33,06, 30,85, 30,83, 30,74, 30,64, 30,61, 30,46, 30,37, 30,35, 30,25, 30,21, 30,18, 28,50 - 27,96 (m), 26,03 (d, *J* = 3,3 Hz), 23,73, 14,46.

Señales minoritarias:

25 <sup>1</sup>H-RMN (600 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>) δ 4,56 (s), 3,79 (s), 3,35 (s), 2,95 - 2,72 (m), 2,45 - 2,39 (m), 2,16 (s), 2,13 (t, *J* = 6,9 Hz), 1,76 - 1,67 (m), 1,06 - 0,95 (m).

<sup>13</sup>C-RMN (151 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>) δ 174,97, 174,70, 136,28 (d, *J* = 3,0 Hz), 134,77 (d, *J* = 10,0 Hz), 131,53 (d, *J* = 12,6 Hz), 131,22, 129,97 (d, *J* = 5,1 Hz), 129,48, 129,31, 129,22, 128,88, 128,75, 108,23, 72,47, 64,12 (d, *J* = 5,0 Hz), 34,51, 32,67, 30,45, 27,53, 26,59 (d, *J* = 4,4 Hz), 25,93, 23,63, 14,48.

**30 Ejemplo 10: Preparación de 1-trimetilhexanoil-fosfatidilcolina**

R'' = mezcla de acilos, el componente principal es oleoilo.

35 Se preparó 1-trimetilhexanoil-fosfatidilcolina mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 7, en el rendimiento del 82%.

EM: calculada: 662,4755; hallada: 662,4758 (M<sup>+</sup>).

40 IR: 3404(m), 3009(w), 2957(m), 2927(s), 2855(m), 1739(s), 1478(s), 1467(m), 1394(m), 1365(m), 1247(s), 1054(m), 925(m), 723(m) cm<sup>-1</sup>.

45 <sup>1</sup>H-RMN (600 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>) δ 5,46 - 5,32 (m, 2H), 5,31 - 5,20 (m, 2H), 4,58 (s, 1H), 4,46 (ddd, *J* = 22,6, 12,1, 3,2 Hz, 1H), 4,29 (tp, *J* = 5,5, 2,7 Hz, 2H), 4,19 (ddd, *J* = 21,8, 12,1, 6,9 Hz, 1H), 4,08 - 3,95 (m, 2H), 3,73 - 3,61 (m, 2H), 3,25 (s, 9H), 2,41 - 2,31 (m, 4H), 2,13 - 1,98 (m, 4H), 1,64 (dq, *J* = 12,3, 7,4 Hz, 2H), 1,49 - 1,29 (m, 20H), 1,27 (d, *J* = 4,2 Hz, 2H), 1,15 (ddd, *J* = 14,0, 6,2, 1,9 Hz, 1H), 1,00 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H), 0,97 - 0,85 (m, 12H).

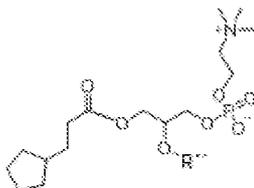
50 <sup>13</sup>C-RMN (151 mHz, metanol-*d*<sub>4</sub>) δ 174,58, 174,21, 130,84 (d, *J* = 23,7 Hz), 129,18 (d, *J* = 11,0 Hz), 71,84 (d, *J* = 8,0 Hz), 67,48 (dt, *J* = 6,8, 3,1 Hz), 65,14 - 64,30 (m), 63,70 (d, *J* = 2,3 Hz), 60,47 (d, *J* = 5,0 Hz), 55,06 - 54,34 (m), 51,64 (d, *J* = 3,0 Hz), 49,85, 44,63 (d, *J* = 1,5 Hz), 35,10, 33,06, 31,88, 30,83, 30,60, 30,45, 30,43, 30,34, 30,33, 30,22, 30,17, 28,16, 28,15, 26,56, 26,00 (d, *J* = 1,3 Hz), 23,74, 23,15, 23,12, 14,47.

Señales minoritarias:

5  $^1\text{H-RMN}$  (600 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$  5,47 - 5,36 (m), 2,93 - 2,82 (m), 2,80 (t, J = 6,7 Hz), 2,22 - 2,11 (m), 1,72 (td, J = 7,3, 3,8 Hz), 1,16 (dd, J = 6,2, 1,9 Hz).

$^{13}\text{C-RMN}$  (151 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$  131,22, 130,96, 130,84, 130,36, 129,99, 129,95, 129,93, 129,48, 129,14, 128,89, 128,77, 126,31, 34,51, 32,67, 30,73, 30,47, 30,24, 28,14, 26,60 (t, J = 0,9 Hz), 25,92, 23,72, 23,63, 21,49.

10 **Ejemplo 11: Preparación de 1-ciclopentanopropionil-fosfatidilcolina**



15  $R''$  = mezcla de acilos, el componente principal es oleoilo.

Se preparó 1-ciclopentanopropionil-fosfatidilcolina mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 7, en el rendimiento del 71%.

20 EM: calculada: 668,4262; hallada: 668,4267 ( $M+Na^+$ ).

IR: 3363(m), 3008(w), 2950(sh), 2927(s), 2856(m), 1734(s), 1487(m), 1465(m), 1553(m), 1377(m), 1245(s), 1068 (m), 926(m)  $\text{cm}^{-1}$ .

25  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$  5,47 - 5,32 (m, 2H), 5,32 - 5,23 (m, 1H), 4,70 - 4,62 (m, 1H), 4,46 (dd, J = 12,0, 3,2 Hz, 1H), 4,31 (tq, J = 7,3, 2,6 Hz, 2H), 4,03 (t, J = 5,9 Hz, 2H), 3,72 - 3,64 (m, 2H), 3,26 (s, 9H), 2,36 (td, J = 7,6, 4,4 Hz, 4H), 2,18 - 2,04 (m, 4H), 1,81 (pd, J = 6,7, 4,5, 3,8 Hz, 1H), 1,64 (q, J = 5,8, 4,1 Hz, 4H), 1,56 (dp, J = 7,1, 3,2 Hz, 4H), 1,45 - 1,28 (m, 20H), 1,22 - 1,07 (m, 4H), 0,93 (td, J = 6,9, 3,4 Hz, 3H).

30  $^{13}\text{C-RMN}$  (126 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$  130,82 (d, J = 20,1 Hz), 129,35 (d, J = 7,6 Hz), 77,92, 76,62, 75,61, 74,56, 74,38, 71,76, 69,56, 64,89 (d, J = 5,2 Hz), 63,71, 61,86 - 60,10 (m), 57,72 - 53,49 (m), 35,08, 34,26, 33,43, 33,05, 32,24, 30,83, 30,59, 30,44, 30,34, 30,22, 30,16, 28,17, 26,10, 26,02, 23,73, 14,48.

Señales minoritarias:

35  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$  4,94 (dd, J = 6,2, 2,8 Hz, 1H), 4,79 (d, J = 11,4 Hz, 1H), 4,60 - 4,52 (m, 4H), 4,26 - 4,15 (m, 3H), 3,87 - 3,80 (m, 2H), 3,75 (dd, J = 10,8, 2,9 Hz, 1H), 2,93 - 2,74 (m, 3H).

40  $^{13}\text{C-RMN}$  (126 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$  139,75, 139,66, 139,39, 128,97 (d, J = 3,6 Hz), 128,86 - 128,58 (m), 101,07, 40,87, 34,48, 32,66, 30,73, 30,46, 26,58, 23,62.

40 **Ejemplo 12: Preparación de 1-palmitoil-fosfatidilcolina**



45  $R''$  = mezcla de acilos, el componente principal es oleoilo.

Se preparó 1-palmitoil-fosfatidilcolina mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 7, en el rendimiento del 15%.

50 EM: calculada: 760,5851; hallada: 760,5855 ( $M^+$ ).

IR: 3403(m), 3007(w), 2956(m), 2923(s), 2853(m), 1738(s), 1478(sh), 1467(m), 1379(m), 1251(s), 1068(m), 926(m), 721(m)  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H-RMN}$  (600 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$  5,38 (td, J = 4,9, 4,1, 1,2 Hz, 2H), 5,28 (dtd, J = 6,9, 5,4, 3,1 Hz, 1H), 4,47 (dd, J =

12,0, 3,2 Hz, 1H), 4,35 - 4,27 (m, 2H), 4,21 (dd, J = 12,0, 6,9 Hz, 1H), 4,03 (ddd, J = 6,7, 5,3, 1,3 Hz, 2H), 3,75 - 3,58 (m, 2H), 3,26 (s, 9H), 2,36 (dt, J = 16,0, 7,4 Hz, 4H), 2,15 - 2,00 (m, 4H), 1,64 (pd, J = 9,1, 8,0, 4,1 Hz, 4H), 1,46 - 1,24 (m, 44H), 0,93 (td, J = 7,1, 1,4 Hz, 6H).

5 <sup>13</sup>C-RMN (151 MHz, metanol-d<sub>4</sub>) δ 174,90, 174,56, 130,84 (d, J = 24,7 Hz), 71,81 (d, J = 8,1 Hz), 67,49 (t, J = 6,7 Hz), 64,90, 64,87, 63,69, 60,47 (d, J = 5,0 Hz), 55,70 - 53,83 (m), 30,87, 30,82, 30,79, 30,67, 30,47, 30,38 (d, J = 1,4 Hz), 30,27, 30,24, 30,20, 28,18, 26,05, 26,03, 23,75, 14,46.

10 Se digirieron los 1,2-diacilfosfolípidos específicos de 1-acilo mostrados en los ejemplos 8-12 mediante fosfolipasa A2 y se purificaron tal como se describió en el ejemplo 4. Este proceso produjo los siguientes productos que se designaron tal como se muestra en la siguiente tabla:

R'	Designación
hexanoílo	sn-1 hexanoil PC/E-DAPL+FA
estearoílo	sn-1 estearoil PC/E-DAPL+FA
trimetilhexanoílo	sn-1 trimetilhexanoil PC/E-DAPL+FA
ciclopentanopropionilo	sn-1 ciclopentanopropionil PC/E-DAPL+FA
palmitoílo	sn-1 palmitoil PC/E-DAPL+FA

15 Los productos contenían ácidos grasos libres (liberados) (+FA) y los componentes principales eran lisofosfolípidos que tenían las siguientes estructuras:

sn-1 hexanoil PC/E-DAPL	sn-1 ciclopentanopropionil PC/E-DAPL	sn-1 trimetilhexanoil PC/E-DAPL
sn-1 estearoil PC/E-DAPL	sn-1 palmitoil PC/E-DAPL	

**Ejemplo 13: Preparación de derivados de N-acilo de 1,2-diacil-fosfatidiletanolamina**

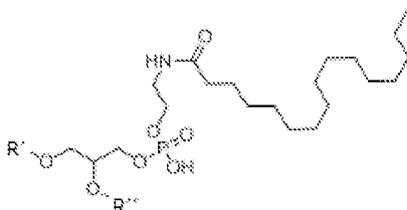
20 En la fosfatidiletanolamina aislada según el ejemplo 2, se reemplazó el hidrógeno del grupo amino por el radical acilo R2 (véase la tabla a continuación) usando una reacción de esterificación. La fosfatidiletanolamina aislada de la fuente natural según el ejemplo 2 porta en la posición sn-1 una mezcla de residuos de ácido graso, siendo aproximadamente el 80% residuos de ácido palmítico, siendo el resto residuos de ácido esteárico, ácido oleico y una pequeña cantidad de otros residuos de ácido graso.

5 Se disolvió la fosfatidiletanolamina purificada en benceno anhidro y se mezcló con dos equivalentes de anhídrido (palmítico, decanoico, oleico, linoleico o elaidico, respectivamente) en presencia de DMAP. Los anhídridos se prepararon mediante condensación de los ácidos relevantes en presencia de DCC. La N-acilación se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se secó la mezcla de reacción, se disolvió en hexano, se eliminó la fracción insoluble mediante centrifugación y se aislaron las N-acilfosfatidiletanolaminas mediante precipitación mediante 2 equivalentes en volumen de acetona a 4°C durante la noche. Se lavó el precipitado 3 veces con hexano:acetona 1:2 enfriado con hielo a 0°C.

R2	Designación del producto
palmitoílo	N-palmitoil PE
decanoílo	N-decanoil PE
oleoílo	N-oleoil PE
linoleoílo	N-linoleoil PE
elaidoílo	N-elaidoil PE

10

#### Ejemplo 14: Preparación de N-palmitoil-fosfatidiletanolamina



15 R' = mezcla de acilos, el componente principal es palmitoílo.

R'' = mezcla de acilos, el componente principal es oleoílo.

Se preparó N-palmitoil-fosfatidiletanolamina mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 13.

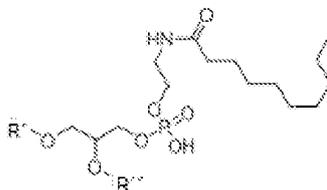
20

<sup>1</sup>H-RMN (600 MHz, metanol-d<sub>4</sub>) δ 5,50 - 5,32 (m, 2H), 5,27 (quinteto, J = 5,5 Hz, 1H), 4,46 (dd, J = 12,0, 3,1 Hz, 1H), 4,20 (dd, J = 12,1, 6,9 Hz, 1H), 4,12 (ddd, J = 9,5, 6,2, 3,5 Hz, 2H), 4,08 - 4,01 (m, 2H), 3,26 - 3,21 (m, 2H), 2,40 - 2,37 (t, J = 7,7 Hz, 2H), 2,34 (t, J = 7,7 Hz, 2H), 2,28 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,13 - 2,00 (m, 4H), 1,62 (m, 6H), 1,31 (m, 82H), 0,92 (t, J = 6,9 Hz, 9H).

25

Señales de los derivados de ácidos grasos minoritarios: 5,50 - 5,32 (m, 2H), 2,90 - 2,77 (m, 3H) <sup>13</sup>C-RMN (151 MHz, metanol-d<sub>4</sub>) δ 173,48, 173,14, 172,95, 129,51, 129,31, 70,36, 63,51, 61,51, 60,86, 40,24, 33,53, 31,67, 29,5-28,8 (señales múltiples), 24,85, 24,63, 22,33, 13,03.

#### 30 Ejemplo 15: Preparación de N-decanoil-fosfatidiletanolamina

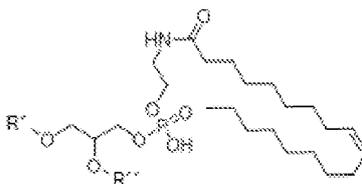


35 R' = mezcla de acilos, el componente principal es palmitoílo.

R'' = mezcla de acilos, el componente principal es oleoílo.

Se preparó N-decanoil-fosfatidiletanolamina mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 13.

40

**Ejemplo 16: Preparación de N-oleoil-fosfatidiletanolamina**

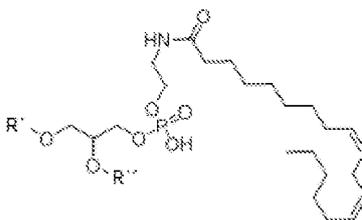
R' = mezcla de acilos, el componente principal es palmitoílo.

5 R'' = mezcla de acilos, el componente principal es oleoílo.

Se preparó N-oleoil-fosfatidiletanolamina mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 13.

**Ejemplo 17: Preparación de N-linoleoil-fosfatidiletanolamina**

10



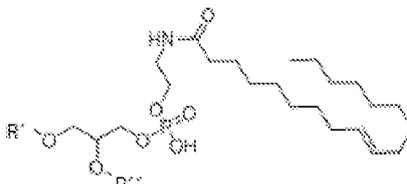
R' = mezcla de acilos, el componente principal es palmitoílo.

15 R'' = mezcla de acilos, el componente principal es oleoílo.

Se preparó N-linoleoil-fosfatidiletanolamina mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 13.

**Ejemplo 18: Preparación de N-elaidoil-fosfatidiletanolamina**

20



R' = mezcla de acilos, el componente principal es palmitoílo.

25 R'' = mezcla de acilos, el componente principal es oleoílo.

Se preparó N-elaidoil-fosfatidiletanolamina mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 13.

**Ejemplo 19: Preparación de 1-acil-lisofosfolípidos derivados de N-palmitoil PE, N-decanoil PE, N-oleoil PE, N-linoleoil PE y N-elaidoil PE, en una mezcla con ácido graso libre (escindido)**

30

N-acilfosfolípido a una concentración del 10% (p/v) se agitó repetidamente con vórtex y se sonicó a 43°C en Tris-HCl 50 mM (pH 8,0, KCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 8 mM) hasta que el fosfolípido se dispersó completamente y luego se procesó tal como se describió en el ejemplo 4, se digirió mediante fosfolipasa A2 a una proporción de 2 unidades de enzima/mg de fosfolípido a 43°C y se monitorizó la reacción mediante cromatografía en capa fina de gel de sílice (CCF), eluida con cloroformo:metanol:agua 20:10:1. Tras la escisión completa, se detuvo la reacción mediante la adición de EDTA hasta una concentración de 10 mM y se almacenó a 0-4°C.

35

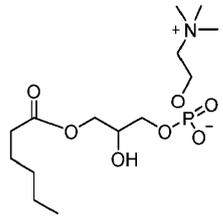
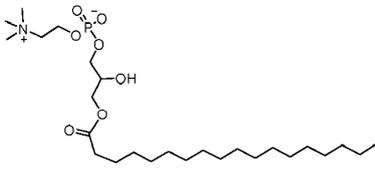
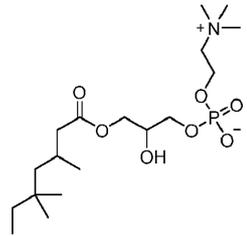
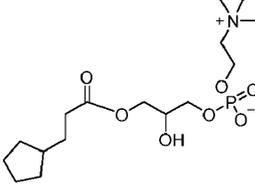
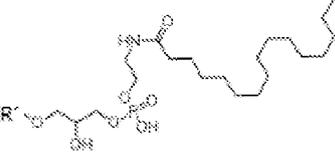
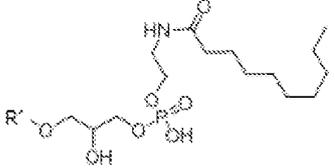
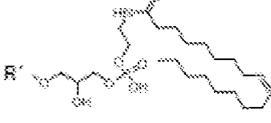
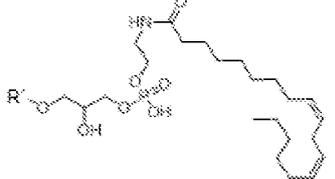
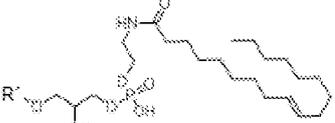
Los productos resultantes se marcaron tal como se muestra en la siguiente tabla:

40

R2	Designación del producto
palmitoílo	N-palmitoil PE/E-DAPL+FA
decanoílo	N-decanoil PE/E-DAPL+FA
oleoílo	N-oleoil PE/E-DAPL+FA
linoleoílo	N-linoleoil PE/E-DAPL+FA
elaidoílo	N-elaidoil PE/E-DAPL+FA

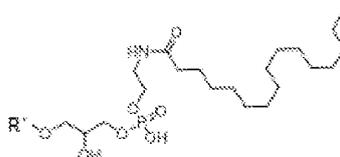
**Ejemplo 20: Eliminación de ácidos grasos libres (FA) de los productos**

5 Los productos de 1-acil-lisofosfolípido preparados según los presentes ejemplos mediante desacilación enzimática en la posición sn-2 para formar una mezcla con ácidos grasos (es decir, PE/E-DAPL+FA, PC/E-DAPL+FA y E-DAPL+FA, sn-1 hexanoil PC/E-DAPL+FA, sn-1 estearoil PC/E-DAPL+FA, sn-1 trimetilhexanoil PC/E-DAPL+FA, sn-1 ciclopentanopropionil PC/E-DAPL+FA, N-palmitoil PE/E-DAPL+FA, N-decanoil PE/E-DAPL+FA, N-oleoil PE/E-DAPL+FA, N-linoleoil PE/E-DAPL+FA, N-elaidoil PE/E-DAPL+FA) se disolvieron en etanol y luego se añadieron gradualmente agua y cloroformo para dar una proporción de etanol:agua:cloroformo de 3:2:4. Se agitó la mezcla  
 10 vigorosamente durante 10 min, se centrifugó durante 5 min a 3000 x g a temperatura ambiente y se aisló la fase de cloroformo y se evaporó. Se lavó el residuo con n-hexano a 0-4°C. Se obtuvieron lisofosfolípidos insolubles mediante centrifugación y se lavó el sedimento 3 veces con n-hexano:acetona 1:2 (4°C) y se secó. Las formulaciones secas estaban prácticamente libres de ácidos grasos y se designaron PE/E-DAPL, PC/E-DAPL, E-DAPL, sn-1 hexanoil PC/E-DAPL, sn-1 estearoil PC/E-DAPL, sn-1 trimetilhexanoil PC/E-DAPL, sn-1 ciclopentanopropionil PC/E-DAPL, N-  
 15 palmitoil PE/E-DAPL, N-decanoil PE/E-DAPL, N-oleoil PE/E-DAPL, N-linoleoil PE/E-DAPL y N-elaidoil PE/E-DAPL.

 <p>sn-1 hexanoil PC/E-DAPL</p>	 <p>sn-1 estearoil PC/E-DAPL</p>	 <p>sn-1 trimetilhexanoil PC/E-DAPL</p>
 <p>sn-1 ciclopentanopropionil PC/E-DAPL</p>	 <p>N-palmitoil PE/E-DAPL R' = mezcla de acilos, el componente principal es palmitoílo</p>	 <p>N-decanoil PE/E-DAPL R'= mezcla de acilos, el componente principal es palmitoílo</p>
 <p>N-oleoil PE/E-DAPL R' = mezcla de acilos, el componente principal es palmitoílo</p>	 <p>N-linoleoil PE/E-DAPL R' = mezcla de acilos, el componente principal es palmitoílo</p>	 <p>N-elaidoil PE/E-DAPL R' = mezcla de acilos, el componente principal es palmitoílo</p>

N-palmitoil PE/E-DAPL

20



R' = mezcla de acilos, el componente principal es palmitoílo.

25 <sup>1</sup>H-RMN (600 MHz, metanol-d<sub>4</sub>) δ 4,19 (dd, J = 11,4, 4,3 Hz, 1H), 4,13 (dd, J = 11,3, 6,2 Hz, 1H), 4,08 (ddd, J = 9,5, 6,2, 3,5 Hz, 2H), 4,02 - 3,97 (m, 1H), 3,95 - 3,88 (m, 2H), 3,19 - 3,15 (m, 2H), 2,37 (t, J = 7,5 Hz, 4H), 2,37- 2,15 (m,

2H), 1,63 (q, J = 7,3 Hz, 4H), 1,31 (s, 52H), 0,92 (t, J = 7,0 Hz, 2H).

$^{13}\text{C}$ -RMN (151 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$  174,13, 173,95, 2 x 130,05, 68,39, 66,41, 64,87, 61,62, 40,28, 33,50, 31,66, 29,62-28,69 (señales múltiples), 24,60, 22,32, 12,96.

5 **Ejemplo 21: Efecto de los compuestos y mezclas preparados sobre el crecimiento de células tumorales en cultivo celular**

10 Este ejemplo demuestra el efecto de los compuestos y mezclas preparados, es decir PE/E-DAPL+FA, PC/E-DAPL+FA y E-DAPL+FA, sn-1 hexanoil PC/E-DAPL+FA, sn-1 estearoil PC/E-DAPL+FA, sn-1-trimetilhexanoil PC/E-DAPL+FA, sn-1 ciclopentanopropionil PC/E-DAPL+FA, N-palmitoil PE/E-DAPL+FA, N-decanoil PE/E-DAPL+FA, N-oleoil PE/E-DAPL+FA, N-linoleoil PE/E-DAPL+FA, N-elaidoil PE/E-DAPL+FA y PE/E-DAPL, PC/E-DAPL, E-DAPL, sn-1 hexanoil PC/E-DAPL, sn-1 estearoil PC/E-DAPL, sn-1 trimetilhexanoil PC/E-DAPL, sn-1 ciclopentanopropionil PC/E-DAPL, N-palmitoil PE/E-DAPL, N-decanoil PE/E-DAPL, N-oleoil PE/E-DAPL, N-linoleoil PE/E-DAPL y N-elaidoil PE/E-DAPL, sobre el crecimiento de células tumorales en cultivo tisular. Como control, se usaron los fosfolípidos de partida en las mismas concentraciones y condiciones. Los fosfolípidos de partida fueron PE, PC, sn-1 estearoil PC, N-palmitoil PE o la mezcla inicial de fosfolípidos, respectivamente.

20 Se sometió a prueba la actividad citotóxica de los productos en cultivos de células tumorales C32 (melanoma humano), TIB-75 (que induce hepatocarcinoma murino), LMH (hepatocarcinoma de pollo).

25 A) Se cultivaron células C32 en medio D-MEM que contenía suero fetal al 10% y penicilina+estreptomicina a 37°C en atmósfera de aire/el 5% de  $\text{CO}_2$  saturada con vapor de agua. Cada pocillo contenía  $5 \times 10^4$  células y 0,5 ml de medio. Se añadieron los productos sometidos a prueba a las células a las concentraciones de 0, 2,5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 y 240  $\mu\text{M}$ . Después de 16 horas de cultivo, se registró el estado celular.

30 B) Se cultivaron células LMH en medio D-MEM que contenía suero fetal al 10% y penicilina+estreptomicina a 37°C en atmósfera de aire/el 5% de  $\text{CO}_2$  saturada con vapor de agua. Cada pocillo contenía  $5 \times 10^4$  células y 0,5 ml de medio. Se añadieron los fosfolípidos sometidos a prueba a las células a concentraciones de 0, 2,5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 y 240  $\mu\text{M}$ . Después de 16 horas de cultivo, se registró el estado celular.

35 C) Se cultivaron células TIB-75 en medio D-MEM que contenía suero fetal al 10% y penicilina+estreptomicina a 37°C en atmósfera de aire/el 5% de  $\text{CO}_2$  saturada con vapor de agua. Cada pocillo contenía  $5 \times 10^4$  células y 0,5 ml de medio. Se añadieron los fosfolípidos sometidos a prueba a las células a concentraciones de 0, 2,5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 y 240  $\mu\text{M}$ . Después de 16 horas de cultivo, se registró el estado celular.

La presencia de ácidos grasos libres no tuvo ningún efecto significativo sobre la toxicidad de los productos para las células tumorales sometidas a prueba.

40 Los controles (PE, PC, sn-1 estearoil PC, N-palmitoil PE o la mezcla inicial de fosfolípidos) a exactamente las mismas concentraciones no afectaron al fenotipo ni redujeron la tasa de crecimiento celular. Para comparación, se sometieron a prueba 2-acil-lisofosfolípidos preparados a partir de PC, PE y fosfolípidos totales (estos productos eran ligeramente citotóxicos, necesitaban aproximadamente 4-5 veces más concentración para lograr el mismo nivel de toxicidad que PE/E-DAPL, PC/E-DAPL, E-DAPL y sn-1 estearoil PC/E-DAPL).

45 La citotoxicidad de los productos se cuantificó determinando el contenido de ATP de las células y usando la ingesta de rojo neutro y se determinaron  $\text{IC}_{50\text{ATP}}$  e  $\text{IC}_{50\text{NR}}$  [ $\mu\text{M}$ ]. Ambos métodos proporcionaron prácticamente los mismos valores. La tabla muestra los valores de  $\text{IC}_{50\text{ATP}}$ .

	C32 $\text{IC}_{50\text{ATP}}$ [ $\mu\text{M}$ ]	LMH $\text{IC}_{50\text{ATP}}$ [ $\mu\text{M}$ ]	TIB-75 $\text{IC}_{50\text{ATP}}$ [ $\mu\text{M}$ ]
sn-1 estearoil PC/E-DAPL	45	40	45
sn-1 hexanoil PC/E-DAPL	130	135	135
sn-1 ciclopentanopropionil PC/E-DAPL	150	130	
sn-1 trimetilhexanoil PC/E-DAPL	130	140	
PC/E-DAPL	50	35	45
PE/E-DAPL	35	30	35
N-palmitoil PE/E-DAPL	150	140	140
N-decanoil PE/E-DAPL	180		
N-oleoil PE/E-DAPL	180		
N-linoleoil PE/E-DAPL	180		

2-acilo PC (15-20% de 1-acil PC)	200		210
2-acilo PE(15-20% de 1-acil PE)	200		200

**Ejemplo 22: Efecto de E-DAPL+FA sobre el desarrollo de hepatocarcinomas experimentales en pollos**

5 Se administraron derivados de 1-acil-lisofosfatidilo E-DAPL+FA por vía oral a pollos 5 veces a la semana a 40 mg/20 g de peso del pollo. Se indujeron hepatocarcinomas en los pollos en la fase embrionaria mediante la inyección de células de hepatocarcinoma LMH. Se evaluó el experimentos el día 25 desde la eclosión de los pollos.

Pollos	Número de pollos al comienzo del experimento	Números de pollos supervivientes el día 25
infectados, no tratados	8	1 (múltiples carcinomas hepáticos grandes)
infectados, tratados mediante E-DAPL+FA	8	4 (3 pollos estaban libres de carcinomas, 1 pollo tenía 2 carcinomas hepáticos pequeños)

**Ejemplo 23: Efecto de E-DAPL sobre el desarrollo de tumores subcutáneos experimentales en ratones**

10 Se indujeron tumores subcutáneos en 16 ratones BALB/c (8 a 10 semanas de edad) mediante inyección de células TIB-75 singénicas. Se administraron 8 mg de E-DAPL en 0,1 ml de solución salina una vez a la semana a un grupo de 8 ratones y se administraron 8 mg de fosfolípidos (PL) de control una vez a la semana a un grupo de 8 ratones, los productos administrados se aplicaron al área de tumor en desarrollo. Después de 7 semanas, se disecaron los tumores, se midió su diámetro en tres direcciones perpendiculares y se calcularon los volúmenes esféricos a partir de los valores medios. El volumen medio de tales tumores aproximados en ratones tratados con E-DAPL fue el 30% del volumen de los tumores en ratones tratados con PL de control.

**Ejemplo 24: Efecto de E-DAPL sobre el desarrollo de tumores intraperitoneales experimentales en ratones**

20 Se indujeron tumores intraperitoneales en 20 ratones BALB/c (8-10 semanas de edad) mediante inyección de células TIB-75 singénicas. Un grupo de control de 10 ratones se alimentó durante ocho semanas con alimento experimental bajo en grasa (Altromin) y un segundo grupo se alimentó con la misma dieta que contenía 8 mg de E-DAPL por 5 g de alimento. Los ratones recibieron el alimento experimental 4 días a la semana; en los restantes 3 días recibieron alimento convencional. En el plazo de 6 semanas del inicio del experimento, 2 ratones de control murieron por los tumores TIB-75. Entonces, se disecaron 2 grupos iguales de ratones de control y tratados. El peso tumoral promedio en el grupo de ratones tratados fue el 75% del peso de los tumores de control. Después de 2 semanas más, se analizaron los ratones restantes. El peso tumoral promedio en el grupo de ratones tratados era ahora el 40% del peso tumoral en el grupo de control. El experimento muestra que E-DAPL administrado en la dieta (por vía oral) también ralentiza el crecimiento de tumores intraperitoneales experimentales.

**Ejemplo 25: Efecto E-DAPL sobre el desarrollo de tumores gastrointestinales (GIT) experimentales en ratones**

35 Se usó un modelo de ratón experimental de poliposis adenomatosa familiar APC/Min para producir espontáneamente pólipos premalignos y finalmente tumores en el intestino delgado de los ratones (LK Su, KW Kinzler, B. Vogelstein, AC Preisinger, AR Moser, C. Luongo, KA Gould, WF Dove: Multiple intestinal neoplasia caused by mutation in the murine homologue of the APC gene, Science 256 (1992), págs. 668-670)

40 Se añadió E-DAPL a la mezcla de pienso para ratones (65 mg de E-DAPL/5 g de la dieta baja en grasa). Esta cantidad la consumía aproximadamente cada ratón todos los días. Los ratones se alimentaron con este pienso modificado 3 días a la semana desde las 16 semanas de edad (cuando tenían muchas docenas de pólipos en el intestino delgado) hasta las 28 semanas de edad (cuando solo estaban presentes los adenomas en crecimiento en el intestino delgado). Se aisló el intestino delgado de los ratones de 28 semanas de edad tratados mediante E-DAPL y de los ratones de control alimentados con dieta baja en grasa sin modificar 3 días a la semana y se procesaron para dar preparaciones histológicas. La evaluación de las preparaciones proporcionó los siguientes resultados (área redondeada hasta el 3 decimal):

	E-DAPL	control	significación estadística / valor de p
número promedio de adenomas/ratón	24,5	34,4	0,049062
área total de adenomas [mm <sup>2</sup> ]	2,975	11,741	0,026129
área de adenoma promedio [mm <sup>2</sup> ]	0,121	0,337	0,005119

Conclusión: La exposición a E-DAPL a largo plazo no afecta de manera adversa a la fisiología de animales experimentales y la administración de E-DAPL inhibe significativamente el número y el crecimiento de los adenomas (representativos de tumores GIT) en el intestino delgado de ratones APC/Min.

5 **Ejemplo 26: Efecto de E-DAPL sobre el crecimiento de tumores trasplantados subcutáneos en crecimiento rápido**

10 Se indujo crecimiento tumoral en ratones BALB/C experimentales mediante inyección subcutánea de células tumorales singénicas CT26.CL25. La mitad de los ratones se trataron con E-DAPL. Se administraron por vía intravenosa doscientos microlitros de E-DAPL al 0,3% (en solución salina que contenía solución salina tamponada con fosfato al 20%) a cada ratón 3 veces a la semana. A los animales de control se les administró de manera similar solución salina/solución salina tamponada con fosfato al 20%. Después de tres semanas, se recogieron los tumores y se pesaron. El peso de los tumores de los animales tratados fue el 42% del peso de los tumores de control. Los tumores en ratones tratados con E-DAPL fueron también de un tipo limitado, incluso microscópicamente, en contraste con los tumores de control, que eran notablemente ilimitados. Esto confirma adicionalmente el efecto beneficioso de E-DAPL sobre la reducción del crecimiento de tumores malignos.

20 Conclusión: La administración intravenosa de E-DAPL en solución salina se tolera bien e inhibe significativamente el desarrollo de tumores experimentales.

25 Conclusiones extraídas de los experimentos *in vivo*: Los resultados de los experimentos facilitados en los ejemplos 22-26 así como experimentos *in vivo* adicionales realizados por los inventores revelaron que la administración oral de una dosis diaria de E-DAPL que oscila entre 400 y 3200 mg/kg del peso vivo del animal no tenía efectos adversos observables sobre los animales experimentales sino que inhibía el crecimiento de diversos tumores experimentales. Como regla general, dosis superiores fueron progresivamente más eficaces. La administración intravenosa de disolución de E-DAPL al 0,3% se toleró bien por los ratones y demostró ser un modo eficaz de inhibición de tumores, en particular tumores con suministro vascular bien desarrollado.

30 **Ejemplo 27: Efecto sinérgico de la coadministración de E-DAPL y un fármaco anticancerígeno, doxorubicina (Dox)**

35 Se evaluó la potenciación del efecto citotóxico de la combinación de E-DAPL/Dox. Se determinó la relación de dosis-efecto de fármacos individuales y la mezcla de E-DAPL/Dox (se sometió a prueba una proporción 202:1) en la línea de células cancerosas 4T1 de glándula mamaria por medio de ensayo con violeta cristal (tres mediciones). El gráfico de mediana del efecto linealizado de la línea de dosis-respuesta proporcionó ambos parámetros (IC<sub>50</sub>; línea de tendencia, valor de *m*) de la ecuación de mediana del efecto para el tratamiento individual y de combinación [ref.: Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies; Ting-Chao Chou: Pharmacol Rev. 58(3), 2006, 621-81; Erratum in Pharmacol Rev. 2007;59(1),124]:

40 *Ecuación de mediana del efecto*

$$\left(\frac{f_a}{f_u}\right) = \left(\frac{D}{IC_{50}}\right)^m$$

45 *Gráfico de mediana del efecto linealizado*

$$\log\left(\frac{f_a}{f_u}\right) = m \log(D) - m \log(IC_{50})$$

Parámetros calculados de la relación de dosis-efecto			
	Calculado a partir del gráfico de mediana del efecto		Curva de dosis-efecto
	IC <sub>50</sub> [µM]	valor de <i>m</i> [línea de tendencia]	
E-DAPL	160,37	1,8886	sigmoidea
Dox	0,93	0,7877	sigmoidea plana
E-DAPL/Dox (202:1)	46,45	0,8904	~ sigmoidea plana

50 La potenciación del efecto de combinación de E-DAPL/Dox/202:1 se expresó para las concentraciones IC<sub>1</sub> a IC<sub>60</sub> mediante el cálculo del índice de combinación ("Combination Index", CI) aplicando el teorema del índice de combinación para fármacos mutuamente no excluyentes que obedecen a condiciones de orden superior [ref.:

Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors; Ting-Chao Chou, Paul Talalay: *Advances in Enzyme Regulation*, volumen 22, 1984, páginas 27-55]:

$$CI = \frac{D_1}{(D_x)_1} + \frac{D_2}{(D_x)_2} + \frac{D_1 D_2}{(D_x)_1 (D_x)_2}$$

5

$CI < 1$  (sinergismo);  $CI = 1$  (efecto aditivo);  $CI > 1$  (antagonismo)

en la que:

10

$$D_x = (IC_{50}) [f_a / (1 - f_a)]^{\frac{1}{m}}$$

$$D_1 = (D_x)_{1,2} \times [1 / (202 + 1)]$$

15

$$D_2 = (D_x)_{1,2} \times [202 / (202 + 1)]$$

$D_1$  - dosis del primer fármaco en la mezcla;  $D_2$  - dosis del segundo fármaco en la mezcla

Índice de combinación para el intervalo de concentración IC <sub>1</sub> a IC <sub>60</sub>					
IC <sub>1-20</sub>	CI	IC <sub>21-40</sub>	CI	IC <sub>41-60</sub>	CI
IC <sub>1</sub>	0,510	IC <sub>21</sub>	0,469	IC <sub>41</sub>	0,552
IC <sub>2</sub>	0,476	IC <sub>22</sub>	0,472	IC <sub>42</sub>	0,557
IC <sub>3</sub>	0,461	IC <sub>23</sub>	0,475	IC <sub>43</sub>	0,563
IC <sub>4</sub>	0,452	IC <sub>24</sub>	0,479	IC <sub>44</sub>	0,568
IC <sub>5</sub>	0,448	IC <sub>25</sub>	0,482	IC <sub>45</sub>	0,574
IC <sub>6</sub>	0,445	IC <sub>26</sub>	0,486	IC <sub>46</sub>	0,580
IC <sub>7</sub>	0,443	IC <sub>27</sub>	0,490	IC <sub>47</sub>	0,586
IC <sub>8</sub>	0,443	IC <sub>28</sub>	0,493	IC <sub>48</sub>	0,592
IC <sub>9</sub>	0,443	IC <sub>29</sub>	0,497	IC <sub>49</sub>	0,598
IC <sub>10</sub>	0,444	IC <sub>30</sub>	0,501	IC <sub>50</sub>	0,605
IC <sub>11</sub>	0,445	IC <sub>31</sub>	0,505	IC <sub>51</sub>	0,612
IC <sub>12</sub>	0,447	IC <sub>32</sub>	0,509	IC <sub>52</sub>	0,619
IC <sub>13</sub>	0,448	IC <sub>33</sub>	0,514	IC <sub>53</sub>	0,626
IC <sub>14</sub>	0,450	IC <sub>34</sub>	0,518	IC <sub>54</sub>	0,633
IC <sub>15</sub>	0,453	IC <sub>35</sub>	0,523	IC <sub>55</sub>	0,641
IC <sub>16</sub>	0,455	IC <sub>36</sub>	0,527	IC <sub>56</sub>	0,649
IC <sub>17</sub>	0,457	IC <sub>37</sub>	0,532	IC <sub>57</sub>	0,657
IC <sub>18</sub>	0,460	IC <sub>38</sub>	0,537	IC <sub>58</sub>	0,665
IC <sub>19</sub>	0,463	IC <sub>39</sub>	0,542	IC <sub>59</sub>	0,674
IC <sub>20</sub>	0,466	IC <sub>40</sub>	0,547	IC <sub>60</sub>	0,683

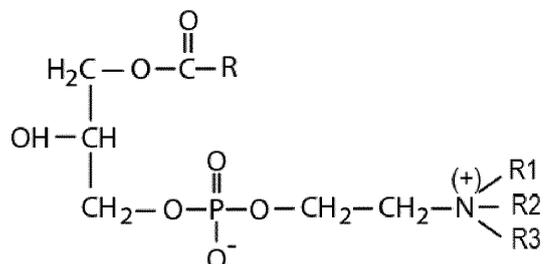
20

Los datos mostrados en la tabla anterior indican sinergia de E-DAPL y Dox. La sinergia de ambos fármacos es más pronunciada a concentraciones inferiores. Los datos anteriormente mencionados indican una potenciación significativa del efecto de un agente anticancerígeno establecido, Dox, cuando se combina con E-DAPL. Por ejemplo, la concentración de Dox a IC<sub>25</sub>Dox e IC<sub>25</sub>E-DAPL/Dox/202:1 para la línea celular 4T1 es de 0,2306 μM y 0,066 μM respectivamente. Esto permite una reducción de la dosis del 71% de Dox cardiotoxica sin disminuir el efecto citotóxico IC<sub>25</sub>. Para IC<sub>50</sub>, el nivel es la reducción de la dosis relativa de 0,9303 μM frente a 0,2287 μM (75%). El cálculo del índice de combinación mediante un método menos preciso para fármacos mutuamente excluyentes proporcionó valores incluso más favorables de CI [ref.: Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors; Ting-Chao Chou, Paul Talalay: *Advances in Enzyme Regulation*, volumen 22, 1984, páginas 27-55].

25

## REIVINDICACIONES

1. Derivados de 1-acil-lisofosfatidilo de fórmula general I,



5 en la que

R es una cadena de hidrocarbilo alifática C4 a C30,

10 R1 se selecciona de H o alquilo C1 a C10,

R2 se selecciona de H, acilo C10 a C30 o alquilo C1 a C10,

15 R3 se selecciona de H o alquilo C1 a C10, o R3 no está presente,

para su uso en un método de tratamiento de cáncer seleccionado de un hepatocarcinoma y un melanoma.

2. Derivados de 1-acil-lisofosfatidilo para su uso según la reivindicación 1, en los que R se selecciona del grupo que consiste en alquenoilo o alquilo C5 a C10 lineal, ramificado o cíclico o que contiene ciclos.

3. Derivados de 1-acil-lisofosfatidilo para su uso según la reivindicación 1, en los que R se selecciona del grupo que consiste en pentilo, 3,5,5-trimetilpentilo, ciclopentiletilo.

4. Derivados de 1-acil-lisofosfatidilo para su uso según la reivindicación 1, en los que R se selecciona del grupo que consiste en alquenoilo o alquilo C13 a C20 lineal o ramificado.

5. Derivados de 1-acil-lisofosfatidilo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en los que R2 se selecciona del grupo que consiste en acilos C10-C20 que contienen cadenas lineales saturadas o insaturadas.

6. Derivados de 1-acil-lisofosfatidilo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en los que R2 se selecciona del grupo que consiste en decanoilo, palmitoilo, estearoilo, oleoilo, linoleoilo, elaidoilo.

7. Derivados de 1-acil-lisofosfatidilo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en los que al menos uno de R1, R2, R3 es metilo, o todos de R1, R2, R3 son metilo.

8. Derivados de 1-acil-lisofosfatidilo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en los que R1 y R2 son hidrógeno y R3 no está presente.

9. Derivados de 1-acil-lisofosfatidilo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en los que R1 es H y R2 es acilo C10-C20 que contiene cadenas lineales saturadas o insaturadas.

10. Derivado de 1-acil-lisofosfatidilo de fórmula general (I) para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que además se administra un fármaco anticancerígeno.

11. Derivado de 1-acil-lisofosfatidilo de fórmula general (I) para su uso según la reivindicación 10, en el que la coadministración del derivado de 1-acil-lisofosfatidilo de fórmula (I) con el fármaco anticancerígeno se realiza en la proporción de al menos 20:1, o al menos 50:1, o al menos 100:1, o al menos 180:1 o al menos 200:1.

12. Derivado de 1-acil-lisofosfatidilo de fórmula general (I) para su uso según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que el fármaco anticancerígeno es doxorubicina.