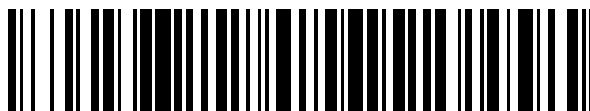


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 780 200**

51 Int. Cl.:

**C07C 69/602** (2006.01)

**C07C 57/03** (2006.01)

**C07C 57/13** (2006.01)

**A61K 31/11** (2006.01)

**A61K 31/202** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2006** E 12166293 (6)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020** EP 2540696

54 Título: **Carotenoides trans, formulación y usos**

30 Prioridad:

**24.02.2005 US 655422 P**

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

**24.08.2020**

73 Titular/es:

**DIFFUSION PHARMACEUTICALS LLC (100.0%)  
1317 Carlton Avenue, Suite 200  
Charlottesville, VA 22902, US**

72 Inventor/es:

**GAINER, JOHN, L. y  
LANZ, MARC**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 780 200 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

Carotenoides *trans*, formulación y usos

5 Se describen métodos de síntesis química para fabricar carotenoides *trans*, carotenoides *trans* bipolares (BTC), entre ellos sales de carotenoides *trans* bipolares (BTCS), tales como crocetinato *trans* de sodio (TSC), los propios compuestos, métodos para formularlos, para administrarlos y métodos para utilizarlos.

## Antecedentes de la invención

10 Los carotenoides son una clase de hidrocarburos que consisten en unidades de isoprenoides unidas de tal manera que su distribución es simétrica desde el centro de la molécula. El esqueleto de la molécula consiste en enlaces dobles y sencillos conjugados entre carbonos, y también pueden tener grupos colgantes. Aunque al principio se creía que el esqueleto de un carotenoide contenía 40 carbonos, hace tiempo que se ha reconocido que los carotenoides pueden tener también esqueletos carbonados que contienen menos de 40 átomos de carbono. Los 4 enlaces sencillos que rodean el doble enlace carbono-carbono se encuentran en el mismo plano. Si los grupos colgantes se encuentran del mismo lado del doble enlace carbono-carbono, se dice que los grupos están en *cis*; si están en lados opuestos del enlace carbono-carbono, se dice que están en *trans*. Debido al gran número de dobles enlaces, hay muchísimas posibilidades para la isomería geométrica (*cis/trans*) de los carotenoides, y la isomerización se produce con facilidad en solución. Una serie de libros son una excelente referencia para muchas de las propiedades, etc., de los carotenoides (*Carotenoids*, editado por G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander, Birkhauser Verlag, Basilea, 1995).

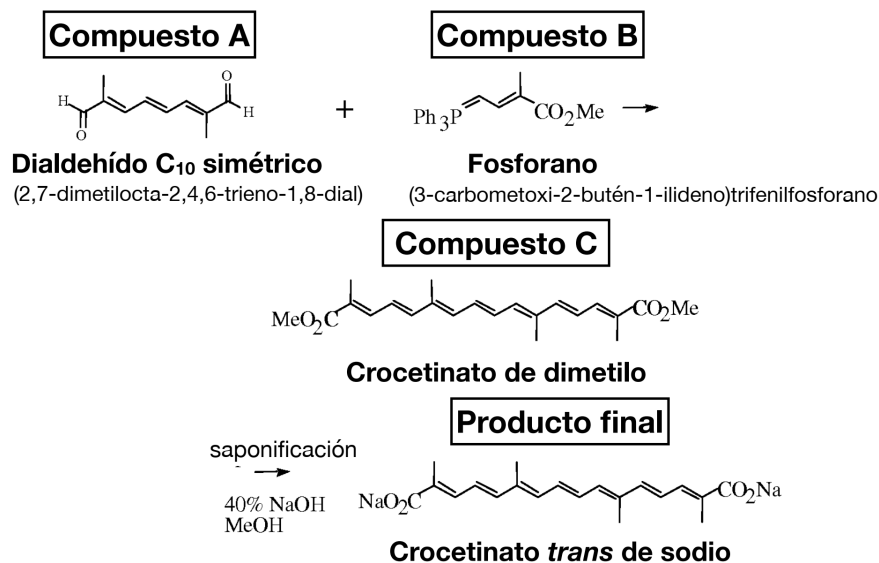
20 Muchos carotenoides son apolares y, por lo tanto, son insolubles en el agua. Estos compuestos son muy hidrófobos, lo que dificulta su formulación para los usos biológicos porque, para solubilizarlos, se debe utilizar un solvente orgánico en vez de un solvente acuoso. Otros carotenoides son monopolares y tienen características de tensioactivos (una porción hidrófoba y un grupo polar hidrófilo). Tal cual, estos compuestos se ven atraídos a la superficie de una solución acuosa en vez de disolverse en el volumen de líquido. Existen unos pocos compuestos carotenoides bipolares naturales, los cuales contienen una porción hidrófoba central, así como dos grupos polares, uno en cada extremo de la molécula. Se ha descrito (*Carotenoids*, vol. 1A, pág. 283) que los sulfatos de carotenoides son «significativamente hidrosolubles hasta 0,4 mg/ml». Otros carotenoides que se podría pensar que son bipolares tampoco son muy hidrosolubles. Entre ellos se incluyen los dialdehídos y las dicetonas. También se ha descrito una sal dipiridínica de crocetina, pero su hidrosolubilidad es de menos de 1 mg/ml a la temperatura ambiente. Otros ejemplos de carotenoides bipolares son la crocetina y la crocina (ambas se encuentran en la especia azafrán). Sin embargo, la crocetina es solo moderadamente hidrosoluble. De hecho, entre todos los carotenoides bipolares naturales, solo la crocina muestra una solubilidad significativa en el agua.

25 Las patentes de los EE. UU. n.ºs 4 176 179; 4 070 460; 4 046 880; 4 038 144; 4 009 270; 3 975 519; 3 965 261; 3 853 933; y 3 788 468 se refieren a los diferentes usos de la crocetina.

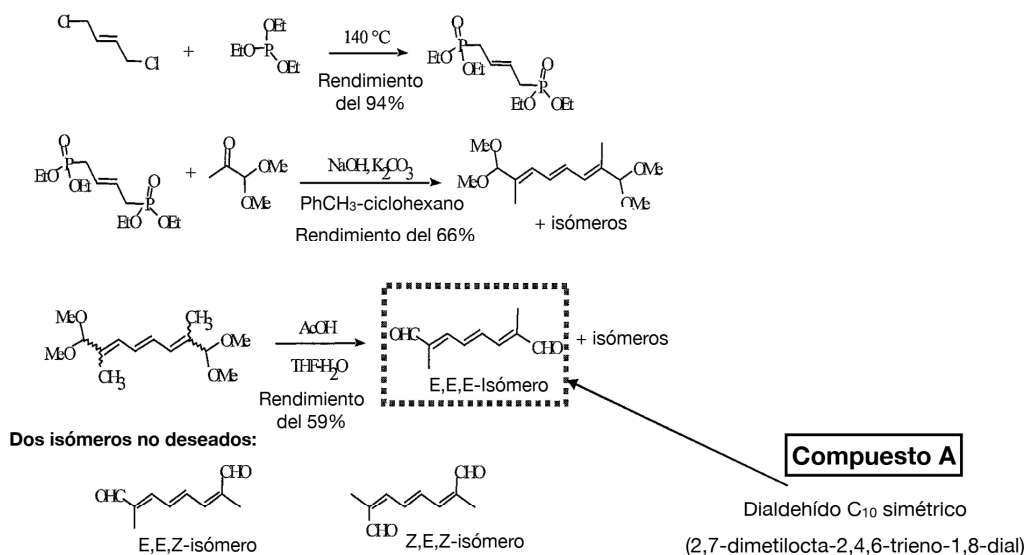
35 La patente de los EE. UU. n.º 6 060 511 se refiere al crocetinato *trans* de sodio (TSC) y sus usos. El TSC se fabrica al hacer reaccionar el azafrán que se produce de forma natural con hidróxido de sodio seguido de extracciones. La patente '511 cubre un método de extracción para fabricar una sal de carotenoide *trans* bipolar (crocetinato *trans* de sodio), una composición purificada obtenida de la extracción y diferentes usos de la composición, tales como mejorar la capacidad de difusión del oxígeno y el tratamiento del choque hemorrágico.

La solicitud internacional en el marco del PCT de la patente de EE. UU. US03/05521 se refiere al método de síntesis química para fabricar sales de carotenoides *trans* bipolares y los métodos para utilizarlas.

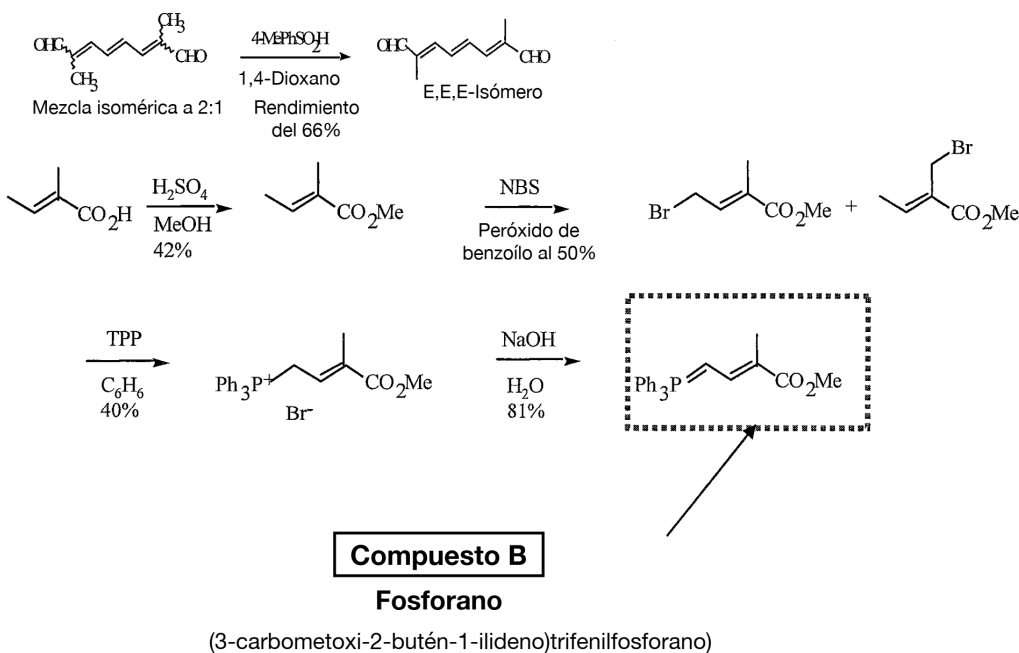
40 En la figura que viene a continuación se muestran las últimas etapas de un proceso de síntesis química para el TSC descritas en la solicitud internacional en el marco del PCT de la patente de EE. UU. US03/05521.



El procedimiento de síntesis completa para el TSC, tal y como se describe en la solicitud en el marco del PCT, llegó a los intermedios clave, el «compuesto A» y el «compuesto B» mediante procedimientos sintéticos de muchas etapas que se muestran en las dos figuras que vienen a continuación:



**Isomerización de dialdehído indeseado a deseado:**



Una forma habitual de tratamiento para los tumores malignos, o cáncer, es la radioterapia. La radioterapia se administra en forma de ondas electromagnéticas o partículas cargadas o neutras. Las ondas electromagnéticas están representadas por los rayos X o los rayos γ. Las partículas cargadas toman la forma de electrones, protones o iones pesados, mientras que los neutrones son un ejemplo de partículas neutras. Durante el transcurso del tratamiento, la radiación se debe administrar con un haz externo, un implante intersticial, o una combinación de los dos. Con la radioterapia, las unidades habituales de medición son el rad y el Gray. Una dosis de 1 rad para cualquier tipo de radioterapia da lugar a la absorción de 100 ergios de energía por gramo de tejido destinatario, y 1 Gray es igual a 100 rad. Por lo tanto, un centiGray (cGy) equivale a un rad. Para la mayoría de tumores más pequeños de cabeza y cuello, lo adecuado suele ser un ciclo de radioterapia que consiste en de 6000 a 6500 cGy durante 6 a 6,5 semanas. Las dosis de 6500 a 7000 cGy durante 6,5 a 7,5 semanas pueden ser necesarias para controlar masas más grandes con dosis incluso más elevadas necesarias para una enfermedad voluminosa. Se ha demostrado que una dosis de 5000 cGy durante 5 semanas controlará la enfermedad subclínica en el 90-95 % de los pacientes. Una célula tumoral viable es aquella en la que está presente la capacidad de división sin límite. Una célula tumoral debe perder esta capacidad reproductiva para considerarla muerta. El control tumoral con radioterapia se consigue por la eliminación de todas las células viables dentro de un tumor, y una dosis determinada de radiación dará lugar a la muerte de una determinada proporción (no número) de células viables con cada administración. Por lo tanto, cuanto mayor es el volumen del tumor, mayor es la dosis total de radiación que se necesita para controlar el tumor. Una célula tumoral que se ha

esterilizado o matado con radioterapia no tiene necesariamente que haberse alterado morfológicamente y lo típico es que manifieste la muerte celular en el momento de la mitosis (división celular). Es importante observar que esta muerte quizá no ocurra en la primera división celular después de la radiación. Pueden tener lugar varios ciclos celulares aparentemente exitosos antes de que la muerte celular se manifieste abiertamente, pero la célula todavía no se considera viable puesto que se ha perdido ya su potencial reproductivo sin límite.

La radiosensibilidad de las células tumorales está influida por muchos factores. No hace mucho se pensaba que la histología y la localización del tumor eran muy importantes para el posible control de los tumores con radioterapia. No cabe duda de que algunos tumores son más difíciles de controlar con la radioterapia, pero la histología ya no se considera que es importante. El número de células tumorales viables y la proporción de las células hipóxicas (que carecen de oxígeno) dentro de un tumor son contribuciones importantes para la radiosensibilidad, y ambos varían con el tamaño de un tumor dado.

Durante muchos años ha resultado evidente que el oxígeno desempeña una función importante en la sensibilidad que el tumor ofrece ante la radioterapia. Está bien consolidado que las células tumorales hipóxicas son más radiorresistentes. Aunque el mecanismo de este fenómeno no se conoce del todo, se cree que la presencia de oxígeno repara la lesión por radiación que se produce dentro de la célula y la hace inestable, y que, si no, no se reparará. El cambio máximo de la radiosensibilidad se produce sobre el margen de 0 a 20 mmHg, un valor que está muy por debajo de la tensión venosa del oxígeno. En la experimentación con tumores sólidos se ha demostrado que hay una hipoxia significativa, y las pruebas indirectas significativas indican que dentro de los tumores humanos también hay condiciones de hipoxia. Se pueden desarrollar las condiciones hipóxicas debido a que los tumores a menudo crecen por encima de lo que aporta el torrente circulatorio.

La quimioterapia es otro método utilizado para tratar el cáncer. Se administran los fármacos, tales como carmustina (BCNU), temozolamida (TMZ), cisplatino, metotrexato, etc., y estos fármacos harán al final que las células tumorales acaben muriendo o que no crezcan. Se ha observado que la quimioterapia, al igual que la radioterapia, tiene menos eficacia con las células hipóxicas que se suelen dar en los tumores.

La tensión arterial elevada, o hipertensión, afecta casi a uno de cada cuatro estadounidenses. Esta enfermedad potencialmente mortal puede darse prácticamente sin síntomas. La tensión arterial está caracterizada por dos valores: la tensión arterial sistólica y la tensión arterial diastólica. La hipertensión se suele definir a una tensión sistólica por encima de 140 mmHg o una tensión diastólica por encima de 90 mmHg; sin embargo, estas definiciones cambian y algunos médicos creen que la tensión arterial debe permanecer en 120/70 durante toda la vida, bien de forma natural o con el uso de medicamentos antihipertensivos.

En algunas personas, el sistema que regula la tensión arterial no funciona bien: las arteriolas de su cuerpo se mantienen estrechadas, lo que eleva la tensión en los vasos sanguíneos más grandes. La elevación constante de la tensión arterial por encima de 140/90 mmHg, de acuerdo con la mayoría de los expertos, se denomina hipertensión. Aproximadamente el 90 % de las personas con hipertensión arterial tiene lo que se denomina en la actualidad hipertensión «idiopática», lo que significa que no tiene una causa identificable. En el restante 10 % de los casos, la elevación de la tensión arterial se debe a nefropatía, diabetes o cualquier otro trastorno subyacente. El artículo de WILKINS E.S. et al. titulado «The effect of crocetin on the irradiation of Walker-256: *in vitro* and *in vivo* studies», publicado en CANCER BIOCHEMISTRY BIOPHYSICS de la editorial estadounidense GORDON AND BREACH SCIENCE, INC, vol. 3, el 1 de enero de 1979 (1979-01-01), págs. 71-74, XP008157982, ISSN: 0305-7232, trata del efecto del compuesto carotenoide, la crocetina, sobre la radiación de Walker-256, tanto *in vivo* como *in vitro*. Se describe que el compuesto carotenoide, la crocetina, se halló que actúa *in vivo* como sensibilizador para la radioterapia de los tumores Walker-256. Además, los experimentos *in vitro* muestran que este efecto probablemente se produce en el plano celular, en vez del plano sistémico. Además, describe que los experimentos se deben hacer con otros sistemas tumorales para determinar si este efecto es general. Se supone que la acción de la crocetina se debe a que transporta mejor el oxígeno desde el torrente circulatorio hasta el tejido tumoral.

### Compendio de la invención

La invención se refiere a composiciones para ser usadas en los tratamientos, en concreto en un método para tratar un tumor en un mamífero que comprende administrar al mamífero (i) un carotenoide *trans* y (ii) radioterapia o quimioterapia.

En concreto, la presente invención hace referencia a una composición farmacéutica que comprende

(1) una sal de carotenoide *trans* bipolar que tiene la fórmula:



donde: Y = un catión que puede ser igual o diferente, Z = un grupo polar que puede ser igual o diferente y que está asociado al catión,

y TCRO = un esqueleto carotenoide *trans* lineal con dobles enlaces y enlaces simples carbono-carbono conjugados y que tienen grupos colgantes X, en donde los grupos colgantes X, que pueden ser iguales o diferentes, son un grupo de hidrocarburo lineal o ramificado que tiene 10 átomos de carbono o menos, o un halógeno, y

(2) una ciclodextrina;

5 y en donde la sal carotenoide *trans* bipolar es crocetinato *trans* de sodio (TSC),

y en donde la absorbancia de la sal de carotenoide *trans* bipolar en la solución acuosa en el pico más elevado que se aparece en el espectro de longitudes de onda visibles dividido por la absorbancia del pico que se produce en el ultravioleta es mayor de 7,

10 para ser usados en tratamientos, optativamente para ser usados en el tratamiento de un tumor en un mamífero en combinación con radioterapia o quimioterapia.

### Descripción detallada de la invención

Compuestos de la descripción

15 Se describen carotenoides *trans* que incluyen compuestos de diésteres, dialcoholes, dicetonas y diácidos de carotenoides *trans*, carotenoides *trans* bipolares (BTC) y sales de carotenoides *trans* bipolares (BTCS), y la síntesis de los compuestos que tienen la estructura:



donde:

20 – Y (que puede ser igual o diferente en los dos extremos) = H o un catión diferente a H, preferiblemente Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup> o Li<sup>+</sup>. Y es ventajosamente un ion metálico monovalente. Y puede ser también un catión orgánico, p. ej., R<sub>4</sub>N<sup>+</sup>, R<sub>3</sub>S<sup>+</sup>, donde R es H, o C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub> en donde n es de 1 a 10, ventajosamente de 1 a 6. Por ejemplo, R puede ser metilo, etilo, propilo o butilo.

25 – Z (que puede ser igual o diferente en los dos extremos) = grupo polar que está asociado con H o con el catión. Existe la posibilidad de que incluya el carbono terminal del carotenoide (o del compuesto relacionado con los carotenoides), y que este grupo pueda ser un grupo carboxilo (COO<sup>-</sup>) o un grupo CO (p. ej., un grupo éster, aldehído o cetona), o un grupo hidroxilo. Este grupo puede ser también un grupo sulfato (OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) o un grupo monofosfato (OPO<sub>3</sub><sup>-</sup>), (OP(OH)O<sup>2-</sup>), un grupo difosfato, trifosfato, o combinaciones de los mismos. Este grupo puede ser un grupo éster de COOR, en donde R es C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>.

30 – TCRO = carotenoide *trans* o esqueleto relacionado con carotenoide (ventajosamente de menos de 100 carbonos) que es lineal, que tiene grupos colgantes (definidos más abajo) y que comprende típicamente enlaces simples y dobles carbono-carbono «conjugados» o alternantes (en una realización, el TCRO no está totalmente conjugado como en un licopeno).

35 Los grupos colgantes (X) son típicamente grupos metilo, pero pueden ser otros grupos como los que se explican más adelante. En una realización ventajosa, las unidades del esqueleto se agrupan de tal manera que su distribución está invertida desde el centro de la molécula. Los 4 enlaces sencillos que rodean el doble enlace carbono-carbono se encuentran en el mismo plano. Si los grupos colgantes se encuentran del mismo lado del doble enlace carbono-carbono, se dice que los grupos están en *cis* (también conocido como «Z»); si están en el lado opuesto del enlace carbono-carbono, se dice que los grupos están en *trans* (también conocidos como «E»). A lo largo de este caso, los isómeros se denominarán *cis* y *trans*.

40 – Los compuestos descritos en la presente memoria son *trans*. El isómero *cis* es típicamente un perjuicio y hace que no se incremente la capacidad de difusión. En una realización, se puede utilizar un isómero *cis* donde el esqueleto permanece lineal.

45 La colocación de los grupos colgantes puede ser simétrica con respecto al punto central de la molécula, o puede ser asimétrica de tal modo que el lado izquierdo de la molécula no se parece al lado derecho de la molécula, bien en términos del tipo de grupo colgante o por su relación espacial con respecto al carbono del centro. Los grupos colgantes X (que pueden ser iguales o diferentes) son átomos de hidrógeno (H), o un grupo de hidrocarburo lineal o ramificado que tiene 10 carbonos o menos, ventajosamente 4 o menos, (de manera optativa contienen un halógeno), o un halógeno. X podría ser también un grupo éster (COO<sup>-</sup>) o un grupo etoxi/metoxi. Ejemplos de X son un grupo metilo (CH<sub>3</sub>), un grupo etilo (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), un fenilo o una estructura de anillo aromático simple con o sin grupos colgantes del anillo, un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) que contiene halógeno, tal como CH<sub>2</sub>Cl, o un halógeno tal como Cl o Br, o un metoxi (OCH<sub>3</sub>) o etoxi (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). Los grupos colgantes pueden ser iguales o diferentes, pero los grupos colgantes utilizados deben mantener el esqueleto lineal. Aunque existen muchos carotenoides en la naturaleza, no ocurre igual con las sales de carotenoides. La patente de los EE. UU. n.º 6 060 511 se refiere al crocetinato *trans* de sodio (TSC). El TSC se fabricó

al hacer reaccionar el azafrán que se produce de forma natural con hidróxido de sodio seguido de extracciones que seleccionaron principalmente el isómero *trans*.

La presencia de los isómeros *cis* y *trans* de un carotenoide o sal de carotenoide se puede determinar mirando al espectro visible ultravioleta de la muestra del carotenoide disuelto en una solución acuosa. Dado el espectro, el valor de dividir la absorbancia del pico más alto que se produce en el margen de longitudes de onda visibles de 380 a 470 nm (el número depende del solvente utilizado y la longitud de la cadena del BTC o de la BTCS. La adición de los grupos colgantes o la diferente longitud de las cadenas cambiará este pico de absorbancia, pero el experto en la técnica reconocerá la existencia de un pico de absorbancia en el margen visible que corresponde a la estructura del esqueleto conjugado de estas moléculas) por la absorbancia del pico que se produce en el margen de longitudes de onda UV de 220 a 300 nm, se puede utilizar para determinar el nivel de pureza del isómero *trans*. Cuando el diéster de carotenoide *trans* (TCD) o la BTCS se disuelve en agua, el pico más alto del margen de longitudes de onda visibles estará entre 380 nm y 470 nm (en función de la estructura química exacta, de la longitud del esqueleto y de los grupos colgantes) y el pico del margen de longitudes de onda UV estará entre 220 a 300 nm. De acuerdo con M. Craw y C. Lambert, *Photochemistry and Photobiology*, vol. 38 (2), 241-243 (1983), el resultado del cálculo (en ese caso se analizó la crocetina) fue de 3,1, que aumentaba a 6,6 después de la purificación.

Al realizar el análisis de Craw y Lambert, en el que se emplea una cubeta diseñada para márgenes de longitudes de onda visibles e UV, sobre la sal de sodio de crocetina *trans* de la patente de los EE .UU. n.º 6 060 511 de titularidad compartida (TSC fabricado al hacer reaccionar el azafrán que se produce de forma natural con hidróxido de sodio seguido de extracciones que seleccionaban principalmente el isómero *trans*), el valor obtenido promedia aproximadamente 6,8. Al realizar dicha prueba con el TSC sintético de la invención en cuestión, dicha relación es mayor de 7,0 (p. ej., de 7,0 a 8,5), ventajosamente mayor de 7,5 (p. ej., de 7,5 a 8,5), lo más ventajosamente mayor de 8. El material sintetizado es un isómero *trans* «más puro» o muy purificado.

Formulación y administración de los compuestos y composiciones de calidad farmacéutica de la descripción

Al formular carotenoides *trans*, entre ellos los BTCS, tales como el crocetinato *trans* de sodio (TSC), con otros ingredientes (excipientes), resulta ventajoso: mejorar la solubilidad (incrementar la concentración del agente activo (p. ej., de TSC) en la solución), la estabilidad, la biodisponibilidad y el equilibrio isotónico del BTC, reducir el pH de una solución acuosa, y/o incrementar la osmolaridad de una solución acuosa. El excipiente debe actuar como aditivo para impedir la autoagregación de las unidades monoméricas de BTC de la solución, o para impedir la precipitación prematura del BTC. La adición del excipiente debe ayudar en al menos uno de estos aspectos. Las moléculas de los carotenoides *trans* bipolares (BTC) se pueden formular de diferentes formas. Una formulación básica es una mezcla del BTC en agua estéril, administrada por inyección intravenosa. Esta formulación se puede modificar a través de la inclusión de diferentes excipientes farmacéuticos, entre ellos las ciclodextrinas. Estas formulaciones también se pueden administrar por inyección intravenosa.

Cualquiera de las diferentes formulaciones líquidas descritas más arriba se puede liofilizar para formar un polvo seco con características mejoradas con respecto a solubilidad y estabilidad. Tales formas en polvo se reconstituyen a continuación para la administración. Un método consiste en reconstituir el polvo en un líquido, tal como solución salina o agua estéril para la inyección y, a continuación, administrarla por inyección intravenosa. Este método puede incluir el uso de una jeringuilla de varios compartimentos que contiene el polvo en un compartimento y el líquido en el otro compartimento. De igual forma, el producto se puede envasar en un vial que contiene una barrera que separa el polvo del líquido. Antes de la administración, se rompe la barrera y los componentes se mezclan antes de la inyección intravenosa.

Además de la inyección intravenosa, las vías de administración para las moléculas carotenoides *trans* formuladas específicamente incluyen la inyección intramuscular, la administración por inhalación, la administración oral y la administración transdérmica.

#### • Ciclodextrinas

Para administrar algunos fármacos, es necesario añadir otro compuesto que ayudará a incrementar la absorción/solubilidad/concentración del ingrediente activo farmacéutico (IAF). Tales compuestos se denominan excipientes y las ciclodextrinas son ejemplos de excipientes. Las ciclodextrinas son cadenas de glúcidos cíclicos derivados del almidón. Difieren unas de otras en el número de unidades de glucopiranosas de su estructura. Las ciclodextrinas originales contienen seis, siete y ocho unidades de glucopiranosas y se denominan ciclodextrinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , respectivamente. Las ciclodextrinas se descubrieron por primera vez en 1891 y se han utilizado como parte de preparaciones farmacéuticas durante varios años.

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos con enlaces ( $\alpha$ -1,4) entre las  $\alpha$ -D-glucopiranosas que contienen una cavidad central relativamente hidrófoba y una superficie externa hidrófila. En la industria farmacéutica, las ciclodextrinas se han utilizado principalmente como complejantes para incrementar la hidrosolubilidad de los fármacos poco hidrosolubles y para incrementar su biodisponibilidad y su estabilidad. Además, las ciclodextrinas se utilizan para reducir o impedir la irritación digestiva u ocular, reducir o eliminar olores o sabores desagradables, impedir las

interacciones entre moléculas de fármaco o del fármaco con los aditivos, o incluso convertir los fármacos líquidos y oleaginosos en polvos microcristalinos o amorfos.

5 Aunque los compuestos de BTC son hidrosolubles, el uso de las ciclodextrinas puede incrementar aún más esa solubilidad, de tal forma que, para una dosis determinada, se pueda administrar un volumen más pequeño de la solución farmacológica.

Hay numerosas ciclodextrinas que se pueden utilizar con los compuestos de la invención. Véase, por ejemplo, la patente de los EE. UU. n.º 4 727 064. Las ciclodextrinas ventajosas son la  $\gamma$ -ciclodextrina, la 2-hidroxiilpropil- $\gamma$ -ciclodextrina y la 2-hidroxiilpropil- $\beta$ -ciclodextrina, u otras ciclodextrinas que realzan la solubilidad del BTC.

10 El uso de la  $\gamma$ -ciclodextrina con el TSC incrementa la hidrosolubilidad del TSC de 3 a 7 veces. Aunque no es un factor tan grande como el que se ha visto en algunos otros casos de incremento de la solubilidad de un agente activo con una ciclodextrina, es importante para permitir la administración parenteral del TSC en dosis de volúmenes más pequeños en los humanos (o en los animales).

15 Las dosis de TSC y  $\gamma$ -ciclodextrina han dado lugar a soluciones acuosas que contienen como mucho 44 mg de TSC por mililitro de solución. Las soluciones no necesitan ser equimolares. La incorporación de la  $\gamma$ -ciclodextrina también permite que el TSC se incorpore al torrente circulatorio cuando se inyecta por vía intramuscular. La absorción es rápida y se alcanza con rapidez la concentración eficaz de TSC en la sangre (como se ha visto en las ratas).

20 La formulación de la ciclodextrina se puede utilizar con otros carotenoides *trans* y sales de carotenoides. El objeto de la invención también incluye nuevas composiciones de carotenoides que no son sales (p. ej., formulaciones ácidas tales como crocetina, crocina o los compuestos intermedios indicados más arriba) y una ciclodextrina. En otras palabras, los carotenoides *trans* que no son sales se pueden formular con una ciclodextrina. El manitol se puede añadir para la osmolaridad, o se puede añadir la mezcla de BTC y ciclodextrina a una solución salina isotónica (véase más adelante).

La cantidad de ciclodextrano utilizado es la cantidad que contendrá el carotenoide *trans*, pero no tanto como para que no libere el carotenoide *trans*.

25 Ciclodextrina-manitol

Un carotenoide *trans*, tal como el TSC, se puede formular con una ciclodextrina tal y como se indica más arriba y un azúcar no metabolizable, tal como manitol (p. ej., D-manitol para ajustar que la presión osmótica sea la misma que la de la sangre). De esta manera, se pueden fabricar soluciones que contienen más de 20 mg de TSC por mililitro de solución. Esta solución se puede añadir a la solución salina isotónica o a otras soluciones isotónicas para diluirla y seguir manteniendo la osmolaridad adecuada. Véase el ejemplo 12.

30 • Manitol/ácido acético

Una BTCS, tal como el TSC, se puede formular con manitol, tal como D-manitol, y un ácido débil, tal como ácido acético o ácido cítrico, para ajustar el pH. El pH de la solución debe estar en torno a 8 a 8,5. Debe estar cercano para ser una solución isotónica y, como tal, poderse inyectar directamente en el torrente circulatorio. Véase el ejemplo 13.

35 • Agua + solución salina

Una BTCS, tal como el TSC, se puede disolver en agua (ventajosamente agua inyectable). A continuación, esta solución se puede diluir con agua, solución salina normal, lactato de Ringer o tampón de fosfato, y la mezcla resultante se puede infundir o bien inyectar.

Tampones

40 A la formulación se le puede añadir un tampón, tal como glicina o bicarbonato, a una cantidad de aproximadamente 50 mM para dar estabilidad al BTC, tal como el TSC.

TSC y  $\gamma$ -ciclodextrina

45 La relación de TSC por ciclodextrina se basa en los datos de la solubilidad de TSC:ciclodextrina. Por ejemplo, 20 mg/ml de TSC,  $\gamma$ -ciclodextrina al 8 %, glicina a 50 mM, manitol al 2,33 % con pH  $8,2 \pm 0,5$ , o 10 mg/ml de TSC y ciclodextrina al 4 % o 5 mg/ml y ciclodextrina al 2 %. Se pueden alterar de algún modo las relaciones entre estos ingredientes, como resulta obvio para el experto en la técnica.

50 Se puede utilizar el manitol para ajustar la osmolaridad y su concentración varía en función de la concentración de otros ingredientes. La glicina se mantiene constante. El TSC es más estable a pH más altos. Se necesita que el pH esté en torno a  $8,2 \pm 0,5$  para dar estabilidad y compatibilidad fisiológica. El uso de la glicina es compatible con la liofilización. Como alternativa, el TSC y la ciclodextrina se formulan con un tampón de bicarbonato a 50 mM en lugar de la glicina.



Retirada de la endotoxina de la  $\gamma$ -ciclodextrina

La ciclodextrina de calidad farmacéutica disponible en el mercado tiene una cantidad de endotoxina que es incompatible con la inyección intravenosa. La cantidad de endotoxina se deben reducir para utilizar la ciclodextrina en una formulación de BTC que se piense inyectar por vía intravenosa.

5 Liofilización

La liofilización, así como otros métodos de cristalización, se pueden utilizar para secar el fármaco BTC.

Los compuestos de la descripción también se pueden formular de acuerdo con el apartado sobre las formulaciones presentadas en la solicitud de los EE. UU. de número de serie 10/647 132.

Administración pulmonar

- 10 Se ha demostrado que el TSC pasa al torrente circulatorio después de la administración por vía pulmonar. La incorporación de la  $\gamma$ -ciclodextrina mejora el paso del TSC a la circulación sistémica, con el efecto global de incrementar la eliminación plasmática. De igual forma, un incremento del volumen de inyección da lugar a una mayor absorción del TSC y durante un periodo de tiempo más grande. Así pues, una inyección con un volumen más grande para la misma dosis da lugar a una mayor biodisponibilidad. Se ha encontrado que el choque hemorrágico en las ratas se puede tratar de un modo satisfactorio con la administración del TSC por vía pulmonar.
- 15

No se necesitan las ciclodextrinas para la absorción pulmonar. Los estudios pulmonares que consisten en el TSC en agua desionizada con el pH ajustado mostraron una absorción satisfactoria en el torrente circulatorio.

Administración intramuscular

- 20 El TSC no se absorbe por vía intramuscular cuando simplemente se disuelve en agua desionizada; sin embargo, la adición de una ciclodextrina (como en el producto farmacológico formulado) hace que se incorpore en el torrente circulatorio. La administración de la  $\gamma$ -ciclodextrina con el TSC dio lugar a una absorción satisfactoria en la circulación sistémica. Se ha visto que el choque hemorrágico en las ratas se puede tratar satisfactoriamente mediante la administración del TSC por medio de una inyección intramuscular. La formulación del TSC con propilenglicol, polímeros de polietilenglicol (PEG) y otros agentes también ayuda a que pase al torrente circulatorio cuando el TSC se administra como inyecciones intramusculares. Estos agentes se pueden utilizar también con otros BTC para la administración intramuscular.
- 25

Administración transdérmica

- 30 En las ratas se ha demostrado que el TSC pasa al torrente circulatorio después de la administración transdérmica cuando se formula con ciclodextrinas. La formulación del TSC con propilenglicol, polímeros de polietilenglicol (PEG), DMSO y otros agentes también ayuda a que pase al torrente circulatorio cuando el TSC se administra por vía transdérmica. Estos agentes se pueden utilizar también con otros BTC para la administración transdérmica.

Administración oral

- 35 Se ha demostrado que el TSC pasa al torrente circulatorio después de la administración oral. Se vio que la incorporación de una ciclodextrina, tal como la  $\gamma$ -ciclodextrina, con un BCT, tal como el TSC, mejora la absorción del TSC en la circulación sistémica. La formulación de un BCT con propilenglicol, polímeros de polietilenglicol (PEG) y otros agentes también mejora la absorción oral hacia el torrente circulatorio.

Usos de los compuestos y composiciones de la descripción

- 40 Los compuestos y composiciones de la descripción pueden ser para su uso en el tratamiento de una serie de trastornos de los mamíferos, entre ellos los humanos. Los compuestos de más arriba pueden ser para su uso en los usos de más adelante, así como en los usos presentados en la solicitud de los EE. UU. con el número de serie 10/647 132.

Carotenoides *trans* y radioterapia de tumores malignos

- 45 Para superar la hipoxia de las células tumorales que da lugar a la radiorresistencia, resulta útil el tratamiento con oxígeno. De hecho, se ha definido una cantidad que se conoce como factor de potenciación del oxígeno (OER). Su valor indica que la dosis de radiación que da lugar a un nivel determinado de supervivencia celular es un factor constante de veces mayor en condiciones hipóxicas que cuando las células están bien oxigenadas. Para la mayoría de las células de mamífero, el OER es de 2,5 a 3. En otros términos, para matar las células hipóxicas es necesario aumentar de 2,5 a 3 veces la dosis de radiación que se necesita para matar las células bien oxigenadas. Así pues, incrementar el transporte del oxígeno hacia los tumores permite que se «maten» las células malignas con dosis de radiación más bajas. Esto es importante en muchos tipos de tumores.

- 50 El uso de un compuesto carotenoide *trans* bipolar, tal como el crocetinato *trans* de sodio, se ha demostrado que incrementa la cantidad de oxígeno que alcanza los tejidos hipóxicos; así pues, es un radiosensibilizador muy útil.

5 Permite utilizar dosis de radiación reducidas, o incrementa la eficacia de la radioterapia y posibilita la regresión del tumor y la cura. Es útil con cualquier tipo de cáncer para el cual se utiliza actualmente la radioterapia. La radioterapia se administra a aproximadamente el 60 % de los pacientes con cáncer y lo típico es que se utilice una dosis de radiación de aproximadamente 6000 a 6500 cGy durante varias semanas. Un BTC o una BTCS, tal como el TSC, se puede utilizar junto con la radioterapia para conseguir una tasa de curación más alta. En una realización, el TSC se administra de 0,02 a 2 mg/kg, ventajosamente de 0,05 a 1 mg/kg, antes de cada dosis de radiación.

Se utilizarán dosis más elevadas para otro tipo de dosificación (p. ej., 3 veces más alta, ya que el TSC no se absorbe del todo por otras vías).

10 En una realización, otro método, tal como el uso de oxígeno hiperbárico, respirar oxígeno puro gaseoso, o la administración de otro compuesto, tal como misonidazol, se realiza además de la administración de un compuesto de BTC, tal como el TSC, para potenciar la eficacia de la radioterapia. Estos métodos adicionales también se pueden llevar a cabo con los otros usos explicados más adelante (p. ej., quimio).

15 Los compuestos de la descripción junto con la radioterapia pueden ser para su uso en el tratamiento de muchos tipos de tumores, entre ellos: carcinomas de células epidermoides, melanomas, linfomas, sarcomas, sarcoides, osteosarcomas, tumores asociados al cáncer de piel, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer ginecológico, cáncer urológico y genital masculino, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de hueso, cánceres de las glándulas endocrinas, cánceres del tubo digestivo (p. ej., cáncer de colon), cánceres de las principales glándulas/órganos digestivos (p. ej., estómago, hígado, páncreas), cáncer del SNC (que incluye los cánceres del cerebro tales como los gliomas), y cáncer de pulmón.

20 El crocetinato *trans* de sodio (TSC) se ha empleado con éxito como sensibilizador de la radioterapia para un carcinoma humano que se injertó en los ratones. Se realizaron estudios que concluyeron que una dosis del TSC que oscila de 0,07 mg/kg a 0,18 mg/kg potenciará el efecto de la radioterapia en estos tipos de tumores.

#### Carotenoides *trans* y quimioterapia

25 El uso de compuestos carotenoides, tal como el crocetinato *trans* de sodio, se ha demostrado que incrementa la cantidad de oxígeno que alcanza los tejidos hipóxicos; lo que lo hace útil en combinación con la quimioterapia del cáncer. Esto garantiza un incremento de la eficacia de la quimioterapia. Es útil para cualquier tipo de cáncer para el cual se utiliza actualmente la quimioterapia. La quimioterapia se administra a la mayoría de los pacientes con cáncer, en los que se utilizan muchos tipos diferentes de agentes. Un BTC o una BTCS, tal como el TSC, se puede utilizar junto con la quimioterapia para conseguir la regresión del tumor y una tasa de curación más alta. En una realización, el TSC se administra de 0,02 a 2 mg/kg, ventajosamente de 0,05 a 1 mg/kg, antes, durante o después de que cada quimioterápico se dosifique por vía intravenosa. Si se dosifica por otra vía, la dosis necesitará verse incrementa por un factor de 2 a 3 para compensar la disminución de la biodisponibilidad.

35 Los compuestos de la descripción junto con la quimioterapia se pueden utilizar en el tratamiento de muchos tipos de tumores, que incluyen: carcinomas de células epidermoides, melanomas, linfomas, sarcomas, sarcoides, osteosarcomas, tumores asociados al cáncer de piel, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer ginecológico, cáncer urológico y genital masculino, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de hueso, cánceres de las glándulas endocrinas, cánceres del tubo digestivo (p. ej., cáncer de colon), cánceres de las principales glándulas/órganos digestivos (p. ej., estómago, hígado, páncreas), cáncer del SNC (que incluye los cánceres del cerebro, tales como los gliomas), y cáncer de pulmón.

#### 40 Fibrilación ventricular

El corazón late cuando las señales eléctricas se mueven por él. La fibrilación ventricular («fib V») es una afección en la que está alterada la actividad eléctrica del corazón. Cuando esto sucede, las cámaras (de bombeo) inferiores del corazón se contraen de un modo rápido sin sincronizar. (Los ventrículos «aletan» en vez de latir). El corazón bombea poco o nada de sangre.

45 La fibrilación ventricular es una afección muy grave. El desmayo y la muerte cardíaca repentina seguirán a los minutos a menos que se le proporcione inmediatamente asistencia médica. Si se trata a tiempo, la fib V y la taquicardia ventricular (latido del corazón extremadamente rápido) se pueden devolver a su ritmo normal. El tratamiento actual para esta afección necesita dar una descarga al corazón con un dispositivo llamado desfibrilador. Otro modo eficaz para corregir los ritmos potencialmente mortales es con el uso de un dispositivo electrónico llamado desfibrilador cardioversor implantable. Este dispositivo suelta una descarga al corazón para normalizar el ritmo del latido si se alteran las señales eléctricas del propio corazón.

55 Tanto la fibrilación ventricular como la taquicardia se pueden también «corregir» con un compuesto de la invención, tal como crocetinato *trans* de sodio (TSC). El TSC, cuando se inyectó por vía intravenosa durante un estudio preclínico de infarto de miocardio, impidió la fibrilación ventricular. Además, se ha demostrado que el TSC reduce la taquicardia en las ratas sometidas a un choque hemorrágico.

Una dosis ventajosa del TSC es de 0,02 a 2 mg/kg y más ventajosamente de 0,05 a 1 mg/kg si se dosifica por vía intravenosa. Si se dosifica por otra vía, la dosis necesitará verse incrementada por un factor de 2 a 3 para compensar la disminución de la biodisponibilidad.

#### Hipertensión

- 5 El consumo de oxígeno en los humanos disminuye con la edad. Además, la incidencia de la hipertensión se incrementa con la edad. Aunque no se desea quedar comprometidos con ninguna teoría específica, se cree que estos dos factores están relacionados, esto es, después de que disminuya el consumo de oxígeno, la tensión arterial aumenta para proporcionar más oxígeno al tejido. Así pues, si se proporciona más oxígeno mediante algún otro método, la tensión arterial debe disminuir. Una dosis ventajosa del TSC es de 0,02 a 2 mg/kg y, más ventajosamente, de 0,05 a 1 mg/kg si se dosifica por vía intravenosa. Si se dosifica por otra vía, la dosis necesitará verse incrementada por un factor de 2 a 3 para compensar la disminución de la biodisponibilidad.

Los compuestos de la descripción, tal como el TSC, hacen disminuir la tensión arterial sistólica, así como la tensión diastólica. También pueden ocasionar una reducción de la frecuencia cardíaca y, así pues, provocar una disminución del pulso, que con frecuencia está acelerado en el paciente hipertenso.

- 15 Una dosis ventajosa del TSC para tratar la hipertensión es de 0,02 a 2 mg/kg y, más ventajosamente, de 0,05 a 1 mg/kg.

#### Hiperlipidemia

- 20 Los compuestos de la descripción, tales como el TSC, pueden disminuir la lipemia, que incluye la concentración de los triglicéridos y del colesterol en la sangre. Una dosis ventajosa del TSC es de 0,02 a 2 mg/kg y, más ventajosamente, de 0,05 a 1 mg/kg si se dosifica por vía intravenosa. Si se dosifica por otra vía, la dosis necesitará verse incrementada por un factor de 2 a 3 para compensar la disminución de la biodisponibilidad.

#### Uso con recién nacidos prematuros

- 25 Los compuestos de la descripción, tal como el TSC, se puede utilizar con recién nacidos prematuros para evitar el entorpecimiento de las habilidades intelectuales. Una dosis ventajosa del TSC es de 0,02 a 2 mg/kg y, más ventajosamente, de 0,05 a 1 mg/kg si se dosifica por vía intravenosa. Si se dosifica por otra vía, la dosis necesitará verse incrementada por un factor de 2 a 3 para compensar la disminución de la biodisponibilidad.

#### Uso durante el parto

- 30 Los compuestos de la descripción, tal como el TSC, se pueden administrar al feto o a la madre durante el parto para evitar la privación de oxígeno que pueda sufrir feto durante el parto. La privación de oxígeno que pueda sufrir feto durante el parto puede dar lugar a daños cerebrales o autismo. Una dosis ventajosa del TSC es de 0,02 a 2 mg/kg y, más ventajosamente, de 0,05 a 1 mg/kg si se dosifica por vía intravenosa. Si se dosifica por otra vía, la dosis necesitará verse incrementada por un factor de 2 a 3 para compensar la disminución de la biodisponibilidad.

#### Uso después de la inhalación de tabaco

- 35 Los compuestos de la descripción, tal como el TSC, se pueden administrar después de la inhalación significativa de tabaco. Una dosis ventajosa del TSC es de 0,02 a 2 mg/kg y, más ventajosamente, de 0,05 a 1 mg/kg si se dosifica por vía intravenosa. Si se dosifica por otra vía, la dosis necesitará verse incrementada por un factor de 2 a 3 para compensar la disminución de la biodisponibilidad.

#### Fibromialgia

- 40 Los compuestos de la descripción, tales como el TSC, se pueden utilizar para tratar la fibromialgia al incrementar la cantidad de oxígeno en las células. Una dosis ventajosa del TSC es de 0,02 a 2 mg/kg y, más ventajosamente, de 0,05 a 1 mg/kg si se dosifica por vía intravenosa. Si se dosifica por otra vía, la dosis necesitará verse incrementada por un factor de 2 a 3 para compensar la disminución de la biodisponibilidad.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos.

#### Ejemplos

Lista de abreviaturas para los ejemplos

- |    |         |                         |
|----|---------|-------------------------|
| 45 | a/a [%] | Pureza relativa en %    |
|    | AP      | Capa acuosa             |
|    | Aprox.  | Aproximadamente         |
|    | COA     | Certificado de análisis |

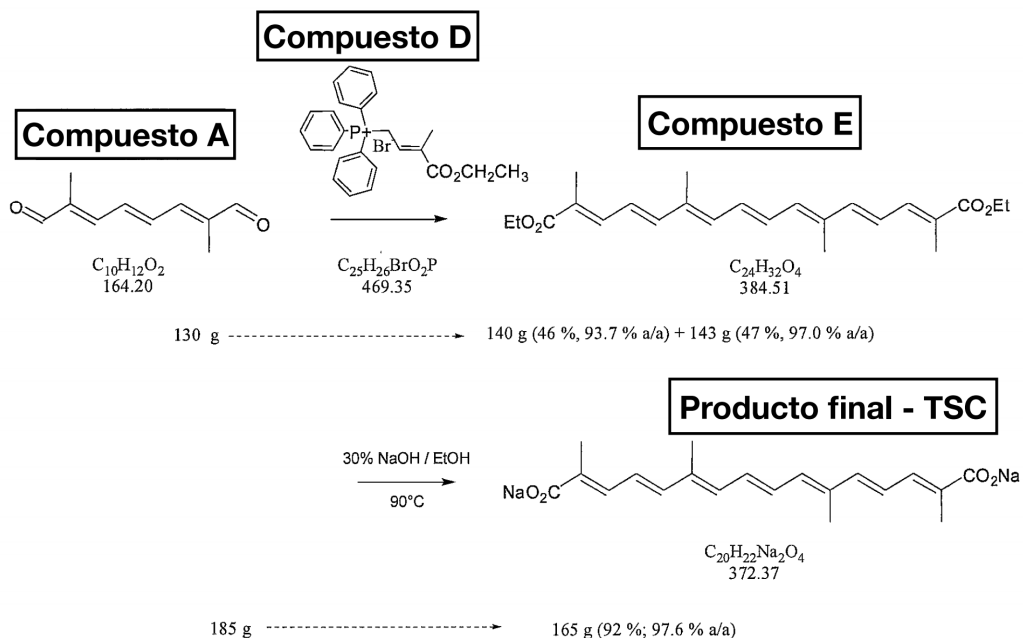
## ES 2 780 200 T3

	corr.	Corregido
	d	Días
	DCM	Diclorometano
	DSC	Calorimetría diferencial de barrido
5	E-No.	Número de referencia para cada uno de los compuestos
	Eq	Equivalentes
	EtOAc	Acetato de etilo
	FW	Peso de la fórmula
	GMP	Buenas prácticas de fabricación
10	h	Hora
	H-RMN	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
	HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
	HV	Herstellungsvorschrift (Procedimiento de síntesis)
	IPC	Control durante el proceso
15	IT	Temperatura interna
	JT	Temperatura de la camisa
	LC-MS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas
	MeOH	Metanol
	min	Minutos
20	ML	Agua madre
	MOR	Registro de operaciones principal
	nc	Sin corregir
	OP	Capa orgánica
	RT	Temperatura ambiente (unos 22 °C)
25	sat.	Saturada
	soln.	Solución
	sm	Sustancia de partida
	Temp.	Temperatura
	TFA	Ácido trifluoroacético
30	Th.	Teórico
	TPPO	Óxido de trifenilfosfina
	TLC	Cromatografía en capa fina
	TSC	Crocetinato <i>trans</i> de sodio (C-013229)
	UV	Espectroscopia ultravioleta
35	y.	Rendimiento

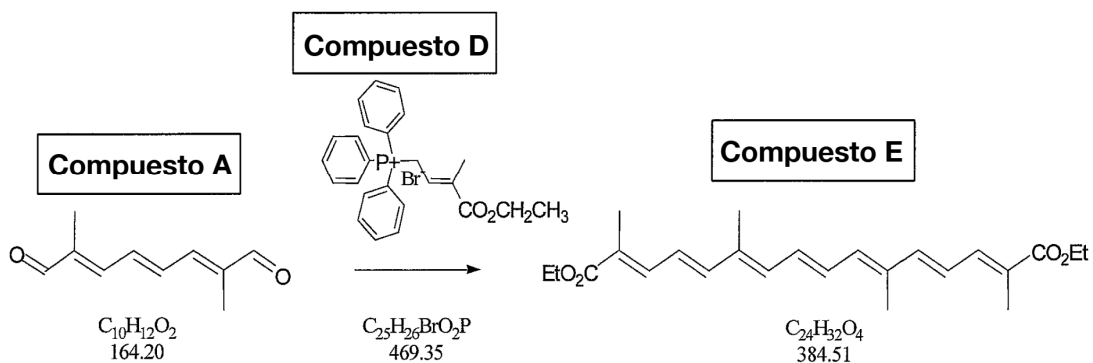
Ejemplo 1

Síntesis a pequeña escala de 165 g de TSC

Visión general de la reacción química



5 Síntesis del compuesto E (2,6,11,15-tetrametilhexadeca-2E,4E,6E,8E,10E,12E,14E-heptaeno-1,16-diotato de dietilo)



<b>Tamaño:</b>	130 g del compuesto A	0,792 mol (nc)			
<b>Cantidad Th.:</b>	304,4 g del compuesto E				
<b>Cantidad Pr.:</b>	139,6 g del compuesto D + 143,2 g del compuesto E	0,736 mol (nc)			
<b>Rendimiento (nc):</b>	92,9 %	<b>Pureza:</b> 93,68 % + 96,99 % a/a HPLC			
Pos.	Reactivo	Masa molecular	Eq.	Cantidad	Unidad
1	Compuesto A	164,20	1,0	130	g
2	Compuesto D	444,01 <sup>1</sup>	3,0	1052	g
3	Óxido de butileno			0,64	l
4	Tolueno			1,27	l
5	Etanol			0,15	l

6	Metilciclohexano			0,79	l
7	Óxido de butileno			0,20	l
8	Tolueno			0,50	l
9	Etanol			0,10	l
10	Metilciclohexano			0,40	l
11	Metanol			1,00	l

### Procedimiento

- Se evacuó y se purgó un matraz con nitrógeno.
- El matraz se cargó con el compuesto A (1) y el compuesto D (2) a JT = 20 °C.
- El material utilizado era una mezcla de sal que contenía bromuro al 48 % y cloruro al 52 % de acuerdo al CoA del proveedor. Así pues, la masa real era diferente de la teórica, como se representa en el esquema de las fórmulas.
- En el matraz se cargaron óxido de butileno (3) y tolueno (4) a JT = 20 °C. El matraz se evacuó y se purgó con nitrógeno dos veces. La mezcla de reacción se calentó a JT = 100 °C. Se obtuvo una solución homogénea.
- La solución se agitó a JT = 100 °C durante 6,5 h (la IT era de aproximadamente 93 °C).
- Se tomó una muestra para un IPC.

IPC1#2	No se detectaron señales de aldehído ( <sup>1</sup> H-RMN), véase la nota 1.
--------	--

- La mezcla se enfrió lentamente a IT = 20 °C (15 h).
- Se formó una suspensión roja. La suspensión se enfrió a IT = 1 °C en menos de 2 h.
- La suspensión se filtró en un secador con filtro en unos pocos minutos.
- Se utilizó etanol frío (5), a 2 °C, para enjuagar el matraz. La solución de enjuague se transfirió al secador con filtro.
- La torta del filtro se lavó con metilciclohexano (6) a 22 °C.
- La torta del filtro se secó en un evaporador rotatorio durante 5 h a 55 °C.
- Se obtuvieron 139,6 g del compuesto E como un sólido rojo. Se confirmó la identidad por <sup>1</sup>H-RMN. La pureza era del 93,68 % a/a según se determinó por HPLC. Además, también se observaron isómeros *cis* a 2,90 + 3,00 %. El rendimiento (nc) fue del 45,9 %.
- El agua madre (aproximadamente 3 l) se concentró al 40 % de su volumen (aún una solución roja) y se agitó a JT = 100 °C durante 15 h (la IT fue de aproximadamente 100 °C).
- Se formó una suspensión roja. Se tomó una muestra para un IPC.

IPC2#1	Se detectó poco o nada del isómero <i>cis</i> ( <sup>1</sup> H-RMN).
--------	--

- La mezcla se diluyó con óxido de butileno (7) y tolueno (8, todavía una suspensión) y se enfrió a IT = 2,9 °C en menos de 3,5 h.
- La suspensión se filtró en un secador con filtro en menos de 10 min.
- Se utilizó etanol frío (9), aproximadamente a 2 °C, para enjuagar el matraz. La solución de enjuague se transfirió al secador con filtro.
- La torta del filtro se lavó con metilciclohexano (10) a 18 °C.
- La torta del filtro se secó en un evaporador rotatorio durante 15 h a 50 °C.

## ES 2 780 200 T3

20. Se obtuvieron 384,5 g del producto bruto como un sólido rojo. Una <sup>1</sup>H-RMN reveló la presencia de TPPO además del producto deseado.

21. El producto bruto se trató con metanol (11) y se agitó durante 30 min a JT = 60 °C.

22. La suspensión se enfrió a JT = 0 °C en menos de 60 min.

5 23. La suspensión se filtró en un secador con filtro en unos pocos minutos.

24. Se utilizó metanol (11) para enjuagar el matraz. La solución de enjuague se transfirió al secador con filtro.

25. La torta del filtro se secó en un evaporador rotatorio durante 2 h a 55 °C.

10 26. Se obtuvieron 143,2 g del producto bruto como un sólido rojo. Se confirmó la identidad por <sup>1</sup>H-RMN. La pureza fue del 96,99 % a/a por HPLC. Además, también se observaron isómeros *cis* a 1,02 + 1,26 %. El rendimiento (nc) fue del 47,0 %. La <sup>1</sup>H-RMN mostró un TTPO al 11,5 %.

### Notas

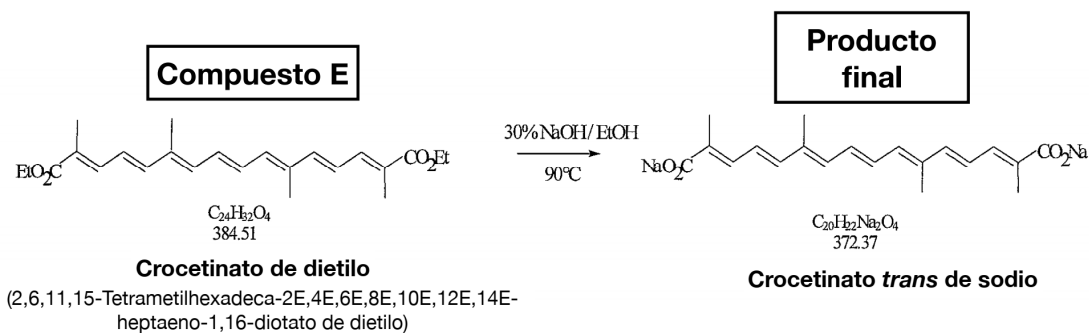
1) Se tomó un primer IPC al cabo de 2,5 h. Esto mostró un consumo completo del aldehído y un isómero *cis* adicional. La relación de los isómeros mejoró con el tiempo para la reacción.

### Preparación de la muestra

<i>Control en proceso (IPC)</i>	Conversión: Se tomaron aproximadamente 0,5 ml de la mezcla de reacción, se evaporaron y se analizaron por <sup>1</sup> H-RMN o HPLC.
<i>Pureza:</i>	Se analizaron 6-7 mg del producto por HPLC; método HPLC-TSC-M1,1.
<i><sup>1</sup>H-RMN</i>	Se disolvieron de 5 a 10 mg del producto en 0,9 ml de CDCl <sub>3</sub> (estándar interno: TMS) para la espectroscopia por RMN.

15

### Síntesis del TSC a partir del compuesto E



<b>Tamaño:</b>	185 g del compuesto A	0,481 mol (nc)			
<b>Cantidad Th.:</b>	179,2 g de TSC				
<b>Cantidad Pr.:</b>	164,9 g de TSC	0,443 mol (nc)			
<b>Rendimiento (nc):</b>	92,0 %	<b>Pureza:</b> 97,56 % a/a HPLC			
Pos.	Reactivo	Masa molecular	Eq.	Cantidad	Unidad
1	Compuesto E	384,51	1,0	139 + 46 <sup>2</sup>	g g
2	Etanol			0,72	l
3	NaOH al 30 %			0,72	l
4	Agua			2,21	l
5	Agua			1,92	l

## ES 2 780 200 T3

<b>6</b>	Agua			1,92	l
<b>7</b>	Agua			1,92	l

### Procedimiento

1. Se evacuó y se purgó un matraz con nitrógeno.
2. El matraz se cargó con el compuesto E (**1**) a JT = 20 °C.
- 5 3. Se cargaron etanol (**2**) y NaOH al 30 % (**3**) en el matraz a JT = 20 °C. El matraz se evacuó y se purgó con nitrógeno dos veces. La mezcla de reacción se calentó a JT = 90 °C. Se obtuvo una suspensión naranja espesa.
4. La suspensión se agitó a JT = 90 °C durante 47 h (la IT era de aproximadamente 77 °C).
5. La mezcla se enfrió a IT = 21 °C en menos de 16 h. Se tomó una muestra para un IPC.

<b>IPC1#1</b>	Conversión del 98,2 % de monoéster en TSC (HPLC); no se detectó ningún diéster (compuesto E).
---------------	---

- 10 <sup>2</sup>La cantidad exacta de material de partida era ligeramente más baja que la representada, porque la segunda porción (46 g) contenía TPPO al 11,5 % aproximadamente en él de acuerdo con la <sup>1</sup>H-RMN.
6. La mezcla se diluyó con agua (**4**).
7. La suspensión se filtró en un secador con filtro en menos de 50 min.
8. Se utilizó agua fría (**5**), a 3 °C, para enjuagar el matraz y lavar la torta del filtro.
- 15 9. La torta del filtro se lavó además con agua fría (**6 + 7**), a 5 °C y 2 °C.
10. La torta del filtro se secó en un evaporador rotatorio durante 20 h a 55 °C.
11. Se obtuvieron 164,9 g de TSC como un sólido naranja. Se confirmó la identidad por <sup>1</sup>H-RMN. La pureza fue del 97,56 % a/a según se midió por HPLC. El rendimiento (nc) fue del 92,0 %. El contenido de agua se determinó que era del 1,89 % p/p, la relación UV de 421 nm por 254 nm fue de 8,42. Análisis calculado para C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>·0,5H<sub>2</sub>O·0,2NaOH: C, 61,41; H, 6,03; Na 12,93; O, 19,63. Encontrado: C, 61,5; H, 6,2; Na, 13,0; O, 19,8.
- 20

### Preparación de la muestra

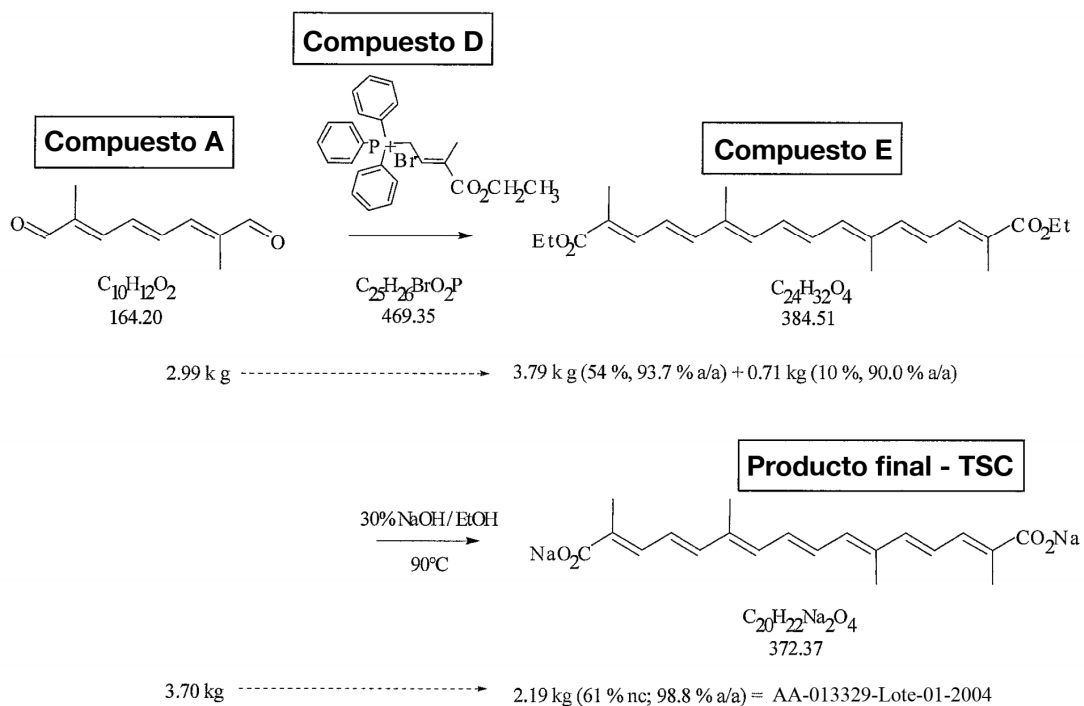
<i>Control en proceso (IPC)</i>	Conversión: Se tomaron aproximadamente 0,5 ml de la mezcla de reacción y se analizaron por HPLC.
<i>Pureza:</i>	Se analizaron de 6 a 7 mg del producto por HPLC; método HPLC-TSC-M1,1.
<i><sup>1</sup>H-RMN</i>	Se disolvieron de 5 a 10 mg del producto en 0,9 ml de D <sub>2</sub> O para la espectroscopia de RMN.

### Ejemplo 2

Producción de TSC a mayor escala (2 kg) en las condiciones de GMP

- 25 Visión general del esquema de reacción





Material bruto

Se verificó la calidad de las sustancias de partida (compuestos A y D) y los resultados del análisis se muestran a continuación:

Lote-n.º	Pureza por HPLC (% a/a)	Apariencia	Identidad por IR
E-027211-002 (UQ40112015; C10 dial.; compuesto A)	95,22	Polvo amarillo	Cumple
E-027684-001 (UQ40112015; C10 dial.; compuesto A)	94,70	Polvo amarillo	Cumple
E-027684-002 (UQ40112015; C10 dial.; compuesto A)	94,60	Polvo amarillo	Cumple
E-027758-001 - E-027758-003, E-027685-001 - E-027685-021 (UE00401004; éster de Wittig C5; compuesto D)	97,88	Polvo blanco	Cumple

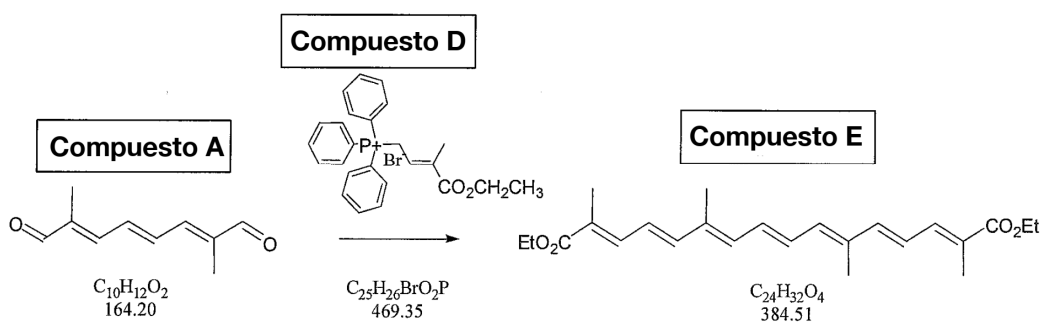
5

Todas las sustancias cumplían las especificaciones dadas (compuesto D:  $\geq 97,0\%$ ; compuesto A:  $\geq 94,0\%$ ). Además, todas las sustancias se prepararon por medios sintéticos sin el uso de ningún componente animal ni ningún componente procedente de productos animales.

10

El C-10 dial (compuesto A) era un polvo cristalino amarillento. El fosforano, el compuesto D, era un polvo de blanco a amarillento. Las identidades se comprobaron por  $^1H$ -RMN.

Síntesis del compuesto E



<b>Tamaño:</b>	2,99 kg del compuesto A	18,21 mol (nc)			
<b>Cantidad Th.:</b>	7,00 kg del compuesto E				
<b>Cantidad Pr.:</b>	3,79 kg del compuesto E + 705 g del compuesto E	11,69 mol (nc)			
<b>Rendimiento (nc):</b>	64,2 %	<b>Pureza:</b> 93,70 % + 90,01 % a/a HPLC			
Pos.	Reactivo	Masa molecular	Eq.	Cantidad	Unidad
1	Compuesto A	164,20	1,0	2,99	kg
2	Compuesto D	444,01 <sup>3</sup>	3,0	24,04	kg
3	Óxido de butileno			15	l
4	Tolueno			30	l
5	Óxido de butileno			9	l
6	Etanol			4	l
7	Metilciclohexano			18	l
8	Metanol			17,5	l
9	Óxido de butileno			3	l
10	Tolueno			11	l
11	Óxido de butileno			7	l
12	Tolueno			10	l
13	Metilciclohexano			7	l
14	Metanol			13	l
15	Metanol			14	l

## Procedimiento

- Se evacuó un reactor de 100 l y se purgó con nitrógeno dos veces.
  - El reactor de 100 l se cargó con el compuesto A (1) y el compuesto D (2) a JT = 20 °C.
  - <sup>3</sup> El material utilizado era una mezcla de sal que contenía bromuro al 48 % y cloruro al 52 % de acuerdo al CoA del proveedor. Así pues, la masa real era diferente de la teórica, tal y como se representa en el esquema de las fórmulas.
  - En el reactor se cargaron óxido de butileno (3) y tolueno (4) a JT = 20 °C. Se evacuó el reactor de 100 l y se purgó con nitrógeno dos veces. La mezcla de reacción se calentó a JT = 100 °C. Se obtuvo una solución homogénea.
  - La solución se agitó a JT = 100 °C durante 4 h (la IT era de aproximadamente 98 °C).
  - La solución se concentró a un vacío ligero a JT = 110 °C. Se retiraron 9,0 l del solvente. La mezcla se agitó a JT = 110 °C durante 13 h (la IT era de aproximadamente 105 °C).
  - La mezcla se diluyó con óxido de butileno (5) y se enfrió a IT = 20°C (2,75 h.). Se formó una suspensión roja.
  - Se tomó una muestra para un IPC.
- |               |  |
|---------------|--|
| <b>IPC1#1</b> | No se detectaron señales de aldehído ( <sup>1</sup> H-RMN), véase la <b>nota 1</b> . |
|---------------|--|
- La mezcla se enfrió a IT = 0 °C (80 min).
  - La suspensión se filtró en un secador con filtro en menos de 100 min.
  - Se utilizó etanol frío (6) para enjuagar el reactor de 100 l. La solución de enjuague se transfirió al secador con filtro.
  - La torta del filtro se lavó con metilciclohexano (7).

## ES 2 780 200 T3

12. La torta del filtro se secó en un evaporador rotatorio durante 4,5 h a 55 °C.

13. Se obtuvieron 5,246 kg del producto bruto como un sólido rojo. Un espectro de <sup>1</sup>H-RMN reveló la presencia de una cantidad sustancial de TPPO (aproximadamente del 25 % al 30 %), además del producto deseado.

14. El producto bruto se transfirió a un secador con filtro y se lavó con metanol (8).

5 15. La torta del filtro se secó en un evaporador rotatorio durante 19 h a 55 °C.

16. Se obtuvieron 3,787 kg del compuesto E como un sólido rojo (bruto3#1). Se confirmó la identidad por <sup>1</sup>H-RMN. La pureza era del 93,70 % a/a según se midió por HPLC. Además, también se observaron isómeros *cis* a 3,17 + 2,54 %. El rendimiento (nc) fue del 54,1 %.

10 17. El agua madre (aproximadamente 81 l) se concentró a vacío ligero a JT = 100 °C. Se retiraron 30 l del solvente. La mezcla se agitó a JT = 110 °C durante 12,5 h (la IT era de aproximadamente 105 °C).

18. La mezcla se diluyó con óxido de butileno (9) y tolueno (10) y se enfrió a IT = 20 °C (2,75 h). Se formó una suspensión roja.

19. Se tomó una muestra para un IPC, se enfrió a 0°C y se filtró.

<b>IPC3#1</b>	Todavía queda demasiado TPPO en el producto ( <sup>1</sup> H-RMN).
---------------	--

15 20. La mezcla se diluyó con óxido de butileno (11) y tolueno (12), se calentó a JT = 60 °C y se enfrió de nuevo a IT = 20 °C.

21. Se tomó una muestra filtrada y se lavó con metanol.

<b>IPC3#2</b>	El contenido de TPPO en el producto se redujo significativamente ( <sup>1</sup> H-RMN).
---------------	---

22. La suspensión se enfrió a 1°C en menos de 60 min y se filtró en un secador con filtro en menos de 60 min.

20 23. La torta del filtro se lavó con metilciclohexano (13).

24. La torta del filtro se lavó dos veces con metanol (14 + 15).

25. La torta del filtro se secó en un evaporador rotatorio durante 4,5 h a 55 °C.

25 26. Se obtuvieron 705 kg del producto bruto como un sólido rojo (bruto2#1). Se confirmó la identidad por <sup>1</sup>H-RMN. La pureza fue del 90,01 % a/a según se midió por HPLC. Aún más, en la HPLC se observaron isómeros *cis* 3,83 % + 5,34 %. El rendimiento (nc) fue del 10,1 %. El rendimiento corregido total fue del 63,0 %.

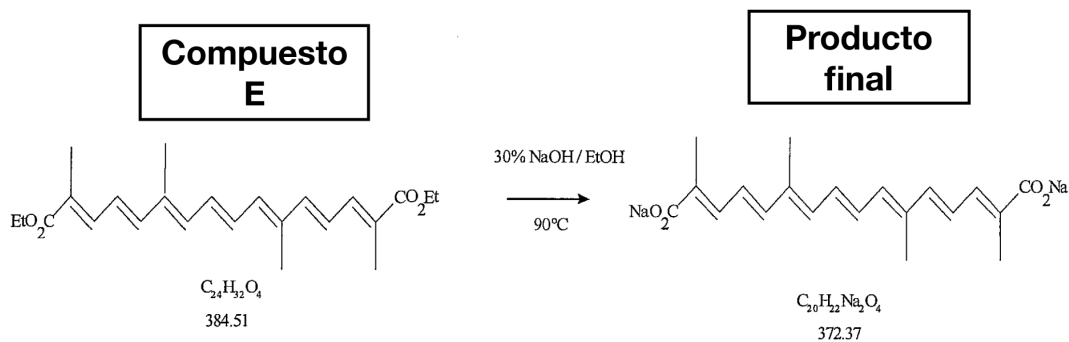
### Notas

1) La relación de los isómeros fue de aproximadamente 60:40 *trans/cis* de acuerdo con la HPLC.

### Preparación de la muestra

<i>Control en proceso (IPC)</i>	Conversión: Se tomaron aproximadamente 0,5 ml de la mezcla de reacción, se evaporaron y analizaron por <sup>1</sup> H-RMN o HPLC.
<i>Pureza:</i>	Se analizaron de 6 a 7 mg del producto por HPLC; método HPLC-TSC-M1,1.
<i><sup>1</sup>H-RMN</i>	Se disolvieron de 5 a 10 mg del producto en 0,9 ml de CDCl <sub>3</sub> (estándar interno: TMS) para espectroscopia por RMN.

Síntesis del TSC a partir del compuesto E



**Crocetinato de dietilo**

(2,6,11,15-Tetrametilhexadeca-2E,4E,6E,8E,10E,12E,14E-heptaeno-1,16-diotato de dietilo)

**Crocetinato *trans* de sodio**

<b>Tamaño:</b>	3,70 kg del compuesto A	9,62 mol (nc)			
<b>Cantidad Th.:</b>	3,58 kg de TSC				
<b>Cantidad Pr.:</b>	2,19 kg de TSC	5,88 mol (nc)			
<b>Rendimiento (nc):</b>	61,2 %	<b>Pureza:</b> 98,76 % a/a por HPLC			
Pos.	Reactivo	Masa molecular	Eq.	Cantidad	Unidad
1	Compuesto E	384,51	1,0	3,70	kg
2	Etanol			15,7	l
3	NaOH al 30 %			15,0	l
4	Agua			45	l
5	Etanol			3,5	l
6	Agua			39	l
7	Agua			39	l
8	Agua			38	l
9	Etanol			39	l

5 Procedimiento

1. Se evacuó un reactor de 100 l y se purgó con nitrógeno dos veces.
2. El reactor de 100 l se cargó con el compuesto E (1) a JT = 20 °C.
3. Se cargaron etanol (2) y NaOH al 30 % (3) en el reactor de 100 l a JT = 20 °C. Se evacuó el reactor de 100 l y se purgó con nitrógeno dos veces. La mezcla de reacción se calentó a JT = 90 °C. Se obtuvo una suspensión naranja espesa.
4. La suspensión se agitó a JT = 90 °C durante 63 h (IT a 81 °C).
5. La mezcla se enfrió a IT = 21 °C en menos de 2 h. Se tomó una muestra para un IPC.

<b>IPC1#1</b>	Conversión del 98,7 % del monoéster en TSC (HPLC); no se detectó ningún diéster (compuesto E).
---------------	--

6. La mezcla se diluyó con agua (4).
7. La suspensión se filtró en un secador con filtro en menos de 15 h.

8. Se utilizó etanol (5) para enjuagar el reactor de 100 l.
9. La torta del filtro se lavó tres veces con agua fría (6, 7 + 8), entre 0 °C y 5 °C.
10. La torta del filtro se lavó con etanol (9).
11. La torta del filtro se secó en un evaporador rotatorio durante 5 h a 50 °C.
- 5 12. Se obtuvieron 2,186 kg de TSC como un sólido naranja. Se confirmó la identidad por <sup>1</sup>H-RMN. La pureza fue del 97,96 % a/a según se midió por HPLC. El rendimiento (nc) fue del 61,2 %; véase la **Nota 1**. El contenido de agua se determinó que era del 1,58 % p/p y la relación UV de 421 nm por 254 nm que era de 8,9. Análisis calculado para C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>·0,34H<sub>2</sub>O: C, 63,47; H, 6,04; Na, 12,15; O, 18,35. Encontrado: C, 63,81; H, 5,64; Na, 12,21; O, 18,34.
- 10 13. Se agitaron 2,184 kg de bruto1#1 en una mezcladora durante 4 días a RT. Los trozos restantes se molieron fácilmente en un mortero. Se obtuvieron 2,183 kg del sólido naranja bruto2#1 (que correspondía a AA-013329-lote-01-2004). La pureza fue del 98,76 % a/a por HPLC. Una medición de DSC no reveló ninguna diferencia.

Notas

- 15 1) El producto es hidrosoluble. Así pues, la enorme duración de la filtración, así como el lavado con agua adicional, podrían haber causado el bajo rendimiento observado en esta situación específica. El tercer lavado con agua se realizó para ajustar el contenido de sodio deseado en el producto.

Preparación de la muestra

<i>Control en proceso (IPC)</i>	Conversión: Se tomaron aproximadamente 0,5 ml de la mezcla de reacción y se analizaron por HPLC.
<i>Pureza:</i>	Se analizaron de 6 a 7 mg del producto por HPLC; método HPLC-TSC-M1,2.
<i><sup>1</sup>H-RMN</i>	Se disolvieron de 5 a 10 mg del producto en 0,9 ml de D <sub>2</sub> O para la espectroscopia de RMN.

**Analítica**

**Métodos por HPLC**

- Método:** HPLC-TSC-M,1,2
- Método reemplazado:** HPLC-TSC-M,1,1
- Método válido para:** C-009594, compuesto A, TSC, compuesto D, compuesto E
- Productos químicos:** Acetonitrilo, calidad para HPLC (J.T. Baker o equivalente);  
 agua, de calidad para HPLC (sistema Milli-Q purificado o equivalente);  
 ácido trifluoroacético (Merck o equivalente);  
 THF, de calidad para HPLC, sin estabilizante (Scharlau o equivalente);  
 MeOH, de calidad para HPLC (Scharlau o equivalente)
- Equipamiento:** Sistema HP-1100 o equivalente  
 Columna: YMC Pack Pro C18, 100 × 4,6 mm, 3 μm

20 **Preparación de la fase móvil:**

- Solución A:* TFA al 0,1 % en H<sub>2</sub>O/ACN 90:10 % v/v
- Solución B* CAN

**Preparación de la muestra:**

## ES 2 780 200 T3

*Mezcla de solventes* THF, MeOH, H<sub>2</sub>O, ACN

*C-009594, C-013327:* De 6 a 7 mg (pesado con exactitud) del material bruto se disuelven en MeOH

*C-014679:* De 6 a 7 mg (pesado con exactitud) del material bruto se disuelven en 30 ml de ACN y se llena con agua hasta la línea de 100 ml.

De 6 a 7 mg (pesado con exactitud) del material bruto se disuelven en 100 ml de THF.

*C-014681:* De 6 a 7 mg (pesado con exactitud) del material bruto se disuelven en 10 ml de H<sub>2</sub>O; y

*C-013329:* Llenado hasta 100 ml con THF.

### Parámetros de la HPLC:

<i>Columna:</i>	YMC Pack Pro C18, 100 × 4,6 mm, 3 μm
<i>Fase móvil:</i>	A: TFA al 0,1 % en H <sub>2</sub> O/ACN 90:10 % v/v B: ACN
<i>Gradiente:</i>	0,00 min B al 30 % 12,00 min B al 95 % 16,00 min B al 95 % 16,10 min B al 30 % 20,00 min B al 30 %
<i>Velocidad de flujo:</i>	1 ml/min
<i>Temperatura:</i>	20 °C
<i>Detección:</i>	421 nm (si el detector es capaz, adicionalmente 220, 230, 254 y 350 nm)
<i>Volumen de inyección:</i>	10 μl

### Parámetros de la integración:

NA

5

### Tabla de identificación para las siguientes trazas de HPLC:

Tiempo de retención* [min]	Masa molecular [g/mol]	Estructuras propuestas / número de C	Tiempo de retención relativo
3,54	469	Compuesto D	0,51
4,47	164	Compuesto A	0,65
4,99	278	C-009594	0,72
6,90	372	TSC	1,00
14,30	384	Compuesto E	2,07

*\*tiempos de retención típicos para G-1172 con la columna LC-0402.*

### Métodos por UV

- Método modificado para esta síntesis:

Método: UV-TSC-M,2,1

Reemplaza al método: -

Método válido para: TSC

Productos químicos: Agua, de calidad para HPLC (purificada por sistema Milli-Q o equivalente)

Equipamiento: Sistema Perkin Elmer Lambda 25 o equivalente  
 Cubeta: cuarzo cristalino, de 1 cm

Parámetros de UV: Longitud de onda: 421 nm; 350 nm; 254 nm

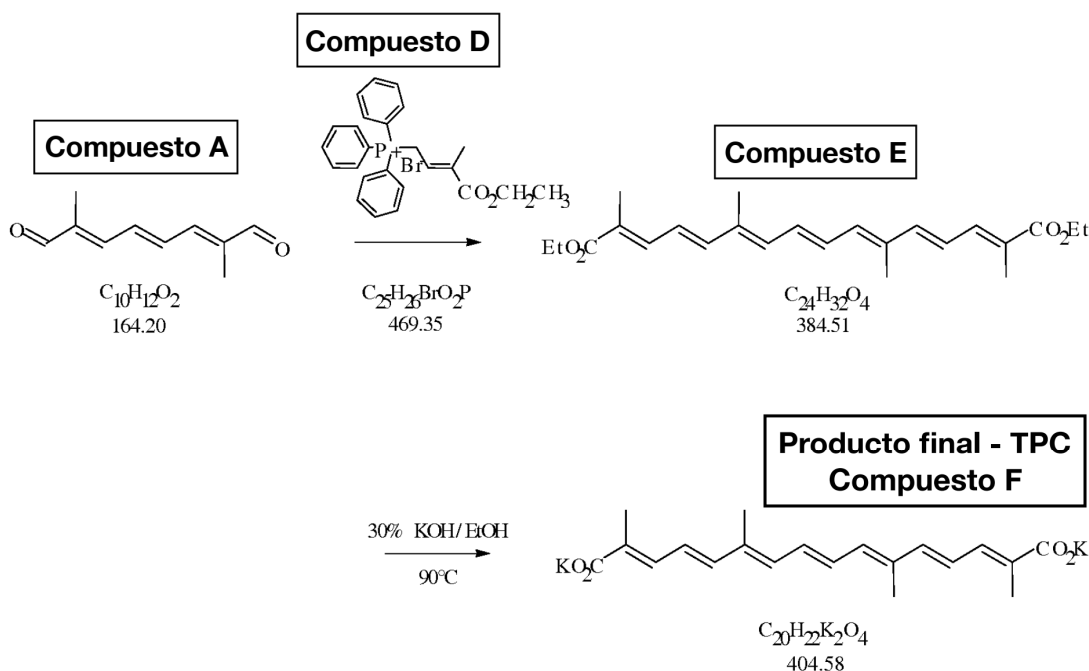
Preparación de la muestra: 10 mg (pesados con exactitud) se disolvieron en 50 ml de agua. La muestra se trató con ultrasonidos durante 30 min a 45 °C-50 °C. Se diluyó 1 ml de esta solución con 49 ml más de agua (lo que hace un volumen total de la solución de 50 ml).

Documento y evolución del método: Preparación de las muestras del método del cliente modificado para medir dentro del margen lineal.

Ejemplo 3

Síntesis del crocetinato *trans* de potasio (2,6,11,15-tetrametilhexadeca-2E,4E,6E,8E,10E,12E,14E-heptano-1,16-diotato de dipotasio)

5 El crocetinato *trans* de potasio también se denomina más adelante TPC o compuesto F. La síntesis química se muestra a continuación.



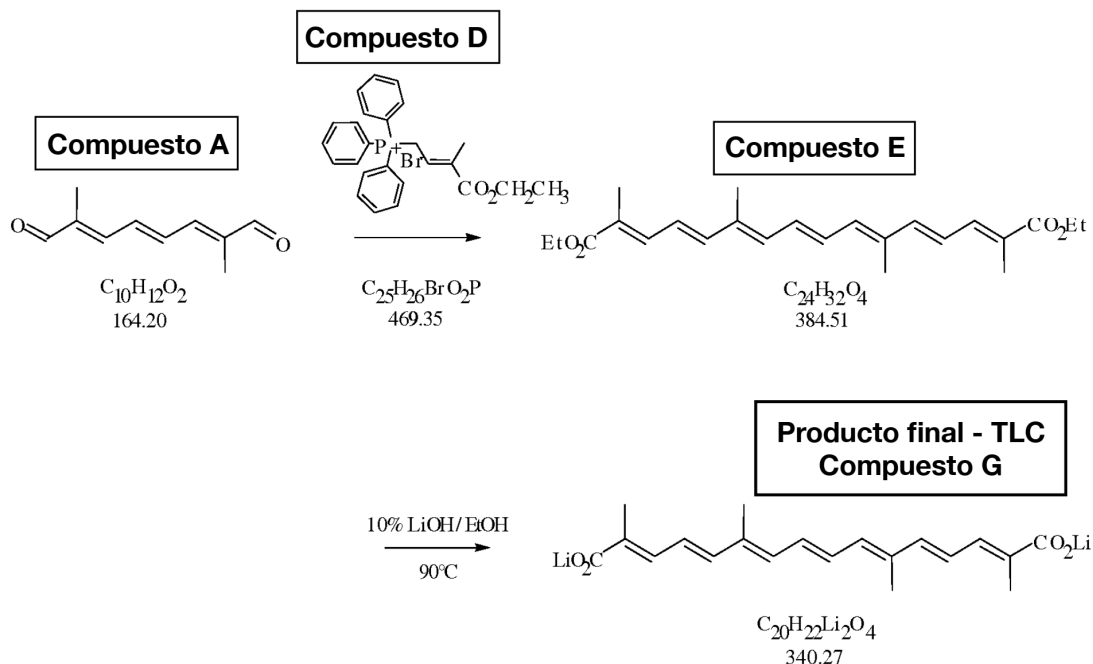
10 La reacción de saponificación (última etapa en la síntesis) se realizó de una manera similar al procedimiento utilizado en los ejemplos 1 y 2 de más arriba. El éster dietílico, compuesto E, se preparó tal y como se describe más arriba en los ejemplos 1 y 2.

15 Para este ejemplo, el compuesto E se trató con hidróxido de potasio (KOH) al 30 % (1,5 ml/mmol) en etanol (EtOH) (1,5 ml/mmol) a 90 °C durante 4 días. La mezcla se diluyó con etanol debido a la pérdida de algún solvente durante el procedimiento. El producto naranja se aisló por filtración a temperatura ambiente (22 °C) y mediante lavado con etanol al 50 % en agua (3×). El producto se secó en un evaporador rotatorio durante 5 h a JT = 60 °C. Esto produjo un rendimiento de la reacción del 86 % (experimento de 12 g). El espectro de <sup>1</sup>H-RMN y el espectro de LC-MS confirmaron que el producto deseado era el crocetinato *trans* de potasio. La calidad por HPLC fue del 98,3 % mediante el uso del método el método por HPLC descrito más arriba en el ejemplo 2 con una longitud de onda de detección de 421 nm.

Ejemplo 4

20 Síntesis del crocetinato *trans* de litio (2,6,11,15-tetrametilhexadeca-2E,4E,6E,8E,10E,12E,14E-heptano-1,16-diotato de dilitio)

El crocetinato *trans* de litio también se denomina más adelante TLC o compuesto G. La síntesis química se muestra a continuación.



La reacción de saponificación se realizó mediante un procedimiento similar al delineado en los ejemplos 1 a 3. Sin embargo, en este caso, se utilizó hidróxido de litio como agente de saponificación. En este ejemplo, el compuesto E se sintetizó de nuevo tal y como se describe en los ejemplos 1 y 2. El compuesto E se trató con hidróxido de litio (LiOH) al 10 % (2,8 ml/mmol) en etanol (EtOH) (1,5 ml/mmol) a 90 °C durante 4 días. La suspensión de color naranja oscuro se filtró a temperatura ambiente (22 °C) y se lavó con etanol al 50 % en agua (3×) y etanol puro. El sólido naranja oscuro se secó en un evaporador rotatorio durante 5 h a temperatura de la camisa (JT) = 60 °C. Esto produjo 9,5 g de un sólido de color naranja oscuro.

El análisis por HPLC de este compuesto indicó que el 38 % a/a de la sustancia de partida permaneció además en el producto deseado. La cantidad sustancial del material de partida restante es probablemente resultado de utilizar una solución básica menos concentrada (LiOH) en esta reacción de saponificación. En este caso, dada la escasa solubilidad del LiOH en el agua, solo se utilizó una solución al 10 % de LiOH en agua. En los otros ejemplos (1 a 3 descritos en la presente memoria), se utilizó una solución básica al 30 % en agua.

Para mejorar el rendimiento de la reacción, el producto aislado de la etapa anterior se trató con LiOH sólido (13 eq.) en EtOH al 50 % en agua (2,9 ml/mmol) a 95 °C durante 2 días más. El producto naranja resultado de este segundo tratamiento con hidróxido de litio se aisló por filtración a temperatura ambiente y se lavó con EtOH al 50 % en agua (3×) y EtOH puro. El sólido resultante se secó en un evaporador rotatorio durante 3 h a temperatura de la camisa (JT) = 60 °C. Esto dio un rendimiento del producto de 14 g. Ya que esto era mayor que el rendimiento teórico, se realizó una suspensión viscosa más en agua (1,6 ml/mmol) para retirar el exceso de LiOH. El producto naranja se aisló por filtración a temperatura ambiente y mediante lavado con EtOH al 50 % en agua (3×) y EtOH puro. El producto se secó en un evaporador rotatorio durante 2 h a temperatura de la camisa (JT) = 60 °C. Esto dio un rendimiento de 8,5 g, que corresponde a un rendimiento de reacción global del 67 % (experimento de 12 g).

Un espectro de  $^1H$ -RMN y un espectro de LC-MS confirmaron que se había obtenido el producto deseado, el crocetinato *trans* de litio. La calidad por HPLC fue del 99,7 % utilizando el método de análisis descrito más arriba en el ejemplo 1 con una longitud de onda de detección ajustada a 421 nm.

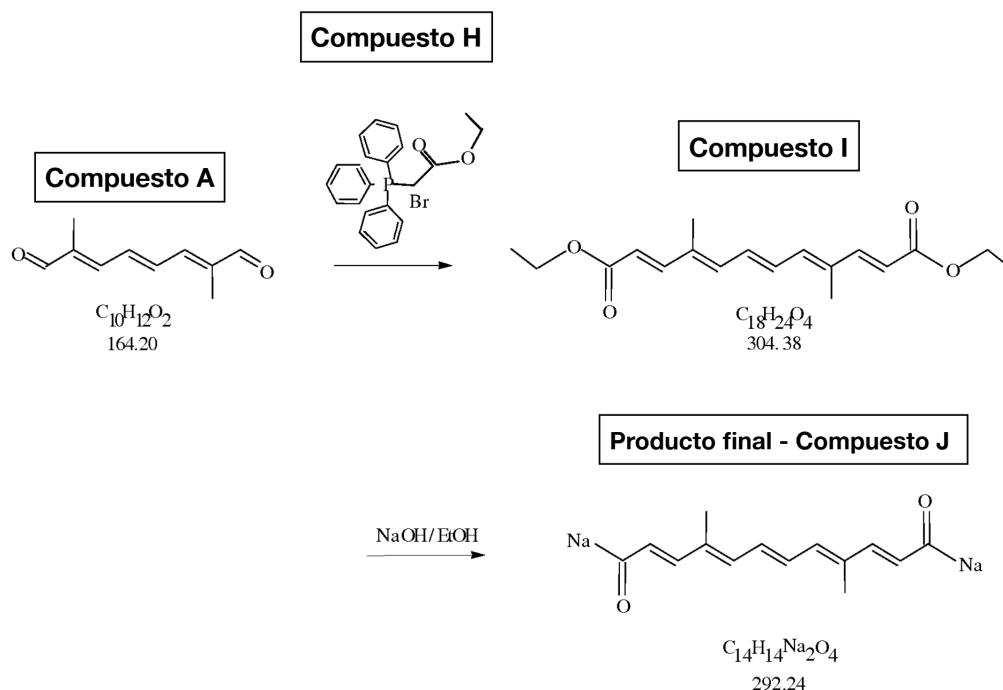
#### Ejemplo 5

Síntesis del derivado C-14 del TSC (4,9-dimetildodeca-2E,4E,6E,8E,10E-pentano-1,12-diotato de disodio)

La síntesis de los compuestos simétricos con una longitud de cadena más corta que el TSC requirió el uso de un reactivo de Wittig diferente del compuesto B mostrado en los ejemplos 1 a 4. Los compuestos de BPTC de longitud de cadena más corta se sintetizan con el uso del compuesto A, el dialdehído C-10 utilizado anteriormente. A continuación, el compuesto A se convirtió mediante una reacción de Horner-Emmons o bien una reacción de acoplamiento de Wittig con un fosfonato C2 o C3 disponible en el mercado o bien con bromuro de fosfonio (compuesto H) para formar los correspondientes ésteres C14 y C16, respectivamente. La hidrólisis con NaOH/EtOH completó la reacción, lo que dio lugar a la formación de los derivados C14 o C16 del TSC deseados.



La síntesis del derivado C-14 del TSC, el compuesto J, se completó mediante la reacción del compuesto A y del compuesto H (bromuro de etoxicarbonilmetiltrifenilfosfonio). Se hicieron reaccionar los compuestos A y H para formar el intermedio final, el compuesto I, antes de una etapa de saponificación que produjo el compuesto J, tal y como se muestra a continuación.



5

Reacción de acoplamiento para formar el compuesto I

El mejor método para la formación del compuesto I consistió en el uso del bromuro de fosfonio C2 (compuesto H). Esta reacción de acoplamiento se llevó a cabo en óxido de butileno/tolueno a 2:1 (0,7 ml + 1,4 ml/mmol), tal y como se utilizó en los ejemplos 1 a 4 de más arriba. El resultado fue una buena formación del producto con 3 eq. del reactivo de Wittig a la temperatura de la camisa JT = 100 °C. El producto amarillo se aisló por filtración a 0 °C y el posterior lavado (dos veces) con metilciclohexano. El rendimiento para esta etapa fue del 56-61 % (escala de 10 g).

10

Se determinó que la pureza era del 83,4 % a/a del isómero *trans* a una longitud de onda de detección de 369 nm (11,5 min) por HPLC. Además del compuesto I, se observó que estaban presentes tres compuestos más en el cromatograma de la HPLC y se especula que son los isómeros *cis* del compuesto I (1,0 % a/a, 10,5 min; 13,4 % a/a, 11,2 min; 2,0 % a/a, 11,9 min).

15

Reacción de saponificación para formar el producto final (compuesto J)

La reacción de saponificación para convertir el compuesto I en el compuesto J se realizó de una manera similar a la descrita en los ejemplos 1 a 4. El éster dietílico, el compuesto I, se trató con NaOH al 30 % (2 ml/mmol) en (EtOH) (4 ml/mmol) a 90 °C durante 3 días. El producto amarillo se aisló por filtración a temperatura ambiente y mediante lavado con EtOH al 50 % en agua (5×) y EtOH puro (3×). La reacción de saponificación dio un rendimiento bruto de aproximadamente el 100 %. Para mejorar la pureza, la mezcla se suspendió en NaOH al 30 % (0,5 ml/mmol) en EtOH (1 ml/mmol) a 90 °C durante 4 h. La suspensión se filtró a 0 °C y se lavó con EtOH (3×), lo que dio un producto amarillo, que correspondía a un rendimiento sin corregir del 79 % (escala de 10 g). La <sup>1</sup>H-RMN confirmó que el producto deseado, el compuesto J, se sintetizó con una calidad por HPLC del 97,8 % con una longitud de onda de detección ajustada a 383 nm.

20

25

Ejemplo 6

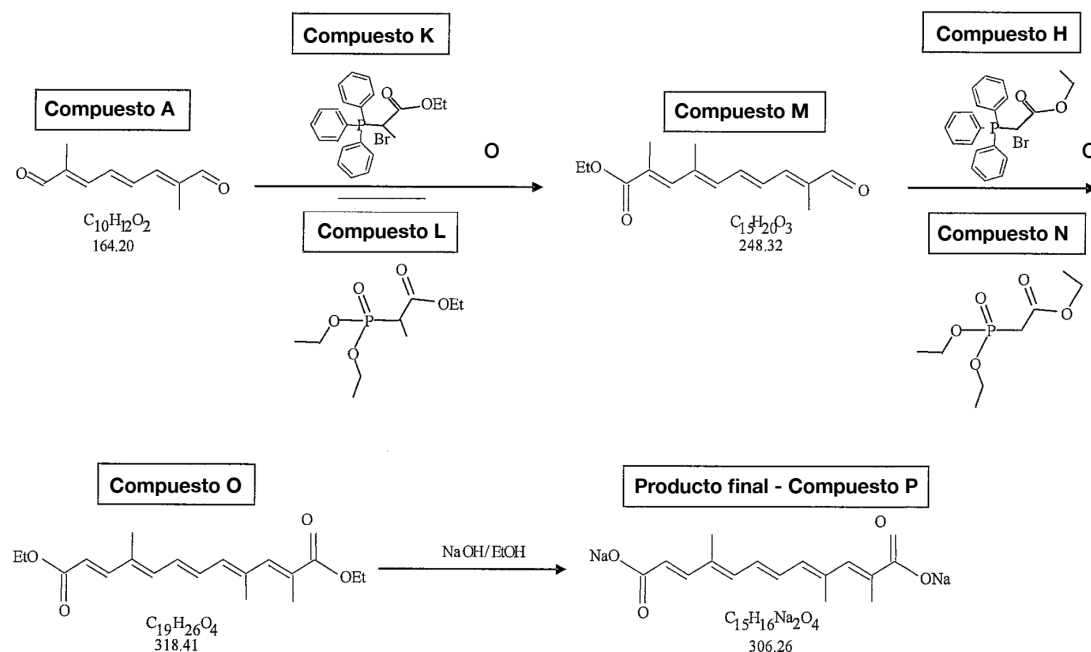
Síntesis del derivado C-15 del TSC (2,4,9-trimetildodeca-2E,4E,6E,8E,10E-pentaeno-1,12-diotato de disodio)

El compuesto A se hizo reaccionar con el compuesto K (bromuro de 1-(etoxicarbonil)-etiltrifenilfosfonio), una sal de fosfonio C3 / bromuro de éster de Wittig C3 para producir el primer intermedio en esta secuencia de la reacción, el compuesto M. Como alternativa, en esta primera etapa, se puede conseguir el mismo resultado si el compuesto A se hace reaccionar con el compuesto L (2-fosfopropionato de trietilo), un fosfonoéster C3, para producir el compuesto M intermedio.

30

En la segunda reacción de acoplamiento, el compuesto M se hizo reaccionar con el compuesto H (bromuro de etoxicarbonilmetiltrifenilfosfonio), una sal de fosfonio C2 / bromuro de éster de Wittig C2, para formar el penúltimo intermedio, el compuesto O. Como alternativa, el compuesto O se puede formar mediante una reacción entre el compuesto M y el compuesto N (fosfonoacetato de trietilo), un fosfonoéster C2.

- 5 En la etapa final de la reacción, el compuesto O se sometió a una reacción de saponificación para formar el derivado asimétrico C-15 del TSC, el compuesto P. El esquema de reacción se muestra en la figura que viene a continuación.



- 10 El derivado C15 requirió el uso de dos reacciones consecutivas y diferentes de monoacoplamiento; la primera con el fosfonoéster C3 o bromuro de fosfonio y la segunda con el bromuro de fosfonio C2. Debido a la formación de algunos ésteres de dietilo C16, el producto bruto de la primera reacción de monoacoplamiento se purificó por cromatografía en gel de sílice.

Primera reacción de acoplamiento para formar el compuesto M

- 15 El compuesto A se trató con 1 eq de bromuro de fosfonio C-3 (compuesto K) a 100 °C durante 1 día. Esta reacción de acoplamiento se realizó en óxido de butileno/tolueno a 2:1 (0,7 ml + 1,4 ml/mmol) y mostró la buena formación del producto. Mientras se enfriaba a temperatura ambiente y más tarde a 0°C no se observó ninguna precipitación. A continuación, la mezcla de color naranja se filtró sobre gel de sílice (0,33 g/mmol). La torta del filtro se lavó con tolueno (1,7 ml/mmol). Se combinaron los filtrados y se evaporaron hasta secarlos completamente a JT = 45 °C para dar un producto bruto que tenía el aspecto de un aceite anaranjado.

- 20 A continuación, se evaporó la mezcla de reacción hasta secarla completamente. El resto se suspendió en MeOH para obtener el producto bruto en forma sólida y luego se lavó con MeOH (3×). La calidad del producto bruto era mala debido a la presencia de éster dietílico C16 además del producto de monoacoplamiento C13 deseado, el compuesto M. Así pues, se llevó a cabo una etapa de purificación en gel de sílice con metilciclohexano/EtOAc a 10:1. El producto bruto se disolvió en diclorometano (0,3 ml/g del producto bruto). El éster dietílico C-16 (aproximadamente el 7 %) fue el primer compuesto que se eluyó. Una vez que se había realizado esta etapa, el rendimiento fue del 45 % (experimento de 20 g). A una escala más pequeña, el rendimiento llegó a alcanzar el 70 %. Se determinó que el producto con la mejor calidad tenía el 98,1 % a/a del isómero *trans* a una longitud de onda de detección de 383 nm (9,22 min). Se hallaba presente un compuesto adicional (1,7 % a/a, 9,47 min), que se sospechaba que era un isómero *cis* del compuesto M.

Segunda reacción de acoplamiento para formar el compuesto O

- 30 El compuesto M se trató con 1,5 eq. de bromuro de fosfonio C-2 (compuesto H) a 100 °C. Esta reacción de acoplamiento se llevó a cabo en óxido de butileno/tolueno a 2:1 (0,5 ml + 1,0 ml/mmol) y mostró una buena formación del producto. El producto amarillo se aisló por filtración a 0 °C y mediante dos lavados con metilciclohexano. El rendimiento en esta etapa fue del 36 %.

En un intento de mejorar el rendimiento, el agua madre se concentró a aproximadamente la mitad del volumen original y se enfrió a 0 °C para obtener una segunda cosecha con un rendimiento del 27 %. El rendimiento total de ambas cosechas combinadas fue del 63 % (escala de 13 g).

- 5 Se determinó que el producto con la mejor calidad (compuesto O) tenía el 87,0 % a/a del isómero *trans* a una longitud de onda de detección de 383 nm (12,4 min). Además, se observó un segundo compuesto sobre el cromatograma de la HPLC (11,3 % a/a, 11,8 min) y podría ser un isómero *cis* del compuesto O.

Reacción de saponificación para formar el producto final (compuesto P)

- 10 El éster dietílico, el compuesto O, se trató con NaOH al 30 % (2 ml/mmol) en (EtOH) (4 ml/mmol) a 90 °C durante 3 días. Un producto amarillo verdoso se aisló por filtración a RT y mediante lavado con EtOH al 50 % en agua (5×) y EtOH puro (3×). La reacción de saponificación produjo un rendimiento del 83 % (escala de 6 g).

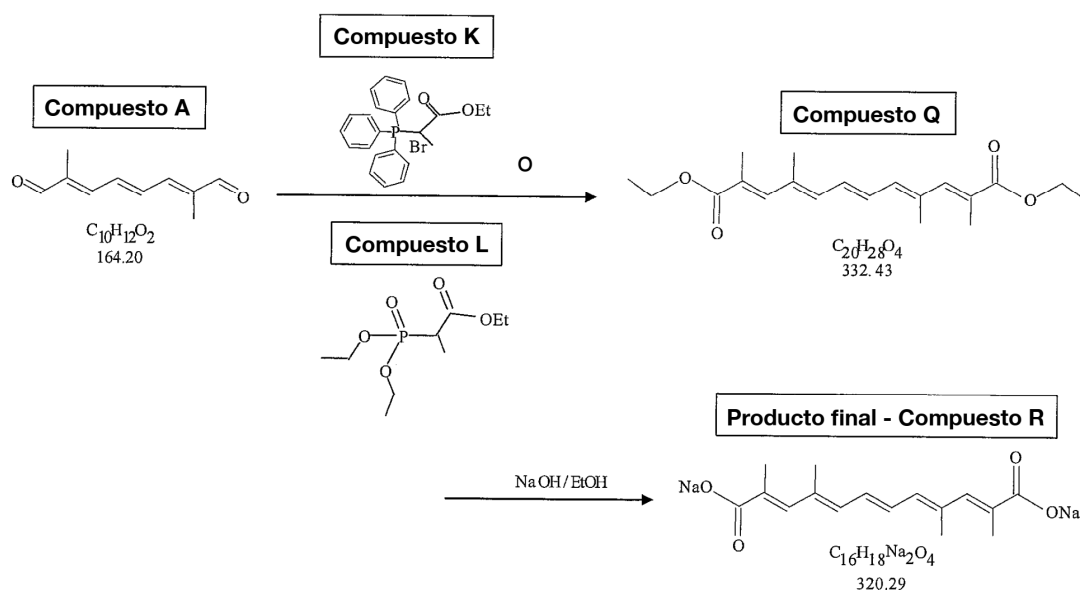
Un experimento de <sup>1</sup>H-RMN confirmó el producto deseado, el compuesto P. La calidad por HPLC fue del 97,0 % del compuesto P a una longitud de onda de detección de 383 nm. Además, se observaron otros posibles isómeros *cis* que corresponden a 1,4 % a/a + 1,2 % a/a. Los datos de la LC-MS confirmaron la estructura dada.

Ejemplo 7

- 15 Síntesis del derivado C-16 del TSC (2,4,9,11-tetrametildodeca-2E,4E,6E,8E,10E-pentaeno-1,12-diotato de disodio)

- El compuesto A se hizo reaccionar con el compuesto L (2-fosfonopropionato de trietilo), un fosfonoéster C3, para formar el intermedio crítico de la síntesis, el compuesto Q. Como alternativa, el compuesto Q se puede producir mediante una reacción entre el compuesto A y el compuesto K (bromuro de 1-(etoxicarbonil)-etiltrifenilfosfonio), una sal de fosfonio C3 / bromuro de éster de Wittig C3. Aunque los reactivos iniciales (compuestos A, K y L) son los mismos que los que se encuentran en el ejemplo 6, las condiciones de la reacción utilizadas aquí produjeron un intermedio simétrico diferente, el compuesto Q.
- 20

- En la etapa final de la reacción, el compuesto Q se hizo reaccionar con hidróxido de sodio y etanol en una reacción de saponificación que produjo el producto final, el compuesto R. El compuesto R (2,4,9,11-tetrametildodeca-2E,4E,6E,8E,10E-pentaeno-1,12-diotato de disodio) es el derivado simétrico C-16 del TSC. El esquema de reacción se muestra en la figura que viene a continuación.
- 25



Reacción de acoplamiento para formar el compuesto Q (con el compuesto L como reactante)

- La síntesis del derivado C16 (compuesto R) comenzó de una manera similar a la mostrada en el ejemplo 6: una reacción de acoplamiento entre el compuesto A y el compuesto L. El compuesto A se trató con el compuesto L a 100 °C en tolueno/óxido de butileno a 2:1. No se observó ninguna reacción química sin la adición de una base y, en este caso, la mezcla se enfrió a 0 °C y se le añadió NaOMe (3 eq.).
- 30

- A la mezcla de reacción se le añadió una segunda cantidad del reactivo, preparado a partir del fosfonoéster C-3 (2 × 1,5 eq.) y NaOMe en DCM dos veces. La mezcla se agitó a JT = 65 °C y se observó un porcentaje más alto de los productos deseados. El cromatograma de la HPLC indicaba que quedaba solo un pequeño porcentaje del compuesto A sin reaccionar (2,3 % a/a). La mezcla de reacción se paró con agua y la fase orgánica se lavó en una solución que
- 35

consistía en: agua, una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y una solución de  $\text{NaCl}$  saturada al 50 %. El resultado fue la producción de 36,4 g del compuesto Q después de la evaporación.

- 5 La purificación del compuesto Q se llevó a cabo en gel de sílice con metilciclohexano/ $\text{EtOAc}$  a 10:1. El resultado fueron 0,26 g de un producto amarillento claro (compuesto Q) y 4,0 g de un sólido amarillo (compuesto M). El producto de transesterificación, el compuesto Q (éster dimetilico, en vez de éster dietílico) se aisló con un rendimiento del 32 % mediante el uso de  $\text{MeOH}$  como solvente. Un solvente alcohólico también habría sido idóneo para la reacción de acoplamiento. En conjunto, la calidad del producto de esta etapa era excelente con una pureza del 85,7 %. Los experimentos de HPLC demostraron que la mayoría de las impurezas eran isómeros *cis* del compuesto Q.

Reacción de acoplamiento para formar el compuesto Q (con el compuesto K como reactante)

- 10 En un segundo experimento para sintetizar el compuesto Q, el compuesto L se substituyó por el compuesto K en la reacción de acoplamiento. Esta substitución mostró una mejor conversión global de la reacción. La reacción de acoplamiento entre el compuesto A y el compuesto K se realizó en una mezcla de óxido de butileno/tolueno a 2:1 (0,9 ml + 1,8 ml/mmol) y mostró una buena formación del producto con 3 eq. del reactivo de Wittig a  $\text{JT} = 100^\circ\text{C}$  (22 h). El producto amarillo se aisló por filtración a  $0^\circ\text{C}$  y mediante dos lavados con metilciclohexano. El rendimiento fue del 61 al 62 % (escala de 10 g). El análisis por HPLC mostró una pureza del compuesto Q del 85,2 % a/a del isómero *trans* a 369 nm (13,3 min), en donde la mayor impureza era un isómero *cis*.

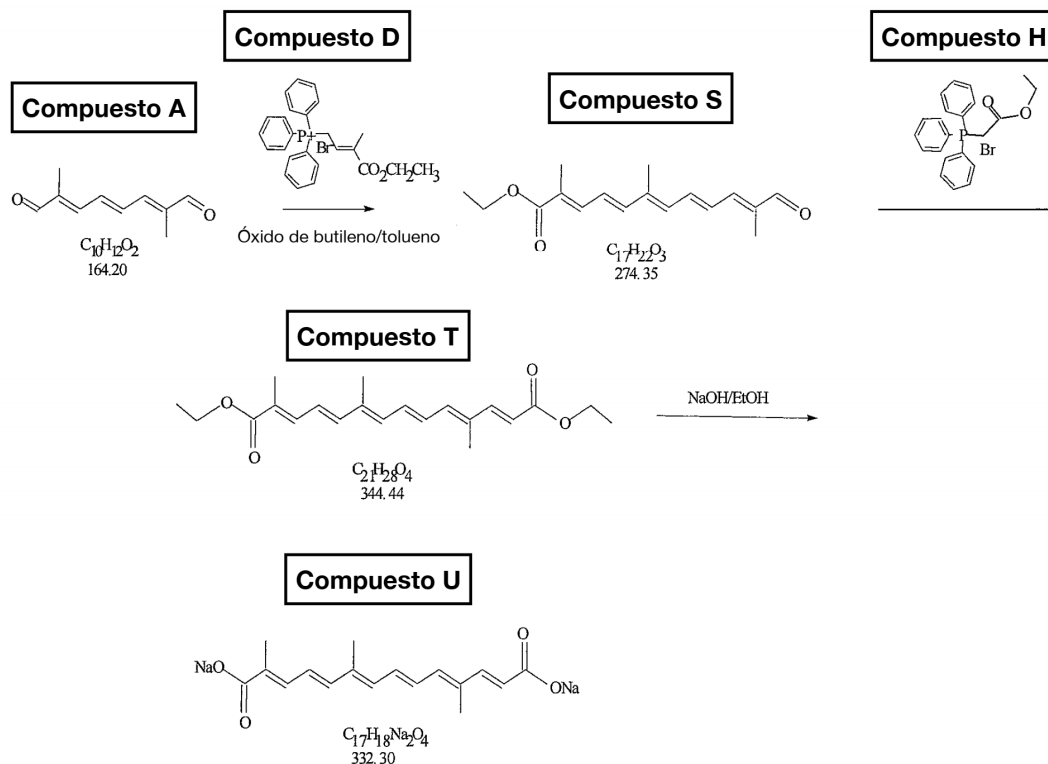
Reacción de saponificación para formar el producto final (compuesto R)

- 20 La reacción de saponificación para producir el compuesto R se llevó a cabo de una manera similar a la descrita en el ejemplo 5. El éster dietílico (compuesto Q) se trató con  $\text{NaOH}$  al 30 % (2 ml/mmol) en ( $\text{EtOH}$ ) (4 ml/mmol) a  $90^\circ\text{C}$  durante 3 días. La saponificación dio un rendimiento del 85 % (escala de 12,5 g) después de la filtración a RT y del lavado con  $\text{EtOH}$  al 50 % en agua (3x) y  $\text{EtOH}$  (3x). La  $^1\text{H-RMN}$  confirmó que el producto deseado era el compuesto R. La calidad por HPLC fue del 95,7 % con una longitud de onda de detección de 383 nm. Aún más, se observó un isómero *cis* al 3,8 %. Los datos de la LC-MS confirmaron la estructura dada.

Ejemplo 8

- 25 Síntesis del derivado C-17 del TSC (2,6,11-trimetiltetradeca-2E,4E,6E,8E,10E,12E-hexaeno-1,14-diotato de disodio)

- 30 La preparación de un derivado asimétrico del TSC de cadena más larga se llevó a cabo con el uso de los compuestos A y D como sustancias de partida al igual que en los ejemplos 1 y 2. Sin embargo, en este caso, las condiciones de reacción se cambiaron para favorecer la formación del primer intermedio de acoplamiento, el compuesto S. A continuación, el compuesto S se hizo reaccionar en una segunda reacción de acoplamiento con el compuesto H para formar el compuesto T. En la etapa final de esta secuencia de reacciones, el compuesto T se sometió a una reacción de saponificación con hidróxido de sodio y etanol para formar el producto deseado final, el compuesto U. El compuesto U es el derivado C-17 del TSC y es asimétrico con respecto a la colocación de los grupos metilo colgantes en torno al esqueleto de dieno. Los detalles de la secuencia de síntesis se muestran en la figura que viene a continuación.



#### Primera reacción de acoplamiento para formar el compuesto S

El compuesto A se trató con 1 eq. del compuesto D a 100 °C durante 1 día. Esta reacción de acoplamiento se llevó a cabo en óxido de butileno/tolueno a 2:1 (0,44 ml + 0,88 ml/mmol) tal y como se utilizó en el ejemplo 1, y mostró una buena formación del producto. Durante una etapa de enfriamiento posterior a 0 °C, se formó una suspensión a partir de la solución original de color rojo oscuro. Finalmente, se aisló un sólido de color naranja oscuro por filtración a 0 °C y mediante lavado con metilciclohexano (3×). Este sólido rojo-anaranjado se identificó como el compuesto E, descrito más arriba en los ejemplos 1 a 4. El rendimiento del compuesto E en esta situación fue de aproximadamente el 4 %.

El agua madre, obtenida en la etapa descrita más arriba, se evaporó hasta secarla completamente a JT = 45 °C para dar el compuesto S como un producto bruto oleáceo de color rojo. La calidad del producto bruto obtenido era mala debido a la presencia de algo del compuesto E además del producto deseado, el compuesto S. Para aislar el compuesto S, se llevó a cabo una etapa de purificación en gel de sílice con metilciclohexano/EtOAc a 8:1. Para ello, el producto bruto se disolvió primero en diclorometano (producto bruto a 0,3 ml/g). El primer producto eluido a partir de esta mezcla fue el éster dietílico C-20 (compuesto E). La restante fracción contenía una mezcla de compuestos, entre ellos el compuesto S deseado. El rendimiento después de esta etapa fue del 46 % (experimento de 30 g) de un sólido anaranjado. Se determinó que la calidad (por HPLC) era del 71,2 % a/a del isómero *trans* a una longitud de onda de detección de 369 nm (10,4 min). Además, se identificaron dos compuestos más (0 % a/a + 4,9 % a/a) que probablemente son los isómeros *cis* del compuesto S.

#### Segunda reacción de acoplamiento para formar el compuesto T

El compuesto S se hizo reaccionar con 1,5 eq. del compuesto H a 100 °C. Esta reacción de acoplamiento se llevó a cabo en óxido de butileno/tolueno a 2: 1 (0,6 ml + 1,2 ml/mmol) y mostró una buena formación del producto. El producto rojo, el compuesto T, se aisló por filtración a 0 °C y con dos lavados con metilciclohexano. El rendimiento fue del 58 % (escala de 10 g). Se determinó que la calidad era del 97,2 % a/a del isómero *trans* a una longitud de onda de detección de 421 nm (14,2 min). Además, se detectaron otros dos compuestos y se especula que son los isómeros *cis* del compuesto T.

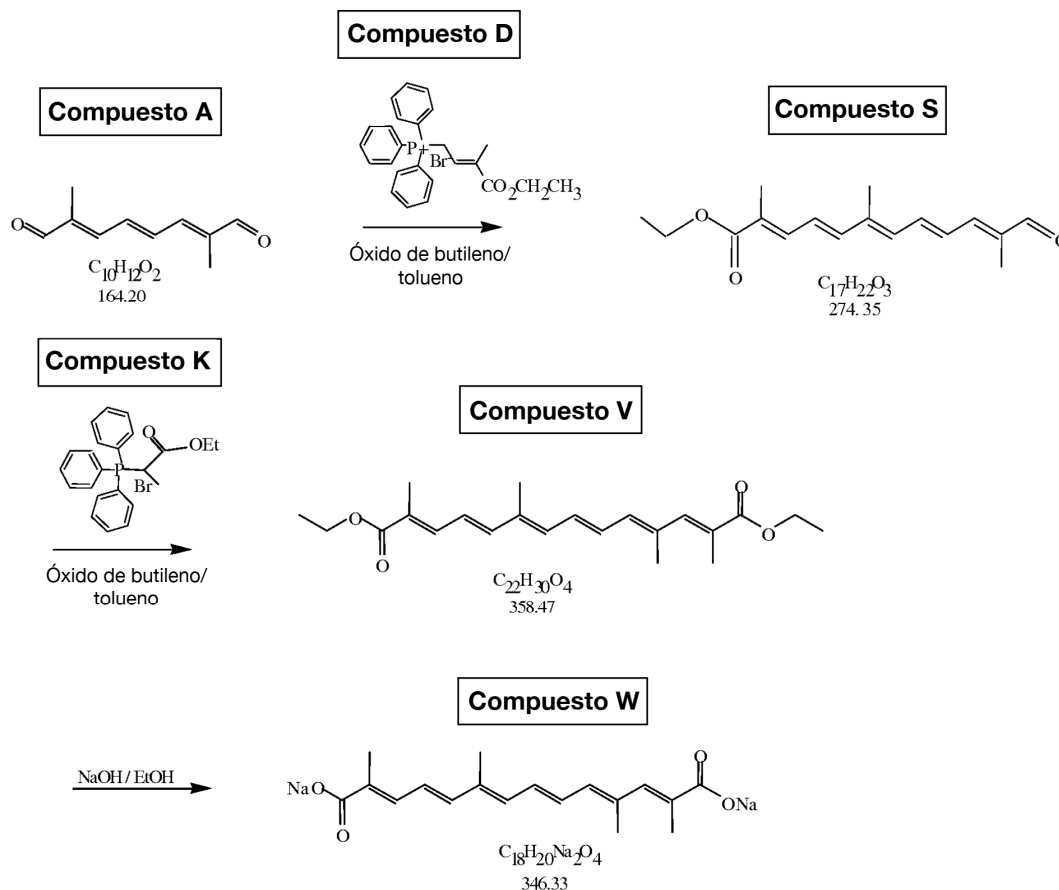
#### Reacción de saponificación para formar el compuesto U

Se realizó la reacción de saponificación de una manera similar a los ejemplos 1 a 4. El compuesto T se trató con NaOH al 30 % (2 ml/mmol) en (EtOH) (2 ml/mmol) a 90 °C durante 4 días. Al cabo de 2 días, la mezcla se diluyó con agua (1 ml/mmol). El producto amarillento, el compuesto U, se aisló por filtración a RT y por lavado con EtOH al 50 % en agua (2×) y EtOH (3×). La reacción de saponificación mostró un rendimiento del 93 % (escala de 7 g). La <sup>1</sup>H-RMN confirmó que el producto deseado era el compuesto U. La calidad por HPLC fue del 98,4 % a una longitud de onda de detección de 399 nm cuya principal impureza se hallaba al 0,7 %.

## Ejemplo 9

Síntesis del derivado C-18 del TSC (2,4,9,13-tetrametiltetradeca-2E,4E,6E,8E,10E,12E-hexaeno-1,14-diotato de disodio)

- 5 El derivado C18 del TSC, el compuesto W, se preparó mediante dos reacciones secuenciales de monoacoplamiento como las vistas en los ejemplos 6 y 8 en esta solicitud. La primera reacción de acoplamiento se comenzó como en el ejemplo 8, lo que condujo a la formación del compuesto S. En la segunda reacción de acoplamiento, el compuesto S se hizo reaccionar con el compuesto K para formar el penúltimo intermedio, el compuesto V. El producto deseado final, el compuesto W, se produjo mediante la reacción de saponificación del compuesto V. La figura que viene a continuación ilustra los detalles de la secuencia de síntesis.



10

## Primera reacción de acoplamiento para formar el compuesto S

La primera reacción de acoplamiento mostrada más arriba, que conduce a la formación del compuesto S, se describió ya antes en esta solicitud en el ejemplo 8. El método utilizado en este ejemplo es idéntico.

## Segunda reacción de acoplamiento para formar el compuesto V

- 15 La segunda reacción de acoplamiento se realizó al hacer reaccionar el compuesto S (también conocido como el monoéster C15) con 1,5 eq. del compuesto K (un bromuro de fosonio C-3) a 100 °C. Esta reacción de acoplamiento se llevó a cabo en óxido de butileno/tolueno a 2:1 (0,6 ml + 1,2 ml/mmol) y mostró una buena formación del producto. Un producto de color naranja se aisló por filtración a 0 °C y por dos etapas de lavado con metilciclohexano. El rendimiento para esta etapa fue del 56 % (escala de 9 g). La calidad del compuesto V se midió por HPLC y se encontró
- 20 que era 96,7 % a/a del isómero *trans* a una longitud de onda de detección de 369 nm (14,2 min). Además, la principal impureza observada (1,7 % a/a, 13,6 min) se especula que sea un isómero *cis* del compuesto V.

## Reacción de saponificación para formar el compuesto W

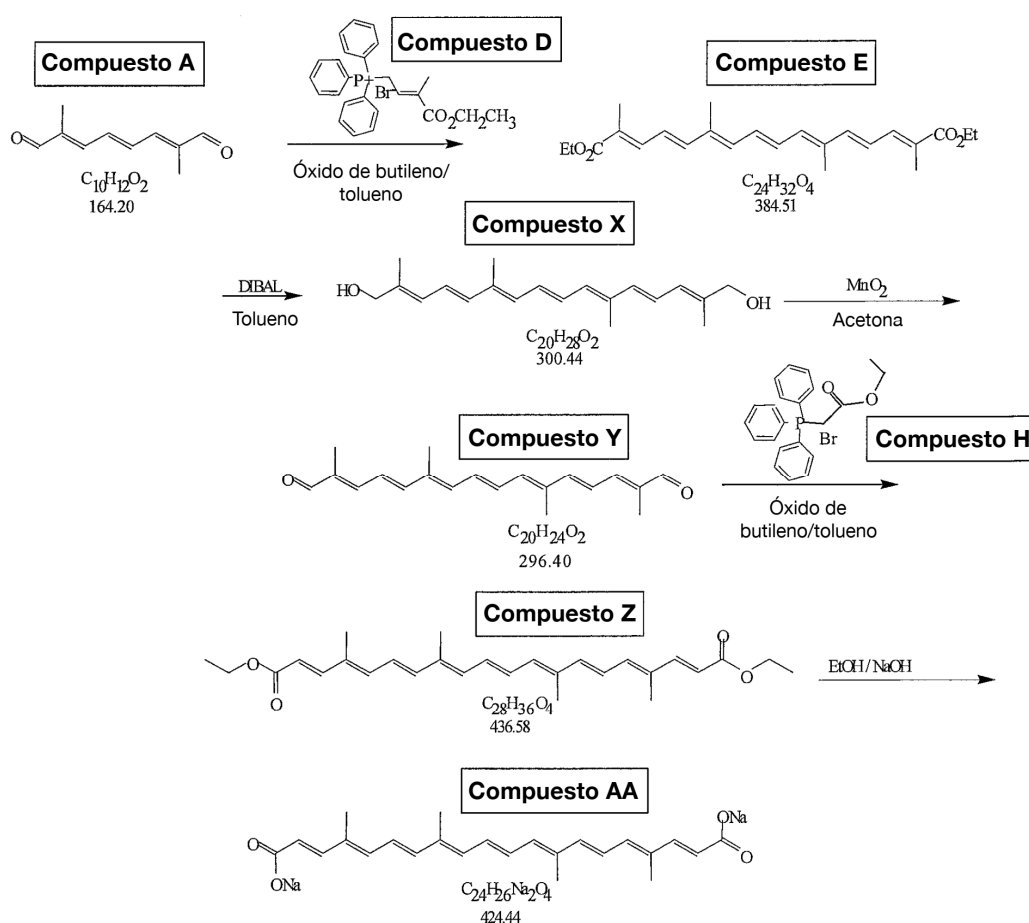
- 25 Se realizó la reacción de saponificación de una manera similar a los ejemplos de más arriba. El compuesto V se trató con NaOH al 30 % (2,2 ml/mmol) en EtOH (3,4 ml/mmol) a 90 °C durante 4 días. Al cabo de 2 días, la mezcla se diluyó con agua (1,1 ml/mmol). Un producto amarillento se aisló por filtración a RT y por lavado con EtOH al 50 % en agua (2×) y EtOH (3×). La reacción de saponificación dio un rendimiento del 98 % (escala de 6 g). La  $^1H$ -RMN confirmó que el producto obtenido era el producto deseado, el compuesto W. El análisis por HPLC mostró que la pureza del

compuesto W era del 99,2 % a una longitud de onda de detección de 405 nm. Además, se observó una impureza del 0,3 % a/a y se cree que es un isómero *cis* del compuesto W.

Ejemplo 10

5 Síntesis del derivado C-24 del TSC (4,8,13,17-tetrametileicosa-2E,4E,6E,8E,10E,12E,14E,16E,18E-nonaeno-1,10-diotato de disodio)

10 Los derivados de cadena más larga del TSC necesitaron el uso de procedimientos de síntesis de varias etapas que implicaron etapas de reducción y oxidación. Este ejemplo ilustra la síntesis del derivado C24 del TSC (4,8,13,17-tetrametileicosa-2E,4E,6E,8E,10E,12E,14E,16E,18E-nonaeno-1,10-diotato de disodio). La síntesis comenzó con el compuesto E, el punto de partida para varios ejemplos ya descritos en esta solicitud. El compuesto E (un éster dietílico) se convirtió en un compuesto X, un dialcohol, mediante una etapa de reducción. La tercera etapa en la secuencia de reacción fue una oxidación del compuesto X con MnO<sub>2</sub> para formar el compuesto Y. La siguiente etapa consistió en una reacción de acoplamiento con el compuesto H para formar el compuesto Z y una etapa de saponificación final para formar el producto deseado, el compuesto AA (derivado C-24 del TSC). La secuencia de la reacción se muestra a continuación.



15 Reacción para formar el compuesto E

La reacción de acoplamiento entre los compuestos A y D para formar el compuesto E se ha descrito anteriormente en los ejemplos 1 a 4.

Reacción de reducción para formar el compuesto X

20 Se suspendieron 40 g del éster dietílico (compuesto E) en tolueno y se trataron con DiBAL (6 eq.) a JT = -70 °C. La mezcla se agitó durante 4,5 h a JT = -70 °C. Un IPC reveló que la conversión fue completa. La mezcla se paró con HCl a 2 M a -77 °C.

La mezcla se dividió en tres porciones. Cada porción se diluyó con agua y THF. La capa orgánica se lavó 3x con salmuera. Las capas orgánicas combinadas se evaporaron a JT = 45 °C para dar 30,63 g de un sólido de color naranja,

que correspondía a un rendimiento del 98 %. La reextracción de las capas acuosas dio además 1,48 g de un sólido de color naranja.

A partir del procedimiento descrito más arriba, se obtuvo un producto anaranjado con una calidad del 89,0 % a/a según se midió por HPLC. Además, una impureza, que se creía que era un producto de reacción secundario de tipo aldehído, se observó a una concentración del 4,8 % a/a del isómero.

Además, se llevó a cabo un estudio independiente para determinar si la reacción de reducción se podría haber llevado a cabo con LAH o NaBH<sub>4</sub>. La reducción con LAH (2 eq.) en THF a 0 °C mientras se calentaba lentamente a RT en menos de 4 h dio un rendimiento de aproximadamente el 80 % en un experimento de 1 g, pero la calidad no fue tan alta como con el método con DiBAL-H. Pero este reactante puede ser una opción para evaluaciones adicionales de esta etapa. En cambio, la reducción con NaBH<sub>4</sub> (2 eq.) en THF se halló que era la adecuada para esta etapa. Aún más, la adición de MeOH como un cosolvente no mejoró la reacción.

Reacción de oxidación para formar el compuesto Y

Se realizaron dos experimentos para intentar optimizar la reacción de oxidación con la que se forma el compuesto Y. En el primer experimento, la reacción de oxidación se llevó a cabo en una concentración baja del compuesto X (1,7 %) en acetona y un exceso de MnO<sub>2</sub> (30 eq.). La reacción comenzó a 0 °C mientras se calentaba a RT a lo largo de 1 día. Se retiró el reactivo por filtración sobre celite o gel de sílice y evaporación para dar un producto sólido púrpura con un rendimiento de 42-57 %. La calidad del producto se midió por HPLC al 87,7 % a/a a una longitud de onda de detección de 421 nm. Esta estrategia condujo a un producto de gran pureza, según se midió por HPLC.

Como segundo método para llevar a cabo la reacción de oxidación, se realizó un experimento a pequeña escala centrado en el procedimiento de cristalización. El uso de una mezcla de acetona/agua a una relación de 2:3 (0,013 g/ml) como solvente produjo los mejores resultados en esta etapa. Otros solventes, tales como dioxano/MCH (1:2), THF y EtOAc, no mejoraron los resultados de cristalización. El único parámetro que mejoró la cristalización fue cambiar la temperatura de la camisa. El incremento de la temperatura de la camisa a 75 °C mejoró significativamente la conversión al producto y redujo la cantidad de MnO<sub>2</sub> necesario para la reacción total para 10 eq. a partir de 30 eq. En el párrafo que viene a continuación se ofrece una descripción más detallada de las etapas tomadas en este método modificado.

Se suspendieron en acetona 5 g del compuesto X y se trataron con 5 eq. de MnO<sub>2</sub> a JT = 75 °C. La mezcla se agitó durante 2 días a 75 °C. Un IPC reveló la presencia de especies de dialdehído y monoaldehído además de la sustancia de partida. Como resultado, se le añadieron 5 eq. más de MnO<sub>2</sub> para impulsar la reacción hacia su completación. Al cabo de 8 horas de tiempo de reacción, se consumió la mayor parte de la sustancia de partida y del intermedio. Se enfrió la mezcla y se filtró primero sobre gel de sílice e inmediatamente después sobre celite. La etapa de doble filtración era necesaria para retirar el MnO<sub>2</sub>. Una tercera etapa de filtración se realizó sobre una membrana. En total, el lavado de las tortas de filtro con THF dio lugar a 0,7 g de un producto rojo además de 1,95 g + 2,51 g de un producto marrón oscuro con trazas de manganeso. El rendimiento de masa total para la reacción fue de 5,16 g (99,6 %). HPLC de un IPC: 61,0 % + 5,4 % + 19,3 % (incluidos los isómeros) a 463 nm.

En este segundo método para la reacción de oxidación, aunque el rendimiento del producto era más alto que la primera secuencia de síntesis, la calidad por HPLC no era tan alta, y quedaban cantidades residuales de óxido de manganeso en el producto del compuesto Y.

Se debe observar que, en cualquiera de los métodos, se debe consumir el intermedio (monoaldehído) para que se consigan buenos rendimientos y calidades. Los restos de manganeso se pueden retirar mediante un cambio de solvente con THF o EtOAc calientes antes de la etapa de filtración.

Reacción de acoplamiento para formar el compuesto Z

La síntesis del éster dietílico C24 (compuesto Z) se llevó a cabo de una manera similar a los ejemplos 5, 6 y 8 con el uso del compuesto H. El dial C20 (compuesto Y) se trató con el compuesto H a 100 °C en tolueno/óxido de butileno a 2:1 (1 ml y 0,5 ml/mmol) durante 1 día. Aunque se enfrió a RT, no se observó ninguna precipitación. Todavía estaba presente una solución transparente de color rojo intenso.

A continuación, la mezcla se evaporó hasta secarla completamente a JT = 40-50 °C. El residuo se trató con MeOH (1,25 mmol/mmol) y se enfrió a 0 °C. Se filtró la suspensión y la torta del filtro se lavó dos veces con metanol. Esta etapa dio lugar a un producto rojo-pardusco después de secarlo en un evaporador rotatorio a JT = 50 °C.

El rendimiento para esta reacción fue del 19-22 %. Este rendimiento se pudo mejorar con una recuperación adicional del producto desde el agua madre. Se determinó que la mejor calidad era del 92,4 % a/a del isómero *trans* (del compuesto Z) a una longitud de onda de detección de 421 nm (16,8 min). Otros compuestos que se observaron en el espectro por HPLC se creía que eran isómeros *cis* del compuesto Z.

Reacción de saponificación para formar el compuesto AA

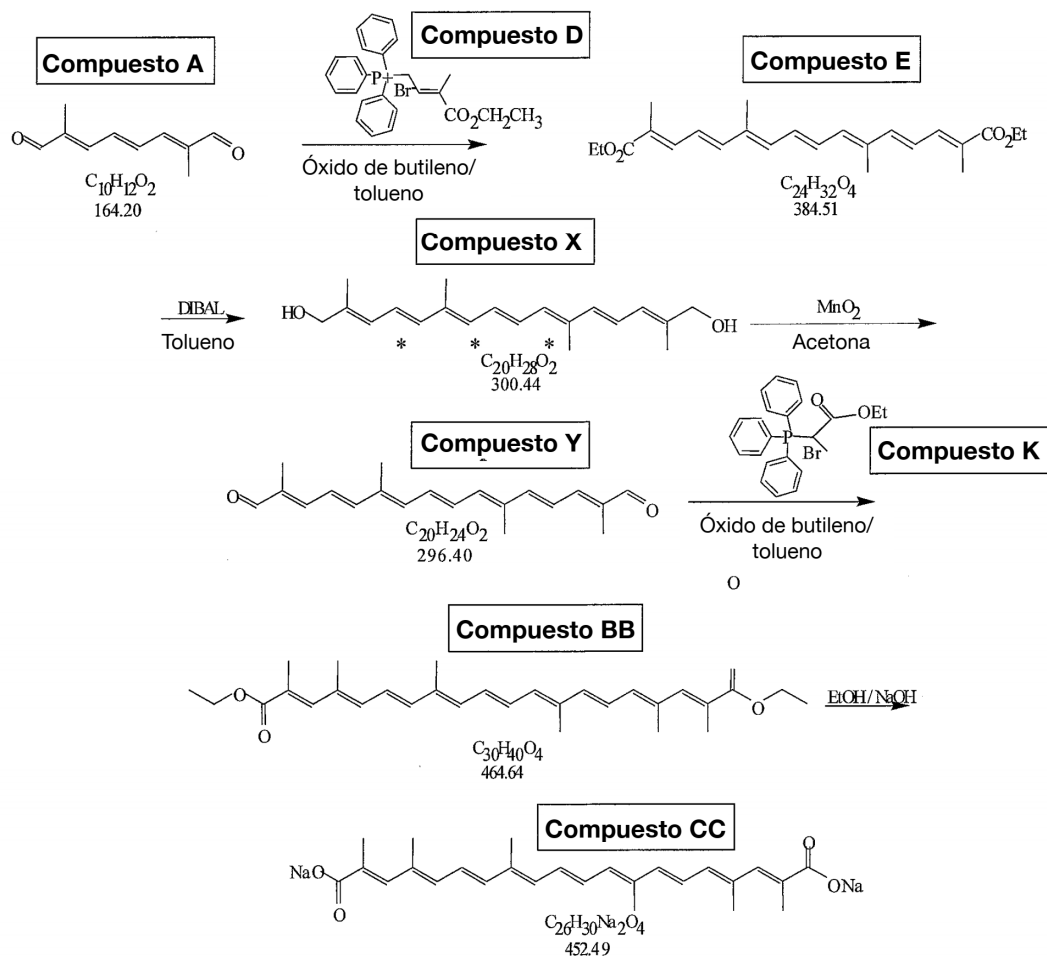


La reacción de saponificación se llevó a cabo de una manera similar a la anteriormente descrita en este documento. El éster dietílico (compuesto Z) se trató con NaOH al 30 % (3 ml/mmol) en EtOH (3 ml/mmol) a 90 °C durante 3 días. La reacción de saponificación produjo un rendimiento del 83 % (escala de 0,8 g) después de la dilución con agua (6 ml/mmol) y etanol (3 ml/mmol), filtración a RT y lavado con EtOH al 50 % en agua (12 ml/mmol) y EtOH (12 ml/mmol). La calidad por HPLC fue del 95,3 % para el compuesto AA a 463 nm además del 0,5 % para el isómero *cis*.

5

Ejemplo 11

Síntesis del derivado C-26 del TSC (2,4,8,13,17,19-hexametileicosa-2E,4E,6E,8E,10E,12E,14E,16E,18E-nonaeno-1,10-diotato de disodio)



10 Secuencia de reacciones para formar el compuesto Y

La secuencia de reacciones necesarias para formar el compuesto Y se describió más arriba en el ejemplo 10. En este ejemplo se siguió la misma secuencia.

Reacción de acoplamiento para formar el compuesto BB

15 La síntesis del éster dietílico C26 comenzó a partir de la producción del compuesto Y, tal y como está descrito en el ejemplo 9. El compuesto Y se trató con el compuesto K a 100 °C en tolueno/óxido de butileno a 2:1 (2 ml y 1 ml/mmol) durante 1 día. Mientras se iba enfriando a RT, no se observó ninguna precipitación. Todavía estaba presente una solución transparente de color rojo intenso. La mezcla se enfrió a 0 °C. Se filtró la suspensión resultante. A continuación, la torta del filtro se lavó tres veces con MeOH para dar un sólido púrpura oscuro después de secarlo en un evaporador rotatorio a JT = 45 °C.

20 El rendimiento de esta etapa se situó entre el 17 y el 26 %. Una de las principales razones era que parte del producto permanecía en el agua madre. Se determinó que el producto con la mejor calidad tenía el 83,9 % a/a del isómero *trans* a una longitud de onda de detección de 463 nm (por HPLC). Se baraja que los otros compuestos que se observaron eran los isómeros *cis* del compuesto BB. Este experimento se realizó a una escala de 1,5 g.

Reacción de saponificación para formar el compuesto CC

5 La reacción de saponificación se realizó de una manera similar a la descrita en el ejemplo 9. El éster dietílico (compuesto BB) se trató con NaOH al 30 % (3 ml/mmol) en EtOH (3 ml/mmol) a 90 °C durante 3 días. La reacción de saponificación dio un rendimiento del 84 % (escala de 0,8 g) después de la dilución con agua (6 ml/mmol) y etanol (3 ml/mmol), filtración a RT y lavado con EtOH al 50 % en agua (12 ml/mmol) y EtOH (12 ml/mmol). La <sup>1</sup>H-RMN confirmó que se había obtenido el producto deseado (compuesto CC). La calidad por HPLC fue del 91,5 % a una longitud de onda de detección de 460 nm. Además, se observó el isómero *cis* al 0,2 %.

Ejemplo 12

Formulación del TSC con ciclodextrina-manitol

- 10 1. Se hace una solución que contenga concentraciones equimolares de la ciclodextrina y el TSC. De esta manera, se pueden fabricar soluciones que contienen más de 20 mg de TSC por mililitro de solución. Primero se añade la ciclodextrina a un agua inyectable, a continuación se le añade el TSC a esa solución.
2. Se añade D-manitol para que la concentración final sea de aproximadamente 20 a 50 mg/ml de manitol en solución.
- 15 3. Esta solución se puede añadir a la solución salina isotónica para diluirla y seguir manteniendo la osmolaridad adecuada. Se añade la solución a la salina o bien se añade la salina a la solución.

Ejemplo 13

Formulación del TSC con manitol/ácido acético

1. Se hace una solución de ácido acético a 0,01 M en agua destilada.
- 20 2. Se combina esta solución con un agua inyectable en las proporciones adecuadas para tener una concentración final de ácido acético de 0,0005 M. Nota: No debe utilizarse el ácido acético muy concentrado. Por ejemplo, a 0,0006 M está bien, pero a 0,001 M no se disuelve el TSC.
3. Se añade lentamente la solución de ácido acético a 0,0005 M al TSC. La solubilidad máxima está alrededor de 6 a 6,5 mg de TSC por mililitro de solución.
- 25 4. Se añade D-manitol a la solución de más arriba a una concentración de 50 mg/ml para obtener la osmolaridad adecuada. El pH de esta solución está alrededor de 8 a 8,5. Debe estar cercano para ser una solución isotónica y, como tal, poderse inyectar directamente en el torrente circulatorio.

Ejemplo 14

Administración pulmonar

30 Se ha demostrado que el TSC, en las ratas, pasa al torrente circulatorio después de la administración pulmonar. En este método, se intubaron las ratas y un pequeño volumen (0,1 ml habitualmente) de la solución de TSC se inyectó seguido de dos bocanadas de 3 ml de aire. Se halló que del 40 al 70 % de la dosis dada pasó rápidamente al torrente circulatorio (el tiempo necesario para alcanzar la concentración plasmática máxima fue de menos de 5 minutos).

35 Se han realizado otros estudios con dosis pulmonares en las que se investigó el efecto del volumen del líquido inyectado en la tráquea, así como con el uso del TSC en su forma farmacéutica formulada. El producto farmacéutico formulado contenía  $\gamma$ -ciclodextrina al 8 %, manitol al 2,3 % y glicina a 50 mM, y TSC a 20 mg/ml, reconstituido en agua estéril. En estos estudios se le añadió solución salina estéril (0,9 %) como diluyente para alcanzar las dosis deseadas. La misma dosis (937  $\mu$ g/kg) se administró a todas las ratas.

40 Se halló que la incorporación de la  $\gamma$ -ciclodextrina parece mejorar el paso del TSC a la circulación sistémica, con el efecto global del incremento de la eliminación plasmática. De igual forma, un incremento del volumen de la inyección da lugar a una mayor absorción del TSC y durante un periodo de tiempo más prolongado. Así pues, una inyección con un volumen más grande para la misma dosis da lugar a una mayor biodisponibilidad. Se debe observar también que se ha encontrado que el choque hemorrágico en las ratas se puede tratar satisfactoriamente con la administración del TSC por vía pulmonar.

45 Ejemplo 15

Administración intramuscular

50 El TSC no se absorbe por vía intramuscular cuando simplemente se disuelve en agua desionizada; sin embargo, la adición de una ciclodextrina (como en el producto farmacológico formulado) da lugar a que pase al torrente circulatorio. Se inyectaron volúmenes pequeños (0,05 ml) en cada músculo del muslo de las ratas con el TSC formulado con 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina o  $\gamma$ -ciclodextrina, y se disolvió en agua. La administración intramuscular de 3347  $\mu$ g/kg de

masa corporal (con 14 mg de 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina por kilogramo de masa corporal) dio lugar a una concentración máxima del TSC en el plasma de 4,8 µg/ml y a una biodisponibilidad de 0,27. La administración de la γ-ciclodextrina con el TSC también dio lugar a una absorción satisfactoria en la circulación sistémica. El choque hemorrágico en las ratas se trató satisfactoriamente mediante la administración del TSC por inyección intramuscular.

5 Ejemplo 16

Administración transdérmica

Se ha demostrado que el TSC, en las ratas, pasa al torrente circulatorio después de la administración transdérmica. Para estos estudios, se cortaron y/o afeitaron las áreas seleccionadas por el abdomen y/o el muslo externo para exponer la capa córnea de la piel. El producto farmacéutico formulado (γ-ciclodextrina al 8 %, manitol al 2,3 % y glicina a 50 mM, y TSC a 20 mg/ml) se aplicó a la capa córnea expuesta y del 0,25 al 0,5 % de la dosis dada se hallaba presente en el torrente circulatorio al cabo de 15 a 30 min después de administrarla.

Ejemplo 17

Administración oral

Se utilizó la intubación con PE-50 para administrar el TSC formulado en el estómago de las ratas y la concentración plasmática se midió después de eso. Las ratas se mantuvieron en ayuno durante las 24 h que preceden a cada experimento. Se les dio agua a voluntad y se impidió la coprofagia mediante el uso de jaulas con suelo de malla de alambre. En un estudio participaron ratas a las que se les permitió comer sin límite después de la administración del TSC y en el otro estudio participaron las ratas a las que se les retiró la comida después de la administración del TSC. La dosis del TSC que se administró a ambos grupos fue de 55 mg/kg y se encontró que del 1 al 2 % de la dosis estaba presente en el torrente circulatorio transcurridos de 15 a 30 min desde la administración.

Ejemplo 18

Retirada de endotoxinas de la γ-ciclodextrina

La γ-ciclodextrina de calidad farmacéutica disponible en el mercado que se adquirió al fabricante tiene una cantidad de endotoxinas que es incompatible con la inyección intravenosa. La cantidad de endotoxinas se debe reducir para utilizar la γ-ciclodextrina en una formulación de TSC que se pretende inyectar por vía intravenosa. Se desarrolló un procedimiento que utiliza varios pases de filtración de la solución de la ciclodextrina a través de un filtro de retirada de endotoxinas (filtro Durapore de 0,22 µm de Millipore), que reduce la cantidad de endotoxinas aproximadamente de 10 a 30 veces. La recuperación de la ciclodextrina es del 90 al 100 %. Un ejemplo de los resultados obtenidos al utilizar este procedimiento sobre una solución de γ-ciclodextrina al 8 % se encuentra en la tabla que viene a continuación.

Etapas de filtración	Concentración de endotoxinas (EU/mg de ciclodextrina)
Prefiltrado	0,226
Después de 1 filtración	0,0246
Después de 2 filtraciones	0,0125
Después de 3 filtraciones	0,0125

30

Ejemplo 19

Liofilización

El procedimiento de liofilización para producir una torta con menos de un 3 % de humedad es tal y como sigue:

Etapas	Temperatura (°C)	Presión	Tiempo (h)
Carga	ambiental	n/a	n/a
Congelación	-30	n/a	1
Congelación	-30	n/a	6
Evacuación	-30	225 um	n/a
Secado	-30	225 um	2
Secado	30	225 um	15
Secado	30	225 um	4
Secado	30	50 um	99

Diluyente

Se puede utilizar como diluyente uno entre tampón de glicina (p. ej., tampón de glicina a 50 mM con manitol al 2-4 %) con la osmolaridad ajustada con manitol.

Ejemplo 20

5 Sensibilización de la radiación

Los tumores de tipo carcinoma de colon humano HCT116 que miden entre 0,25 y 0,35 cm<sup>3</sup> se hicieron crecer en las patas traseras de ratones macho atímicos (de 6 a 7 semanas en el momento de la compra), que requirieron de 2 a 3 semanas de crecimiento antes del uso. Ya que los pacientes no están normalmente anestesiados durante la radioterapia (la anestesia puede disminuir el torrente circulatorio al tumor y hacerlo más hipóxico), el estudio se realizó con animales sin anestesiarse.

10

Había seis grupos de estudio de cinco ratones por grupo (para un total de 30 ratones) denominados grupos de estudio del 1 al 6. A todos los ratones del estudio se les inyectó por vía intravenosa una dosis de TSC o bien un control de solución salina durante cinco días sucesivos. Tal y como se muestra a continuación, los grupos de estudio 1, 2 y 3 recibieron las dosis A, B y C de TSC, que corresponde a 0,07, 0,14 y 0,28 mg/kg, respectivamente, para el estudio B, y 1,35, 0,54 y 0,18 mg/kg, respectivamente, para el estudio A.

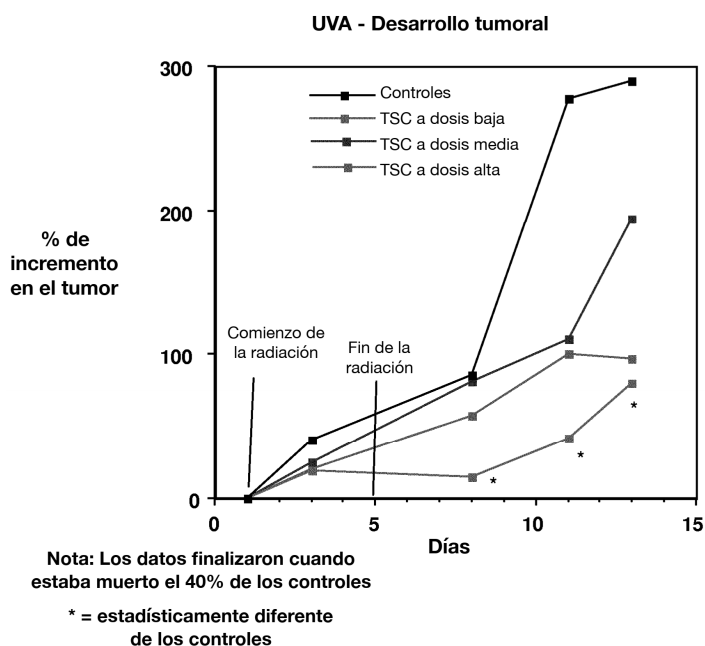
15

Denominación	N (ratones macho atímicos)	Dosis	Radioterapia
Grupo 1	Cinco (5)	Dosis A de TSC	Sí
Grupo 2	Cinco (5)	Dosis B de TSC	Sí
Grupo 3	Cinco (5)	Dosis C de TSC	Sí
Grupo 4	Cinco (5)	Control de solución salina	Sí
Grupo 5	Cinco (5)	Dosis B de TSC	No
Grupo 6	Cinco (5)	Control de solución salina	No

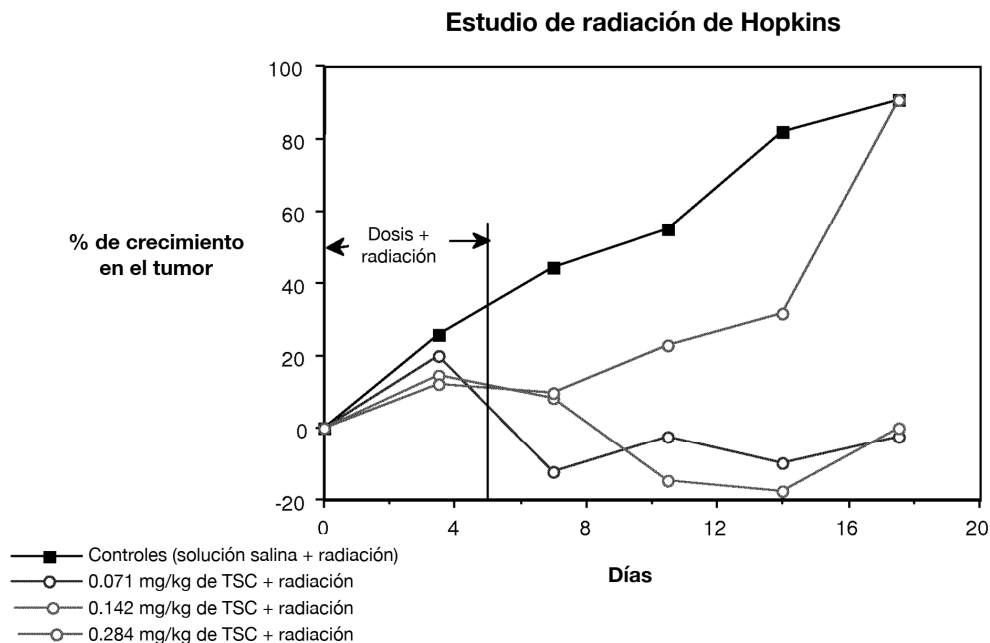
Al grupo 4 se le inyectó un control de solución salina. Transcurridos 45 min desde la inyección en cada uno de los cinco días sucesivos, los tumores de los grupos de estudio 1 a 4 recibieron 2 Gy de radiación. El grupo de estudio 5 recibió solo TSC y el grupo de estudio 6 recibió solo solución salina, y ni el grupo de estudio 5 ni el 6 recibieron radiación. El volumen tumoral de todos los grupos de estudio se midió cada semana durante las 4 primeras semanas o hasta que el tumor alcanzara 4 veces el volumen en el comienzo del tratamiento. Los resultados para estas pruebas se muestran a continuación:

20

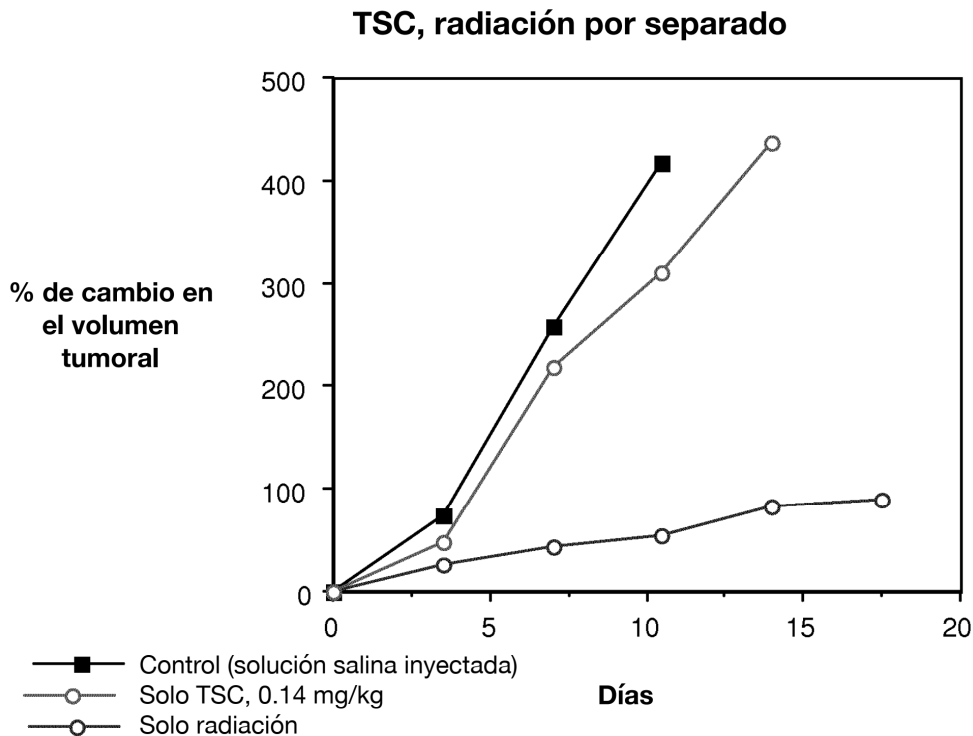
Resultados del estudio A:



Resultados del estudio B:



5 La dosis óptima para el estudio A fue de 0,18 mg/kg y para el estudio B, las dosis de 0,07 y 0,14 mg/kg funcionaron igualmente bien. También se estudió la monoterapia de TSC. Esos resultados se muestran más adelante, junto con el efecto de monoterapia de radiación (que también se muestra en el gráfico de más arriba). Se puede observar que la monoterapia con TSC no afecta de manera apreciable al desarrollo tumoral.



10 Resultará claramente obvio para los expertos en la técnica que se pueden realizar numerosas modificaciones y adiciones tanto en los presentes compuestos y composiciones como en los métodos relacionados, sin alejarse de la invención descrita.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende

(i) una sal de carotenoide *trans* bipolar que tiene la fórmula:



5 en donde:

Y = un catión que puede ser igual o diferente,

Z = un grupo polar que puede ser igual o diferente y que está asociado al catión, y

10 TCRO = un esqueleto de carotenoide *trans* lineal con enlaces carbono-carbono dobles y simples conjugados, y que tienen grupos colgantes X, en donde los grupos colgantes X, que pueden ser iguales o diferentes, son un grupo de hidrocarburo lineal o ramificado que tiene 10 átomos de carbono o menos, o un halógeno, y

(ii) una ciclodextrina; y

15 en donde la sal de carotenoide *trans* bipolar es el crocetinato *trans* de sodio (TSC), y en donde la absorbancia de la sal de carotenoide *trans* bipolar en la solución acuosa del pico más alto que se produce en el espectro de longitud de onda visible dividido por la absorbancia del pico que se produce en el ultravioleta es mayor de 7,

para ser usado en tratamientos, optativamente para ser usado en el tratamiento de un tumor en un mamífero en combinación con radioterapia o quimioterapia.

20 2. La composición para ser usada según la reivindicación 1, en donde la composición es para ser usada en el tratamiento de un tumor en un mamífero en combinación con radioterapia o quimioterapia, optativamente en donde dicha sal de carotenoide *trans* bipolar se administra antes, durante o después de la administración de dicha radioterapia o quimioterapia a dicho tumor.

3. La composición para ser usada según la reivindicación 1 o 2, en donde la ciclodextrina se selecciona del grupo que consiste en  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina, 2-hidroxiilpropil- $\beta$ -ciclodextrina, 2-hidroxiilpropil- $\gamma$ -ciclodextrina y  $\gamma$ -ciclodextrina.

25 4. La composición para ser usada según la reivindicación 3, en donde la ciclodextrina es la  $\gamma$ -ciclodextrina.

5. La composición para ser usada según la reivindicación 3, en donde la ciclodextrina es la  $\alpha$ -ciclodextrina.

6. La composición para ser usada según la reivindicación 3, en donde la ciclodextrina es la  $\beta$ -ciclodextrina.

7. La composición para ser usada según la reivindicación 3, en donde la ciclodextrina es la 2-hidroxiilpropil- $\beta$ -ciclodextrina.

30 8. La composición para ser usada según la reivindicación 1 o 2 que además comprende manitol.

9. La composición para ser usada según la reivindicación 1 o 2 que además comprende solución salina.

10. La composición para ser usada según la reivindicación 1 o 2 que además comprende un compuesto para regular el pH.

35 11. La composición para ser usada según la reivindicación 10, en donde dicho compuesto para regular el pH se selecciona del grupo que consiste en ácido acético, ácido cítrico, bicarbonato o glicina.

12. La composición para ser usada según la reivindicación 1 o 2, en donde dicha composición está liofilizada.

13. La composición para ser usada según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en donde la radioterapia se da a una dosis de aproximadamente 6000 a 6500 cGy a lo largo de varias semanas.

40 14. La composición para ser usada según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en donde el tumor se selecciona del grupo que consiste en glioblastomas, carcinomas de células epidermoides, melanomas, linfomas, sarcomas, sarcoides, osteosarcomas, tumores asociados al cáncer de piel, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer ginecológico, cáncer urológico y genital masculino, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de hueso, cánceres de las glándulas endocrinas, cánceres del canal alimentario, cánceres de las principales glándulas/órganos digestivos, cáncer del SNC, y cáncer de pulmón.

45 15. La composición para ser usada según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en donde el tumor es un tumor cerebral.

16. La composición para ser usada según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en donde el TSC se administra de 0,02 a 2 mg/kg antes de dicha radioterapia o quimioterapia.
17. La composición para ser usada según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en donde el mamífero es un humano.
- 5 18. La composición para ser usada según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en donde el tumor es cáncer de páncreas.