



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 338 987**

51 Int. Cl.:

**C07F 9/09** (2006.01)

**C07F 9/10** (2006.01)

**C07F 9/11** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01958325 .1**

96 Fecha de presentación : **01.08.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1305322**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2003**

54

Título: **Derivados de moléculas lipofílicas de cadena ramificada y usos de los mismos.**

30

Prioridad: **03.08.2000 IL 137672**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**14.05.2010**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**14.05.2010**

73

Titular/es: **D-Pharm Ltd.**  
**Kiryat Weizmann Science Park**  
**Rehovot 76326 , IL**

72

Inventor/es: **Kozak, Alexander;**  
**Vinnikova, Marina;**  
**Polyak, Michael;**  
**Beit-Yannai, Eliezer y**  
**Reznitsky-Cohen, Dalia**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 338 987 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 moléculas lipofílicas de cadena ramificada y usos de los mismos.

5 La presente invención se refiere a nuevos derivados fosforados de moléculas lipófilas de cadena ramificada, a composiciones farmacéuticas de las mismas y a su uso para aumentar la permeabilidad de barreras biológicas de una forma reversible y selectiva y para inhibir el crecimiento tumoral.

10 Una limitación importante en el uso de muchos fármacos y agentes terapéuticos es su capacidad inadecuada para pasar a través de barreras biológicas. Esto supone un problema grave, en especial para el tratamiento de enfermedades y trastornos en sitios privilegiados como el sistema nervioso central (SNC).

15 La barrera hematoencefálica (BHE), compuesta de células endoteliales microvasculares especializadas conectadas por estrechas uniones, normalmente es responsable de mantener el entorno hemostático del cerebro y protegerlo de agentes tóxicos y productos de degradación presentes en el sistema circulatorio. Sin embargo, en algunas situaciones patológicas, la presencia de la BHE puede interferir con el transporte de sustancias terapéuticas al cerebro, impidiendo así el tratamiento de lesiones del sistema nervioso central, incluyendo tumores, infecciones, abscesos y enfermedades degenerativas.

20 De una forma similar, la presencia de la barrera hematotumoral (BHT) interfiere con el suministro de agentes quimioterapéuticos al tumor, disminuyendo así la biodisponibilidad del fármaco y previniendo el efecto terapéutico eficaz donde se necesita. El problema de acceso insuficiente del agente terapéutico al objetivo enfermo es especialmente grave en el caso de tumores del SNC, y los pacientes que tienen tumores cerebrales malignos tienen un pronóstico malo.

25 Con el fin de alcanzar concentraciones clínicamente útiles de determinados fármacos en sitios restringidos, a menudo se requiere administrar estos compuestos como dosificaciones sistémicas altas. Las concentraciones sistémicas altas, a su vez, están asociadas con efectos secundarios adversos y niveles altos de toxicidad.

30 Una estrategia para atacar el problema implica alterar las características biofísicas de las moléculas de fármaco hidrófilas, por ejemplo, mediante la unión de estos fármacos a un vehículo lipófilo. Puesto que la permeabilidad de los fármacos a través de dichas membranas biológicas depende de su lipofilia, el aumento de la naturaleza lipófila del compuesto debería, teóricamente, mejorar su biodisponibilidad y aumentar los efectos terapéuticos. Dichos conjugados lipídicos polares covalentes con compuestos neurológicamente activos dirigidos se describen en la patente de EE.UU. 5.827.819 de Yatvin *et al.*

35 Otro enfoque para superar la impermeabilidad de la BHE es usando agentes que abran transitoriamente la BHE y faciliten la entrada de un fármaco o agente particular en el cerebro. Se ha mostrado que agentes tales como el manitol ejercen este efecto deseable y se han usado para el suministro de agentes quimioterapéuticos en tumores cerebrales malignos (Hiesinger *et al.* (1986), *Annals of Neurology*, 19:50-59). Sin embargo, el uso de este tipo de alteración hiperosmolar de la BHE en la terapia de tumores cerebrales ha sido controvertido, puesto que además del fármaco que cruza la BHE, también se permite que entren otras moléculas tales como neurotoxinas. Esto puede dar cuenta de la incidencia alta de accidentes cerebrovasculares, ataques epilépticos, reacciones inmunológicas y toxicidad ocular asociada con tratamientos que usan métodos de apertura osmótica.

45 Se han descrito una variedad de tratamientos distintos para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, que incluyen: el uso de agonistas de la bradiquinina (documento WO 91/16355 de Alkermes) y algunos otros péptidos (documento WO 92/18529 de Alkermes); uso de fragmentos de pared celular bacteriana (documento WO 91/16064 de Rockefeller Univ.) o el uso de anticuerpo contra hemaglutinina filamentosa de *Bordetella pertussis* o molécula endotelial x cerebral (WO 92/19269 de Rockefeller Univ.). También se ha publicado que algunos ácidos grasos, como el ácido oleico, abren de forma reversible la BHE (Sztrihai y Betz (1991), *Brain Res.* 336: 257-262).

50 Se ha descrito la utilidad de métodos para el aumento reversible de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica antes de la administración de reactivos de diagnóstico (patente de EE.UU. 5.059.415 de la Oregon Health Sci. U.) o de reactivos terapéuticos (WO 89/11299 de la Oregon Health Sci. U.).

55 Los autores de la presente invención han descrito previamente, en la publicación de solicitud de patente internacional número WO 99/02120, que ácidos grasos ramificados y determinados derivados lipófilos de los mismos, son útiles para la permeabilización reversible de biomembranas. Sin embargo, no se han descrito compuestos que comprenden un resto fosfato. Además, no se ha descrito que mediante la modificación de los ácidos grasos ramificados por adición de un resto fosfato, se puede modular la apertura de barreras biológicas de una forma específica y diferencial.

60 Claramente, las composiciones desarrolladas hasta ahora para permeabilizar membranas y barreras biológicas producen efectos secundarios graves. Por lo tanto, hay una necesidad no satisfecha de proporcionar medios eficaces y seguros para suministrar cantidades adecuadas de agentes terapéuticos y de diagnóstico en sitios restringidos.

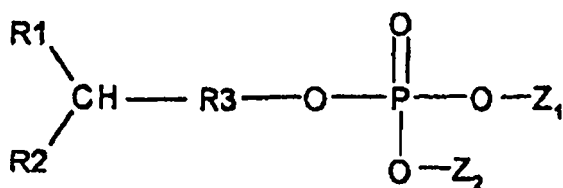
65 Se han propuesto numerosas composiciones para usar en el tratamiento de diferentes cánceres, y están incluidos entre ellos los compuestos que comprenden una cadena hidrocarbonada y un resto de fosfocolina. Las patentes de

## ES 2 338 987 T3

EE.UU. 4.837.023 y 5.049.552, ambas de Eibl, describen composiciones y métodos útiles para tratar el cáncer. El material activo en estos casos es la sustancia conocida hexadecilfosfocolina (HePC). Sin embargo, de acuerdo con la descripción en estas patentes, de todos los compuestos ensayados solo la HePC tiene una acción antitumoral útil en la práctica, mientras que homólogos con radicales alquilo más cortos no tienen o tienen una acción antitumoral demasiado baja y los homólogos con radicales alquilo más largos eran demasiado tóxicos. La técnica anterior no describe ni sugiere ninguno de los compuestos que son el objeto de la presente invención.

El documento DE 3609492 A1 describe un procedimiento para preparar una sal de metal alcalino de un éster fosfónico, haciendo reaccionar una sal de metal monoalcalina de un monoéster fosfónico y un compuesto epoxídico.

La presente invención proporciona, en un aspecto, un compuesto de fórmula general I:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, en la que:

R1 y R2 son cadenas alifáticas saturadas o insaturadas diferentes, que comprenden de 2 a 30 átomos de carbono;

R3 es A-[CH<sub>2</sub>]<sub>m</sub>-B-[CH<sub>2</sub>]<sub>n</sub>-C-[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-D, en el que m, n y p son cada uno independientemente cero o un número entero de 1 a 12, y A, B, C y D se selecciona cada uno independientemente de un enlace covalente, grupo amino, amido, oxígeno, tio, carbonilo, carboxilo, oxicarbonilo, tiocarbonilo, fosfato, aminofosfato, mono, di y triaminofosfato, con la condición de que 2 átomos de oxígeno no estén conectados directamente entre sí, en el que -R3-O- comprende un resto mono o dietilenglicol;

Z<sub>1</sub> y Z<sub>2</sub> son iguales o diferentes, cada uno puede estar ausente o se selecciona independientemente de a) hidrógeno, sodio, litio, potasio, amonio, mono, di, tri y tetraalquilamonio, o b) junto con el grupo fosfo forman un fosfoéster de glicerol, colina, etanolamina, inositol, serina, mono u oligosacárido.

En una realización preferida, el compuesto de fórmula general I es una molécula grasa  $\alpha$ -ramificada en la que R1 y R2 son cadenas hidrocarbonadas que tienen, respectivamente 3 y de 12 a 16 átomos de carbono.

Los compuestos actualmente preferidos de acuerdo con la invención son:

Fosfato de 2-(4-hexadecilcarboxil)etilo (3,12-MEG-PO<sub>4</sub>),

Fosfato de 2-[2-(4-Hexadecilcarboxil)etoxi]etilo (3,12-DEG-PO<sub>4</sub>),

Fosfato de 2-(4-hexadeciloxi)etilo (3,12-(éter)-MEG-PO<sub>4</sub>),

Fosfato de 2-[2-(4-hexadeciloxi)etoxi]etilo (3,12-(éter)-DEG-PO<sub>4</sub>),

2-(4-Hexadecilcarboxil)etilfosfocolina (3,12-MEG-PC),

2-[2-(4-Hexadecilcarboxil)etoxi]etilfosfocolina (3,12-DEG-PC),

Fosfato de 2-{2-[10-(4-hexadeciloxi)deciloxi]etoxi}etilo (3,12-O-C<sub>10</sub>-DEG-PO<sub>4</sub>),

2-{2-[10-(4-Hexadeciloxi)deciloxi]etoxi}etilfosfocolina (3,12-O-C<sub>10</sub>DEG-PC),

Fosfato de 2-(4-octadeciloxi)etilo (3,14-MEG-PO<sub>4</sub>),

Fosfato de 2-[2-(4-octadecilcarboxil)etoxi]etilo (3,14-DEG-PO<sub>4</sub>),

Fosfato de 2-(4-octadeciloxi)etilo (3,14-(éter)-MEG-PO<sub>4</sub>),

Fosfato de 2-[2-(4-octadeciloxi)etoxi]etilo (3,14-(éter)-DEG-PO<sub>4</sub>),

2-(4-Octadecilcarboxil)etilfosfocolina (3,14-MEG-PC),

## ES 2 338 987 T3

2-[2-(4-Octadecilcarboxil)etoxi]etilfosfocolina (3,14-DEG-PG),

Fosfato de 2-(4-icosilcarboxil)etilo (3,16-MEG-PO<sub>4</sub>),

5 Fosfato de 2-[2-(4-icosilcarboxil)etoxi]etilo (3,16-DEG-PO<sub>4</sub>),

Fosfato de 4-icosaniloxi etilo (3,16-(éter)-MEG-PO<sub>4</sub>),

10 Fosfato de 2-[2-(4-icosiloxi)etoxi]etilo (3,16-(éter)-DEG-PO<sub>4</sub>),

2-(4-Icosilcarboxil)etilfosfocolina (3,16-MEG-PC),

2-[2-(4-Icosilcarboxil)etoxi]etilfosfocolina (3,16-DEG-PC),

15 Fosfato de 2-[2-(2-propilicosilcarboxil)etoxi]etilo (3,18-DEG-PO<sub>4</sub>) y

2-[2-(2-Propilicosilcarboxil)etoxi]etilfosfocolina (3,18-DEG-PC).

Actualmente, los compuestos más preferidos son:

20 Fosfato de 2-[2-(4-hexadecilcarboxil)etoxi]etilo, sal monosódica,

Fosfato de 2-[2-(4-hexadecilcarboxil)etoxi]etilo, sal disódica,

25 Fosfato de 2-[2-(4-hexadeciloxi)etoxi]etilo,

2-(4-Hexadecilcarboxil)etilfosfocolina, y

30 2-[2-(4-Hexadecilcarboxil)etoxi]etilfosfocolina.

Los compuestos de la invención son útiles para aumentar la permeabilidad de barreras biológicas. Así pues, en otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de un compuesto de la fórmula general I representada antes, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente biológicamente activo. En una realización preferida, el agente biológicamente activo es un agente terapéutico. El agente terapéutico se puede seleccionar de, pero sin limitación, agentes antitumorales, antivíricos, antimicrobianos, antifúngicos, antiinflamatorios, neuroprotectores y péptidos y proteínas bioactivos.

40 En otra realización preferida, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden además un agente de diagnóstico.

45 Las composiciones farmacéuticas son útiles para facilitar la administración de moléculas biológicamente activas, por ejemplo agentes terapéuticos y de diagnóstico, a tejidos y órganos, en particular sitios privilegiados que están protegidos por barreras biológicas.

50 En una realización particular, las composiciones farmacéuticas son útiles para aumentar el suministro de fármacos a través de la barrera hematorretiniana (BHR), barrera hematoencefálica (BHE) y barrera hematotumoral (BHT). Las composiciones farmacéuticas, de acuerdo con la invención, también pueden ser útiles para aumentar la permeabilidad de otras barreras biológicas, así, por ejemplo, facilitar la absorción a través de la piel, córnea, epitelio conjuntival, nasal, bronquial, bucal, vaginal y gastrointestinal, y a través de la barrera hematotesticular y la interfase hematorrenal.

55 Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por administración oral, parenteral o tópica o por perfusión regional, enema o lavado intra-órgano. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas de la invención se administran por vía intraarterial o intratecal.

60 En otro aspecto más, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula I para la fabricación de un medicamento para aumentar la permeabilidad de barreras biológicas. Preferiblemente, el medicamento comprende exponer dichas barreras a una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula general I, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, permitiendo o aumentando así la permeabilidad de la barrera biológica.

65 En otro aspecto más, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula I para fabricar un medicamento para la administración de un agente biológicamente activo en un sitio u órgano privilegiado, en el que la administración comprende exponer dicho sitio u órgano a dicho agente biológicamente activo, en presencia de una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la invención, permitiendo o aumentando así la penetración y/o acumulación del agente biológicamente activo en el sitio u órgano privilegiado. El sitio u órgano privilegiado se puede seleccionar, pero sin limitación, de la médula espinal, cerebro, ojo, testículos, glándulas y tumores.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula I para fabricar un medicamento para el tratamiento de un tumor, en el que el tratamiento comprende administrar a un paciente que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende como principio activo un compuesto de la fórmula general I de acuerdo con la invención. Dicho tumor se puede seleccionar, pero sin limitación, de carcinoma (p. ej., carcinomas de mama, colon, rectal y vejiga), glioma (p. ej., astrocitoma), neuroblastoma, retinoblastoma, tumor maligno intraocular, linfoma, leucemia, sarcoma y melanoma. El tumor puede ser un tumor primario o secundario.

La invención proporciona además el uso de un compuesto de fórmula I para fabricar un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno del sistema nervioso central, en el que el tratamiento comprende administrar a un paciente que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula general I, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, en combinación con un agente terapéutico. El agente terapéutico puede estar incluido en la misma composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula general I, o en una composición separada.

En una realización preferida, la enfermedad tratada en el sistema nervioso central es un tumor cerebral y el agente terapéutico es un fármaco anticancerígeno. En otra realización preferida, la enfermedad tratada es una enfermedad o trastorno oftalmológico, por ejemplo, edema macular cistoide (EMC), degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), infecciones intraoculares, inflamaciones intraoculares y tumores malignos intraoculares.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula I para fabricar un medicamento para aumentar la acumulación de un agente de diagnóstico en un órgano protegido por una barrera biológica, administrando a un individuo dicho agente de diagnóstico en combinación con una cantidad eficaz de un compuesto de la fórmula general I como se ha definido antes, aumentando así la acumulación del agente de diagnóstico en el órgano protegido por una barrera biológica. El agente de diagnóstico puede estar incluido en la misma composición que comprende el compuesto de fórmula general I, o en una composición separada.

En una realización preferida, dicho órgano protegido por una barrera biológica es el sistema nervioso central.

La figura 1 representa una gráfica que correlaciona diferentes longitudes de cadena de ácidos grasos  $\alpha$ -ramificados del tipo 3,n, con la potencia de estos compuestos en la extravasación del complejo de albúmina-azul de Evans en cerebro de rata.

Las figuras 2A-C representan la acumulación de azul de Evans en secciones de cerebro de ratas que llevan gliomas bilaterales después de administración unilateral de un compuesto como sigue: 3,12-DEG- $\text{HPO}_4\text{Na}$  10  $\mu\text{M}$  (Fig. 2A), 3,12-Na 40  $\mu\text{M}$  (Fig. 2B) o manitol al 25% (Fig. 2C).

Las figuras 3A-C representan la angiografía con sal sódica de fluoresceína (F-Na) de la parte posterior de un ojo de rata registrado a los 30 segundos y 10 minutos después de la administración de F-Na solo (Fig. 3A) o en combinación con 3,12-DEG-  $\text{HPO}_4\text{Na}$  (Fig. 3B) o vehículo (Fig. 3C).

Las figuras 4A-B representan la acumulación de F-Na en la parte anterior del ojo, registrado 10 minutos después de la administración de F-Na acompañada de 3,12-DEG- $\text{HPO}_4\text{Na}$  (Fig. 4A) o vehículo (Fig. 4B), siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 26.

La presente invención se refiere a compuestos y composiciones para aumentar la permeabilidad de barreras biológicas y para inhibir el crecimiento tumoral.

Un agente deseable para facilitar el suministro de agentes terapéuticos o de diagnóstico en sitios restringidos (p. ej., el cerebro, ojo, testículos, etc.) es uno que sea capaz de permeabilizar la barrera biológica limitante. Sin embargo, la permeabilización preferida debe llevarse a cabo de una forma diferente sin producir un grado inaceptable de efectos secundarios. Por ejemplo, en el caso de tratar un tumor cerebral, sería ventajoso usar un agente que permeabilice la BHT en mucha mayor medida que la BHE en el tejido cerebral vecino intacto. En este caso, la permeabilización específica, permite la acumulación preferencial de fármacos tóxicos en el tejido patológico produciendo daño mínimo o no produciendo daño en el tejido cerebral sano que lo rodea. Se aplican consideraciones similares para otras barreras biológicas. Por ejemplo, es conveniente tener un agente que sea capaz de aumentar el suministro de fármacos u otras moléculas beneficiosas a través de la piel y las barreras intestinales de una forma transitoria y específica.

La presente invención se refiere a nuevos compuestos y se basa en el descubrimiento inesperado de que estos compuestos pueden aumentar la permeabilidad de las barreras biológicas en una forma reversible y selectiva. De acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, los nuevos compuestos tienen la fórmula general I como se ha definido en lo que antecede o sus sales farmacéuticamente aceptables.

En la memoria descriptiva, los compuestos de fórmula general I se denominarán de forma colectiva "DP-BFA" o de forma intercambiable por el nombre más general derivados fosforados de moléculas lipófilas de cadena ramificada, y abreviado "P-BFA". Las moléculas lipófilas de cadena ramificada que no llevan un resto fosfato se denominarán "BFA" o "carbo-BFA".

## ES 2 338 987 T3

En una realización preferida, los P-BFA son derivados fosforados de moléculas lipófilas  $\alpha$ -ramificadas de la estructura general R1(R2)-CH-. En otras realizaciones de acuerdo con la presente invención, los P-BFA son derivados fosforados de moléculas lipófilas ramificadas de estructura general R1(R2)-CH-[CH<sub>2</sub>]<sub>m</sub> en el que m es de 1 a 12, denominándose así moléculas lipófilas  $\omega$ -ramificadas, por ejemplo, en la posición  $\beta$  (m=1),  $\gamma$  (m=2) etc.

Los DP-BFA específicos en lo sucesivo se denominarán con sus R1 y R2 particulares que representan, respectivamente, el número de átomos de carbono en la cadena lateral y principal de la molécula lipófila de cadena ramificada.

Los compuestos de la fórmula general I, en la que -R3-O- comprende un resto monoetilenglicol o dietilenglicol se denominarán R1,R2-MEG-PO<sub>4</sub> y R1,R2-DEG-PO<sub>4</sub>, respectivamente. En algunos casos, el enlace que une el resto de cadena ramificada y el grupo químico adyacente se indica específicamente como, por ejemplo, en 3,12-O-C<sub>10</sub>-DEG-PO<sub>4</sub>, 3,12-(éter)-DEG-PO<sub>4</sub> etc. Los compuestos de fórmula general I en la que Z<sub>1</sub> es colina se denominarán R1, R2-PC.

De acuerdo con la enseñanza de la presente invención, variando los distintos componentes en la estructura de los compuestos de fórmula general I, se puede lograr un ajuste fino en la estabilidad de las moléculas y su efecto de permeabilización en barreras biológicas. Por ejemplo, la variación del número de átomos de carbono en los grupos alquilo R1 y R2, y el nivel de saturación afectan a la hidrofobicidad general de la molécula, permitiendo así la optimización de su capacidad para cruzar membranas biológicas específicas.

Los compuestos actualmente preferidos de acuerdo con la invención, son moléculas DP-BFA en las que la longitud de la cadena de carbonos en R1 es de 2 a 14, y el número total de átomos de carbono en R1 y R3 juntos es de 6 a 26. Los compuestos actualmente más preferidos son los compuestos de cadena  $\alpha$ -ramificada en los que R1 tiene 3 átomos de carbono y R2 tiene de 12 a 16 átomos de carbono. Los compuestos preferidos de la fórmula general I comprenden una cadena alifática que tiene hasta 20 átomos de carbono de longitud contado desde el grupo fosfato hasta el punto de ramificación de la molécula lipófila ramificada. Este número de átomos de carbono calculado en el resto R3 de la fórmula general I como se ha definido antes, es el más adecuado para la alteración eficaz de la membrana por la molécula de DP-BFA y por lo tanto para provocar el efecto de permeabilización deseable. Debe indicarse que la cadena alifática mencionada antes, puede ser una cadena hidrocarbonada continua, o puede estar interrumpida por uno o más heteroátomos seleccionados del grupo de átomos de oxígeno, azufre, nitrógeno y fósforo, incluido en la definición de R3.

En una realización preferida de acuerdo con la invención, el R3 de la molécula de fórmula general I incluye un grupo carbonilo que une el resto de cadena ramificada y al menos un resto de glicol por un enlace éster. En otra realización preferida, R3 incluye un enlace covalente que une el resto de cadena ramificada y al menos un resto glicol por un enlace éter. En condiciones fisiológicas, en general los enlaces éter son menos susceptibles de escisión enzimática, y por lo tanto se espera que sean más estables que otros enlaces éster.

Otro factor que puede afectar a la capacidad de los compuestos DP-BFA para permeabilizar diferentes barreras biológicas es la polaridad de diferentes grupos químicos en la molécula. Esto también puede contribuir al ajuste fino del diferente efecto de permeabilización.

Los compuestos preferidos de la invención están en forma de sales, siendo compuestos mono o disales de la fórmula general I. Las sales adecuadas pueden incluir cualquier sal farmacéuticamente aceptable que comprende un contraión monovalente o divalente que se puede seleccionar de, pero sin limitar, Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, mono, di, tri y tetra-alquilamonio. Los compuestos más preferidos comprenden una sal monovalente. Son particularmente preferidas las moléculas DP-BFA en la forma de sal de sodio, siendo sales de monosodio o disodio.

Los compuestos de la invención se pueden preparar por métodos sintéticos químicos conocidos en la técnica. Algunos de estos métodos se ilustran en lo sucesivo en los ejemplos. También se pueden aplicar procedimientos alternativos conocidos para los expertos en la técnica.

Se encontró que los compuestos de la invención eran útiles para alterar las estrechas uniones celulares *in vitro* y aumentar la permeabilización de las barreras *in vivo*. Además, la presente invención se basa en el descubrimiento inesperado, de que determinados derivados de fósforo de moléculas lipófilas de cadena ramificada, tienen efectos diferenciales en la apertura de las barreras BHE y BHT. Por consiguiente, los diferentes compuestos P-BFA de la invención pueden ser útiles para ejercer la permeabilización de barreras biológicas produciendo una toxicidad y efectos secundarios mínimos.

Algunos compuestos de DP-BFA son selectivos en términos de que son capaces de permeabilizar de forma diferencial las barreras biológicas para moléculas de diferentes tamaños. Esta característica se puede atribuir a niveles de seguridad más altos de los agentes fosfo-BFA. Algunos DP-BFA difieren en la duración de su efecto, lo cual puede demostrar ser otro factor beneficioso en determinadas circunstancias terapéuticas en las que es deseable la permeabilización selectiva transitoria de una barrera limitante.

Los compuestos de la invención y las composiciones farmacéuticas que los comprenden pueden permitir o facilitar el suministro de agentes biológicamente activos a través de barreras biológicas.

## ES 2 338 987 T3

La expresión “agentes biológicamente activos” se pretende que abarque todos los compuestos naturales y sintéticos capaces de provocar una respuesta biológica, que tienen un efecto en los sistemas biológicos o que sirven como herramienta indicativa. Los agentes biológicamente activos pueden ser agentes terapéuticos o de diagnóstico.

5 Los agentes terapéuticos pueden incluir, pero sin limitar, agentes antineoplásicos, antiproliferativos, antiinflamatorios, neurológicos, antibacterianos, antimicóticos y antivíricos. Estos compuestos en combinación con los compuestos de la invención son particularmente útiles en el tratamiento de afecciones patológicas, enfermedades y trastornos en sitios restringidos. Por ejemplo, en el tratamiento del sistema nervioso central y lesiones que incluyen tumores, infecciones, abscesos y trastornos degenerativos.

10 Los agentes de diagnóstico pueden incluir, pero sin limitar, agentes de marcaje, agentes de contraste y colorantes. Los ejemplos de agentes de diagnóstico incluyen sustancias con marcadores radiactivos (p. ej., agentes basados en tecnecio-99m y fluoruro-18) y agentes de contraste tales como compuestos basados en gadolinio. Los compuestos de la invención pueden ser útiles, por ejemplo, en métodos para el diagnóstico y caracterización de lesiones cerebrales.  
15 En este caso, un compuesto de la invención usado para aumentar la permeabilidad de la BHE, se puede introducir conjuntamente (en la misma composición o separada) con un agente químico que está marcado de forma que se puede seguir.

20 El agente químico que se va a seguir puede ser, por ejemplo, un indicador general para las células o estructuras cerebrales, o uno que se une o acumula específica y exclusivamente en determinadas regiones del cerebro o lesiones cerebrales. Después, se puede analizar el cerebro para determinar la presencia del agente de marcaje. El análisis se puede realizar usando medios de barrido y formación de imágenes conocidos en la materia (p. ej., técnicas de imágenes por resonancia magnética (MRI), tomografía de emisión de positrones (PET) y tomografía computerizada (CT)).

25 En otras realizaciones de la invención, los compuestos DP-BFA pueden ser útiles para potenciar la absorción de fármacos en los intestinos o a través de la piel. Las barreras biológicas en los intestinos y la piel evitan la difusión pasiva de una serie de sustancias a través del epitelio gastrointestinal o la piel, previniendo así la absorción eficaz de determinados productos químicos, nutrientes y fármacos útiles. Este obstáculo se puede superar aplicando los  
30 productos químicos, nutrientes y fármacos útiles en combinación con un compuesto DP-BFA.

35 Será fácilmente evidente para los expertos en la técnica que son adecuados una amplia variedad de compuestos biológicamente activos para usar en combinación con las moléculas lipófilas ramificadas de fórmula general I, y por lo tanto son útiles en composiciones farmacéuticas o tratamiento o diagnóstico.

40 Para el compuesto P-BFA de acuerdo con la invención que se va a administrar en combinación con el agente biológicamente activo deseable, debe aclararse que el agente biológicamente activo deseable puede estar incluido en la misma composición farmacéutica del compuesto de fórmula general I, o se puede administrar en una composición separada. Preferiblemente, tanto los agentes activos, es decir el compuesto de fórmula general I, como el o los agentes biológicamente activos deseables, se administran simultáneamente o en un periodo de tiempo corto entre uno y otro. El o los agentes biológicamente activos se pueden administrar antes o después de la administración del compuesto de P-BFA, con la condición de que sea en una ventana de tiempo de modo que el efecto del p-BFA en la barrera biológica sea suficiente para facilitar el paso de los agente pertinentes al sitio restringido.

45 También es posible que el agente biológicamente deseable no se administre entorno al mismo tiempo de la administración de P-BFA, sino que ya esté presente en la sangre (siendo generado de forma natural en el cuerpo o producido como un fármaco de liberación lenta). Algunos ejemplos incluyen péptidos y proteínas bioactivos tales como neurotransmisores, factores de crecimiento, hormonas, antibióticos etc. En este caso el requisito es que ocurre el efecto de permeabilización de la barrera diana mientras esté presente suficiente cantidad del agente biológicamente activo  
50 deseable para ejercer su efecto biológico.

55 La actividad mejorada de los compuestos de la invención en la permeabilización de barreras biológicas da como resultado una mayor biodisponibilidad de los fármacos administrados, extendiendo así la utilidad terapéutica de estos fármacos a afecciones que no responden a dosis de los fármacos más bajas. Esto es especialmente relevante en el tratamiento de enfermedades y trastornos en sitios restringidos, p. ej., el cerebro y el ojo.

60 Además, los compuestos de la invención son ventajosos en cuanto que permiten la disminución de la dosificación útil de fármacos y por consiguiente la reducción de efectos secundarios sistémicos indeseables. Además, puesto que las moléculas de la invención permiten la permeabilización selectiva de barreras, pueden aumentar de forma preferencial la absorción de fármaco en un sitio específico (p. ej., tumor) y no en las células y tejidos vecinos.

65 Al examinar el efecto de permeabilización de los P-BFA *in vivo* en ratas portadoras de tumores, se encontró sorprendentemente que algunos de los compuestos ensayados presentaban efectos citotóxicos notables en el tumor, demostrado por su capacidad para inhibir significativamente el crecimiento del tumor tratado. Por lo tanto, se ha establecido que determinados compuestos de la invención pueden ser útiles como agentes anticancerígenos. Además, algunos de los compuestos de la invención han demostrado una actividad citotóxica diferencial cuando se ensaya su efecto en diferentes células normales y tumorales *in vitro*.

De acuerdo con los principios de la presente invención, las diferentes moléculas de DP-BFA se pueden diseñar específicamente para que sean adecuadas para sitios diana específicos e indicaciones específicas. Por ejemplo, se ha encontrado que las moléculas de la invención actúan de una forma diferencial en la apertura de las barreras BHE y BHT. En este caso la permeabilización de la BHT por determinados DP-BFA es mucho mayor comparado con el efecto en la BHE. Otras características ventajosas del efecto de algunas moléculas de DP-BFA, es el mantenimiento de algunos niveles de discriminación de los compuestos permitidos para cruzar. Por lo tanto, los DP-BFA afectan a la permeabilización de las barreras de una forma más selectiva comparado con los carbo-BFA o agentes hiperosmóticos, tales como el manitol. Como resultado, se espera que los compuestos P-BFA produzcan menos efectos secundarios tóxicos en comparación con otros agentes de permeabilización conocidos en la técnica. Además, puesto que se encontró que el efecto de permeabilización era reversible, los compuestos de la invención también pueden ser útiles para la administración crónica de fármacos.

Como se menciona en la memoria descriptiva y reivindicaciones, una “cantidad eficaz” de P-BFA se refiere a la cantidad de un compuesto de la invención que ejerce el efecto beneficioso deseado de acuerdo con la invención. De acuerdo con un aspecto de la invención, es la cantidad de P-BFA que aumenta significativamente la permeabilidad de una barrera relevante a una molécula de interés. En particular, es la cantidad de P-BFA que aumenta la permeabilidad de la barrera pertinente para permitir que crucen suficientes cantidades de una molécula de interés a través de la barrera biológica para ejercer así su efecto terapéutico o profiláctico o permitir procedimientos de diagnóstico. De acuerdo con otro aspecto de la invención, es la cantidad de P-BFA que es terapéuticamente eficaz como agente anticancerígeno. En concreto, es la cantidad de P-BFA que inhibe el crecimiento celular incontrolado.

La cantidad eficaz se determinará individualmente y se basará, al menos en parte, en consideraciones del tamaño del individuo, la enfermedad específica, la gravedad de los síntomas que se van a tratar, etc. Por lo tanto, el experto en la técnica podrá valorar fácilmente la cantidad eficaz usando dichos factores y usando solo la experimentación rutinaria.

El intervalo de la dosis y el régimen usado dependerán de la vía de administración, la edad, sexo, salud y peso del receptor y de la potencia del DP-BFA particular y el fármaco o agente útil pertinente administrado. El experto en la técnica podrá ajustar las composiciones de DP-BFA y la dosificación con el fin de obtener la duración y el grado de acción deseados.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de dosificación líquida, aerosol o sólida, y se pueden formular en cualquier formulación adecuada incluyendo, pero sin limitar, disoluciones, suspensiones, micelas, emulsiones, microemulsiones, aerosoles, pomadas, geles, supositorios, cápsulas, comprimidos y similares, según sea necesario para la vía de administración adecuada.

La invención abarca cualquier vía de administración adecuada incluyendo, pero sin limitar, las vías oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, inhalación, intranasal, tópica, rectal u otras vías conocidas. En realizaciones preferidas para el efecto de permeabilización en el SNC, la composición farmacéutica de la invención se administra por vía intraarterial o intratecal. Para usar como una medicación anticancerígena, la composición farmacéutica pertinente de la invención se administra preferiblemente por vía oral o intravenosa o se aplica por vía tópica o por perfusión regional, enema o lavado intraórgano.

La invención ahora se ilustrará mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

## Ejemplos

### I. Ejemplos químicos

Para mayor claridad, se ilustran a continuación procedimientos para la síntesis de moléculas de P-BFA particulares y sus sales. Sin embargo, debe entenderse que también se pueden aplicar procedimientos similares para la síntesis de otras moléculas de P-BFA de la invención incluyendo, pero sin limitar, moléculas de cadena ramificada saturadas e insaturadas y compuestos en los que R1 y/o R2 son cadenas alifáticas que comprenden un grupo o grupos alquilo cíclicos. También se pueden obtener diferentes sales farmacéuticamente aceptables de las moléculas de P-BFA incluyendo, pero sin limitar, sales de sodio, potasio, amonio y alquilamonio y sales con contraiones divalentes.

#### Ejemplo 1

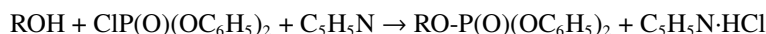
##### *Síntesis de fosfatos de alquilo (referencia)*

Se prepararon fosfatos de fórmula general RO-P(O)(OH)<sub>2</sub>. R representa un resto alquilo de cadena ramificada de estructura R<sub>1</sub>(R<sub>2</sub>)-CH en la que R<sub>1</sub> indica el número de carbonos en la cadena de alquilo lateral y R<sub>2</sub> indica el número de carbonos en la cadena de alquilo principal.

La síntesis de las moléculas de RO-P(O)(OH)<sub>2</sub> es un procedimiento en 3 etapas. En la primera etapa, se preparó el correspondiente alcohol (R-OH) a partir de aldehído y bromuro de alquilo usando la reacción de Grignard (Vogel, “Textbook of practical organic chemistry”, Wiley, New York, pg. 531, (1996)).

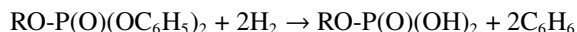
## ES 2 338 987 T3

En la segunda etapa se preparó el éster fosfato de difenilo a partir del alcohol y fosforocloridato de difenilo:



5

En la tercera etapa se obtuvo el dihidrogenofosfato de alcanilo por hidrogenación del éster de difenilo.



### 10 Fosfato de difenilo y 4-hexadecanilo

Se añadió lentamente fosforocloridato de difenilo (4,0 g, 0,015 mole) con agitación a una disolución de hexadecan-4-ol (2,4 g, 0,01 mol) en piridina seca (5 ml) a temperatura ambiente. El matraz se tapó y se dejó durante 48 h, después el contenido se vertió en ácido clorhídrico 1 N enfriado con hielo (100 ml). El aceite pesado que se separó se extrajo con éter dietílico. La capa de éter se lavó con ácido clorhídrico 1 N (3 veces), hidrogenocarbonato de sodio al 5% (5 veces), y agua (5 veces). Después de secado ( $\text{MgSO}_4$ ), se separó el éter, y el residuo se purificó por cromatografía en columna (éter de petróleo (p. e. 30-60°C): éter dietílico, 10:1). Después de evaporar el disolvente, se obtuvieron 3,5 g de líquido. Rendimiento 74%.

20

### Fosfato de 4-hexadecanilo (3,12- $\text{PO}_4$ )

Una suspensión de óxido de platino (catalizador de Adams) (0,32 g) en ácido acético glacial (20 ml) se agitó en atmósfera de hidrógeno hasta que cesó la absorción. Después se lavó bien el catalizador de Adams con ácido clorhídrico 2 N, agua y finalmente ácido acético glacial, por decantación. La disolución de fosfato de difenilo y 4-hexadecanilo (3,2 g) en ácido acético glacial (40 ml) se añadió al catalizador y la disolución se agitó en hidrógeno hasta que cesó la absorción. El catalizador se filtró y se lavó con cloroformo. Los disolventes separaron del filtrado a vacío. El residuo se cristalizó en éter de petróleo (p. e. 30-60°C) y se secó a 65°C. Se obtuvieron 2,01 g del producto final. Rendimiento 92%.

30

### Fosfato de 4-hexadecanilo y disodio. (3,12- $\text{PO}_4\text{Na}_2$ )

Se disolvió fosfato de 4-hexadecanilo (1 g, 0,0031 mol) en etanol (100 ml). Se añadió NaOH (0,25 g, 0,0062 mol) y la mezcla se agitó durante 1 h y después se evaporó. Se añadió etanol (2 x 100 ml) y se evaporó. Se añadió éter dietílico (100 ml) y se evaporó. El residuo se cristalizó en acetona (30 ml) y se secó 65°C (15 mm de Hg). Se obtuvieron 0,9 g del producto final. Rendimiento 79%.

40

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  0,89 (m, 6H), 1,27 (s, 22H), 1,58 (m, 4H), 4,22 (m, 1H). EM (FAB): m/z 367,06 (M + H) $^+$ .

### Fosfato de 4-hexadecanilo y monosodio. (3,12- $\text{HPO}_4\text{Na}$ )

Se disolvió fosfato de 4-hexadecanilo (3,13 g, 0,0097 mol) en etanol (150 ml). Se añadió NaOH (0,37 g, 0,0092 mol) y la mezcla se agitó durante 48 h y después se evaporó. Se añadió etanol (2 x 150 ml) y se evaporó. Se añadió éter dietílico (2 x 100 ml) y se evaporó. El sólido obtenido se trituró con acetona (100 ml) y se secó a 1 mm de Hg durante la noche. Se obtuvieron 2,98 g del producto final. Rendimiento 87%.

50

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  0,87 (m, 6H), 1,25 (s, 22H), 1,51 (m, 4H), 4,12 (m, 1H). EM (FAB): m/z 345,11 (M + H) $^+$ .

### Fosfato de 4-octadecanilo y disodio. (3,14- $\text{PO}_4\text{Na}_2$ )

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  0,89 (m, 6H), 1,27 (s, 26H), 1,58 (m, 4H), 4,17 (m, 1H). EM (FAB): m/z 395,20 (M + H) $^+$ .

55

### Fosfato de 4-octadecanilo y monosodio. (3,14- $\text{HPO}_4\text{Na}$ )

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  0,90 (m, 6H), 1,28 (s, 26H), 1,56 (m, 4H), 4,14 (m, 1H). EM (FAB): m/z 373,29 (M + H) $^+$ .

60

### Fosfato de 8-pentadecanilo y disodio. (7,7- $\text{PO}_4\text{Na}_2$ )

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  0,90 (m, 6H), 1,30 (s, 20H), 1,60 (m, 4H), 4,12 (m, 1H). EM (FAB): m/z 352,93 (M + H) $^+$ .

65

### Fosfato de 8-oentadecanilo y monosodio. (7,7- $\text{HPO}_4\text{Na}$ )

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  0,90 (m, 6H), 1,30 (s, 20H), 1,60 (m, 4H), 4,12 (m, 1H). EM (FAB): m/z 353,05 (M + Na) $^+$ .

## ES 2 338 987 T3

### Ejemplo 2

#### *Síntesis de fosfato de 2-(2'-propiltetradecanoiloxi)etilo*

5 Este compuesto se preparó por los mismos procedimientos descritos antes en el Ejemplo 1 usando el alcohol:  $C_3H_7-C(C_{12}H_{25})H-C(O)-O-CH_2-CH_2-O-$ . Este alcohol se obtuvo a partir del cloruro de anhídrido del ácido 2-propil-pentanoico y etilenglicol (Vogel's, "Textbook of practical organic chemistry", Wiley, New York, pág. 698, (1996)).

10 *Fosfato de 2-(2'-propiltetradecanoiloxi)etilo y disodio (3,12-MEG- $PO_4Na_2$ )*

RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  0,87 (m, 6H), 1,24 (s, 22H), 1,54 (m, 4H), 2,33 (m, 1H), 3,87 (m, 2H), 4,26 (m, 2H). EM (FAB): m/z 439,19 (M + H) $^+$ .

15 *Fosfato de 2-(2'-propiltetradecanoiloxi)etilo y monosodio (3,12-MEG- $HPO_4Na$ )*

RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  0,87 (t, 6H), 1,24 (s, 20H), 1,42 (m, 2H), 1,56 (m, 2H), 2,34 (m, 1H), 4,02 (m, 2H), 4,28 (m, 2H). EM (FAB): m/z 417,19 (M + H) $^+$ .

20

### Ejemplo 3

#### *Síntesis de fosfato de 2-[2'-(2"-propiltetradecanoiloxi)-etoxi]etilo*

25

Este compuesto se preparó por los mismos procedimientos descritos antes en el Ejemplo 1 usando el alcohol:  $C_3H_7-C(C_{12}H_{25})H-C(O)-O-CH_2CH_2O-CH_2-CH_2-O-$ . Este alcohol se obtuvo a partir del cloruro de anhídrido del ácido 2-propil-pentanoico y dietilenglicol (Vogel's, "Textbook of practical organic chemistry", Wiley, New York, pág. 698, (1996)).

30

*Fosfato de 2-[2'-(2"-propiltetradecanoiloxi)-etoxi]etilo y disodio (3,12-DEG- $PO_4Na_2$ )*

35 RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ ):  $\delta$  0,90 (m, 6H), 1,30 (s, 20H), 1,44 (m, 2H), 1,59 (m, 2H), 2,39 (m, 1H), 3,72 (m, 4H), 4,09 (m, 2H), 4,24 (m, 2H). EM (FAB): m/z 483,03 (M + H) $^+$ .

*Fosfato de 2-[2'-(2"-propiltetradecanoiloxi)-etoxi]etilo y monosodio (3,12-DEG- $HPO_4Na$ )*

40 RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ ):  $\delta$  0,90 (m, 6H), 1,30 (s, 20H), 1,44 (m, 2H), 1,59 (m, 2H), 2,39 (m, 1H), 3,72 (m, 4H), 4,09 (m, 2H), 4,24 (m, 2H). EM (FAB): m/z 461,31 (M + H) $^+$ .

Se prepararon compuestos adicionales de una forma análoga. Por ejemplo, el compuesto fosfato de 2-[2'-(2"-propilicosanoiloxi)-etoxi]etilo se preparó usando el alcohol:  $C_3H_7-C(C_{18}H_{37})H-C(O)-O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-O-$ . Este alcohol se obtuvo a partir del cloruro de anhídrido del ácido 2-propilicosanoico y dietilenglicol.

45

*Fosfato de 2-[2'-(2"-propilicosanoiloxi)-etoxi]etilo y monosodio (3,18-DEG- $HPO_4Na$ )*

50 RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ ):  $\delta$  0,90 (m, 6H), 1,30 (s, 34H), 1,44 (m, 2H), 1,59 (m, 2H), 2,39 (m, 1H), 3,72 (m, 4H), 4,09 (m, 2H), 4,24 (m, 2H). EM (FAB): m/z 544,31 (M + H) $^+$ .

### Ejemplo 4

55

#### *Síntesis de la sal monosódica del fosfato de 2-{2'-[10"-(hexadecil-4-oxi)decil-1-oxi]etoxi]etilo (3,12-O- $C_{10}$ -DEG- $HPO_4Na$ )*

60 Este compuesto se preparó por los mismos procedimientos descritos antes en el Ejemplo 1 usando el alcohol:  $C_3H_7-C(C_{12}H_{25})H-O-(CH_2)_{10}-O-CH_2CH_2O-CH_2-CH_2-OH-$ . Este alcohol se obtuvo por un procedimiento en 2 etapas: primero, haciendo reaccionar el tosilato de 4-hexadecanol (Vogel's, "Textbook of practical organic chemistry", Wiley, New York, pág. 698, (1996)) con 1,10-decanodiol monosódico para generar el 10-(hexadecil-4-oxi)decanol. En una segunda etapa el alcohol 2'-[10"-(hexadecil-4-oxi)decil-etiloxietanol se preparó haciendo reaccionar el tosilato de 10-(hexadecil-4-oxi)decanol (generado como en la etapa 1) con 2-(2-hidroxietiloxi)etilato de sodio.

65

RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ ):  $\delta$  0,90 (m, 6H), 1,30 (s, 38H), 1,44 (m, 2H), 1,59 (m, 2H), 3,15 (m, 1H), 3,37 (m, 4H), 3,45-3,62 (6H), 3,95 (m, 2H). EM (FAB): m/z 565,45 (M + H) $^+$ .

## ES 2 338 987 T3

### Ejemplo 5

#### *Síntesis de fosfato de 2-(4-hexadecanoxi)etoxietilo*

5 Este compuesto se preparó por los mismos procedimientos descritos antes en el Ejemplo 1 usando el alcohol:  $C_3H_7-C(C_{12}H_{25})H-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-$ . Este alcohol se obtuvo a partir del 2-(2-hidroxietiloxi)etilato de sodio y tosilato de 4-hexadecanol. (Vogel's, "Textbook of practical organic chemistry", Wiley, New York, pág. 698, (1996)).

#### 10 *Cloruro de 4-hexadecanosulfonilo*

Se disolvieron 4-hexadecanol (12,29 g 0,051 mol) y cloruro de p-toluenosulfonilo (12 g 0,063 mol) en piridina (100 ml) y se agitaron durante la noche a temperatura ambiente. Se añadió diclorometano (400 ml). Después, la disolución de diclorometano se lavó bien con agua,  $H_2SO_4$  (3%), agua,  $NaHCO_3$  (3%) y agua, y se secó con sulfato magnésico anhidro (10 g). Después de evaporar el disolvente, se obtuvieron 20 g de cloruro de 4-hexadecanosulfonilo bruto.

#### *Cloruro de 2-(4-hexadecanoxi)etoxietanosulfonilo*

20 Se añadió sodio (3,5 g 0,15 mol) en trozos pequeños a dietilenglicol (140 ml, 1,5 mol) a 60°C. A la disolución obtenida se añadió tosilato de 4-hexadecanol (bruto 20 g) en THF (300 ml) a la misma temperatura. La disolución se agitó a reflujo durante 6 h. Se añadió agua (100 ml) a la mezcla a temperatura ambiente. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (300 ml). Después de evaporar el disolvente, el residuo se purificó por cromatografía en columna (éter de petróleo (p.e. 30-60°C): éter dietílico, 1:1). Se obtuvieron 4 g de cloruro de 2-(4-hexadecanoil)etoxietilo.  
25 Rendimiento 24% partiendo del 4-hexadecanol.

#### *Fosfato de 2-(4-hexadecanoxi)etoxietilo y disodio (3,12-éter-DEG- $PO_4Na_2$ )*

30 RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ ):  $\delta$  0,9 (m, 6H), 1,28 (s, 22H), 1,43 (m, 4H), 3,30 (m, 1H), 3,60 (m, 4H), 3,69 (m, 2H), 4,07 (m, 2H). EM (FAB): m/z 455,45(M + H) $^+$ .

### Ejemplo 6

#### 35 *Síntesis de 2-(2'-propiltetradecanoiloxi)etoxietilfosfocolina*

La fosfocolina de fórmula  $C_3H_7-C(C_{12}H_{25})H-C(O)-O-CH_2CH_2O-CH_2-CH_2-PO^-(O)-O-CH_2CH_2N^+(CH_3)_3$  se preparó como sigue:

40

#### *2-(2'-Propiltetradecanoiloxi)etoxietilfosfocolina (3,12-DEG-PC)*

45 A una disolución enfriada (0°C) de 2-(2'-propiltetradecanoiloxi)etoxietanol (15,8 g, 0,044 mol) y trietilamina (10 ml, 0,075 mol) en éter dietílico seco (250 ml) se añadió 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano (7 ml, 0,075 mol) en 200 ml de éter dietílico seco. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El  $(C_2H_5)_3N.HCl$  cristalino que precipitó se filtró, y el disolvente se separó a vacío. El residuo se disolvió en 500 ml de disolución de trimetilamina (0,27 M) en acetonitrilo anhidro y se transfirió a una botella de presión. La botella de presión se mantuvo durante 48 h en un baño de aceite a 60-65°C. Después la botella se enfrió y se abrió. El disolvente se separó y el residuo se purificó  
50 por cromatografía en columna ( $CHCl_3$ :  $CH_3OH$ :  $H_2O$ , 1:9:1). El aceite obtenido tras evaporación del disolvente se liofilizó durante 72 h a 65°C. Se obtuvieron 17,4 g de cera ligeramente amarilla. Rendimiento 75%.

RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ ):  $\delta$  0,9 (t, 6H), 1,29 (s, 22H), 1,46 (m, 2H), 1,59 (m, 2H), 2,38 (m, 1H), 3,25 (s, 9H), 3,69 (m, 6H), 3,99 (m, 2H), 4,29 (m, 4H). EM (FAB): m/z 524,6 (M + H) $^+$ .

55

Los siguientes compuestos se sintetizaron por un procedimiento análogo al procedimiento descrito antes.

#### *2-(2'-Propilicosanoiloxi)etoxietilfosfocolina (3,18-DEGPC)*

60

RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ ):  $\delta$  0,9 (t, 6H), 1,29 (s, 34H), 1,46 (m, 2H), 1,59 (m, 2H), 2,38 (m, 1H), 3,25 (s, 9H), 3,69 (m, 6H), 3,99 (m, 2H), 4,29 (m, 4H). EM (FAB): m/z 608,6 (M + H) $^+$ .

#### 65 *2-{2'-[10''-(Hexadecil-4-oxi)decil-1-oxi]etoxi}etilfosfocolina (3,12-O- $C_{10}$ -DEG-PC)*

RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ ):  $\delta$  0,9 (t, 6H), 1,29 (s, 34H), 1,46 (m, 2H), 1,59 (m, 2H), 2,38 (m, 1H), 3,25 (s, 9H), 3,69 (m, 6H), 3,99 (m, 2H), 4,29 (m, 4H). EM (FAB): m/z 608,6 (M + H) $^+$ .

## ES 2 338 987 T3

### Ejemplo 7

#### Síntesis de 2-(2'-propiltetradecanoiloxi)etilfosfocolina

- 5 La fosfocolina de fórmula  $C_3H_7-C(C_{12}H_{25})H-C(O)-CH_2-CH_2-O-PO^-(O)-O-CH_2CH_2N^+(CH_3)_3$  se preparó por el mismo procedimiento descrito antes en el ejemplo 6, excepto que se usó el correspondiente alcohol, es decir 2-(2'-propiltetradecanoiloxi)etanol, en lugar de 2-(2'-propiltetradecanoiloxi)etoxietanol.

#### 10 2-(2'-Propiltetradecanoiloxi)etilfosfocolina (3,12-MEG-PC)

RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ ):  $\delta$  0,9 (t, 6H), 1,29 (s, 22H), 1,46 (m, 2H), 1,59 (m, 2H), 2,39 (m, 1H), 3,24 (s, 9H), 3,66 (m, 2H), 4,07 (m, 2H), 4,28 (m, 4H). EM (FAB): m/z 480,7 (M + H) $^+$ .

### 15 Ejemplo 8

#### Síntesis de alquilfosfocolinas. (Referencia)

- 20 Los compuestos de fosfocolina de fórmula  $RO-PO-(O)-O-CH_2CH_2N^+(CH_3)_3$  se prepararon por el mismo procedimiento descrito antes en el Ejemplo 6, excepto que se usó R-OH como el alcohol en la etapa inicial. R representa alquilo de cadena ramificada de tipo  $R_1C(R_2)H-$ .

#### 25 4-Hexadecanilfosfocolina (3,12-PC)

RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ ):  $\delta$  0,91 (t, 6H), 1,28 (s, 22H), 1,57 (m, 4H), 3,21 (s, 9H), 3,62 (m, 2H), 4,25 (m, 3H). EM (FAB): m/z 408,68 (M+ H) $^+$ .

#### 30 4-Octadecanilfosfocolina (3,14-PC)

RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ ):  $\delta$  0,9 (t, 6H), 1,28 (s, 26H), 1,57 (m, 4), 3,21 (s, 9H), 3,61 (m, 2H), 4,23 (m, 3H). EM (FAB): m/z 436,91 (M + H).

35

#### 8-Pentadecanilfosfocolina (7,7-PC)

- 40 RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ ):  $\delta$  0,92 (t, 6H), 1,32 (s, 20H), 1,59 (m, 4H), 3,23 (s, 9H), 3,63 (m, 2H), 4,26 (m, 3H). EM (FAB): m/z 394,35 (M + H) $^+$ .

### Ejemplo 9

#### 45 Síntesis de P-BFA $\omega$ -ramificado (Referencia)

Los compuestos de P-BFA  $\omega$ -ramificados se preparan por los mismos procedimientos descritos antes en los Ejemplos 1 y 6 usando los  $\omega$ -alcoholes pertinentes.

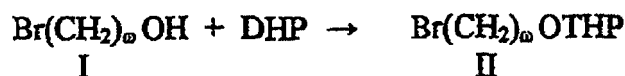
- 50 La preparación de BFA  $\omega$ -ramificado es una síntesis en 6 etapas. Los reactivos iniciales son 1-bromo- $\omega$ -alcohol y n-alkil-m-alkilcerona.

La primera etapa es la protección del grupo hidroxilo del 1-bromo- $\omega$ -alcohol con dihidropirano (DHP) seguido del procedimiento descrito por Kocienski ("Protecting Group"; Georg. Thieme Verlag Stuttgart. N-Y. pg. 83-84 (1994)).

55

#### Etapa 1

60



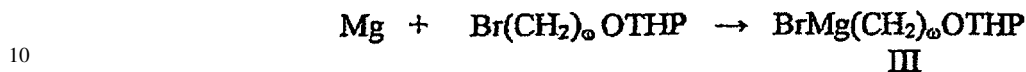
65

THP indica un éter de tetrahidropirano.

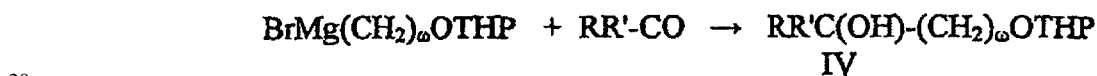
## ES 2 338 987 T3

La segunda y tercera etapas son síntesis de Grignard de alcohol terciario (Vogel's, "Textbook of practical organic chemistry", Wiley, New York, págs. 475, 538, (1996)) como siguen:

5 Etapa 2



15 Etapa 3



R, R' - indican grupos alquilo.

25 La cuarta etapa es la reducción del grupo hidroxilo terciario del compuesto (IV) por reacción de hidrogenación iónica, siguiendo el procedimiento descrito por Carey y Tremper (*JACS*, v. 91, p. 2967, (1969))

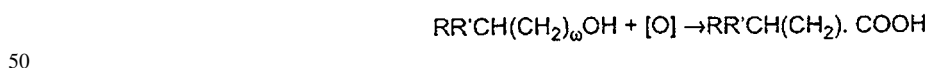
30 Etapa 4



40 La quinta etapa es la escisión del grupo protector para obtener el alcohol  $\omega$ -ramificado (V) ("Protecting Group"; Georg. Thieme Verlag Stuttgart. N-Y. pg. 83-84 (1994)).

La etapa final, etapa 6, es la oxidación del alcohol  $\omega$ -ramificado al correspondiente BFA  $\omega$ -ramificado. Esto se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Manger y Lee (*Tetrahedron letters*, v. 22, N. 18, p. 1655, (1981)).

45 Etapa 6



## II. Propiedades fisicoquímicas

55 Ejemplo 10

### *Mediciones de lipofilia in vitro de DP-BFA*

60 Los valores de lipofilia de diferentes derivados de ácidos grasos ramificados se calcularon comparando la solubilidad de estos compuestos en disoluciones orgánicas frente a acuosas. Se usaron octanol y disolución salina fisiológica, respectivamente, como disoluciones orgánica y acuosa. El valor del coeficiente de partición ( $P_c$ ), es decir la distribución octanol/disolución salina, se midió por la técnica del matraz de agitación. Los resultados, es decir la solubilidad en mg/ml en octanol y agua y el  $\text{Log}P_c$  calculado se muestran en la Tabla 1.

65

# ES 2 338 987 T3

TABLA 1

*Coefficientes de partición en octanol-disolución salina (P<sub>c</sub>)*

Molécula*	Octanol mg/ml	Agua mg/ml	LogP <sub>c</sub>
7,7#	>50	>25	1,33
3,12#	>20	>10	0,99
3,14#	>20	>10	1,26
3,16#	>20	9,4	1,26
7,7-PO <sub>4</sub> #	>10	>10	<5
3,12-PO <sub>4</sub> #	<5	<2,5	1,9
3,14-PO <sub>4</sub> #	>10	<0,5	1,11
3,12-MEG-PO <sub>4</sub>	>10	>10	1,09
3,12-DEG-PO <sub>4</sub>	>5	8	1,31
3,12-(éter)-DEG-PO <sub>4</sub>	>5	>5	0,83
3,12-PC#	>10	>10	
3,12-MEG-PC	>10	>10	1,22
3,12-DEG-PC	>50	>10	0,73
*sales de sodio de los ácidos grasos ramificados y sus derivados de PO <sub>4</sub>			
# Ejemplos de referencia			

## Ejemplo 11

### *Correlaciones estructura-función*

En este estudio se evaluó una correlación entre las propiedades fisicoquímicas de las moléculas de cadena ramificada y sus efectos biológicos. El estudio se dirigía a descubrir si había una correlación entre la longitud de cadena de las moléculas de cadena ramificada y sus potencias en la extravasación de azul de Evans (EB) en el cerebro de rata (véase el Ejemplo 18 para el procedimiento usado en la medición de los valores de CE<sub>50</sub>). Se usaron diferentes ácidos grasos ramificados del tipo 3,n, en el que una cadena ramificada es de 3 átomos de carbono y la segunda cadena hidrocarbonada, n es de 7 a 16 átomos de carbono. Los resultados se representan gráficamente en la figura 1.

Como puede verse en la figura 1, se encontró que los BFA 3,12, 3,14 y 3,16 eran activos en la permeabilización de las BHE. En las condiciones experimentales usadas, el compuesto más potente entre las moléculas ensayadas es el BFA-3,12.

## III. Ejemplos biológicos

### III-a) *Estudios in vitro*

#### Ejemplo 12

### *Estudio de toxicidad in vitro comparativo*

Se seleccionaron diferentes moléculas de DP-BFA en la línea celular AA8 de ovario de hámster chino (CHO) con el fin de establecer su toxicidad. Los valores de CL<sub>50</sub>, es decir las concentraciones que causan la muerte en el 50% de la población de células, se calcularon a partir de las curvas de dosis-respuesta. Los valores de CL<sub>50</sub> de los fosfo-BFA se compararon con los de los correspondientes ácidos grasos ramificados (= carbo-BFA).

*Método*

Se usó la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) como un ensayo de la integridad de la membrana de las células y, por lo tanto, para calcular la toxicidad. Las células ( $2 \times 10^5$ /ml) se sembraron (150  $\mu$ l/pocillo) en placas de 96 pocillos en medio RPMI-1640 que contenía FCS al 10%. Después de dos días, se añadieron los compuestos DP-BFA de ensayo o el compuesto de control, ácido mirístico, a las placas en concentraciones decrecientes en el intervalo de 500 a 1  $\mu$ g/ml. Las células se recogieron después de 1 hora. 45 minutos antes de recogerlas, se añadieron 16,5  $\mu$ l de disolución de lisis a los 6 primeros pocillos con el fin de demostrar la lisis completa y la liberación máxima de lactato deshidrogenasa que indica la muerte celular. Otros controles incluían 2 pocillos de blanco y 5 pocillos que contenían células sin fármacos adicionales. Después de centrifugación (1500 rpm, 5 min), se transfirieron 75  $\mu$ l del líquido sobrenadante a una placa nueva con 45  $\mu$ l de una mezcla de ensayo LDH (kit Tox-7, Sigma). Después de 10-20 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia usando un lector Elisa a 490 nm.

Los datos de toxicidad obtenidos después de 1 hora de incubación con diferentes DP-BFA se resumen en la Tabla 2. Cada experimento se realizó por triplicado.

TABLA 2

*Toxicidad de BFA y sus derivados fosforados en cultivos celulares*

Compuesto ensayado	CL <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
7,7-Na*	65
7,7-PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> *	320
3,12-Na*	165
3,12-PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> *	320
3,12-DEG-PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub>	320
<b>* Ejemplos de referencia</b>	

En general, se encontró que las células eran más sensibles a los carbo-BFA y menos sensibles a los derivados de fosfo-BFA ensayados. Las dosis subtóxicas de los carbo-BFA se calcularon entre 30-100  $\mu$ M después de incubación durante 1 hora. En las mismas condiciones, las dosis subtóxicas para los derivados de fosfo-BFA ensayados se calcularon en el intervalo de 160  $\mu$ M a más de 640  $\mu$ M. Conclusión: En general, se encontró que los fosfo-BFA eran aproximadamente 2 a 5 veces menos tóxicos que las correspondientes moléculas de carbo-BFA.

## Ejemplo 13

*de DP-BFA en uniones de células epiteliales*

Se investigaron los efectos de diferentes derivados de BFA en uniones célula-célula, usando la línea celular de adenocarcinoma humano (A431). Estas células tienen una estructura polarizada característica de las células intestinales.

En este estudio, se siguieron los cambios cuantitativos en la distribución subcelular de ZO<sub>2</sub>, una proteína asociada con los complejos de unión estrecha (Anderson *et al.* (1993) *Current Opinion in Cell Biology* 5: 771-778).

Se incubaron células A431, cultivadas en DMEM con suero en cubreobjetos de vidrio, durante 1 h en presencia o ausencia de dosis subtóxicas de DP-BFA. Las células se fijaron y se permeabilizaron durante 2 minutos con una mezcla de paraformaldehído al 3% y Triton-X-100 al 0,5%, y después se fijaron además durante 20 min con paraformaldehído al 3% solo. Las células fijadas se aclararon y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo policlonal de conejo ZO<sub>2</sub> (Zymed Laboratories, inc. EE.UU.), se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron durante 45 min con anticuerpos secundarios con marcadores fluorescentes. Los cubreobjetos teñidos se montaron en Elvanol (Mowiol 4-88, Hoechst, Frankfurt, Alemania) antes del examen por microscopio. Se siguió la distribución de la proteína ZO<sub>2</sub> con marcaje inmunofluorescente.

## ES 2 338 987 T3

Las células A431 que se incubaron durante 1 hora con pervanadato, que inhibe las fosfotirosina fosfatasas, y por lo tanto altera las uniones celulares, se usaron como un control positivo.

5 Las imágenes de fluorescencia de ZO<sub>2</sub> indicaban que DP-BFA tiene efectos claros en la alteración de las uniones estrechas de células A431.

### Ejemplo 14

#### 10 *Efectos de DP-BFA en la permeabilidad de la monocapa de células epiteliales*

El objetivo de este estudio era evaluar la cinética y el efecto general de los compuestos DP-BFA en la modificación de la permeabilidad en una monocapa de células epiteliales, que servía como sistema de modelo *in vitro* para las barreras biológicas y en particular para la barrera intestinal.

15 Se hicieron dos enfoques con el fin de determinar el efecto de DP-BFA en la permeabilización de barreras biológicas. Un enfoque era seguir el transporte de un compuesto marcado radiactivo a través de la monocapa de células epiteliales. Un segundo enfoque era seguir los cambios en la resistencia eléctrica como una medida que indica el nivel de permeabilidad de la capa celular.

20 Las células epiteliales se cultivan en un filtro de membrana (0,4 micrómetros, 1 cm<sup>2</sup>). La membrana con la monocapa de células epiteliales se coloca entre dos compartimentos, una cámara dadora y una receptora. Se añaden el compuesto P-BFA ensayado, en una concentración predeterminada no tóxica, y trazador radiactivo <sup>14</sup>C-sacarosa (1 Ci en 0,5 ml de tampón) en el lado apical (donador). Se recogen muestras de 0,5 ml cada una del lado basolateral (receptor) a intervalos de 10 minutos durante la duración de 90 minutos del experimento. La incubación se lleva a cabo en medio de cultivo tisular que contiene FCS al 1%, mientras se agita a 70 rpm. La cámara apical y la membrana se transfieren a una nueva cámara receptora en cada punto de tiempo de toma de muestra. Esto se hace con el fin de mantener la concentración constante del trazador en la cámara apical y volúmenes de líquido invariables en ambas cámaras. La concentración de trazador radiactivo en las muestras recogidas se calcula usando un contador microbeta Trilux (Wallac, Finlandia). La velocidad de transporte del trazador se calcula y se expresa como coeficiente de permeabilidad.

La integridad de la monocapa epitelial usada en el experimento se sigue al principio y al final de la incubación, midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) usando millicell-ERC (Millipore).

35 Se lleva a cabo un grupo de experimentos paralelos usando el mismo sistema experimental descrito antes pero sin la adición del trazador radiactivo. Se siguió la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) cada 10 minutos durante un periodo de 90 minutos.

40 Conclusión: el hecho de que i) los P-BFA aumenten significativamente el paso de sacarosa a través de la monocapa de células epiteliales, y ii) la disminución de la TEER de la monocapa, apoyan la conclusión de que los compuestos P-BFA permeabilizan la barrera biológica.

### Ejemplo 15

#### 45 *Actividad citotóxica de diferentes DP-BFA en tipos de células normales y malignas*

La actividad citotóxica de diferentes derivados fosforados de ácidos grasos de cadena ramificada (DP-BFA) se ensayó *in vitro* en cultivos de células que incluían tipos de células normales y malignas. Se usaron los siguientes sistemas celulares:

Fibroblastos primarios (ser humano)

Células de la médula ósea (MO) normales (ratón)

55 Células epiteliales bronquiales primarias (ser humano, de Clonetics, n° de cat. CC-2541)

Caco-2 - línea celular de cáncer de colon (ser humano, ATTC, HTB-37)

60 Línea de células de glioma C6 (rata, ATCC, CRL-2199)

Neuro2a - línea celular de neuroblastoma (ratón, ATCC, CCL-131)

SKBR-3 - línea celular de cáncer de mama (ser humano, ATTC, HTB-30)

65 HL60- línea celular de leucemia mieloide (ser humano, ATCC, CCL-240)

U937- línea celular de leucemia mieloide (ser humano).

## ES 2 338 987 T3

Las células se sembraron en una placa de microvaloración en MEM que contenía L-glutamina 2 mM, penicilina 100 unidades/ml, estreptomicina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y FCS al 10% a 37°C. Las células cultivadas se incubaron, durante su fase de crecimiento lineal en ausencia (grupo de control) o presencia de diferentes DP-DBA como se indica. Las concentraciones finales de los DP-BFA ensayados estaban en el intervalo de 1,5 a 200  $\mu\text{M}$ . Al final del periodo de incubación, que fue de 5 días para las células de la médula ósea y 3 días para las otras líneas celulares, se calculó el efecto citotóxico del P-BFA añadido en las células usando el ensayo colorimétrico de MTT. El ensayo (Mosmann (1983) *J. Immunol. Methods* 65: 55-63) mide la actividad de la reductasa mitocondrial y sirve para la evaluación cuantitativa de la viabilidad celular. La concentración de fármaco que produce 50% de reducción en la viabilidad celular en comparación con el grupo de control, se define como  $\text{CE}_{50}$ . Los valores de  $\text{CE}_{50}$  de los compuestos DP-BFA ensayados se calcularon a partir de las curvas de dosis-respuesta establecidas para cada una de las diferentes líneas celulares ensayadas.

Los resultados se resumen en la Tabla 3. Cada valor de  $\text{CE}_{50}$  es una media de los valores de  $\text{CE}_{50}$  obtenidos de 1-5 experimentos independientes.

Como puede verse a partir de los resultados de la Tabla 3, las diferentes moléculas de DP-BFA eran activas en diferentes grados en su efecto citotóxico en las diferentes células. Entre los compuestos ensayados, los agentes citotóxicos más potentes para las células malignas eran 3,12-DEG- $\text{PO}_4$ , 3,12-(éter)-DEG- $\text{PO}_4$ , 3,12-MEG-PC, 3,12-DEG-PC, 3,18-DEG-PC y 3,14-PC. Se encontró que 2 de estos compuestos, 3,12-DEG- $\text{PO}_4$  y 3,12-(éter)-DEG- $\text{PO}_4$ , tenían la actividad citotóxica más baja en células epiteliales normales. Se encontró que otro compuesto, 3,12-DEG-PC, tenía la actividad citotóxica más baja en los fibroblastos normales y células de la médula ósea normales.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 3: Toxicidad de los DP-BFA en diferentes líneas celulares

Línea celular	Caco-2	glioma C6	Neuro2a	SKBR	HL60	U937	Fibroblastos primarios normales	Médula ósea normal	Epiteliales primarias normales
<b>Compuesto</b>	<b>CE<sub>50</sub> (µM)</b>								
3,12-Na*	100		76	130		68			
3,12-PO <sub>4</sub> -Na <sub>2</sub> *	>200		105	>200		90			
3,12-MEG-PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub>	>200		60	>200		75			
3,12-DEG-PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub>	40	38	58	60		25	65	62	>200
3,12-(éter)-DEG-PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub>	47	40	37	58		10	65	68	>200
3,12-PC*	150			62	47				
3,12-MEG-PC	75		70	50	20	9	160	95	94
3,12-DEG-PC	113	95	134	40	11	6	170	166	90
3,18-DEG-PC					13	6		80	60
3,14-PC*					7	4		160	72

\* Ejemplos de referencia

## ES 2 338 987 T3

*Conclusiones:* Los compuestos fosfo-BFA han demostrado efectos de citotoxicidad específicos del tipo de célula. Algunos de estos compuestos mostraron ser los agentes citotóxicos más potentes cuando se ensayaron en líneas celulares malignas, aunque eran mucho menos tóxicos cuando se ensayaban en células normales de diferentes tejidos. Estos datos sugieren que estos compuestos pueden ser agentes anticancerígenos eficaces con efectos secundarios citotóxicos bajos.

### Ejemplo 6

#### *3,12-DEG-PC induce activación de caspasa-3 y fragmentación de ADN en una línea celular de neuroblastoma*

Con el fin de explorar mejor el posible mecanismo subyacente, se estudiaron el efecto citotóxico ejercido por diferentes DP-BFA, dos marcadores para la apoptosis establecidos, actividad de la caspasa-3 y fragmentación de ADN (Lincz (1998) *Immunol. Ceil Biol.* 76:1-19).

Se sembraron células de neuroblastoma Neuro2a (ATCC, CCL-131) en MEM que contenía L-glutamina 2 mM, penicilina 100 unidades/ml, estreptomycin 100  $\mu$ g/ml y FCS al 10% a 37°C. 24 horas después, cuando las células estaban en la fase logarítmica de crecimiento, se añadió 3,12-DEG-PC hasta una concentración final de 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M o 100  $\mu$ M. Las células cultivadas en presencia de vehículo solo sirvieron como grupo de control.

Los ensayos para la actividad de la caspasa-3 y fragmentación de ADN se llevaron a cabo en lisatos celulares obtenidos después de 6 y 24 horas de incubación con el fármaco, respectivamente. Se ensayó la actividad de la caspasa-3 usando el sustrato fluorogénico Ac-DEVD-AMC (Pharmingen, Becton Dickinson, n° cat. 66081U) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La fragmentación del ADN se cuantificó usando el kit de Elisa plus de detección de muerte celular (Roche, n° cat. 1774 425) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los resultados se resumen en la Tabla 4. La actividad de caspasa medida se expresa como porcentaje de la actividad en las placas de control normalizadas respecto al contenido de proteína. La fragmentación de ADN se expresa como valores de DO a  $\lambda=405$  nm y es una media de las lecturas por duplicado, de los lisatos de los cultivos celulares.

TABLA 4

*Marcadores de apoptosis en células Neuro2a tratadas con 3,12-DEG-PC*

Fármaco añadido	Actividad de caspasa (% del control)	Fragmentación de ADN (DO <sub>405nm</sub> )
Ninguno (Control)	100%	0,030
3,12-DEG-PC, 25 $\mu$ M	210%	0,036
3,12-DEG-PC, 50 $\mu$ M	540%	0,153
3,12-DEG-PC, 100 $\mu$ M	—	0,389

Como puede verse a partir de los resultados en la Tabla 4, la incubación de células Neuro2A con el compuesto 3,12-DEG-PC, causó un aumento de la actividad de caspasa-3 de aproximadamente 5 veces, y un aumento significativo de la fragmentación de ADN. Se obtuvieron resultados similares cuando se ensayó el compuesto en otra línea celular maligna, caco-2, derivada de carcinoma de colon.

Conclusión: La apoptosis puede ser un mecanismo posible para ejercer el efecto citotóxico de derivados de fosfo-colina de BFA en determinadas células malignas.

### III-b) Estudios *in vivo*

#### Ejemplo 17

#### *Sistema de modelo in vivo para medir el efecto de DP-BFA en la permeabilización de la BHE*

La permeabilización de la BHE por DP-BFA se investigó en el sistema de modelo de rata por seguimiento de la acumulación en el cerebro de 2 marcadores: a) colorante azul de Evans (EB), que se une rápidamente con la albúmina (PM 70 kD) *in vivo*, y es un indicador para el transporte paracelular; y b) la sal sódica de la fluoresceína (F-Na), PM 376 D, que es transportada por el espacio celular y permite el seguimiento del transporte transcelular. Tras la alteración de la BHE el complejo de azul de Evans-albúmina se acumula de forma irreversible en el espacio intercelular del cerebro. El trazador mucho más pequeño fluoresceína puede ser transportado por vía intracelular para ocupar tanto el espacio inter como intracelular en el cerebro.

## ES 2 338 987 T3

La permeabilización de la barrera hematoencefálica en ratas Sprague-Dawley se indujo por exposición breve a DP-BFA. Los animales se anestesiaron con Rampun-Imalgen y los compuestos de ensayo DP-BFA se administraron por la arteria carótida externa retrógrada al cerebro (Smith, Q.R. *Methods of study. In: Physiology and Pharmacology of the Blood-Brain Barrier*. Ed. Bradbury M W.B. Spinger-Veriag. Berlin-Heidelberg-NY; 1992: 24-52). La arteria pterigopalatina se ligó para evitar el escape de las disoluciones administradas por infusión hacia la vasculatura externa de la cabeza. Las disoluciones de DP-BFA se administraron por infusión a lo largo de un periodo de 30 segundos o media hora, usando una bomba de jeringa Harvard Apparatus. El flujo de sangre a través de la arteria carótida común se interrumpió solo en el momento de la infusión.

Todas las moléculas de DP-BFA ensayadas se prepararon a partir de disoluciones madre en agua o etanol, por dilución 200-1000 veces en disolución isoosmótica de manitol (5%) en tampón de trometamina (Sigma) o PBS (pH 7,4).

Se inyectaron los marcadores, azul de Evans (EB, 25 mg/ml) y fluoresceína (F-Na, 12,5 mg/ml), en 1 ml de disolución, por vía intravenosa, inmediatamente después de la administración de los DP-BFA ensayados, o después de un intervalo de tiempo específico si se investigaba la reversibilidad de la acción. Se llevó a cabo la infusión i.v. de apoyo de F-Na (12,5 mg/ml -100 µl/min) durante 8 minutos. Se lavaron los cerebros con disolución salina (60 ml) 10 min después del “suministro rápido” intracarotideo. Los hemisferios cerebrales ipsilateral y contralateral y tumores, cuando sea aplicable, se homogeneizaron por separado con ácido tricloroacético al 50% (TCA). Las concentraciones de los marcadores en la corteza y en los tumores, cuando sea aplicable, se determinaron por espectrofluorometría (Uyama, O. *et al.*, (1988) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 8, 282-284; Abraham *et al.*, (1996) *Neurosci. Lett.* 208, 85-88). El contenido de marcadores se calculó como µg de marcador por gramo de tejido cerebral. Se usaron el error típico y el ensayo de Student para la significancia estadística.

### Ejemplo 18

*Efecto de los ácidos grasos de cadena ramificada de diferentes longitudes en la permeabilidad de la BHE (Referencia)*

En la primera etapa del estudio, se seleccionaron moléculas de BFA de diferentes longitudes de cadena por su efecto en la permeabilización de la barrera hematoencefálica (BHE).

El experimento se llevó a cabo en ratas Sprague-Dawley macho que pesaban 250-320 g. Se siguió el procedimiento descrito antes en el Ejemplo 17.

El efecto de los compuestos ensayados en la apertura de la BHE se evaluó por 2 parámetros:

a) eficacia - El grado de apertura de la BHE calculada en términos de acumulación de azul de Evans-albúmina (µg EB/g de tejido cerebral); y

b) potencia - medida en términos de valores de CE<sub>50</sub> y concentración mínima eficaz (CME). La CE<sub>50</sub> es la concentración de un compuesto ensayado que produce 50% del efecto máximo de la extravasación de azul de Evans. La CME se define como la concentración que permite la acumulación de 3 veces la cantidad de azul de Evans acumulada en los animales de control, en este caso un total de 3 µg de EB/g de cerebro. Cuanto menores son los valores de CE<sub>50</sub> y CME, mayor es la potencia del compuesto ensayado.

Los resultados de la evaluación de los efectos de diferentes DP-BFA en la permeabilidad de la BHE se presentan en la Tabla 5.

TABLA 5

*Efectos de los ácidos grasos ramificados en la permeabilidad de la BHE*

Molécula	CE <sub>50</sub> (µM)	CME	µg EB/g cerebro (a CE <sub>50</sub> )
3,7-Na	>450	-	0,8
3,10-Na	-700	-	0,8
3,12-Na	20 ± 3	6,5 ± 0,7	32 ± 4
3,14-Na	40 ± 5	9,1 ± 1,2	16,5 ± 2,5
3,16-Na	137 ± 17	18 ± 2	34 ± 5
7,7-Na	184 ± 21	132 ± 19	4,2 ± 0,6

## ES 2 338 987 T3

Como puede verse a partir de los resultados en la Tabla 5, hay una variación sustancial en el grado de extravasación de azul de Evans dependiendo de la longitud de cadena del DP-BFA. Las moléculas con la longitud de cadena más corta son casi completamente ineficaces en este sistema modelo. Las moléculas con la eficacia más alta eran los BFA 3,12-Na y 3,16-Na, cada uno provoca una acumulación de más de 30  $\mu\text{g}$  de EB/g de cerebro. En el sistema experimental usado, 3,12-Na es el agente de permeabilización más potente que tiene la  $\text{CE}_{50}$  y valores de CME más bajos entre los compuestos ensayados.

Conclusión: En las condiciones del sistema experimental usado, se encontró que el BFA 3,12-Na era el potenciador de la permeabilidad más eficaz en términos tanto de potencia como de eficacia. Por lo tanto, los derivados de DP-BFA basados en BFA-3,12 se estudiaron con más detalle.

### Ejemplo 19

#### *Efecto de diferentes DP-BFA en la permeabilidad de la BHE*

El efecto de diferentes DP-BFA en la permeabilidad de la BHE se ensayó en el sistema modelo de cerebros de rata, descrito antes en el ejemplo 17. La eficacia, en particular el nivel de la apertura de la BHE se expresó como la cantidad de azul de Evans acumulada en el cerebro ( $\mu\text{g}$  de EB/g de cerebro). La potencia de las moléculas ensayadas se calculó por sus valores de  $\text{CE}_{50}$  y concentración mínima eficaz (CME) calculados.

TABLA 6

*Efecto de diferentes DP-BFA en la permeabilidad de la BHE (en cerebros de rata)*

Molécula	$\text{CE}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	CME	$\mu\text{g}$ EB/g cerebro (a $\text{CE}_{50}$ )
3,12- $\text{PO}_4\text{-Na}_2^*$	$55 \pm 1$	$3,3 \pm 0,5$	$20 \pm 3$
3,14- $\text{HPO}_4\text{-Na}^*$	$67 \pm 11$	$6,2 \pm 0,9$	$10 \pm 1$
7,7- $\text{HPO}_4\text{-Na}^*$	150	-	1
3,12-MEG- $\text{PO}_4\text{Na}_2$	$18 \pm 3$	$11 \pm 2$	$5 \pm 1$
3,12-DEG- $\text{PO}_4\text{Na}_2$	$20 \pm 2$	$3,3 \pm 0,5$	$18 \pm 3$
3,12-(éter)-DEG- $\text{PO}_4\text{Na}_2$	$54 \pm 5$	$7,3 \pm 1,4$	$26 \pm 5,2$
3,12-PC*	$76 \pm 14$	$23 \pm 4$	$10 \pm 1$
3,12-MEG-PC	$19,5 \pm 1,5$	$10 \pm 1$	$15 \pm 2$
3,12-DEG-PC	$70 \pm 12$	$15 \pm 2$	$14 \pm 2$
Manitol*	25%	-	$10 \pm 2$
* Ejemplos de referencia			

Como puede verse en la Tabla 6, diferentes moléculas de DP-BFA promueven el paso de la albúmina unida al trazador azul de Evans a través de la BHE. Los compuestos ensayados difieren en su potencia y eficacia.

En las condiciones de este experimento, el derivado más potente de 3,12-BFA era 3,12-DEG- $\text{PO}_4\text{Na}_2$  que tiene un valor de  $\text{DE}_{50}$  de  $20 \mu\text{M}$  y una concentración mínima eficaz (CME) de  $3,3 \mu\text{M}$ . Los compuestos más eficaces para aumentar la permeabilidad de la BHE eran 3,12-(éter)-DEG- $\text{PO}_4\text{Na}_2$ , 3,12- $\text{PO}_4\text{Na}_2$  y 3,12-DEG- $\text{PO}_4\text{Na}_2$ . Los niveles de acumulación del colorante azul de Evans en el cerebro de rata después de tratamiento con concentraciones  $\text{CE}_{50}$  de los compuestos 3,12-(éter)-DEG- $\text{PO}_4\text{Na}_2$ , 3,12- $\text{PO}_4\text{Na}_2$  y 3,12-DEG- $\text{PO}_4\text{Na}_2$  eran, respectivamente, 26, 20 y 18  $\mu\text{g}$  de EB/g de cerebro.

### Ejemplo 20

#### *Efecto de DP-BFA en el transporte de la albúmina unida a azul de Evans y la fluoresceína a través de la BHE*

Se examinó el efecto de diferentes DP-BFA en la permeabilización de la BHE a moléculas de diferentes tamaños, *in vivo* en el sistema modelo de cerebros de rata normales.

## ES 2 338 987 T3

Se siguió el transporte de 2 marcadores: a) azul de Evans (EB) unido a albúmina (PM 70 kD) como un indicador para el transporte paracelular; y b) sal sódica de la fluoresceína (PM 376 D), que representa moléculas de tamaño pequeño.

5 El colorante azul de Evans (EB) y la sal sódica de fluoresceína (F-Na) se administraron por infusión a la arteria carótida externa a lo largo de 30 segundos de acuerdo con el protocolo descrito antes en el ejemplo 17. Los compuestos de ensayo se usaron a sus concentraciones  $CE_{50}$ . Los animales de control se trataron con disolución vehículo.

10 La extravasación de azul de Evans se expresa como el porcentaje de la cantidad total de EB acumulada por gramo de tejido cerebral. El transporte de la fluoresceína en el cerebro, que depende de la concentración de esta molécula en el suero, se presenta como el porcentaje del nivel de F-Na en el suero.

Se calculó la relación de acumulación en el cerebro de F-Na a EB y los resultados se presentan en la Tabla 7.

TABLA 7

*Efecto de diferentes DP-BFA en la permeabilidad de la BHE a EB-albúmina y a la fluoresceína*

Molécula	% F-Na/g cerebro	% EB/g cerebro	Relación *F-Na / EB
control	0,3 ± 0,08	0,04 ± 0,01	9,5 ± 1,6
Manitol-25%#	2,4 ± 0,4	0,6 ± 0,21	4,0 ± 0,5
3,14-Na#	3,8 ± 0,5	0,8 ± 0,07	4,7 ± 1,7
3,12Na#	6,4 ± 1,1	1,8 ± 0,2	4,9 ± 0,9
3,12-PO <sub>4</sub> -Na <sub>2</sub> #	8,2 ± 0,9	2,9 ± 0,6	5,9 ± 1,0
3,12-MEG-PO <sub>4</sub> -Na <sub>2</sub>	5,0 ± 0,8	0,8 ± 0,1	8,4 ± 0,9
3,12-DEG-PO <sub>4</sub> -Na <sub>2</sub>	9,0 ± 1,4	1,4 ± 0,2	9,0 ± 1,2
3,12-(éter)-DEG-PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub>	4,4 ± 0,9	4 ± 0,8	1,1 ± 0,2
3,12-PC#	3,0 ± 0,5	0,8 ± 0,1	7,8 ± 1,3
3,12-MEG-PC	5,2 ± 0,8	0,9 ± 0,2	6,9 ± 0,1
3,12-DEG-PC	2,9 ± 0,5	0,6 ± 0,1	6,8 ± 0,8
*- media de relaciones individuales			
# Ejemplos de referencia			

50 Como puede verse en la Tabla 7, la BHE normal (=control) es aproximadamente 10 veces más permeable a la fluoresceína que el complejo de EB-albúmina. El permeabilizador hiperosmótico, manitol, aumentó la permeabilidad de la BHE al EB en mayor medida que a la F-Na (relación F-Na/EB = 4). Igualmente, los ácidos grasos ramificados ensayados 3,14-Na y 3,12-Na mostraron relaciones de F-Na/EB de 4,7 y 4,9, respectivamente.

55 Los diferentes derivados fosforados de los BFA afectan a la permeabilidad de la BHE a los dos marcadores de diferente forma. Se encontró que 3,12-PO<sub>4</sub> aumentó la permeabilidad de la BHE al complejo de EB-albúmina aproximadamente 1,5 veces más que el aumento de permeabilidad a la fluoresceína. Por otra parte, se encontró que 3,12-DEG-PO<sub>4</sub> aumentó la permeabilidad de la BHE de una forma más fisiológica, es decir, aumentó el transporte de F-Na en la misma medida que la extravasación de EB. La relación de F-Na/EB en los cerebros de rata expuestos a 3,12-DEG-PO<sub>4</sub> era aproximadamente 9. Conclusión: Diferentes compuestos de DP-BFA afectan a la permeabilidad de la BHE de diferentes maneras. Algunos DP-BFA, p. ej., 3,12-(éter)-DEG-PO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> y 3,12-PO<sub>4</sub> (relaciones respectivas de F-Na/EB de 1,1 y 5,9) indujeron la apertura selectiva de la BHE que favorece el transporte de moléculas grandes frente a moléculas con peso molecular bajo. En contraste, otras moléculas, p. ej. 3,12-DEG-PO<sub>4</sub>, aumentaron de igual forma el transporte de moléculas tanto pequeñas como la F-Na como de moléculas más grandes como EB-albúmina.

## ES 2 338 987 T3

### Ejemplo 21

#### *Duración del efecto de DP-BFA en la apertura de la BHE*

5 Se examinaron los efectos de DP-BFA en la extravasación de azul de Evans y fluoresceína en el cerebro de rata, en diferentes tiempos de medición después de la administración de DP-BFA.

10 Se administraron por infusión diferentes DP-BFA, a lo largo de un periodo de 30 segundos, en la arteria carótida externa de ratas Sprague Dawley, siguiendo el procedimiento descrito antes en el ejemplo 17. Los compuestos ensayados se usaron en las concentraciones de sus  $CE_{50}$ . La extravasación de azul de Evans y fluoresceína en el cerebro se determinaron a los 10, 30, 60, 120 y 240 minutos después de la administración de DP-BFA. El contenido de azul de Evans ( $\mu\text{g/g}$ ) y fluoresceína (% de suero) en el cerebro de rata se calculó usando una media de 2-3 animales individuales por tiempo de medición.

15 Los resultados obtenidos en el sistema experimental como se ha descrito antes, demuestran que el efecto de los DP-BFA en la permeabilización de la BHE es reversible. Además, se sugiere que los efectos de apertura de la BHE de los DP-BFA son de vida relativamente corta. La mayoría de los derivados ensayados de DP-BFA-3,12 mantienen la permeabilidad de la BHE durante menos de 1 hora, con una  $D_{1/2}$  de aproximadamente 30 minutos. La  $D_{1/2}$  se define como la duración de al menos 50% de la apertura de la BHE usando las concentraciones de  $CE_{50}$  de los compuestos  
20 ensayados. Dos compuestos, 3,12-PC y 3,12-MEG-PC, ambos comprenden un resto fosfocolina, han mostrado una  $D_{1/2}$  que era 4 veces más larga que la de los otros derivados 3,12-BFA ensayados, es decir  $D_{1/2}$  de aproximadamente 120 minutos.

25 Conclusiones: Se mostró que los DP-BFA afectaban a la apertura de la BHE en el cerebro de rata de una forma reversible. Diferentes DP-BFA tienen diferentes duraciones del efecto de permeabilización.

### Ejemplo 22

#### 30 *Estudios de toxicología y seguridad*

Se evaluó la seguridad y toxicidad de las moléculas DP-BFA. Se administraron dosis crecientes de los compuestos ensayados por vía intraarterial (i.a.) a ratas, siguiendo el protocolo descrito antes en el ejemplo 17. La viabilidad animal se siguió durante 24 horas para evaluar las concentraciones letales (CL). La CL se define como la concentración  
35 mínima que causa la muerte.

TABLA 8

*Datos de seguridad comparativos de diferentes DP-BFA (en ratas)*

Molécula*	CL ( $\mu\text{M}$ )	CME	Seguridad CL/CME
3,12#	40 $\pm$ 10	6,5 $\pm$ 0,7	6,1
3,14#	78 $\pm$ 11	9,1 $\pm$ 1,2	8,6
3,16#	431 $\pm$ 55	18 $\pm$ 2	23,9
7,7#	360 $\pm$ 67	132 $\pm$ 19	2,7
3,12- $\text{PO}_4$ #	63 $\pm$ 12	3,3 $\pm$ 0,5	19,1
3,14- $\text{PO}_4$ #	134 $\pm$ 18	6,2 $\pm$ 0,9	21,6
3,12-MEG- $\text{PO}_4$	80 $\pm$ 15	11 $\pm$ 2	7,5
3,12-DEG- $\text{PO}_4$	30 $\pm$ 5	3,0 $\pm$ 0,5	10
3,12-PC#	80 $\pm$ 16	23 $\pm$ 4	3,5
3,12-MEG-PC	15 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1	1,5
3,12-DEG-PC	300 $\pm$ 60	15 $\pm$ 2	20
* sal de sodio			
# Ejemplos de referencia			

## ES 2 338 987 T3

El índice de seguridad se define como la relación entre la dosis letal (CL) y la concentración mínima eficaz (CME), en la que la CME corresponde a una concentración calculada del compuesto ensayado que provoca la acumulación de 3 veces la cantidad de azul de Evans acumulada en animales de control tratados con vehículo solo, es decir, acumulación total de 3 µg de EB. Cuanto mayor es la relación de CL/CME mayor, es el índice de seguridad.

5

Conclusiones: la introducción de un grupo fosfato aumentó el índice de seguridad en 2-3 veces, sin dificultar la potencia de forma significativa.

### 10 Ejemplo 23

*Sistema de modelo in vivo para medir el efecto de DP-BFA en la permeabilización de la BHT (ratas portadoras de tumores)*

15 Con el fin de estudiar la capacidad de los compuestos DP-BFA de modular la barrera hematotumoral (BHT), se usó un sistema de modelo de ratas portadoras de glioma C6.

20 Se inocularon en ratas Sprague Dawley (SP) células de gliosarcoma C6 siguiendo el procedimiento descrito por Bartus *et al.* (*Exp. Neurol.* (1996); 142:14-28). Se hizo un pequeño agujero con taladro en el hueso frontal del cráneo de la rata fijada en un aparato de estereotaxis. Usando una jeringa de Hamilton, se inocularon 10 µl o 5 µl de medio que contenía  $2,5 \times 10^5$  células de gliosarcoma C6 en la corteza frontal. Las coordenadas eran 1 mm posterior al bregma, 2,5 mm lateral y 3 mm de profundidad. La aguja permaneció en el sitio durante 5 min. Después de sacar la aguja, se suturaron la fascia y el cuero cabelludo. Las ratas se comprobaron 6-8 días después de la inoculación, cuando se

25

El tumor se pesó después de visualización de la F-Na y disección. Partes de los cerebros de las ratas se sometieron a exámenes histológicos y se siguió la absorción de azul de Evans y fluoresceína en el tejido ipsilateral del tumor, tejido peritumoral y tejido contralateral.

30 Los resultados (no se muestran) obtenidos de los experimentos llevados a cabo en ratas portadoras de tumor de control (no tratadas con los compuestos de la invención) demostraron que la permeabilidad de la barrera hematotumoral (BHT) para el EB y la fluoresceína es aproximadamente 2 veces y 4 veces mayor respectivamente, que la encontrada para la BHE intacta.

35

### Ejemplo 24

*Efectos de diferentes moléculas BFA en la apertura de la BHE y BHT (estudio en ratas portadoras de tumor)*

40 Se usó el sistema de modelo de tumor bilateral de ratas portadoras de glioma C6 descrito en el ejemplo 23 anterior, para seleccionar diferentes derivados de DP-BFA por su capacidad para permeabilizar la barrera hematoencefálica (BHE) en comparación con su efecto en la barrera hematotumoral (BHT). Se siguió el procedimiento experimental descrito en el ejemplo 23, excepto que las ratas portadoras de tumor se trataron además con DP-BFA. Los compuestos ensayados, en concentraciones de aproximadamente sus valores de  $CE_{50}$ , se administraron por infusión de forma unilaterial en la arteria carótida externa a lo largo de 30 segundos como se describe en el ejemplo 17. Los animales tratados con vehículo solo sirven de grupo de control. El efecto de permeabilización se cuantificó midiendo la acumulación de colorante azul de Evans unido a albúmina en el tumor (T) frente a tejidos no tumorales (NT).

45

50 Los valores de eficacia y los índices de especificidad calculados se resumen en la Tabla 9. El índice de especificidad se define como la relación entre los niveles de EB acumulados en el tumor y los acumulados en los tejidos cerebrales no tumorales (T/NT).

55

60

65

# ES 2 338 987 T3

TABLA 9

*Comparación de la apertura de la BHE y BHT por diferentes DP-BFA*

Molécula	CE <sub>50</sub> * ( $\mu$ M)	BHT EB $\mu$ g/g Tumor	BHE EB $\mu$ g/g cerebro sin tumor	Especificidad Tumor/ No tumor
3,12Na#	22 $\pm$ 4	44 $\pm$ 8	43 $\pm$ 9	1,1 $\pm$ 0,3
3,12-PO <sub>4</sub> #	10 $\pm$ 2	14 $\pm$ 6	2,5 $\pm$ 1,5	6,3 $\pm$ 1,3
3,12-MEG-PO <sub>4</sub>	22 $\pm$ 3	25 $\pm$ 3	21 $\pm$ 4	1,2 $\pm$ 0,2
3,12-DEG-PO <sub>4</sub>	7 $\pm$ 2	34 $\pm$ 8	2,0 $\pm$ 0,2	22 $\pm$ 5
3,12-PC#	52 $\pm$ 7	17 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2	1,8 $\pm$ 0,5
3,12-MEG-PC	20	12	6	2
3,12-DEG-PC	60	11	5	2
Manitol#	25%	12 $\pm$ 2	7 $\pm$ 2	2,1 $\pm$ 0,5
* Valores de CE <sub>50</sub> para ratas portadoras de tumor				
# Ejemplos de referencia				

Como puede verse en la Tabla 9, la mayoría de los compuestos ensayados han mostrado niveles similares de acumulación de EB en el tumor y en tejidos cerebrales no tumorales, es decir, relaciones de T/NT de aproximadamente 1 a 2. Con manitol (25%) la acumulación de EB en el tumor era aproximadamente el doble de la acumulación en el cerebro no tumoral. En el sistema experimental usado, el compuesto 3,12-DEG-PO<sub>4</sub>, mostró una especificidad alta para la apertura de la barrera hematotumoral (BHT) manifestado como acumulación de EB en el tumor, que era 22 veces más alta que los niveles de EB en el tejido no tumoral (relación de T/NT = 22).

Conclusión: el 3,12-DEG-PO<sub>4</sub> mostró el efecto más específico en la apertura de la BHT en los tumores de glioma C6. Este compuesto permeabiliza la barrera hematotumoral (BHT) de gliomas C6 en mayor extensión que la barrera hematoencefálica (BHE) normal. Por lo tanto, los derivados de DP-BFA pueden servir como agentes capaces de abrir de forma específica y selectiva la BHT.

## Ejemplo 25

### *Administración de DP-BFA unilateral en ratas SD portadoras de tumor*

Se examinó la penetración del azul de Evans y la fluoresceína en tumores glioma después de infusión unilateral en la arteria carótida externa de 3,12-DEG-HPO<sub>4</sub>Na 10  $\mu$ M (Fig. 2A), 3,12-Na BFA 40  $\mu$ M (Fig. 2B) o manitol al 25% (Fig. 2C). El compuesto relevante se administró por infusión en cerebros de rata 9 a 12 días después de la inoculación de células de glioma C6 como se describe en el ejemplo 23.

Se puede ver claramente en la figura 2A que la tinción de azul de Evans después de la administración de 3,12-DEG-PO<sub>4</sub> a ratas con gliomas bilaterales es solo en el tejido tumoral en el hemisferio ipsilateral. Por otra parte, el homólogo de carbonos del DP-BFA, es decir BFA-3,12, y el agente hiperosmótico manitol, permeabilizaban igual los tejidos tumorales y no tumorales del cerebro.

## Ejemplo 26

### *Efecto de DP-BFA en la permeabilización de la barrera hematorretiniana (BHR)*

Se investigó la permeabilización de la barrera hematorretiniana (BHR) por DP-BFA en ratas por seguimiento de la pérdida del marcador fluorescente, sal sódica de la fluoresceína (F-Na), de los vasos sanguíneos de la esclerótica.

## ES 2 338 987 T3

Ratas Sprague Dawley (SD) que pesaban 250 a 350 gramos se anestesiaron con una disolución de ketamina (140 mg/ml) y xilasina (2%) inyectada en 0,1 ml/100 g de peso corporal. A los animales anestesiados se les inyectaron 0,25 ml de F-Na (12,5 mg/ml) en la vena yugular). Los vasos sanguíneos retinales se grabaron con una cámara de color 3-CCD (teli CS5850) unida con una montura C al microscopio INAMI L-0960 para cirugía oftálmica. El microscopio está equipado con una fuente de luz y un filtro adecuado para detectar la F-Na. Después de 10 min la retina se limpió de F-Na. En este momento, se inyectaron por vía intraarterial 1,5 ml de 3,12-DEG-HPO<sub>4</sub>Na (12,5 µg/ml) a lo largo de un periodo de 30 segundos, acompañada de una segunda inyección i.v. de F-Na. Se tomaron fotos de los vasos sanguíneos en t=0 y 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 y 10 minutos después de la administración del fármaco. Se repitió el mismo experimento en un segundo grupo de ratas de control, a las que se inyectaron 1,5 ml de vehículo (Tab-manitol al 5%) por vía intraarterial en lugar de 3,12-DEG-HPO<sub>4</sub>Na.

Mediante el seguimiento de la distribución de F-Na en los vasos sanguíneos en la parte posterior del ojo del animal, a nivel de la retina, se demostró que 10 minutos después de la administración de F-Na sola, todo el colorante fluorescente se había aclarado de la región que rodeaba los vasos sanguíneos retinales. Sin embargo, la inyección i.v. de F-Na en combinación con inyección i.a. de 3,12-DEG-HPO<sub>4</sub>Na, daba como resultado la acumulación de F-Na alrededor de los vasos sanguíneos a nivel retinal. Este escape de F-Na de los vasos sanguíneos, en presencia de 3,12-DEG-HPO<sub>4</sub>Na, es un indicador de la permeabilización de la barrera hematorretiniana. En los animales de control, en los que se administró solo vehículo en lugar de fármaco de DP-BFA, los resultados eran similares a los de los animales a los que se inyectó F-Na solo, en concreto 10 minutos después de la administración, no se pudo detectar fluorescencia en los vasos sanguíneos o en la región que los rodea a nivel retinal. Los resultados representados en las figuras 3A-C representan la angiografía del ojo, en particular fotos de la imagen del suministro de sangre al ojo tomadas a nivel de la retina, registradas a los 30 segundos y 10 minutos después de la administración de F-Na sola (Fig. 3A) o en combinación con 3,12-DEG-HPO<sub>4</sub>Na (Fig. 3B) o vehículo (Fig. 3C).

De acuerdo con esta observación, a los 10 minutos después de la administración de F-Na, se podían detectar cantidades mayores de F-Na en el vítreo de los animales tratados con 3,12-DEG-HPO<sub>4</sub>Na que en el vítreo de los animales de control a los que se inyectó F-Na y vehículo solo (Figuras 4A-B). La acumulación de la señal fluorescente en el vítreo se debe a la permeabilización de la BHR y el escape de F-Na de los vasos sanguíneos a nivel de la retina. Conclusión: el 3,12-DEG-HPO<sub>4</sub>Na permite la permeabilización de la barrera hematorretiniana, y da como resultado la acumulación de F-Na en la retina y el vítreo.

### Ejemplo 27

#### 35 Actividad antitumoral de DP-BFA

Se estudiaron los efectos antitumorales de diferentes P-BFA en el sistema de modelo *in vivo* descrito antes en el ejemplo 17. Los P-BFA ensayados se administraron por vía intraarterial en las concentraciones previamente determinadas como eficaces en la permeabilización de la BHE y la BHT para la extravasación de azul de Evans y fluoresceína. Se siguió el procedimiento experimental para la inoculación de tumor, como se describe en el ejemplo 23.

El día 3-4 después de inoculación de las células de gliosarcoma C6, la rata se canuló por la arteria carótida externa y los P-BFA ensayados se administraron por infusión durante 30 segundos, como se describe en el ejemplo 17, excepto que en este experimento no se administraron marcadores. Las ratas tratadas se mantuvieron hasta el día 7-9 y después se sacrificaron. Se obtuvieron las secciones coronales, se tiñeron con eosina-hematoxilina, y se hizo una revisión histológica para determinar el volumen del tumor. Los animales tratados con vehículo solo sirven como control. Se usaron el error típico y el ensayo de Student para la significancia estadística. Los resultados se resumen en la Tabla 10.

Como puede verse a partir de los resultados en la Tabla 10, los compuestos P-BFA presentan efecto citostático en el crecimiento tumoral del glioma *in vivo*. En las condiciones experimentales usadas, el compuesto 3,12-DEG-PO<sub>4</sub> presentaba el efecto antitumoral más pronunciado. Otros compuestos, p. ej., 3,12-MEG-PC, también demostraron una actividad antitumoral significativa, aunque en menor medida.

Conclusión: los P-BFA administrados por vía intraarterial en las ratas portadoras de glioma C6 presentan efecto citotóxico en el tumor.

TABLA 10

*Efectos antitumorales de diferentes P-BFA en el crecimiento tumoral*

Molécula	Concentraciones de P-BFA ( $\mu\text{M}$ )	Volumen del tumor ( $\text{mm}^3$ ) $\pm$ ET	P (respecto al control)
Control	0	8,1 $\pm$ 2,22	-
3,12-MEG-HPO <sub>4</sub> Na	30	4,2 $\pm$ 1,6	>0,1
3,12-PC#	50	3,8 $\pm$ 0,8	>0,1
3,12-MEG-PC	10	2,88 $\pm$ 0,6	<0,05*
3,12-DEG-PC	60	3,9 $\pm$ 1,0	>0,1
3,12-DEG-HPO <sub>4</sub> Na	5	1,5 $\pm$ 0,3	<0,01*
3,12-DEG-PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub>	30	1,6 $\pm$ 0,4	<0,01*

ET - error típico de la media,  
 \* - diferencia estadísticamente significativa.  
 # Ejemplo de referencia

Ejemplo 28

*Efecto antitumoral de DP-BFA*

El efecto antitumoral de DP-BFA se evaluó por seguimiento del volumen del tumor y aspecto en un sistema de modelo de ratas portadoras de glioma C6. Se inoculó a ratas Sprague Dawley (SD)  $2,5 \times 10^5$  células de glioma en  $5 \mu\text{l}$  de PB como sigue. Las ratas se montaron en un soporte de la cabeza estereotáxico en una posición con el cráneo plano. Después de reflexión del periostio se taladró un agujero con un taladro de 1 mm en las siguientes coordenadas: bregma -1,0, 3,50 mm lateral desde la línea media en el lado izquierdo, y a una profundidad de 3,50 mm. La suspensión de células se inyectó manualmente a una profundidad de 3,50 mm usando una jeringa de Hamilton de  $10 \mu\text{l}$ . Las ratas portadoras de tumor se trataron 72 h después de inoculación con una sola dosis, en el intervalo de 5 a  $20 \mu\text{M}$  de fosfato de 3,12-dietilenglicol (3,12-DEG-PO<sub>4</sub>; sal sódica) o vehículo (tampón isoosmótico, pH 7,4) administrado por infusión en la arteria carótida externa durante 30 s a una velocidad de 3 ml/min. Se ligó la arteria pterigopalatina, y la arteria carótida común se sujetó con pinzas en el momento de la infusión.

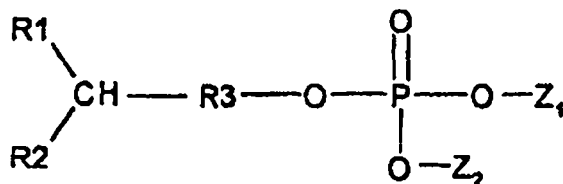
Cinco días después de la inoculación de células tumorales C6, las ratas se anestesiaron con ketamina/xilazina (1:1) 0,1 ml/100 g de peso corporal, se perfusionaron con disolución salina y se fijaron con disolución de formaldehído al 4%. Se sacaron los cerebros y se crioprotegieron en una disolución de sacarosa durante 48 h. Después se cortaron los cerebros en láminas finas en sección coronal, se tiñeron con hematoxilina-eosina y se sometieron a evaluación patológica.

Se observó una disminución significativa del tamaño del tumor en los animales tratados en comparación con los animales no tratados. El volumen del tumor era  $8,1 \pm 2,2 \text{ mm}^3$  (N=7) en los animales tratados con vehículo y  $1,6 \pm 0,2 \text{ mm}^3$  (N=12) en los animales tratados con 3,12-DEG-PO<sub>4</sub>. Además, el microentorno y la naturaleza del crecimiento del tumor eran diferentes. Las ratas portadoras de tumor tratadas con vehículo presentaban una expansión celular local remarcable en la corteza, materia blanca y meninges. Los gliomas C6 aparecían irregulares y muy infiltrantes y mostraron una tendencia alta a la invasión por los espacios linfáticos perivascuales. En contraste, el tratamiento con DP-BFA, dado una vez el tercer día después de la inoculación de células, cambió significativamente el carácter del crecimiento del tumor. La capacidad de invasión del glioma C6 por los espacios perivascuales disminuyó y se observó un tumor sólido con borde definido. Se encontró cierta invasión limitada en las meninges alrededor de la zona de inoculación y subependima. Conclusión, el 3,12-DEG-PO<sub>4</sub> mostró un efecto antitumoral significativo inhibiendo la capacidad de invasión del tumor y la velocidad de crecimiento. Por lo tanto, los compuestos DP-BFA pueden ser útiles para inhibir la expansión y la capacidad de invasión de los tumores.

El experto en la técnica apreciará que los principios de la presente descripción pueden amoldarse a muchas realizaciones y variaciones o modificaciones, todas las cuales están dentro del alcance de la invención. Se pretende que los ejemplos sean interpretados como no limitantes, y el alcance de la invención está definido por las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula general I:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, en la que:

R1 y R2 son cadenas alifáticas saturadas o insaturadas diferentes, que comprenden de 2 a 30 átomos de carbono;

R3 es A-[CH<sub>2</sub>]<sub>m</sub>-B-[CH<sub>2</sub>]<sub>n</sub>-C-[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-D, en el que m, n y p son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 12, y A, B, C y D se selecciona cada uno independientemente de un enlace covalente, grupo amino, amido, oxígeno, tio, carbonilo, carboxilo, oxicarbonilo, tiocarbonilo, fosfato, aminofosfato, mono, di y triaminofosfato, con la condición de que 2 átomos de oxígeno no estén conectados directamente entre sí, en el que -R3-O- comprende un resto monoetilenglicol o dietilenglicol.

Z<sub>1</sub> y Z<sub>2</sub> son iguales o diferentes, cada uno puede estar ausente o se selecciona independientemente de a) hidrógeno, sodio, litio, potasio, amonio, mono, di, tri y tetraalquilamonio, o b) junto con el grupo fosfo forman un fosfoéster de glicerol, colina, etanolamina, inositol, serina, mono u oligosacárido.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R1 es de 3 átomos de carbono de longitud y R2 es de 12 a 16 átomos de carbono de longitud.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que R1 es propilo y R2 es dodecilo.

4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el número total de átomos de carbono en R2 y R3 juntos es de 6 a 26.

5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el número total de átomos de carbono en R2 y R3 juntos es de 16 a 22.

6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que Z<sub>1</sub> es colina.

7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que Z<sub>1</sub> es sodio y Z<sub>2</sub> se selecciona de hidrógeno y sodio.

8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en:

Fosfato de 2-(4-hexadecilcarboxil)etilo (3,12-MEG-PO<sub>4</sub>),

Fosfato de 2-[2-(4-hexadecilcarboxil)etoxi]etilo (3,12-DEG-PO<sub>4</sub>),

Fosfato de 2-(4-hexadeciloxi)etilo (3,12-(éter)-MEG-PO<sub>4</sub>),

Fosfato de 2-[2-(4-hexadeciloxi)etoxi]etilo (3,12-(éter)-DEG-PO<sub>4</sub>),

2-(4-Hexadecilcarboxil)etilfosfocolina (3,12-MEG-PC),

2-[2-(4-Hexadecilcarboxil)etoxi]etilfosfocolina (3,12-DEG-PC),

Fosfato de 2-{2-[10-(4-hexadeciloxi)deciloxi]etoxi}etilo (3,12-O-C<sub>10</sub>-DEG-PO<sub>4</sub>),

2-{2-[10-(4-Hexadeciloxi)deciloxi]etoxi}etilfosfocolina (3,12-O-C<sub>10</sub>-DEG-PC),

Fosfato de 2-(4-octadeciloxi)etilo (3,14-MEG-PO<sub>4</sub>),

Fosfato de 2-[2-(4-octadecilcarboxil)etoxi]etilo (3,14-DEG-PO<sub>4</sub>),

Fosfato de 2-(4-octadeciloxi)etilo (3,14-(éter)-MEG-PO<sub>4</sub>),

## ES 2 338 987 T3

Fosfato de 2-[2-(4-octadeciloxi)etoxi]etilo (3,14-(éter)-DEG-PO<sub>4</sub>),

2-(4-Octadecilcarboxil)etilfosfocolina (3,14-MEG-PC),

5 2-[2-(4-Octadecilcarboxil)etoxi]etilfosfocolina (3,14-DEG-PC),

Fosfato de 2-(4-icosilcarboxil)etilo (3,16-MEG-PO<sub>4</sub>),

10 Fosfato de 2-[2-(4-icosilcarboxil)etoxi]etilo (3,16-DEG-PO<sub>4</sub>),

Fosfato de 4-icosaniloxietilo (3,16-(éter)-MEG-PO<sub>4</sub>),

Fosfato de 2-[2-(4-icosiloxi)etoxi]etilo (3,16-(éter)-DEG-PO<sub>4</sub>),

15 2-(4-Icosilcarboxil)etilfosfocolina (3,16-MEG-PC),

2-[2-(4-Icosilcarboxil)etoxi]etilfosfocolina (3,16-DEG-PG),

20 Fosfato de 2-[2-(2-propilicosilcarboxil)etoxi]etilo (3,18-DEG-PO<sub>4</sub>), y

2-[2-(2- Propilicosilcarboxil)etoxi]etilfosfocolina (3,18-DEG-PC).

9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es fosfato de {2-[2-(4-hexadecilcarboxil)etoxi]etilo}, sal monosódica; fosfato de {2-[2-(4-hexadecilcarboxil)etoxi]etilo}, sal disódica; fosfato de 2-[2-(4-hexadeciloxi)etoxi]etilo; 2-(4-hexadecilcarboxil)etilfosfocolina; o 2-[2-(4-Hexadecilcarboxil)etoxi]etilfosfocolina.

10. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

30 11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, que además comprende un agente biológicamente activo.

12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el agente biológicamente activo es un agente terapéutico, un fármaco anticancerígeno o un agente de diagnóstico.

35 13. Uso de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la fabricación de un medicamento.

40 14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el medicamento es para aumentar la permeabilidad de una barrera biológica.

15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la barrera biológica se selecciona del grupo que consiste en piel, córnea, epitelio conjuntival, nasal, bronquial, bucal, vaginal y gastrointestinal, barrera hematorretiniana, barrera hematoencefálica, barrera hematotesticular, barrera hematotumoral e interfase hematorrenal.

45 16. Uso de un agente biológicamente activo y una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de la reivindicación 10, para la fabricación de un medicamento para permitir o aumentar la penetración y/o acumulación del agente biológicamente activo en un sitio u órgano privilegiado.

50 17. El uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicho sitio u órgano privilegiado es la médula espinal, cerebro, ojo, testículo, una glándula o tumor.

18. Uso de una composición farmacéutica de la reivindicación 10, en combinación con un agente terapéutico para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno del sistema nervioso central.

55 19. El uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que dicho agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en agentes antitumorales, antivíricos, antimicrobianos, antifúngicos, antiinflamatorios, neuroprotectores y péptidos y proteínas bioactivos.

20. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el medicamento es para el tratamiento de un tumor.

60 21. El uso de acuerdo con la reivindicación 20, que además comprende administrar al paciente que lo necesite, una cantidad eficaz de un agente anticancerígeno.

65 22. El uso de acuerdo con la reivindicación 21, en el que dicho fármaco anticancerígeno se administra en una composición farmacéutica separada.

23. El uso de acuerdo con la reivindicación 20, en el que el tumor está en el sistema nervioso central.

## ES 2 338 987 T3

24. El uso de acuerdo con la reivindicación 20, en el que el tumor está en el cerebro.

25. El uso de acuerdo con la reivindicación 20, en el que el tumor se selecciona del grupo que consiste en carcinoma, glioma, neuroblastoma, retinoblastoma, linfoma, leucemia, sarcoma y melanoma.

26. El uso de acuerdo con la reivindicación 20, en el que dicho tumor es un tumor primario o secundario.

27. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad o trastorno oftalmológico.

28. El uso de acuerdo con la reivindicación 27, que además comprende administrar al sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de un agente biológicamente activo adicional.

29. El uso de acuerdo con la reivindicación 27, en el que la enfermedad o trastorno oftalmológico se selecciona de edema macular cistoide (EMC), degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), infecciones intraoculares, inflamaciones intraoculares y tumores malignos intraoculares.

30. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 29, en el que el medicamento se administra por administración oral, parenteral o tópica, o por perfusión regional, enema o lavado intraórgano.

31. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 29, en el que el medicamento se administra por vía intraarterial o intratecal.

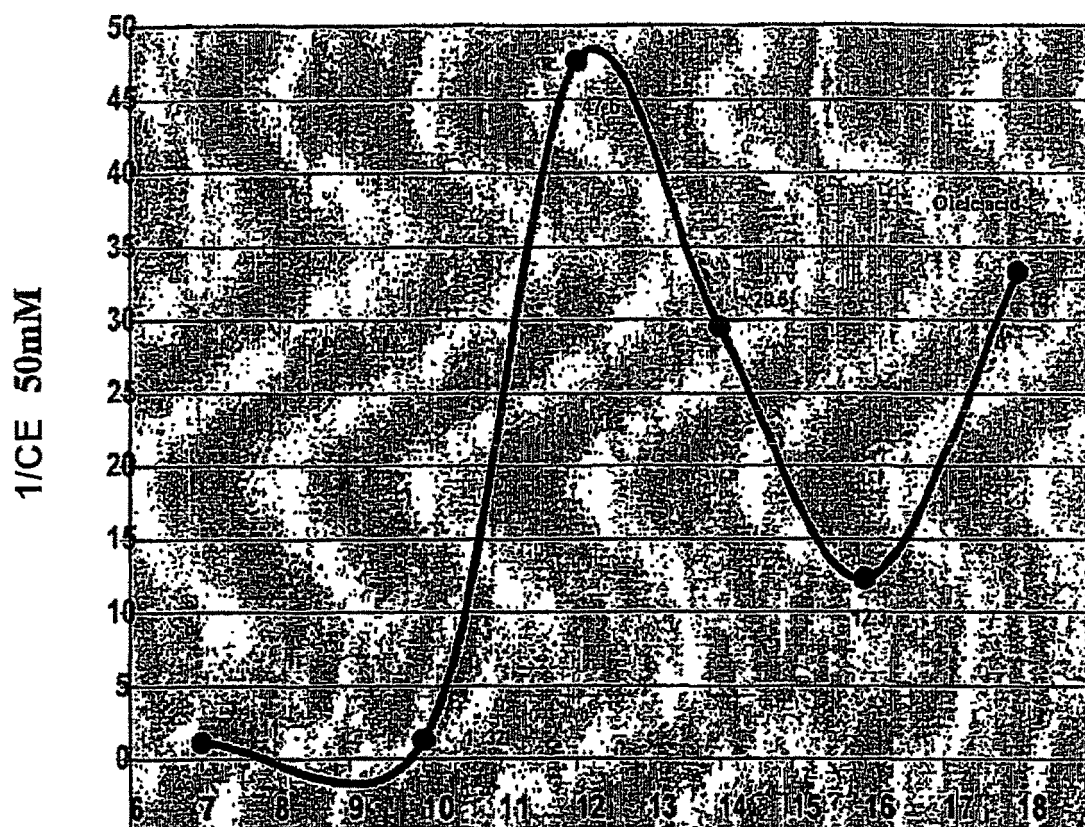
32. El uso de un agente de diagnóstico en combinación con una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de la reivindicación 10, para la fabricación de un medicamento para aumentar la acumulación de un agente de diagnóstico en un órgano protegido por una barrera biológica.

33. El uso de acuerdo con la reivindicación 32, en el que dicho órgano protegido por una barrera biológica es el sistema nervioso central.

34. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para usar para aumentar la permeabilidad de una barrera biológica.

35. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para usar en el tratamiento de un tumor.

FIG. 1



$n$  - número de átomos de C

FIG. 2A



FIG. 2B



FIG. 2C



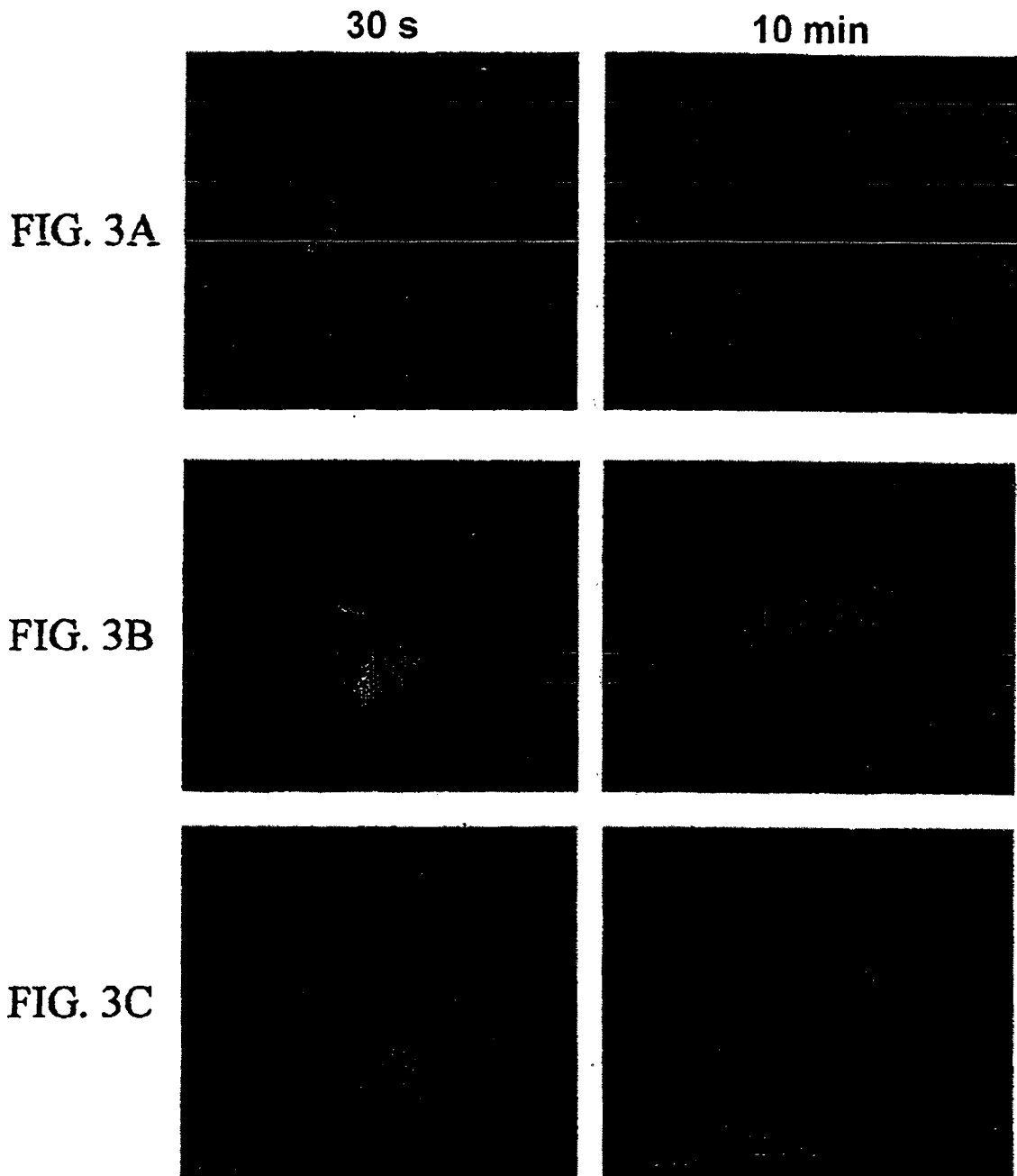


FIG. 4A



FIG. 4B

