

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 322**

51 Int. Cl.:

C07C 319/02 (2006.01)

C07C 319/14 (2006.01)

C07C 321/08 (2006.01)

C07C 323/22 (2006.01)

C07C 327/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.07.2014 PCT/EP2014/065853**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015 WO15011206**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2014 E 14742219 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 3024818**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de un compuesto de cetona poliinsaturado**

30 Prioridad:
24.07.2013 GB 201313238

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.05.2018

73 Titular/es:
**AVEXXIN AS (100.0%)
Nordahl Bruns vei 2A
7052 Trondheim, NO**

72 Inventor/es:
**SANDBERG, MARCEL y
AUKRUST, INGER REIDUN**

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

ES 2 668 322 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

Procedimiento para la preparación de un compuesto de cetona poliinsaturado

5 Campo de la invención

La invención se refiere en general a un método para la preparación de un compuesto de éster o tioéster poliinsaturado. La invención se refiere además a la conversión del tioéster en su tiol correspondiente y a la conversión de ese tiol en una cetona poliinsaturada. Más concretamente, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un tioéster poliinsaturado y, por tanto, también al subsiguiente tiol y compuesto de cetona poliinsaturado en el que las reacciones indeseadas de oxidación y de isomerización *cis/trans* se reducen sustancialmente o se eliminan durante la síntesis.

15 Antecedentes

Muchos ácidos grasos poliinsaturados biológicamente activos tienen uno o más dobles enlaces carbono-carbono en la configuración *cis*. Se ha informado de que los radicales libres apoyan la isomerización de estos enlaces a una configuración *trans* menos deseable. La isomerización *cis/trans* puede afectar negativamente a los compuestos poliinsaturados destinados al uso farmacéutico, por ejemplo, reduciendo la actividad biológica, y/o complicando la síntesis. Véase, por ejemplo, C. Ferreri *et al.* (2007) *Mol. Biotech.* 37:19; Chatgialiloglu, C *et al.* (2002) *Free Rad. Biology & Medicine*, 33: 1681; y el documento WO 2002/100991.

Se ha informado de que algunos radicales libres, pero no todos, apoyan la isomería *cis/trans* de determinados compuestos poliinsaturados. Se cree que la cinética de la oxidación mediada por radicales depende de varios parámetros, incluyendo la naturaleza química del compuesto insaturado que se va a preparar, la temperatura, el pH, la presencia o ausencia de luz, oxígeno, etc. Se ha informado de que los radicales libres se generan de forma natural en el medio ambiente o como subproductos no deseados que se producen a partir de ciertas reacciones químicas. Véase, por ejemplo, Mengele, E.A *et al.* (2010) *Mos. Univ. Chemistry Bull* 65: 210.

30 Ha habido intentos de reducir la oxidación y la isomería *cis/trans* de los dobles enlaces carbono-carbono. En un enfoque, se añade un antioxidante tal como, por ejemplo, galato de octilo, ácido ascórbico, un polifenol, mercaptoetanol, betacaroteno o 2,6,-di-terc-butil-4-metilfenol (BHT) para reducir las reacciones de oxidación no deseadas. Véase Mengele, E.A, *ibid.*; Klein, E y N. Weber (2001) *J. Agric. Food Chem.* 49:1224; y Hung, W-L, *et al.* (2011) *J. Agric. Food Chem.* 1968.

35 Ha habido informes de que ciertos compuestos de trifluorometilcetona poliinsaturados tienen actividades biológicas útiles. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 7.687.543; Huwiler, A *et al.* (2012) *Br. J. Pharm.* 167: 1691.

40 Se han desvelado métodos para preparar cetonas poliinsaturadas particulares. En un método que desvela la síntesis de trifluorometilcetonas poliinsaturadas particulares, se usó una reacción de tipo Mitsunobu para transformar un alcohol en el tioéster correspondiente. Se señaló que reacciones químicas adicionales producían la trifluorometilcetona poliinsaturada (compuesto 18) con un rendimiento del 71 %. Véase Holmeide, A y L. Skattebol (2000) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 2271.

45 Existe un reconocimiento general de que un compuesto destinado a uso farmacéutico debería producirse con un alto rendimiento, por ejemplo, de un 70 % o más. Los rendimientos menos que satisfactorios pueden asociarse con productos secundarios no deseados. Estos pueden ser costosos o difíciles de eliminar del producto principal (API), lo que dificulta el desarrollo farmacéutico adicional. Adicionalmente, las agencias reguladoras a menudo requieren un análisis detallado de los productos secundarios de los compuestos destinados al uso farmacéutico. Este requisito puede hacer que los costes de ampliación sean prohibitivos.

50 Se ha informado de que la reacción de Mitsunobu implica la adición de un nuevo grupo funcional, a menudo un éster, a un alcohol primario o secundario utilizando, entre otros reactivos, una fosfina y un azodicarboxilato. Se ha informado de que el mecanismo de reacción es complejo y existe controversia sobre la identidad de los intermedios de reacción. Véase, por ejemplo, But, T y P. Toy (2007) *Chem. Asian J.* 2: 1340; y Swamy, K.C *et al.* (2009) *Chem. Rev.* 109: 2551. Esto hace que el resultado de ciertas reacciones de Mitsunobu sea difícil de predecir.

55 En muchos casos, se lleva a cabo una reacción de Mitsunobu mezclando el alcohol, el reactivo de ácido carboxílico y la fosfina en un disolvente a baja temperatura. A continuación, normalmente se añade el azodicarboxilato y la reacción se agita durante varias horas para permitir que el ácido carboxílico reaccione con el alcohol y forme un éster. Los presentes inventores han descubierto que este procedimiento proporciona impurezas en el contexto de los compuestos poliinsaturados de la invención. Por ejemplo, este orden de reacción a menudo conduce a una oxidación no deseada, y/o isomería *cis/trans* y conduce a picos claros de impurezas en HPLC.

65

Los presentes inventores buscan un procedimiento para la fabricación de un éster o tioéster poliinsaturado y en última instancia una cetona poliinsaturada correspondiente que produzca, después de una adecuada purificación, un compuesto de grado farmacéutico con mínima oxidación e isomerización cis/trans por productos.

5 Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto que el uso de la reacción de Mitsunobu no proporciona convencionalmente una cetona poliinsaturada con pureza y rendimiento suficientes para uso farmacéutico. Sin embargo, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la química de Mitsunobu puede usarse para hacer que los compuestos particulares desvelados en el presente documento sean adecuados para uso farmacéutico si se emplea un orden de reacción particular y en presencia de al menos un antioxidante. Más específicamente, se ha encontrado un método para preparar de manera directa un éster o tioéster poliinsaturado farmacéuticamente aceptable, que pueda en última instancia convertirse en los compuestos de cetona ventajosos descritos en el presente documento, en los que la oxidación no deseada y la isomerización cis/trans se reducen sustancialmente o se eliminan. La práctica de los métodos de la invención se puede usar para producir una variedad de compuestos de cetonas poliinsaturadas adecuados para uso farmacéutico, que incluyen los especificados en el presente documento.

Es, por tanto, un objeto de la invención preparar compuestos de éster o tioéster poliinsaturados farmacéuticamente aceptables, que puedan en última instancia convertirse en los compuestos de cetona ventajosos descritos en el presente documento, en los que la oxidación y la isomerización cis/trans no deseadas se reducen sustancialmente o se eliminan. El método de la invención implica la conversión de un alcohol en un éster o más preferiblemente un tioéster usando química particular de Mitsunobu en presencia de un antioxidante.

Es también un objeto de la invención proporcionar los compuestos objetivo con una alta pureza, tal como la que a menudo requieren las autoridades reguladoras. Se propone que esto se pueda lograr, en el contexto de la reacción de Mitsunobu, desprotonando esencialmente todo el tioácido o ácido nucleófilo en la reacción antes de la adición del alcohol poliinsaturado. También se cree que los anteriores efectos beneficiosos a menudo se pueden incrementar combinando el alcohol poliinsaturado con al menos un antioxidante farmacéuticamente aceptable antes de la adición del alcohol al nucleófilo. Sorprendentemente, la presencia del antioxidante no altera el éxito de la química de Mitsunobu.

Preferiblemente, las etapas posteriores hacia la formación de la cetona poliinsaturada también se realizan en presencia de un antioxidante farmacéuticamente aceptable, igual o diferente, para minimizar el potencial de oxidación o la isomerización cis/trans en reacciones posteriores.

También entra dentro del alcance de la invención que el alcohol poliinsaturado usado se prepare por contacto de un aldehído poliinsaturado con un agente reductor electrófilo adecuado en condiciones suficientes para preparar el alcohol poliinsaturado. Se cree de nuevo que el uso de agentes reductores electrófilos suaves reduce la reducción no deseada de los dobles enlaces, ayudando así a la síntesis global a lograr una mayor pureza.

Por lo tanto, visto desde un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de un éster o tioéster poliinsaturado que comprende:

- 45 (1) combinar, en un primer recipiente, tioácido (-COSH) en presencia de una fosfina y un compuesto de azodicarboxilato en condiciones que desprotonan esencialmente todo el tioácido en su interior;
- (2) combinar, en un segundo recipiente, un alcohol poliinsaturado y al menos un antioxidante farmacéuticamente aceptable; y
- 50 (3) mezclar el contenido del primer y segundo recipientes para formar dicho tioéster poliinsaturado.

Visto desde otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de un tiol poliinsaturado que comprende:

- 55 (1) combinar, en un primer recipiente, un tioácido en presencia de una fosfina y un compuesto de azodicarboxilato en condiciones que desprotonan esencialmente todo el tioácido en su interior;
- (2) combinar, en un segundo recipiente, un alcohol poliinsaturado y al menos un antioxidante farmacéuticamente aceptable;
- (3) mezclar el contenido del primer y segundo recipientes para formar dicho tioéster poliinsaturado; y
- 60 (4) añadir al menos un antioxidante farmacéuticamente aceptable al tioéster poliinsaturado de la etapa (3), que puede ser igual o diferente del antioxidante utilizado en la etapa (2), y reducir el tioéster de la etapa (3) en condiciones suficientes para producir un tiol poliinsaturado.

Visto desde otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de un compuesto de cetona poliinsaturado que comprende:

65

(1) combinar, en un primer recipiente, un tioácido en presencia de una fosfina y un compuesto de azodicarboxilato en condiciones que desprotonan esencialmente todo el tioácido en su interior;

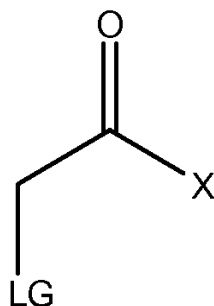
(2) combinar, en un segundo recipiente, un alcohol poliinsaturado y al menos un antioxidante farmacéuticamente aceptable;

(3) mezclar el contenido del primer y segundo recipientes para formar dicho tioéster poliinsaturado;

(4) añadir al menos un antioxidante farmacéuticamente aceptable al tioéster poliinsaturado de la etapa (3), que puede ser igual o diferente del antioxidante utilizado en la etapa (2), y reducir el tioéster de la etapa (3) en condiciones suficientes para producir un tiol poliinsaturado; y

(5) hacer reaccionar dicho tiol poliinsaturado con un compuesto (LG)R³COX

en donde X es un grupo atractor de electrones y R³ es un grupo alquileo que porta un grupo saliente (LG), (tal como un formador LG-CH₂)



donde X es un grupo atractor de electrones y LG es un grupo saliente) opcionalmente en presencia de un antioxidante adicional añadido para formar un compuesto de cetona poliinsaturado, idealmente de fórmula (II) tal como se define en el presente documento.

Visto desde otro aspecto, la invención proporciona el producto de un procedimiento según se ha definido anteriormente en el presente documento.

Visto desde otro aspecto, la invención proporciona un método para producir 1,1,1-trifluoro-3-(((2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-il)tio)propan-2-ona farmacéuticamente aceptable, comprendiendo el método las etapas de:

A) combinar, en un primer recipiente, trifenilfosfina, azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) y ácido tioacético en disolvente para formar una mezcla y hacer reaccionar la mezcla, preferiblemente a una temperatura entre 0-5 °C durante aproximadamente 10-60 minutos, para permitir que se produzca la desprotonación completa;

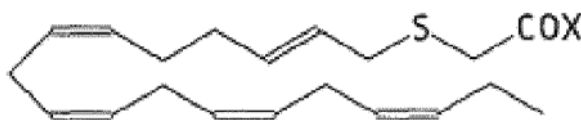
B) combinar, en un segundo recipiente, (2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-ol y (+/-)-α-tocoferol;

C) mezclar el contenido del primer y segundo recipientes, preferiblemente durante un tiempo de entre 10 minutos y 1 hora, para preparar etanoato de S-((2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-ilo);

D) someter el éster producido en la Etapa C) a cromatografía ultrarrápida en seco en condiciones que purifican el éster al menos hasta una pureza del 90 % tal como se determina mediante HPLC (% de área);

E) poner en contacto el éster purificado producido en la Etapa D) con carbonato de potasio y (+/-)-α-tocoferol en condiciones que reducen el grupo éster y produzcan el tiol correspondiente (2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaeno-1-tiol);

F) poner en contacto el tiol producido en la etapa E) con 3-bromo-1,1,1-trifluoroacetona en condiciones que producen la cetona



donde X es CF₃; y

G) purificar la cetona en bruto producida en la etapa F mediante cromatografía ultrarrápida en seco en condiciones que purifican la cetona al menos hasta una pureza del 90 % tal como se determina mediante HPLC (% de área).

Visto desde otro aspecto, la invención proporciona un método para producir un 1,1,1-trifluoro-3-(((3Z,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-3,6,9,12,15-pentaen-1-il)tio)propan-2-ona farmacéuticamente aceptable, que comprende las siguientes etapas:

A) combinar, en un primer recipiente, trifenilfosfina, azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) y ácido tioacético en disolvente para formar una mezcla y hacer reaccionar la mezcla, preferiblemente a una temperatura entre 0-5 °C durante aproximadamente 10-60 minutos, para permitir que se produzca la desprotonación completa;

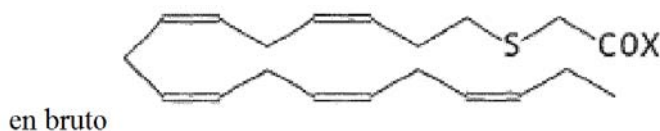
5 B) combinar, en un segundo recipiente, (3Z,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-3,6,9,12,15-pentaen-1-ol y (+/-)- α -tocoferol;

C) mezclar el contenido del primer y segundo recipientes, preferiblemente entre 10 minutos y 1 hora, para preparar etanoato de S-(3Z,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-3,6,9,12,15-pentaen-1-ilo;

10 D) someter el éster producido en la Etapa C) a cromatografía ultrarrápida en seco en condiciones que purifican el éster al menos hasta una pureza del 90 % tal como se determina mediante HPLC (% de área);

E) poner en contacto el éster purificado producido en la Etapa D) con carbonato de potasio y (+/-)- α -tocoferol en condiciones que reducen el grupo éster y produzcan el tiol correspondiente (3Z,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-3,6,9,12,15-pentaeno-1-tiol;

15 F) poner en contacto el tiol producido en la Etapa E) con 3-bromo-1,1,1-trifluoroacetona en condiciones que producen



donde X es CF₃; y

20 G) purificar la cetona en bruto producida en la etapa F mediante cromatografía ultrarrápida en seco y en condiciones que purifican la cetona al menos hasta una pureza del 90 % tal como se determina mediante HPLC (% de área).

25 En cualquiera de los procedimientos de la invención, se prefiere además que el alcohol poliinsaturado se obtenga por reducción de su aldehído correspondiente en presencia de un agente reductor electrófilo tal como DIBAH.

Visto desde otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el producto de un procedimiento según se ha definido anteriormente en el presente documento y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 Definiciones

La expresión éster poliinsaturado o tioéster poliinsaturado se refieren a compuestos que contienen una cadena de hidrocarburos que contiene múltiples dobles enlaces y, por supuesto, un grupo éster o tioéster.

35 Un alcohol poliinsaturado se refiere a un compuesto que contiene una cadena de hidrocarburos que contiene múltiples dobles enlaces y, por supuesto, un alcohol.

Una cetona poliinsaturada se refiere a un compuesto que contiene una cadena de hidrocarburos que contiene múltiples dobles enlaces y, por supuesto, una cetona.

40 Los tioácidos son compuestos que contienen el grupo -CO-SH. El ácido carboxílico o los tioácidos usados en la etapa (1) del procedimiento de la invención son generalmente compuestos de bajo peso molecular que tienen un PM de 250 g/mol o menos.

45 Generalmente, cualquier cetona poliinsaturada de la invención tendrá un PM de menos de 500 g/mol, preferiblemente de 450 g/mol o menos, más preferiblemente de 400 g/mol o menos.

50 La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquello que es útil para preparar un producto farmacéutico que generalmente no es tóxico y ni biológicamente indeseable e incluye aquello que es aceptable para uso veterinario y/o uso farmacéutico humano.

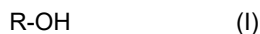
Descripción detallada de la invención

55 La presente invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de un éster o tioéster poliinsaturado y, en última instancia, un tiol poliinsaturado y una cetona poliinsaturada. El procedimiento ofrece altos rendimientos y alta pureza. En particular, se prevé que después de una purificación adecuada, las etapas del procedimiento de la invención proporcionen los compuestos objetivo en grado farmacéutico.

60 La invención proporciona una forma de preparar un éster o tioéster poliinsaturado, la reducción de cualquier tioéster para formar un tiol y la posterior conversión de ese tiol en una cetona en condiciones que proporcionan los compuestos con rendimientos y purezas que a menudo requieren las autoridades reguladoras. Por ejemplo, y sin desear vincularse a ninguna teoría, se cree que la producción de productos de oxidación no deseados en la etapa

(3) anterior puede disminuirse o incluso eliminarse mediante la desprotonación y, por lo tanto, consumiendo esencialmente todo el tioácido en la etapa (1) antes de la adición del alcohol poliinsaturado en la etapa (2). Por consiguiente, la etapa de mezcla (3) tiene lugar después de la reacción de esencialmente todo el ácido/tioácido en la primera etapa (1).

El material de partida en el procedimiento de la invención, usado en la etapa (2), es un alcohol poliinsaturado. Preferiblemente ese alcohol es de fórmula (I)



en donde R es un grupo hidrocarburo insaturado C_{9-23} opcionalmente sustituido opcionalmente interrumpido por uno o más heteroátomos o grupos de heteroátomos seleccionados de S, O, N, SO, SO_2 , comprendiendo dicho grupo hidrocarburo al menos 2, preferiblemente al menos 4, dobles enlaces.

Es preferible que en ningún grupo R los dobles enlaces no estén conjugados. El grupo R preferiblemente comprende de 5 a 9 dobles enlaces, preferiblemente 5 u 8 dobles enlaces, por ejemplo, de 5 a 7 dobles enlaces, tal como 5 o 6 dobles enlaces.

También es preferible que los dobles enlaces no se conjuguen con el grupo hidroxilo.

Los dobles enlaces presentes en el grupo R pueden estar en la configuración cis o trans. Sin embargo, es preferible que la mayoría de los dobles enlaces presentes (es decir, al menos un 50 %) estén en la configuración cis. En realizaciones ventajosas adicionales, todos los dobles enlaces en el grupo R están en la configuración cis o todos los dobles enlaces están en la configuración cis, excepto el doble enlace más cercano al grupo OH que puede estar en la configuración trans.

El grupo R puede tener entre 9 y 23 átomos de carbono, preferiblemente de 11 a 19 átomos de carbono, especialmente de 16 a 18 átomos de carbono. Los átomos de carbono en el grupo R son preferiblemente lineales.

Si bien el grupo R puede estar interrumpido por al menos un heteroátomo o grupo de heteroátomos, eso no es lo preferible y la cadena principal del grupo R preferiblemente contiene solo átomos de carbono.

El grupo R puede estar opcionalmente sustituido, por ejemplo, puede portar hasta tres sustituyentes, seleccionados, por ejemplo, entre halo, alquilo C_{1-6} , por ejemplo, metilo, alcoxi C_{1-6} . Si están presentes, los sustituyentes son preferiblemente no polares y pequeños, por ejemplo, un grupo metilo. Es preferible, sin embargo, que el grupo R permanezca sin sustituir.

El grupo R es preferiblemente lineal, es decir, no hay ramificaciones en la cadena R. Preferiblemente se deriva de una fuente natural tal como un ácido graso o éster de cadena larga. En particular, el grupo R puede derivar de ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico o ácido eicosapentaenoico.

Por lo tanto, el alcohol poliinsaturado de uso en la invención puede derivarse de un ácido graso o aldehído correspondiente (como se describe a continuación en el esquema 1). Además, se ha descubierto que cuando el alcohol poliinsaturado deriva de su aldehído correspondiente, ese alcohol poliinsaturado se obtiene preferiblemente en una reacción que implica poner en contacto un aldehído poliinsaturado con un agente reductor electrófilo adecuado en condiciones suficientes para preparar el alcohol poliinsaturado. Sin desear vincularse a ninguna teoría, se cree que el uso de agentes reductores electrófilos suaves reduce la reducción no deseada de los dobles enlaces, ayudando así a la síntesis global a lograr mejores rendimientos y pureza.

El uso de hidruro de diisobutilaluminio (DIBAH) es particularmente preferido a este respecto. Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que algunos otros agentes reductores bien conocidos tales como borohidruro de sodio no pueden usarse con éxito en esta reducción, ya que aumentan el número de impurezas formadas. Es sorprendente que el uso de DIBAH parece reducir el isomerismo y, por lo tanto, minimiza la formación de impurezas.

La primera etapa del procedimiento de la invención implica la química de Mitsunobu. Esta reacción normalmente implica la disolución del alcohol, el ácido carboxílico y la trifenilfosfina en el disolvente seguido de la adición del ácido azodicarboxílico disuelto en el disolvente. Tal procedimiento, sin embargo, no funciona en el presente caso.

Se propone una variación del orden de reacción para evitar la oxidación y/o isomerización en el contexto de los compuestos de la invención. Es sorprendente que el orden de reacción utilizado ofrezca la oportunidad de preparar los compuestos objetivo sin isomerización u oxidación significativas. Por consiguiente, hasta la presente invención, no estaba claro que el orden de reacción particular que se usa en el presente documento resolvería el problema de la oxidación indeseada y la isomerización cis trans. Además, es aún más sorprendente que el orden de reacción que se emplea sea funcional en presencia del antioxidante.

En el presente documento, se puede usar cualquier compuesto de azodicarboxilato y fosfina conocido para su uso en la reacción de Mitsunobu. Las fosfinas son un grupo de compuestos organofosforados bien conocidos con la fórmula R'_3P (R = derivado orgánico, generalmente un grupo alquilo, arilo o heteroarilo). Los azodicarboxilatos son compuestos de fórmula general $R''OOC-N=N-COO-R''$ donde R'' es un derivado orgánico tal como un grupo alquilo o un grupo arilo.

Las fosfinas preferidas por lo tanto incluyen aquellas de fórmula



donde Y es un alquilo C1-10, arilo C6-10, arilalquilo C7-12, alquilarilo C7-12, cicloalquilo C3-10, heteroarilo C4-10, arilo C6-10-O-, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de NH_2 , NHR^a o NR^a_2 donde R^a es un alquilo C1-6.

Grupos heteroarilo adecuados incluyen piridina.

Las fosfinas preferidas para su uso en el procedimiento de la invención son triarilfosfinas tales como trifenilfosfina o alquilarilfosfinas tales como dicitclohexilfenilfosfina, dietilfenilfosfina, isopropildifenilfosfina, tributilfosfina, triciclohexilfosfina, trihexilfosfina y tri-n-octilfosfina. Otras fosfinas de interés incluyen 4-(dimetilamino)fenildifenilfosfina, difenil-2-piridilfosfina y fenoxidifenilfosfina. El uso de triarilfosfinas tales como trifenilfosfinas es especialmente preferido.

Los compuestos de azodicarboxilato preferidos son aquellos de fórmula



donde cada Z es independientemente alquilo C1-10, arilo C6-10, arilalquilo C7-12, alquilarilo C7-12, heteroarilo C4-10, heterociclo C4-10 o cicloalquilo C3-10, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de haluro. Preferiblemente ambos grupos Z son los mismos. Grupos heteroarilo adecuados incluyen piridina. Heterociclos adecuados incluyen piperidina o piperazina.

Los compuestos de azodicarboxilato adecuados se basan generalmente en ésteres de alquilo C1-6 opcionalmente sustituidos tales como azodicarboxilato de dietilo (DEAD), azodicarboxilato de di-terc-butilo o azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) o ésteres de arilo opcionalmente sustituidos tales como di-4-clorobencilazodicarboxilato. Otros compuestos de interés incluyen 1,1'-(azodicarbonil)dipiperidina.

En general, por lo tanto, la naturaleza del compuesto de fosfina y azodicarboxilato usado en el procedimiento de la invención no es decisiva y se puede usar cualquier agente conocido de fosfina o azodicarboxilato conocido en la bibliografía.

El alcohol poliinsaturado se hace reaccionar con un tioácido. El tioácido es generalmente de bajo peso molecular, por ejemplo, 250 g/mol o menos. El tioácido es preferiblemente un monotioácido. Más preferiblemente, es un compuesto R^1COSH en donde R^1 es un alquilo C₁₋₆, un grupo arilo C6-10, un grupo alquilarilo C7-12 o un grupo arilalquilo C7-12 (tal como bencilo o toliilo). Idealmente, R^1 es etilo o Me, especialmente Me.

La reacción, por lo tanto, de un compuesto R-OH según se ha definido anteriormente en el presente documento con un compuesto R^1COSH en la presente invención produce un compuesto $RSCOR^1$.

La etapa (2) del procedimiento de la invención requiere la presencia de un antioxidante, es decir, un compuesto que suprime las reacciones de oxidación. Es preferible que el antioxidante sea una molécula pequeña, tal como una que tenga un peso molecular de 500 g/mol o menos, tal como 250 g/mol o menos. De manera ideal, el antioxidante debería estar aprobado para su uso por la FDA.

El antioxidante utilizado en la etapa (2) del procedimiento de la invención es preferiblemente butilhidroxianisol, butilhidroxitolueno, galato de propilo, tocoferol, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, tioglicerol, ácido tioglicólico, bisulfito de sodio, sulfito de sodio, metabisulfito de sodio, edetato tetrasódico o EDTA.

El uso de tocoferol es especialmente preferido, en particular (+/-)-alfa-tocoferol.

Se apreciará que los compuestos de la invención son principalmente para uso medicinal y, por lo tanto, preferiblemente, cualquier antioxidante empleado es farmacéuticamente aceptable.

La cantidad de antioxidante añadido al alcohol poliinsaturado puede estar entre el 0,01 y el 1 % en moles, del 0,1 al 0,5 % en moles del alcohol poliinsaturado.

Se ha informado de que una reacción típica de Mitsunobu es compleja y existe controversia con respecto a la identidad y actividad de los intermedios de reacción. Sin embargo, los presentes inventores han descubierto que consumiendo esencialmente todo el tioácido antes de añadir el alcohol poliinsaturado en la etapa (3) anterior, es posible aumentar sustancialmente los rendimientos y, lo que es más importante, la pureza del tioéster poliinsaturado resultante a un nivel aceptable para muchas aplicaciones farmacéuticas. También han aprendido que la presencia de un antioxidante farmacéuticamente aceptable se puede usar en los presentes métodos para ayudar a reducir la isomerización cis/trans no deseada sin ser destruida o bloqueada o inactivada por los agentes y las condiciones que se usan en muchas reacciones de Mitsunobu. Es sorprendente que la presencia del antioxidante no altere el éxito de la reacción. Dada la incertidumbre sobre el mecanismo por el cual la reacción de Mitsunobu realmente funciona, siempre existe el interrogante de si la presencia de un reactivo adicional como el antioxidante interferirá con las numerosas especies intermedias transitorias producidas en la reacción.

Normalmente se puede usar una relación 1:1:1 de los reactivos en la reacción de Mitsunobu. En el procedimiento reivindicado, se requiere el uso de suficiente fosfina y azodicarboxilato para desprotonar el ácido o tioácido esencialmente por completo, preferiblemente por completo. En particular, por lo tanto, no debe haber un exceso de tioácido presente. De hecho, se prefiere que haya un exceso de los reactivos de Mitsunobu usados.

La reacción en la etapa (1) puede controlarse usando baja temperatura, preferiblemente menos de 10 °C, por ejemplo, de 0 a 5 °C. De manera ideal, la mezcla de la etapa (1) se deja durante un periodo de 10 minutos a una hora, tal como al menos 20 o al menos 30 minutos, para asegurar la desprotonación del tioácido a su correspondiente ion tiocarboxilato. Para asegurar la desprotonación completa, se apreciará que debe haber un exceso de los reactivos de Mitsunobu presentes, con respecto al ácido tioacético.

De este modo, de manera ideal, debería haber al menos 1,1 equivalentes molares de ambos reactantes de fosfina y azocarboxilato en comparación con el tioácido. Esto debería garantizar la desprotonación completa.

De manera ideal, la mezcla de fosfina, azodicarboxilato y tioácido forma una solución, en particular una solución clara. No debe haber material pegado a los lados del recipiente en el que tiene lugar la reacción. Como la desprotonación tiene lugar rápidamente, con una buena agitación la desprotonación completa debe producirse muy rápidamente (en segundos, si no menos) y con seguridad en un plazo de un periodo de 10 minutos.

Si no se produce la desprotonación completa, esto se manifiesta en el producto final en términos de altos niveles de impureza. Sin desprotonación completa, es posible observar un 10 % en peso o más de impurezas en el producto final.

Se cree que los efectos beneficiosos en términos de pureza se incrementan combinando el alcohol poliinsaturado con al menos un antioxidante farmacéuticamente aceptable en la etapa (2) antes de la adición del alcohol al material de reacción de la etapa (1). Preferiblemente, estas etapas y las siguientes etapas para preparar la cetona poliinsaturada se realizan en presencia del mismo o de diferente antioxidante farmacéuticamente aceptable para minimizar el potencial de isomerización cis/trans en la reacción.

La reacción real en la etapa (3) del procedimiento de la invención puede durar de 10 minutos a 1 hora y puede llevarse a cabo a cualquier temperatura conveniente, por ejemplo, a temperatura ambiente.

Se apreciará que generalmente la cantidad molar de alcohol poliinsaturado es estequiométrica con la cantidad de ácido o tioácido presente. Una vez que se ha formado el tioéster o éster, puede tratarse de una manera convencional, por ejemplo, sometiénose a cromatografía ultrarrápida en seco. De manera ideal, el éster o tioéster debería tener en este punto una pureza de al menos el 90 % tal como se determina mediante HPLC (% de área). Más preferiblemente, la pureza debería ser del 91 % o más, tal como el 92 % o más, idealmente del 93 % o más, especialmente del 94 % o incluso del 95 % o más.

Se ha descubierto que el procedimiento de la presente invención produce el éster o tioéster con un alto rendimiento, por ejemplo, del 70 % o más. Además, tal como se muestra en los ejemplos, se puede eliminar la presencia de impurezas detectables en HPLC.

En una realización preferida, el tioéster formado en el procedimiento de la invención se convierte a continuación en su tiol correspondiente. Si bien, en teoría, esto puede llevarse a cabo usando cualquier procedimiento de reducción convencional, por ejemplo, usando hidruro de diisobutilaluminio, para evitar la reacción secundaria, la formación de impurezas y la isomerización cis-trans de los dobles enlaces presentes, los inventores proponen llevar a cabo esta reacción en presencia de un antioxidante. El antioxidante se añade preferiblemente en esta etapa, aunque en teoría, si hay un antioxidante residual de la formación del tioéster, puede que no se necesite más antioxidante. Generalmente, sin embargo, cualquier antioxidante añadido durante la formación del tioéster se elimina durante la purificación de ese tioéster y, por lo tanto, se necesita más antioxidante.

Ese antioxidante puede ser igual o diferente del que se agregó en la etapa (2) del procedimiento anterior. El antioxidante se selecciona preferiblemente de butilhidroxianisol, butilhidroxitolueno, galato de propilo, tocoferol, ácido

ascórbico, palmitato de ascorbilo, tioglicerol, ácido tioglicólico, bisulfito de sodio, sulfito de sodio, metabisulfito de sodio, edetato tetrasódico o EDTA.

5 Se prefiere especialmente el uso de tocoferol. La cantidad de antioxidante añadido/presente puede volver a ser del orden del 0,01 al 1 % en moles, preferiblemente del 0,1 al 0,5 % en moles con respecto a la cantidad de tioéster poliinsaturado presente.

10 Además, los efectos beneficiosos anteriores se pueden potenciar aún más produciendo el tiol poliinsaturado en una reacción que implica poner en contacto un tioéster poliinsaturado con un agente reductor electrófilo suave adecuado en condiciones suficientes para producir el tiol poliinsaturado. Sin desear vincularse a ninguna teoría, se cree que el uso de agentes reductores electrófilos suaves, tal como se describe más adelante, reduce la reducción no deseada de los dobles enlaces, ayudando así a la síntesis global a lograr mejores rendimientos y pureza.

15 Agentes reductores adecuados son idealmente carbonatos metálicos tales como carbonato de potasio. El uso de un disolvente tal como metanol es apropiado.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de un tiol poliinsaturado farmacéuticamente aceptable, cuyo método incluye:

- 20 (1) combinar, en un primer recipiente, un tioácido en presencia de una fosfina y un compuesto de azodicarboxilato en condiciones que desprotonan esencialmente todo el tioácido en su interior;
 (2) combinar, en un segundo recipiente, un alcohol poliinsaturado y al menos un antioxidante farmacéuticamente aceptable; y
 25 (3) mezclar el contenido del primer y segundo recipientes en condiciones suficientes para obtener el tioéster poliinsaturado correspondiente; y
 (4) poner en contacto el tioéster poliinsaturado con un segundo antioxidante farmacéuticamente aceptable y hacer reaccionar la mezcla resultante en condiciones suficientes para preparar el tiol poliinsaturado.

30 Los tioésteres preferidos son, por lo tanto, de fórmula R-SCOR¹, en donde R y R¹ son según se ha definido anteriormente en el presente documento. Los tioles preferidos son simplemente RSH.

35 De manera ideal, el tiol debería tener en este punto una pureza de al menos el 90 % tal como se determina mediante HPLC (% de área). Más preferiblemente, la pureza debería ser del 91 % o más, tal como el 92 % o más, idealmente del 93 % o más, especialmente del 94 % o incluso del 95 % o más.

Se ha descubierto que el procedimiento de la presente invención produce el tiol con un alto rendimiento, por ejemplo, del 70 % o más. Además, tal como se muestra en los ejemplos, se puede eliminar la presencia de impurezas detectables en HPLC.

40 De manera ideal, por supuesto, el procedimiento de la invención se dirige a una variedad de cetonas poliinsaturadas farmacéuticamente aceptables que son adecuadas para uso farmacéutico. Los compuestos preferidos incluyen un grupo cetona que comprende un grupo atractor de electrones y un átomo de azufre en la posición α , β , γ o δ del grupo cetona. Un grupo atractor de electrones o EWG extrae electrones de un centro de reacción.

45 Por lo tanto, los objetivos de cetona poliinsaturada preferidos de la invención son fórmula (II)



50 en donde R² es un grupo hidrocarburo poliinsaturado C₁₀₋₂₄ interrumpido en la posición β , γ o δ del grupo cetona por un átomo de S; y
 X es un grupo atractor de electrones (EWG).

55 Grupos atractores de electrones X adecuados para cualquier compuesto de la invención son CN, fenilo, CHal₃, CHal₂H, CHalH₂ en donde Hal representa un halógeno, especialmente F. El EWG es especialmente CHal₃, por ejemplo, CF₃.

Es más preferible que el átomo de S sea beta al carbonilo.

60 Es preferible que en un grupo R² los dobles enlaces no estén conjugados. El grupo R² preferiblemente comprende de 5 a 9 dobles enlaces, preferiblemente 5 u 8 dobles enlaces, por ejemplo, de 5 a 7 dobles enlaces, tal como de 5 o 6 dobles enlaces.

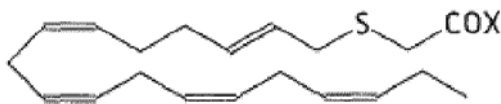
También es preferible que los dobles enlaces no se conjuguen con el grupo hidroxilo.

65 Los dobles enlaces presentes en el grupo R² pueden estar en la configuración cis o trans. Sin embargo, es preferible que la mayoría de los dobles enlaces presentes (es decir, al menos un 50 %) estén en la configuración cis. En

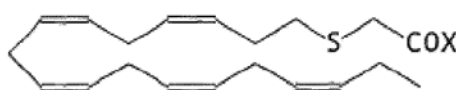
realizaciones ventajosas adicionales, todos los dobles enlaces en el grupo R² están en la configuración cis o todos los dobles enlaces están en la configuración cis, excepto el doble enlace más cercano al grupo S que puede estar en la configuración trans.

- 5 El grupo R² puede tener entre 10 y 24 átomos de carbono, preferiblemente de 12 a 20 átomos de carbono, especialmente de 17 a 19 átomos de carbono.

10 En una realización preferida, la invención proporciona un método para producir un 1,1,1-trifluoro-3-(((2E,6Z,9Z,12Z,15Z,)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-il)tio)propan-2-ona farmacéuticamente aceptable (véase también el esquema 1 del presente documento):

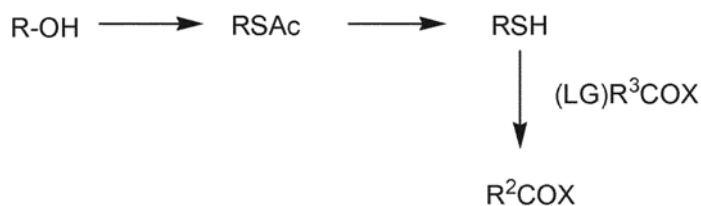


15 donde X es CF₃; o un compuesto relacionado



donde X es CF₃.

- 20 La última etapa del procedimiento de la invención implica, por lo tanto, la reacción del tiol con una cetona adecuada para formar los compuestos deseados de fórmula (II). El compuesto de cetona que reacciona es preferiblemente de fórmula (LG)R³-COX, donde R³ junto con el grupo R del alcohol poliinsaturado usado en la etapa (2) forma el grupo R² en fórmula (II), es decir,



- 25 R³ es preferiblemente alquileo C1-3, tal como metileno. LG representa un grupo saliente que está sustituido nucleófilamente por el grupo tiol. Un grupo saliente es un fragmento molecular que parte con un par de electrones en la escisión del enlace heterolítica. Por supuesto de manera preferible, (LG)R³-COX representa el compuesto LG-CH₂-COX, en donde LG es un grupo saliente tal como un haluro, tosilo, mesilo, etc. De manera ideal, LG es un haluro tal como Br. X es un grupo atractor de electrones según se ha definido anteriormente en el presente documento en las fórmulas anteriores, preferiblemente CF₃ de nuevo. Más preferiblemente (LG)R³-COX es BrCH₂-COCF₃.

- 35 Esta etapa de reacción final puede tener lugar en presencia de un antioxidante adicional según se ha definido anteriormente en el presente documento. De nuevo, el antioxidante podría estar presente de forma inherente como producto de la etapa de reducción del tioéster y, en ese escenario, podría no ser necesario añadir más antioxidante. Sin embargo, está dentro del alcance de la invención añadir más antioxidante, por ejemplo, cuando se purificó el tiol formado y, por lo tanto, se eliminaron los antioxidantes.

- 40 El uso de tocoferol se prefiere especialmente si se emplea un antioxidante. La cantidad de antioxidante añadido/presente puede volver a ser del orden de 0,01 a 1 % en moles, preferiblemente de 0,1 a 0,5 % en moles, en comparación con el contenido de tiol poliinsaturado.

- 45 Se apreciará que cualquier reacción descrita en el presente documento puede necesitar llevarse a cabo en ausencia de oxígeno, por ejemplo, bajo una atmósfera de Ar.

De manera ideal, la cetona debería tener en este punto una pureza de al menos el 90 % tal como se determina mediante HPLC (% de área). Más preferiblemente, la pureza debería ser del 91 % o más, tal como el 92 % o más, idealmente del 93 % o más, especialmente del 94 % o incluso del 95 % o más.

50 Se ha descubierto que el procedimiento de la presente invención produce la cetona con un alto rendimiento, por ejemplo, del 70 % o más. Además, tal como se muestra en los ejemplos, se puede eliminar la presencia de impurezas detectables en HPLC.

55

En una realización más preferida, el procedimiento de la invención incluye al menos las siguientes etapas:

- 5 A) combinar, en un primer recipiente, una fosfina, un azodicarboxilato y ácido tioacético en disolvente para formar una mezcla y permitir que se produzca la desprotonación completa de dicho ácido tioacético;
 B) combinar, en un segundo recipiente, (2E, 6Z, 9Z, 12Z, 15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-ol (alcohol alílico C18) y un antioxidante;
 C) mezclar el contenido del primer y segundo recipientes para preparar etanotioato de S-(2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-ilo.

10 Más específicamente, el procedimiento de la invención requiere las siguientes etapas:

- A) combinar, en un primer recipiente, trifenilfosfina, azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) y ácido tioacético en disolvente y permitir que se produzca la desprotonación completa de dicho ácido tioacético;
 15 B) combinar, en un segundo recipiente, (2E, 6Z, 9Z, 12Z, 15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-ol y tocoferol;
 C) mezclar el contenido del primer y segundo recipientes para preparar etanotioato de S-(2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-ilo.

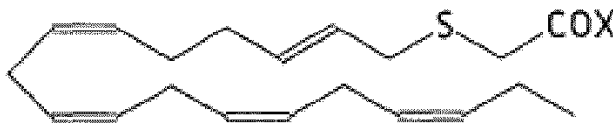
Se prefiere además que el etanotioato de S-(2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-ilo sea:

20 D) sometido a cromatografía ultrarrápida en seco en condiciones que purifican el éster hasta una pureza de al menos el 90 % tal como se determina mediante HPLC (% de área).

Además, después de la etapa C o D, se prefiere que,

25 E) el etanotioato de S-(2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-ilo opcionalmente purificado producido en la Etapa C) o D) entre en contacto con un carbonato de metal, tal como carbonato de potasio, y tocoferol en condiciones que reducen el grupo éster y produzcan el tiol correspondiente (2E, 6Z, 9Z, 12Z, 15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaeno-1-tiol).

Se prefiere entonces que, F) el tiol producido en la etapa E) entre en contacto con 3-bromo-1,1,1-trifluoroacetona en condiciones que producen



30 donde X es CF₃.

Este compuesto se puede purificar mediante cromatografía ultrarrápida en seco hasta una pureza de al menos el 90 % tal como se determina mediante HPLC (% de área) para producir un compuesto farmacéuticamente aceptable.

35 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para producir un 1,1,1-trifluoro-3-(((3Z,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-3,6,9,12,15-pentaen-1-il)tio)propan-2-ona farmacéuticamente aceptable.



40 donde X es CF₃; siguiendo los protocolos anteriores con la sustitución adecuada del alcohol de partida en (3Z,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-3,6,9,12,15-pentaen-1-ol.

45 Se apreciará que los compuestos producidos en el procedimiento de la invención tienen una variedad de aplicaciones, por ejemplo, en el tratamiento de trastornos inflamatorios crónicos. Se pueden formular como composiciones farmacéuticas usando técnicas bien conocidas. No se requiere una descripción adicional de tales técnicas en el presente documento.

50 La invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos y figuras no limitativos.

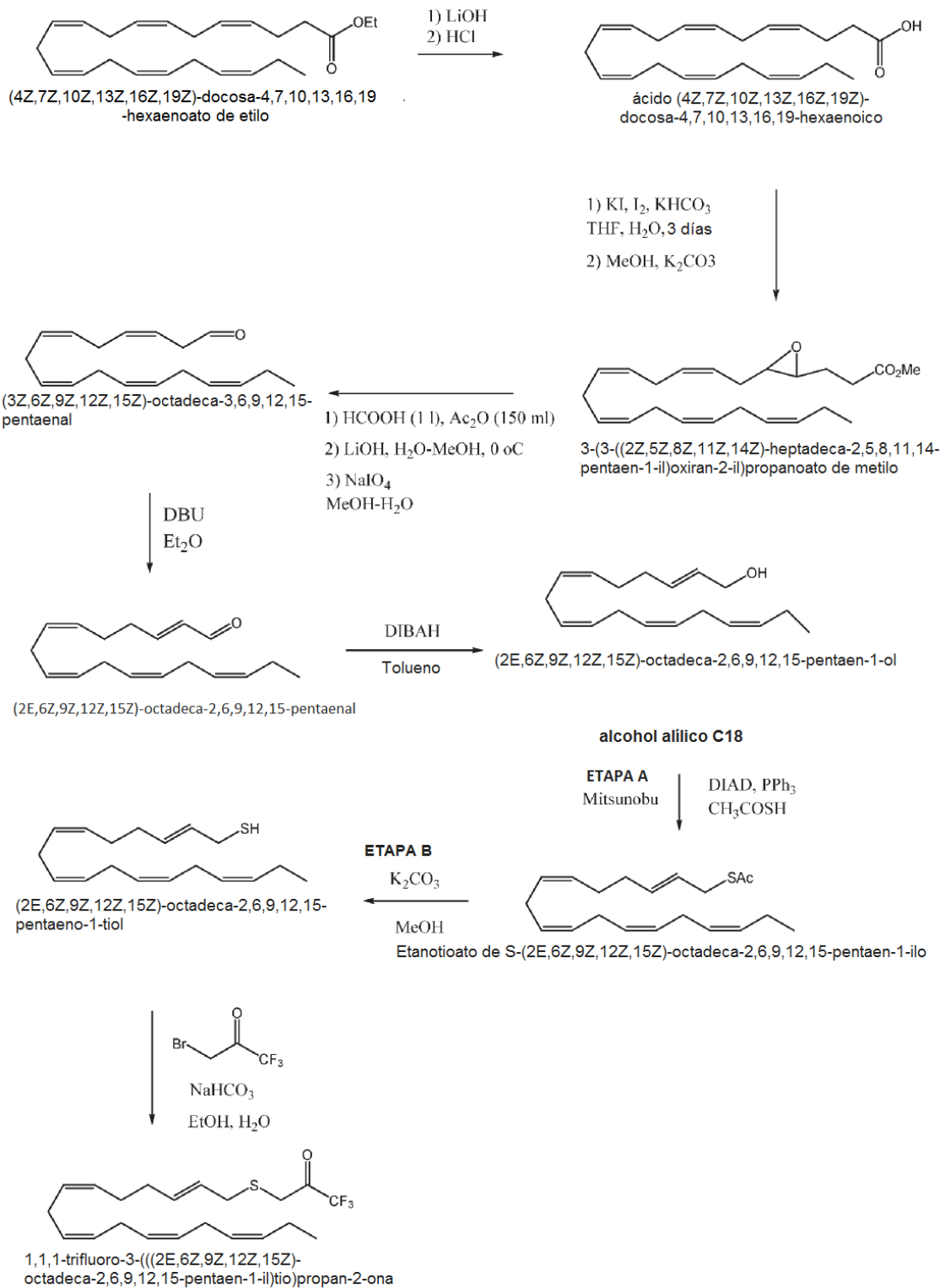
Las figuras 1 a 8 son cromatogramas de HPLC que muestran los productos de los diversos ejemplos a continuación.

Ejemplos

55 Ejemplo 1: Visión de conjunto de la síntesis de 1,1,1-trifluoro-3-(((2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-il)tio)propan-2-ona

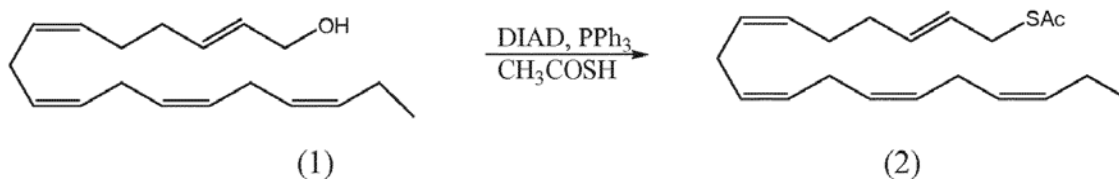
La siguiente información proporciona una visión de conjunto general de la síntesis de la cetona poliinsaturada. Con referencia al Esquema 1, la Etapa A y la Etapa B se mencionan con más detalle en el Ejemplo 6, a continuación.

- 5 Todas las etapas para preparar el alcohol alílico C18 (Esquema 1, a continuación) se llevaron a cabo esencialmente según se describe en J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 2000, 2271-2276 (Skattebøl y Holmeide), con una modificación: en lugar de borohidruro de sodio en la reducción de aldehído a alcohol, se usó hidruro de diisobutilaluminio (DIBALH) para reducir la sobre-reducción del doble enlace trans. Durante las tres últimas etapas (Esquema 1, a continuación), se introdujeron las siguientes precauciones/modificaciones:
- 10 Todas las reacciones se llevaron a cabo en una atmósfera de argón. Las luces de las campanas de extracción debían apagarse. No se consideró necesario tomar otras precauciones con respecto a la protección contra la luz. Además, las 3 últimas etapas (denominadas A, B y C, respectivamente) se realizan en presencia de alfa-tocoferol. La secuencia de adición de reactivos en la reacción de Mitsunobu se consideró importante para evitar la isomerización. Se prevé que es de crucial importancia que todo el ácido tioacético haya reaccionado completamente
- 15 antes de la introducción del alcohol alílico C18. Además, tanto el producto bruto como el purificado de la etapa (A) se enjuagan con argón, se cubren con septo y se colocan en el congelador cuando se almacenan. La etapa (B) se lleva a cabo sin purificación, pero de nuevo: el producto bruto debe almacenarse a -18 °C bajo atmósfera de argón si es necesario el almacenamiento. Durante la última etapa, se tuvo gran cuidado para asegurar que tanto el producto bruto como el material purificado se mantuvieran bajo argón.
- 20



Esquema 1: Visión de conjunto de la síntesis de 1,1,1-trifluoro-3-(((2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-il)tio)propan-2-ona

Ejemplo comparativo 2: La producción de tioéster poliinsaturado produce un contaminante que migra cerca del pico del producto principal.



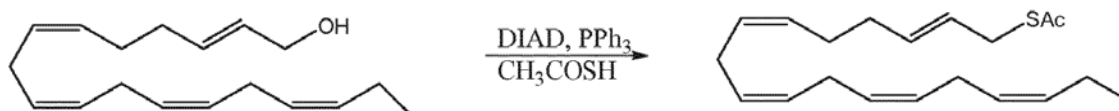
Las luces de las campanas de extracción se apagaron. No se consideró necesario tomar otras precauciones con respecto a la protección contra la luz. Bajo argón, se preparó la siguiente solución en un matraz volumétrico de 200 ml con tapón de vidrio:

(2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-ol ((1), 15,0 g, 57,6 mmol), ácido tioacético (5,00 ml, 70,0 mmol) y alfa-tocoferol (30,4 mg) se combinaron en THF seco (150 ml). La solución se enfrió a 0 °C.

En un matraz de fondo redondo de 1 litro, se colocó trifetilfosfina (18,1 g, 69,1 mmol) seguido de THF seco (300 ml). Se añadió al matraz una barra de agitación, se enjuagó con argón, se sumergió en un baño de hielo con septo y se agitó a 0 °C durante 10 minutos. Se añadió diisopropilazodicarboxilato (13,6 ml, 57,6 mmol) en una porción a través del septo con una jeringa y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a 0 °C. La solución preenfriada de (2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-ol, ácido tioacético y alfa-tocoferol en THF seco se añadió en una porción. Se retiró el baño de enfriamiento y la mezcla de reacción se agitó durante una hora. La solución de color amarillo claro se evaporó a presión reducida (evaporador rotatorio) para eliminar el THF. Al residuo se añadió éter dietílico (120 ml) y el matraz se hizo girar en el evaporador rotatorio durante 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se filtró a través de un vidrio sinterizado (tipo 3) y el residuo se enjuagó con éter (2 x 50 ml). El filtrado combinado se evaporó a presión reducida (evaporador rotatorio). Al residuo se añadió heptano (100 ml) y el matraz se hizo girar durante 10 minutos a temperatura ambiente. La filtración a través de vidrio sinterizado desde arriba, el enjuague con heptano (2 x 25 ml) y la concentración proporcionaron 24,8 g del producto bruto como un aceite amarillo. La purificación se realizó por cromatografía ultrarrápida en seco y cromatografía ultrarrápida (gradiente de heptano:EtOAc) para obtener 12,5 gramos (68 %) de etanoato de S-(2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-ilo como un aceite incoloro.

Las Figuras 1 y 2 muestran cromatogramas del producto en la síntesis. El producto secundario puede verse como un hombro a la derecha inmediata del pico del producto principal en las Figuras 1 y 2.

Ejemplo 3: La reacción previa de ácido tioacético antes de la adición del alcohol poliinsaturado redujo la presencia del contaminante



Las luces de las campanas de extracción deben apagarse. No se considera necesario tomar otras precauciones con respecto a la protección contra la luz.

Se pesa trifetilfosfina (6,06 g, 23,1 mmol), se transfiere a un matraz de fondo redondo de 1 litro equipado con una barra de agitación magnética, se disuelve en THF seco (300 ml), se enjuaga con argón, se cubre con un septo y se sumerge en un baño de hielo/agua. La solución se agita a 0,5 °C durante 11 minutos.

Se añade azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) (4,50 ml, 20,8 mmol) a la mezcla de reacción en una porción y la mezcla se agita a 0, 5 °C durante 32 minutos.

Se añade ácido tioacético (1,50 ml, 21 mmol) a la mezcla de reacción en una porción y la mezcla se agita a 3,5 °C durante 15 minutos.

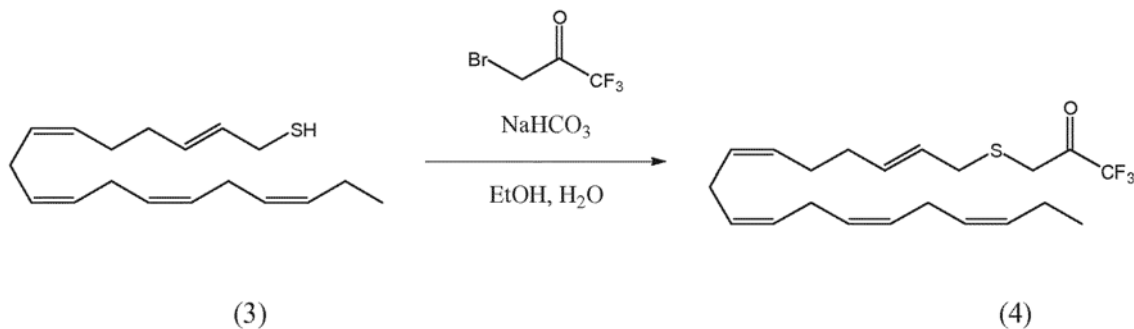
Se pesa alfa-tocoferol (9,8 mg) y octadeca-2(E),6(Z),9(Z),12(Z),15(Z)-pentaen-1-ol (5,00 g, 19,2 mmol), se transfiere a un matraz Erlenmeyer y se disuelve en THF seco (50 ml) y se añade a la mezcla de reacción en una porción. Después de la adición, se retira el baño de enfriamiento y la mezcla se agita durante 47 minutos.

La mezcla de reacción se concentra a presión reducida. Al residuo se añadió éter dietílico (40 ml) y el matraz se hizo girar en el evaporador rotatorio durante 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se filtró a través de un vidrio sinterizado (tipo 3) y el residuo se enjuagó con éter (2 x 15 ml). El filtrado combinado se evaporó a presión reducida (evaporador rotatorio). Al residuo se añadió heptano (35 ml) y el matraz se hizo girar durante 10 minutos a temperatura ambiente. La filtración a través de vidrio sinterizado desde arriba, el enjuague con heptano (2 x 10 ml) y la concentración proporcionaron el producto bruto en forma de aceite amarillo. La purificación se realizó por

cromatografía ultrarrápida en seco (gradiente de heptano:EtOAc) para obtener 4,52 gramos (74 %) de etanoato de S-(2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-ilo como un aceite incoloro.

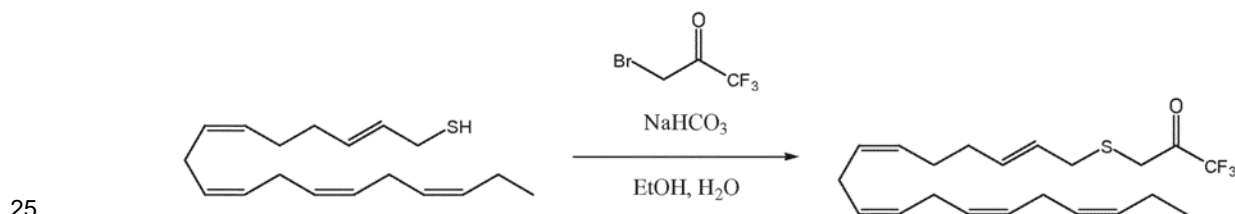
Las Figuras 3 y 4 muestran que la impureza del ejemplo 2 no está presente.

5 Ejemplo comparativo 4: La producción de una trifluorocetona poliinsaturada sin antioxidantes produce un contaminante que migra cerca del pico del producto principal



10 A una solución de (2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaeno-1-tiol (52,36 g, 189,4 mmol) en etanol (1200 ml) y agua (805 ml) se añadió hidrogenocarbonato de sodio (33,48 g, 397,7 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 15 minutos. Se añadió 3-bromo-1,1,1-trifluoroacetona (23,6 ml, 227,3 mmol) en una porción. La mezcla de reacción se agitó durante 40 minutos a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se transfirió a un embudo de decantación y la fase acuosa se extrajo con heptano (2 x 1 l). La capa orgánica se lavó con salmuera (250 ml), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró. La cromatografía ultrarrápida en seco (gradiente de heptano:EtOAc) proporcionó 43,19 g (59 %) de 1,1,1-trifluoro-3-(((2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-yl)tio)propan-2-ona como un aceite de color amarillo pálido.

20 Las siguientes figuras muestran cromatogramas del producto en la síntesis de AVX001 sin presencia de antioxidante (alfa-tocoferol). El contaminante puede verse en las Figuras 5 y 6 como un hombro que migra cerca del pico del producto principal. Ejemplo 5: La producción de una trifluorocetona poliinsaturada *con antioxidante* elimina la presencia del contaminante.



25 A una solución de (2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaeno-1-tiol (5,06 g, 18,3 mmol) en etanol (120 ml) y agua (80 ml) se añadió hidrogenocarbonato de sodio (3,23 g, 38,43 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 15 minutos. Se añadió 3-bromo-1,1,1-trifluoroacetona (2,3 ml, 22,0 mmol) en una porción. La mezcla de reacción se agitó durante 35 minutos a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se transfirió a un embudo de decantación y la fase acuosa se extrajo con heptano (2 x 100 ml). La capa orgánica se lavó con salmuera (30 ml), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró. La cromatografía ultrarrápida (gradiente de heptano: EtOAc) proporcionó 5,51 g (78 %) de 1,1,1-trifluoro-3-(((2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-yl)tio)propan-2-ona como un aceite incoloro. Las figuras 7 y 8 muestran cromatogramas del producto en la síntesis de la trifluorocetona con presencia de antioxidante (alfa-tocoferol). Las luces de las campanas de extracción deben apagarse. No se considera necesario tomar otras precauciones con respecto a la protección contra la luz.

Ejemplo 6: Síntesis de 1,1,1-trifluoro-3-(((2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-yl)tio)propan-2-ona (4)

40 A continuación, se muestra un procedimiento para preparar la trifluorocetona poliinsaturada. Para eliminar o reducir la presencia de contaminantes no deseados, el tioácido se consumió en una reacción separada antes de que se añadiera el alcohol poliinsaturado. Además, el alfa-tocoferol se mezcló con el alcohol en una cámara de reacción separada para reducir o eliminar la oxidación no deseada. Se descubrió que estas etapas y otras que se muestran a continuación, aumentan los rendimientos y la pureza del compuesto al 93 % o más (% de área).

45 A. Etapa A (Véase Esquema 1, arriba)

Se pesó trifetilfosfina (6,05 g ± 0,10 g), se transfirió a un matraz de fondo redondo de 1 litro equipado con una barra de agitación magnética, se disolvió en THF seco (310 ml ± 15 ml), se enjuagó con argón, se cubrió con un septo y se

sumergió en un baño de hielo/agua. La solución se agitó a 0-5 °C durante 10-20 minutos. Se añadió azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) (4,55 ml ± 0,09 ml) a la mezcla de reacción en una porción. La mezcla se agitó a 0-5 °C durante 30-40 minutos. Se añadió ácido tioacético (1,50 ml ± 0,03 ml) (A) a la mezcla de reacción en una porción. La mezcla se agitó a 0-5 °C durante 15-20 minutos

Se pesó alfa-tocoferol (10 mg ± 0.2 mg) y octadeca-2(E),6(Z),9(Z),12(Z),15(Z)-pentaen-1-ol (alcohol C-18) (A) (5,00 g ± 0,10 g), se transfirió a un matraz Erlenmeyer y se disolvió en THF seco (50 ml ± 2,5 ml) y, a continuación, se añadió a la mezcla de reacción en una porción. Después de la adición, se retiró el baño de enfriamiento y la mezcla se agitó durante 45-55 minutos. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. La temperatura en el baño de agua era menor o igual a 30 °C. El producto bruto resultante se analizó mediante HPLC (véase a continuación). El residuo se enjuagó con argón, se cubrió con un septo y se colocó en el congelador.

La síntesis se realizó tres veces y los lotes se combinaron y se sometieron a purificación por cromatografía.

Purificación. Solo se combinaron los productos brutos que superaban el criterio de aceptación. Al residuo, se añadió heptano (50 ml ± 2,5 ml) y el matraz se hizo girar en el rotavapor durante 5-15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado (grado 3); se añadió heptano (25 ml ± 1 ml) al matraz de reacción, se removió y se filtró a través del embudo de vidrio sinterizado. El precipitado se lavó con heptano (25 ml ± 1 ml). El filtrado y los lavados se concentraron a presión reducida, la temperatura en el baño de agua era inferior o igual a 30 °C. El residuo se almacenó mediante enjuague con argón y recubrimiento con un septo y se colocó en el congelador.

Cromatografía ultrarrápida en seco. Se transfirió gel de sílice (500 g ± 25 g) a un embudo de vidrio sinterizado de 1000 ml (grado 3) y se eluyó previamente con 500 ml de heptano. Se añadieron 20-40 ml de heptano al producto bruto y la mezcla se cargó en la columna. La columna se eluyó con fracciones de 250 ml ± 25 ml. Un matraz Erlenmeyer graduado de 250 ml tenía suficiente precisión para este fin. Cuando se preparó el eluyente de heptano:EtOAc (100:1) era suficientemente preciso para añadir 25 ml de EtOAc a un matraz de heptano de 2500 ml sin abrir previamente. Las fracciones se analizaron mediante CCF (eluyente heptano: EtOAc 95:5). Producto R_f de aproximadamente 0,4, tinte con inmersión PMA o inmersión en molibdato de amonio/sulfato cérico. La elución continuó hasta que todo el producto salió de la columna. Las fracciones se recogieron cuando el producto estaba presente con una pureza igual o superior al 93 % (% de área) y el pico en RRT=1,03 era menor o igual al 4 % (% de área) y el pico en RRT=0,59 menor o igual al 1% (% de área). El material se transfirió a un matraz de fondo redondo de 1 litro y se evaporó a presión reducida, a una temperatura de ≤ 35 °C para obtener 13,5 g (73,8 %) del producto como un aceite incoloro. El producto se almacenó a aproximadamente -18 °C bajo atmósfera de argón.

B. Etapa sintética B- véase el Esquema 1, arriba

Preparación de soluciones. Se añadió HCl concentrado (12,3 ± 0,25 ml) a un cilindro graduado de 250 ml que contenía un poco de agua corriente y se llenó con agua corriente adicional hasta la marca (150 ml) y se mezcló. Se mezcló NaCl (≥ 40 g) con agua corriente (110 ml ± 10 ml) en un matraz Erlenmeyer. Las luces de las campanas de extracción estaban apagadas. No se consideró necesario tomar otras precauciones con respecto a la protección contra la luz. Se pesó alfa-tocoferol (27,2 mg) y se pesó MeOH (130 ml), se disolvió y se transfirió al matraz de fondo redondo de 1 litro con ácido tioacético S-octadeca-2(E),6(Z),9(Z),12(Z),15(Z)-pentaenil éster (13,5 g) equipado con una barra de agitación magnética y un embudo de goteo de 100 ml. Se añadió K₂CO₃ (6,45 g) a la mezcla de reacción en una porción. Enjuague con argón y recubrimiento con septo. Agitado a temperatura ambiente durante 30-40 minutos. El matraz de reacción se sumergió en un baño de hielo/agua y se añadió 1M HCl (150 ml) cuidadosamente gota a gota a través del embudo de goteo, luego se transfirió a un embudo de decantación y se extrajo con heptanos [2 x 200 ml]. La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (100 ml), se transfirió a un matraz Erlenmeyer equipado con una barra de agitación magnética y se añadió Na₂SO₄ (70,4 g). Si es necesario, se puede añadir Na₂SO₄ adicional. La suspensión se agitó durante 10-20 minutos. La suspensión se filtró y la torta de filtro se enjuagó con heptano (≥ 25 ml), se transfirió a un matraz de fondo redondo de 1 litro y se evaporó a presión reducida, temperatura ≤ 35 °C. Este producto bruto (12,0 g, rendimiento cuantitativo) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. El producto se almacenó a una temperatura inferior o igual a -18 °C bajo atmósfera de argón.

C. Preparación de trifluorocetona poliinsaturada (véase esquema 1)

Preparación de soluciones

Se mezcló NaCl (≥ 40 g) con agua corriente (l) (110 ml). Las luces de las campanas de extracción se apagaron. No se consideró necesario tomar otras precauciones con respecto a la protección contra la luz. Se pesó NaHCO₃ (7,68 g) y se midió EtOH (290 ml) y agua corriente (192 ml) y se transfirió al matraz de 1 litro que contenía octadeca-2(E),6(Z),9(Z),12(Z),15(Z)-pentaeno-1-tiol (12,0 g) y se enjuagó con argón. Se agitó enérgicamente a temperatura ambiente durante 15-20 minutos. Se añadió 3-bromo-1,1,1-trifluoroacetona (5,4 ml) en una porción y se agitó enérgicamente durante 35-45 minutos. El material se transfirió a un embudo de decantación y se extrajo con heptano (l) (2 x 200 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (100 ml), y se transfirió a un matraz Erlenmeyer equipado con una barra de agitación magnética y se añadió Na₂SO₄ (l) (60 g). Si es necesario, se puede añadir Na₂SO₄ adicional. La suspensión se agitó durante 10-20 minutos.

La suspensión se filtró y la torta de filtro se enjuagó con heptano (≥ 25 ml), se transfirió a un matraz de fondo redondo de 1 l y se evaporó a presión reducida, temperatura (≤ 35 °C).

5 Cromatografía ultrarrápida en seco. Se transfirió sílice (500 g \pm 25 g) a un embudo de vidrio sinterizado de 1000 ml (grado 3). Se preeluyó con heptano 500 \pm 25 ml. Se añadieron 20-25 ml de heptano al producto bruto y la mezcla se cargó en la columna. La columna se eluyó con fracciones de 350 ml \pm 20 ml. Un matraz Erlenmeyer graduado de 500 ml tiene suficiente precisión para esta medición. Cuando se preparó el eluyente de heptano:EtOAc (100:x), era suficientemente preciso para añadir 25x ml de EtOAc a un matraz de heptano de 2500 ml sin abrir previamente. Las fracciones se analizaron mediante CCF (eluyente heptano:EtOAc 80:20). Producto R_f de aproximadamente 0,26, tinte con inmersión PMA o inmersión en molibdato de amonio/sulfato cérico. Continuar la elución hasta que todo el producto salga de la columna. Eluir con heptano - heptano:EtOAc (100:1) - (100:2) - (100:3) - (100:10). Si las impurezas por delante del producto están fuera de la columna después de la fracción n.º 21, se pueden usar (100:10) a partir de la fracción n.º 22; de lo contrario, continuar con (100:2) o (100:3). Cuando las impurezas por delante del producto están fuera de la columna se puede utilizar (100:10).

15 Analizar mediante HPLC las fracciones que por CCF son puras o con solo pequeñas cantidades de impurezas. Recoger las fracciones que contienen el producto con pureza dentro de las especificaciones de HPLC (% de área). El material se transfirió a un matraz de fondo redondo de 1 litro y se evaporó a presión reducida, a una temperatura de ≤ 35 °C. Se llenó un rotavapor con argón cuando se equilibró la presión. Se usó heptano para transferir a un matraz de fondo redondo de 250 ml a través de un filtro de plegado y se evaporó a presión reducida, temperatura (≤ 35 °C). Cuando finalizó la evaporación inicial, se conectó una bomba de alto vacío al rotavapor y se evaporó durante 1-2 horas para obtener 10,29 g (61 %) del producto como un aceite incoloro. El producto se almacenó a una temperatura inferior o igual a -18 °C bajo atmósfera de argón.

25 Se usaron los siguientes materiales y métodos según fuera necesario en este Ejemplo 6.

1. CCF: se analizó una muestra pequeña de producto según fue necesario mediante CCF con heptano:EtOAc (80:20) como eluyente. R_f de producto aproximadamente 0,26, con inmersión en PMA o inmersión en molibdato de amonio/sulfato cérico. Solo se toleran pequeñas cantidades de impurezas.

30 2 - HPLC

Condiciones de HPLC/UV

35 Columna analítica: EC-C18, 150 x 4,6 mm, tamaño de partícula de 2,7 μ m
 Caudal: 1,5 ml / min
 Tiempo de parada: 22 min
 Temperatura: 15 °C
 Detector: UV 210: 8 ref 360: 1 PW> 0,05 min
 40 Fases móviles: A: ACN/Agua 70:30 con ácido fórmico al 0,02 % v/v
 B: ACN con ácido fórmico al 0,02 % v/v

45	Programa de gradiente de fase móvil:	Tiempo	% de B
		Inicial	0 %
		12 min	80 %
		20 min	100 %

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento que comprende:

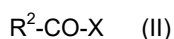
- 5 (1) combinar, en un primer recipiente, un tioácido (-COSH) en presencia de una fosfina y de un compuesto de azodicarboxilato en condiciones que desprotonan esencialmente todo el tioácido en su interior;
 (2) combinar, en un segundo recipiente, un alcohol poliinsaturado y al menos un antioxidante farmacéuticamente aceptable; y
 10 (3) mezclar el contenido del primer y segundo recipientes para formar un tioéster poliinsaturado.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además

- 15 (4) añadir al menos un antioxidante farmacéuticamente aceptable al tioéster poliinsaturado de la etapa (3), que puede ser igual o diferente del antioxidante utilizado en la etapa (2), y reducir el tioéster de la etapa (3) en condiciones suficientes para preparar un tiol poliinsaturado.

3. Un procedimiento según la reivindicación 2, que comprende además:

- 20 (5) hacer reaccionar dicho tiol poliinsaturado con un compuesto (LG)R³COX en donde X es un grupo atractor de electrones y R³ es un grupo alquileo C₁₋₃ que porta un grupo saliente LG, opcionalmente en presencia de antioxidante añadido adicionalmente, para formar un compuesto de cetona poliinsaturado idealmente de fórmula (II)



- 25 en donde R² es un grupo hidrocarburo poliinsaturado C₁₀₋₂₄ interrumpido en la posición β, γ o δ del grupo cetona por un átomo de S; y
 X es un grupo atractor de electrones;
 30 en donde, en la etapa (2) dicho alcohol poliinsaturado es de fórmula R-OH donde R es un hidrocarburo poliinsaturado C₉₋₂₃.

4. El procedimiento según las reivindicaciones 1-3, en donde el antioxidante farmacéuticamente aceptable es tocoferol.

- 35 5. El procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, en donde el tioéster poliinsaturado tiene una pureza de al menos el 90 % tal como se determina mediante HPLC (% de área), preferiblemente en donde tioéster poliinsaturado tiene una pureza de al menos el 91 %, 92 %, 93 %, 94 % o a al menos el 95 % tal como se determina mediante HPLC (% de área).

- 40 6. El procedimiento según la reivindicación 3, en donde la cetona poliinsaturada tiene una pureza de al menos el 90 % tal como se determina mediante HPLC (% de área), preferiblemente en donde la cetona poliinsaturada tiene una pureza de al menos el 91 %, 92 %, 93 %, 94 % o al menos el 95 % tal como se determina mediante HPLC (% de área).

- 45 7. El procedimiento según las reivindicaciones 1-6, en donde la fosfina es trifenilfosfina.

8. El procedimiento según las reivindicaciones 1-7, en donde el azodicarboxilato es azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD).

- 50 9. El procedimiento según cualquier reivindicación anterior en donde hay un exceso molar de fosfina y de azodicarboxilato a tioácido (-COSH) en la etapa (1).

10. El procedimiento según las reivindicaciones 1-9, en donde el alcohol poliinsaturado es de fórmula (I)



- 55 en donde R es un grupo hidrocarburo insaturado C₉₋₂₃ opcionalmente sustituido y opcionalmente interrumpido por uno o más heteroátomos o grupos de heteroátomos seleccionados de S, O, N, SO, SO₂, comprendiendo dicho grupo hidrocarburo al menos 2, preferiblemente al menos 4, dobles enlaces.

- 60 11. El procedimiento según las reivindicaciones 1-10, en donde el alcohol poliinsaturado es un alcohol C₁₈ que comprende 5 dobles enlaces, preferiblemente en donde el alcohol poliinsaturado es (2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-ol.

12. El procedimiento según las reivindicaciones 1-11, en donde el tioéster poliinsaturado es un éster de ácido tioacético poliinsaturado C18 que comprende 5 dobles enlaces, preferiblemente en donde el éster de ácido tioacético poliinsaturado es etanotioato de S-(2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-ilo.

5 13. Un procedimiento según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

A) combinar, en un primer recipiente, una fosfina, un azodicarboxilato y ácido tioacético en disolvente para formar una mezcla y permitir que se produzca la desprotonación completa de dicho ácido tioacético;

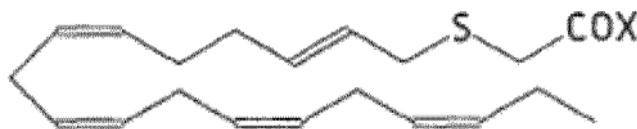
10 B) combinar, en un segundo recipiente, (2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-ol (alcohol alílico C18) y un antioxidante;

C) mezclar el contenido del primer y segundo recipientes para preparar etanotioato de S-(2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-ilo;

15 D) someter opcionalmente el éster producido en la Etapa C) a cromatografía de ultrarrápida en seco en condiciones que purifican el éster al menos hasta una pureza del 90 % tal como se determina mediante HPLC (% de área);

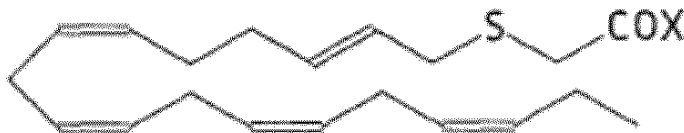
E) opcionalmente poner en contacto el etanotioato de S-(2E,6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaen-1-ilo opcionalmente purificado producido en la Etapa C) o D) con un carbonato de metal, tal como carbonato de potasio, y tocoferol en condiciones que reducen el grupo éster y producen el tiol correspondiente (2E, 6Z, 9Z, 12Z, 15Z)-octadeca-2,6,9,12,15-pentaeno-1-tiol); y

20 F) opcionalmente poner en contacto el tiol producido en la etapa E) con 3-bromo-1,1,1-trifluoroacetona en condiciones que producen:



25 donde X es CF₃.

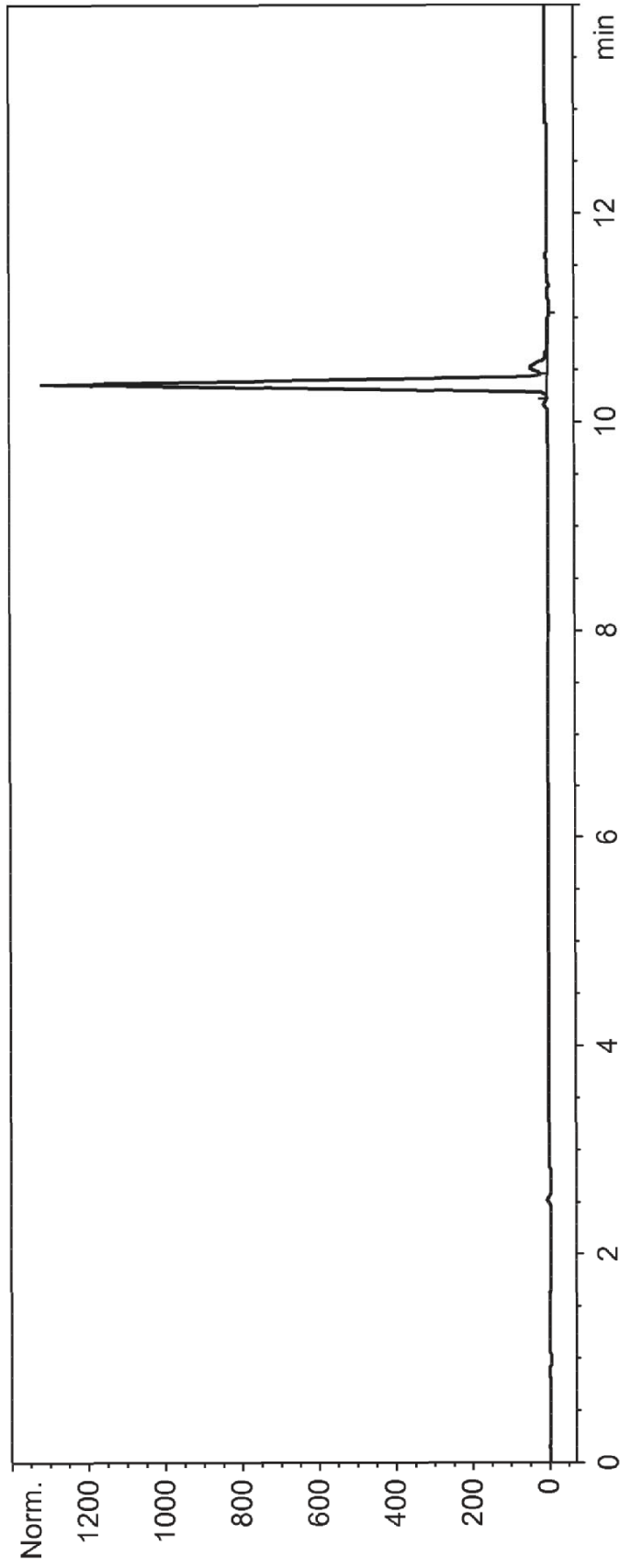
14. Un procedimiento según la reivindicación 3, en donde la cetona es



30 donde X es CF₃.

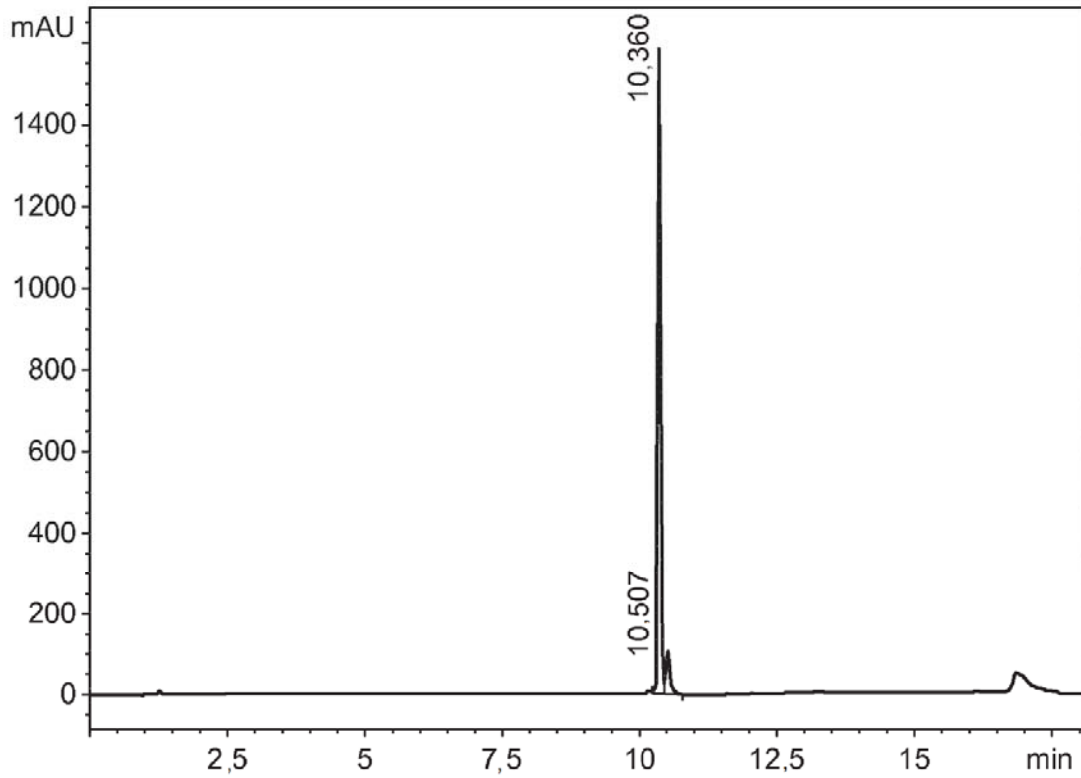
15. Un procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en donde el alcohol poliinsaturado se obtiene por reducción de su aldehído correspondiente en presencia de un agente reductor electrófilo tal como DIBAH.

35



Cromatograma de HPLC que muestra los resultados del Experimento 2 (sin % de área)

FIG. 1

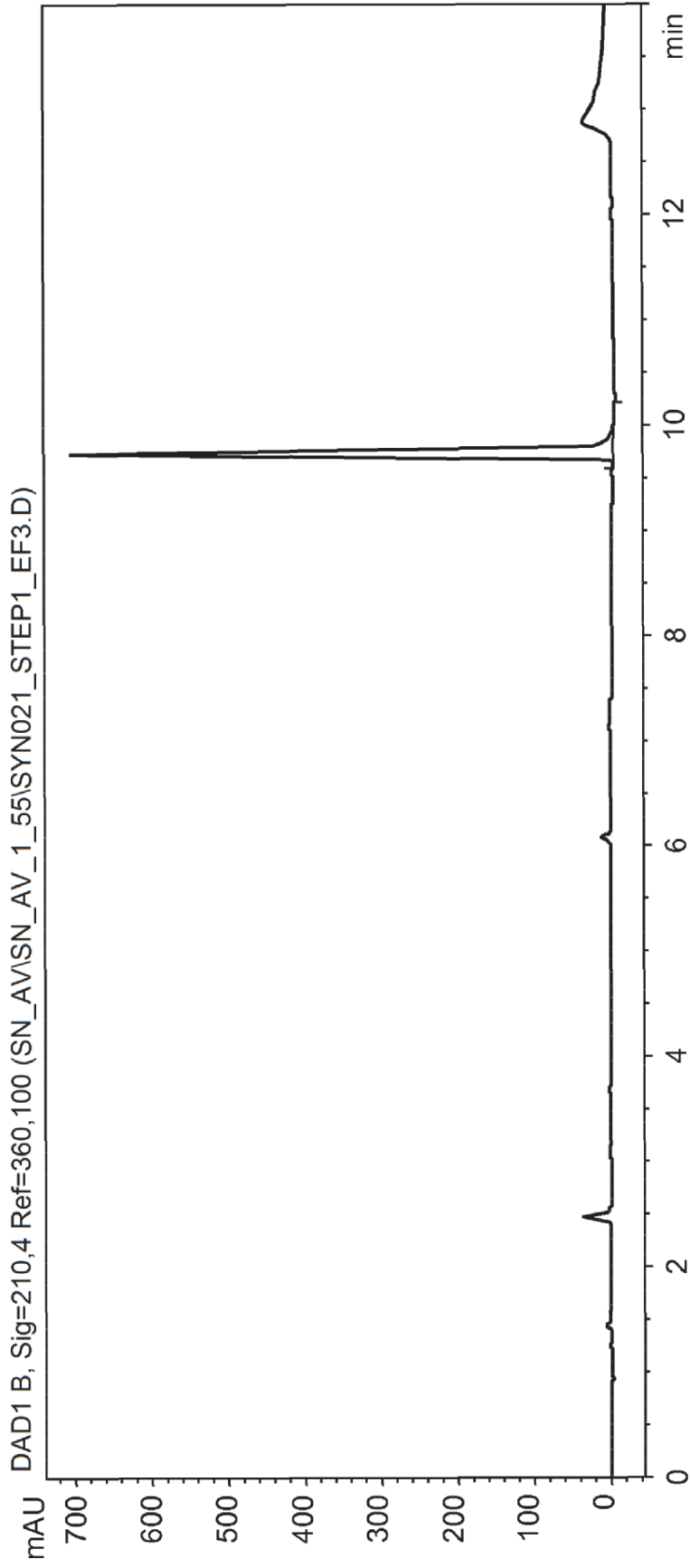


Señal 1: DAD1 B, Sig=210, 4 Ref=360, 100

Pico n.º	TR (min)	Tipo	Anchura (min)	Área	Área %	Altura	Nombre
1	10,360	MF	0,065	6214,439	92,614	1593,639	
2	10,507	FM	0,079	495,595	7,386	103,964	

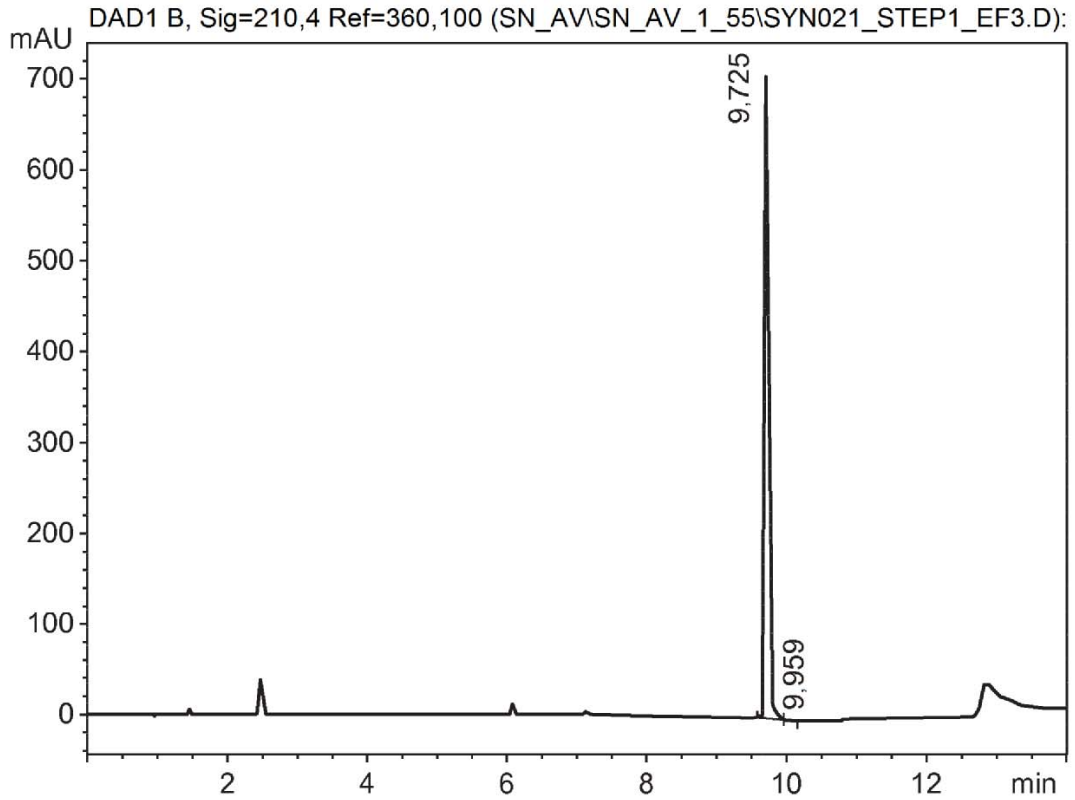
Cromatograma de HPLC que muestra los resultados del Experimento 2 (con % de área)

FIG. 2



Cromatograma de HPLC que muestra los resultados del Experimento 3 (sin % de área)

FIG. 3

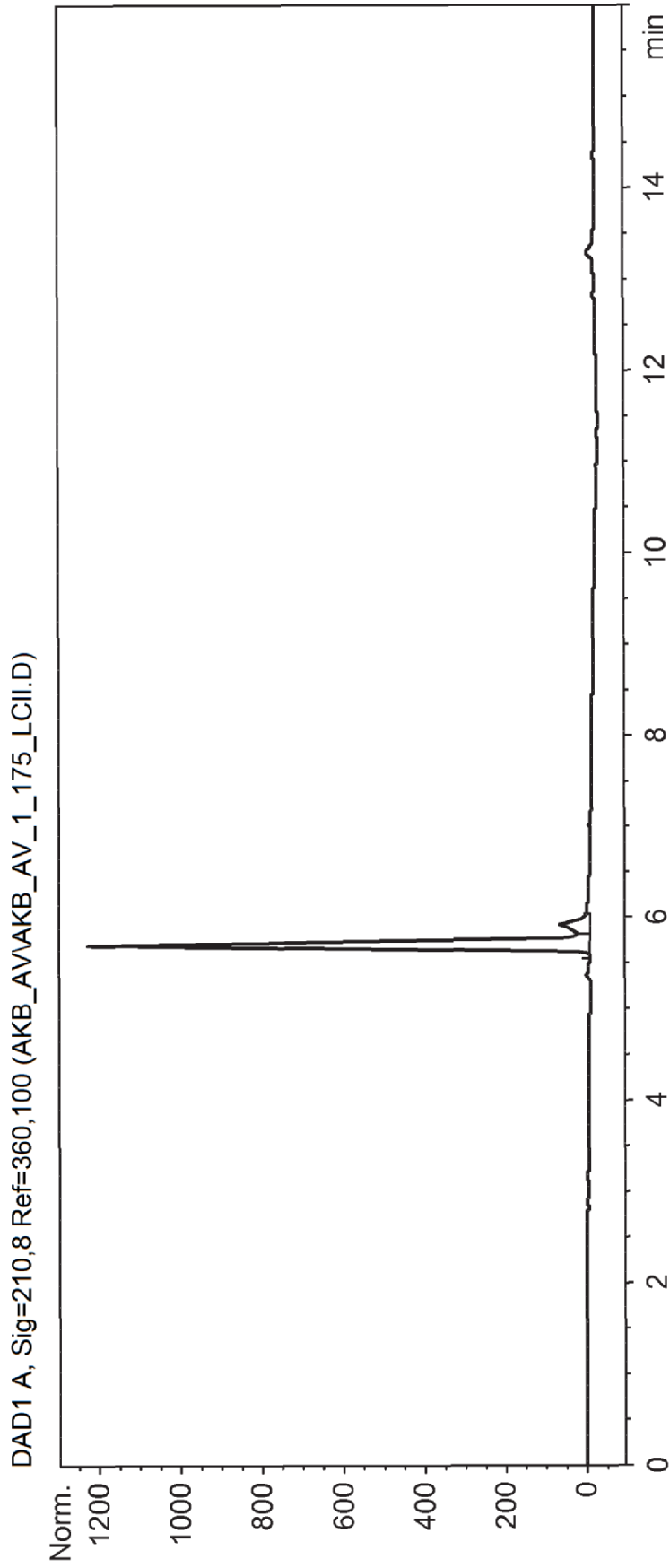


Señal 1: DAD1 B, Sig=210, 4 Ref=360, 100

Pico n.º	TR (min)	Tipo	Anchura (min)	Área	Área %	Altura	Nombre
1	9,725	MF	0,063	2685,342	99,714	712,012	
2	9,959	FM	0,082	7,705	0,286	1,572	

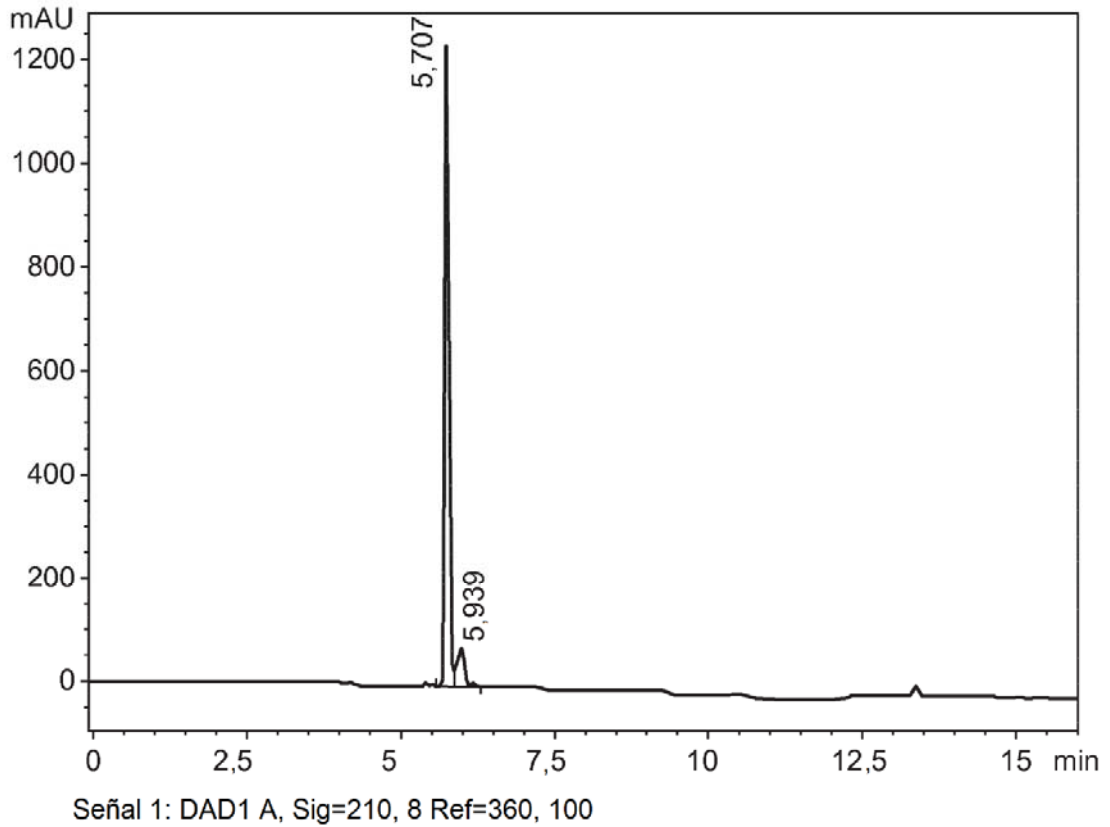
Cromatograma de HPLC que muestra los resultados del Experimento 3 (con % de área)

FIG. 4



Cromatograma de HPLC que muestra los resultados del Experimento 4 (sin % de área)

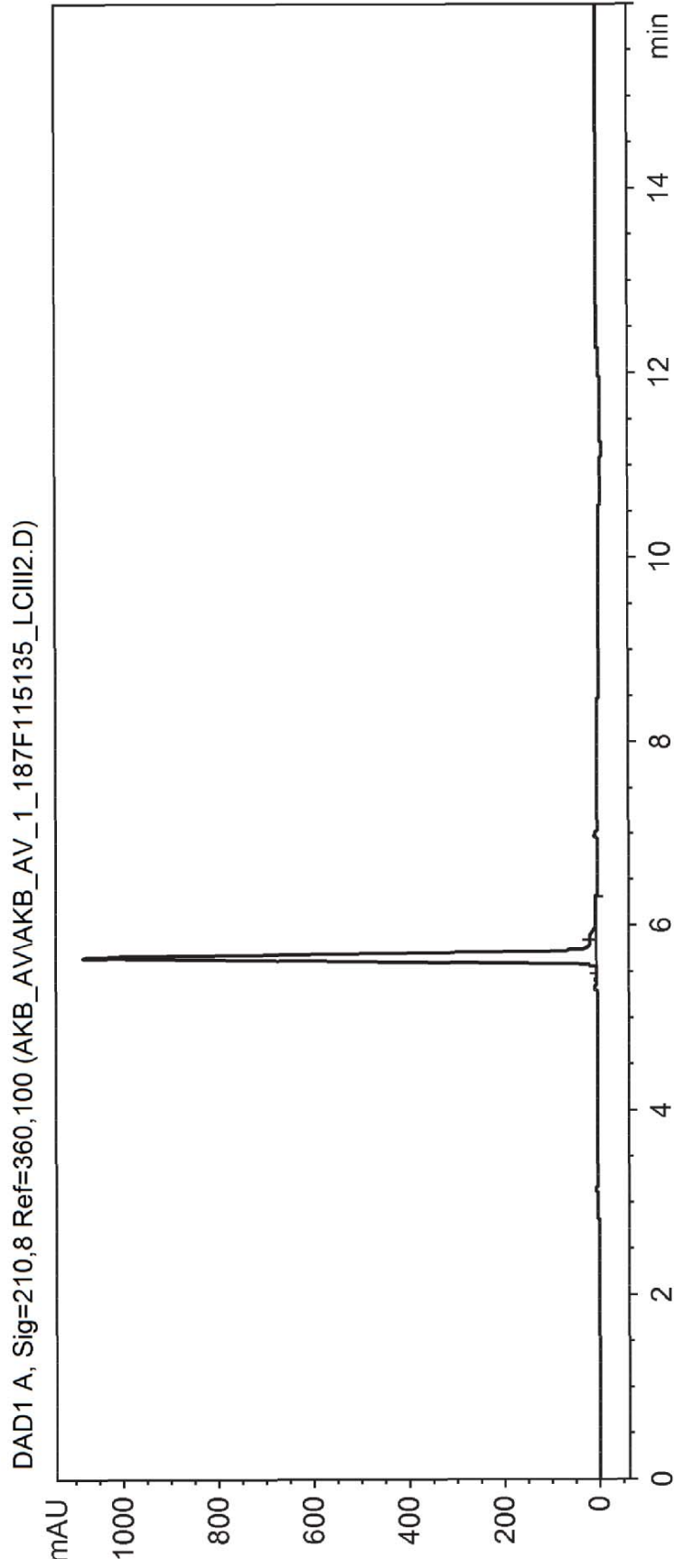
FIG. 5



Pico n.º	TR (min)	Tipo	Anchura (min)	Área	Área %	Altura	Nombre
1	5,707	MF	0,072	5382,040	90,007	1238,745	
2	5,939	FM	0,137	597,524	9,993	72,642	

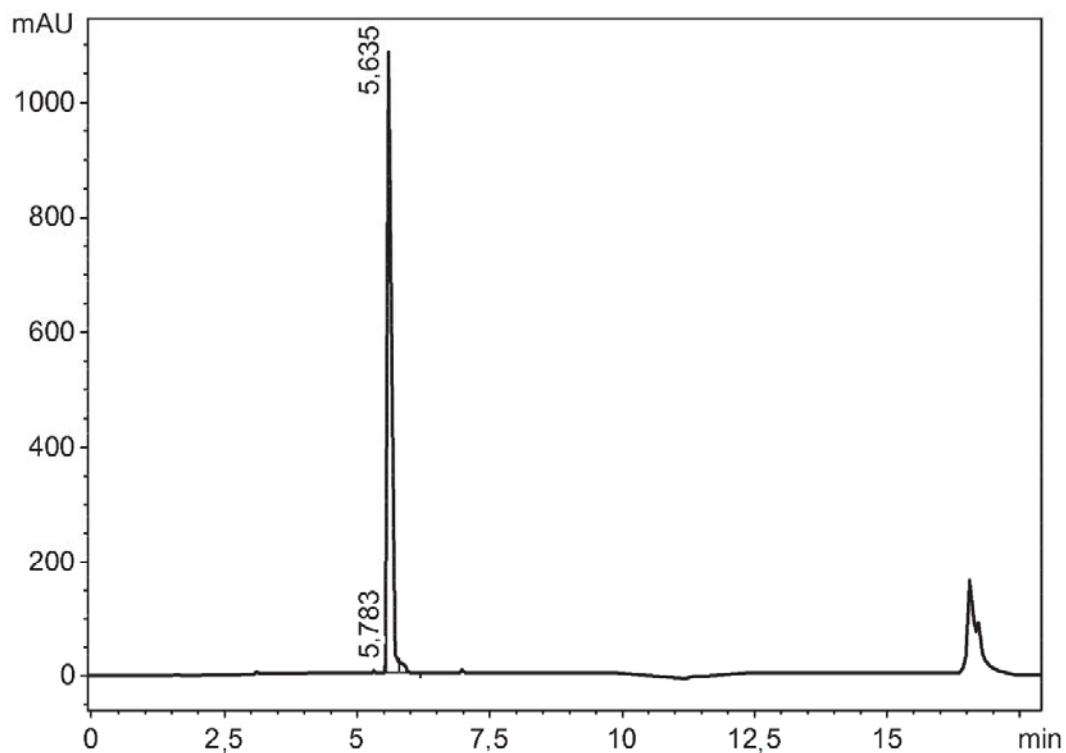
Cromatograma de HPLC que muestra los resultados del Experimento 4 (con % de área)

FIG. 6



Cromatograma de HPLC que muestra los resultados del Experimento 5 (sin % de área)

FIG. 7



Señal 1: DAD1 A, Sig=210, 8 Ref=360, 100

Pico n.º	TR (min)	Tipo	Anchura (min)	Área	Área %	Altura	Nombre
1	5,635	MF	0,072	4690,823	96,972	1090,707	
2	5,783	FM	0,168	146,495	3,028	14,499	

Cromatograma de HPLC que muestra los resultados del Experimento 5 (con % de área)

FIG. 8