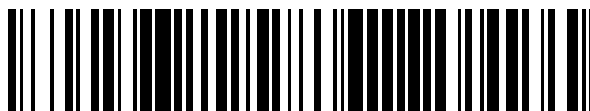


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 387**

51 Int. Cl.:

C07C 215/10 (2006.01)

C07C 229/26 (2006.01)

C07C 241/04 (2006.01)

C07C 59/42 (2006.01)

C07D 295/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2014 PCT/IB2014/003027**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015 WO15071766**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2014 E 14843234 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 3068757**

54 Título: **Sal de lisina de ácido 15-hidroxi-8(Z),11(Z),13(E)-eicosatrienoico**

30 Prioridad:

15.11.2013 US 201361904600 P

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

15.10.2019

73 Titular/es:

**DS BIOPHARMA LIMITED (100.0%)
Trintech Building, South County Business Park,
Leopardstown
Dublin, 18, IE**

72 Inventor/es:

**MANKU, MEHAR;
COUGHLAN, DAVID y
DOWNES, BILL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 727 387 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

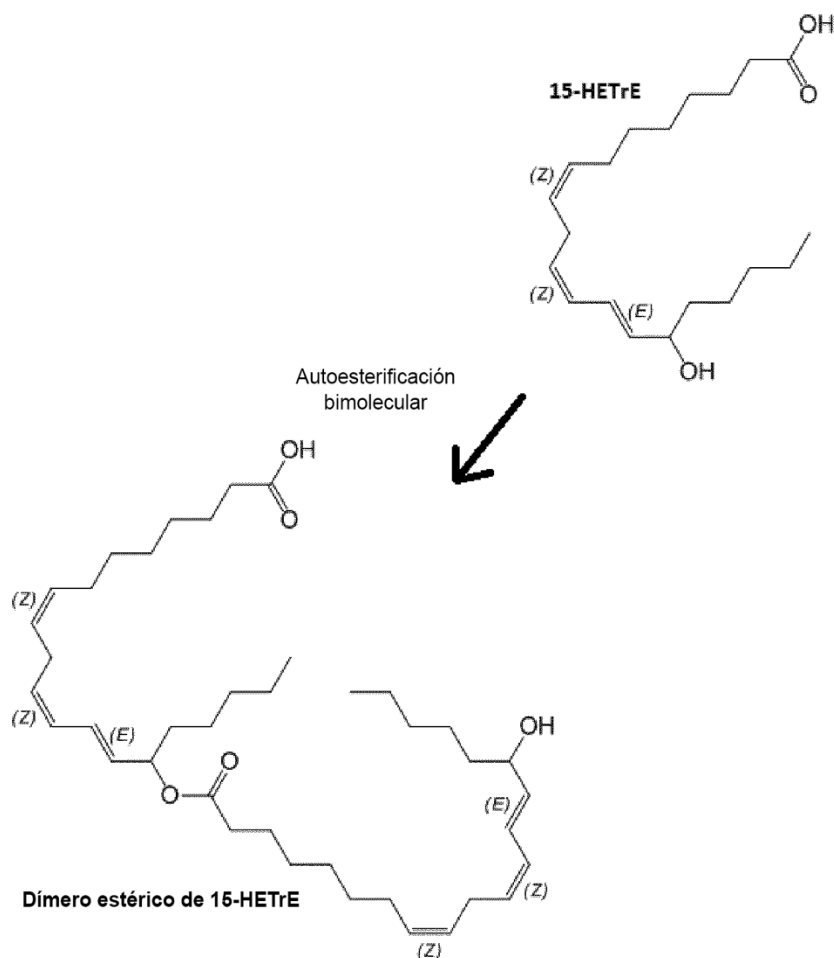
Sal de lisina de ácido 15-hidroxi-8(Z),11(Z),13(E)-eicosatrienoico

Campo

- 5 La presente divulgación versa en general sobre formas de sal estables farmacéuticamente aceptables de productos de 15-lipoxigenasa.

Antecedentes

- Las enzimas son catalizadores muy selectivos, que aceleran enormemente tanto la velocidad como la especificidad de las reacciones bioquímicas. En las reacciones enzimáticas, las moléculas al inicio del proceso, denominadas sustratos, son convertidas en moléculas diferentes, denominadas productos.
- 10 Las lipoxigenasas son enzimas que catalizan la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. La 15-lipoxigenasa (15-LOX) es una enzima de ese tipo que cataliza la oxidación de sustratos tales como ácido linolénico, ácido dihomo-gamma linolénico, ácido eicosapentaenoico y ácido araquidónico generando sus respectivos productos, 13-HODE, 15-HETrE, 15-OHEPA y 15-HETE.
- 15 La 15-LOX es responsable de la conversión del ácido araquidónico en diversos metabolitos biológicamente activos, incluyendo el ácido 15-hidroxi-5,8,11,13-eicosatetraenoico (15-HETE). Se ha implicado al 15-HETE en la patogénesis de enfermedades de las vías aéreas y alérgicas tales como el asma al contribuir a la broncoconstricción, a la secreción de moco y a la migración de eosinófilos. Aunque se el 15-HETE ha estado implicado en reacciones proinflamatorias, se ha demostrado que otros productos de la 15-LOX, tales como 15-OHEPA, 15-HETrE y 13-HODE, tienen efectos antiinflamatorios y pueden ser médicamente útiles.
- 20 Ejemplos de indicaciones potenciales médicamente útiles para los productos de 15-LOX incluyen, sin limitación, la terapia del acné (patente estadounidense 8.293.790), terapia del eritema (publicación de solicitud de patente estadounidense 2013/0101533), antimicrobianos (publicación de solicitud de patente estadounidense 2012/0264705), terapia del hígado graso (GB1300628.3), terapia de la neuropatía (WO2010/125330A1) y tratamiento de la inflamación de la piel (patente estadounidense 8.536.223).
- 25 El documento WO 2010/125330 A1 describe sales farmacéuticamente aceptables de diferentes ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). En realizaciones preferentes, el PUFA es 15-HETrE o 13-HODE.
- 30 Los productos del metabolismo de la 15-LOX son inestables a temperatura ambiente y precisan ser almacenados a temperaturas de -20°C o inferiores. Debido a esta inestabilidad, los productos de 15-LOX no han sido formulados para un uso médico. Según se muestra posteriormente, un problema de estos compuestos es la tendencia a que el grupo hidroxilo derivado de la 15-LOX forme dímeros de ácido graso formando enlaces de éster con el grupo carboxilo del ácido graso.



Debido a su inestabilidad y a la formación de dímeros, su potencial de ser desarrollados como medicina ha sido un reto. En el presente documento se describen formas estables farmacéuticamente aceptables de productos de 15-LOX.

Compendio

5 La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden sales de lisina estables farmacéuticamente útiles del ácido graso 15-lipoxigenasa, el ácido 15-hidroxi-8(Z), 11(Z), 13(E)-eicosatrienoico (15-HETrE).

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden tal composición de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo de 15-HETrE.

10 La FIG. 2 muestra el termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de 15-HETrE de -70°C a 200°C a una velocidad de 10°C/min.

La FIG. 3 muestra el termograma de calorimetría hiperdiferencial de barrido (híper DSC) de 15-HETrE de -75°C a 150°C a una velocidad de 200°C/min.

La FIG. 4 muestra el espectro de RMN protónica de HETrE en d₄-metanol a 500 MHz.

15 La FIG. 5 muestra el espectro FT-IR de 15-HETrE.

La FIG. 6 muestra una comparación de los patrones de difracción de rayos X en polvo de 15-HETrE en forma de ácido libre (panel superior) con carbonato ácido de sodio (panel central) y sal sódica de 15-HETrE (panel inferior).

La FIG. 7 muestra una comparación de los espectros de RMN protónica de 15-HETrE en forma de ácido libre (espectro superior) y sal sódica de 15-HETrE (espectro inferior).

20 La FIG. 8 muestra el espectro de FT-IR de la sal sódica de 15-HETrE.

- La FIG. 9 muestra el termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la sal sódica de 15-HETrE.
- La FIG. 10 muestra una comparación de los patrones de difracción de rayos X en polvo de ácido libre de 15-HETrE (panel superior), lisina preparada mediante craqueo de la sal (segundo panel hacia abajo), monohidrato de lisina (tercer panel hacia abajo), y sal de lisina de 15-HETrE (panel inferior).
- 5 La FIG. 11 muestra una comparación de los espectros de RMN protónica para la lisina (espectro superior), el ácido libre de 15-HETrE (espectro central) y la sal de lisina de 15-HETrE (espectro inferior).
- La FIG. 12 muestra el espectro FT-IR de la sal de lisina de 15-HETrE.
- La FIG. 13 muestra el termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la sal de lisina de 15-HETrE.
- 10 La FIG. 14 muestra una comparación de los patrones de difracción de rayos X en polvo del ácido libre de 15-HETrE (panel superior), ornitina preparada mediante craqueo de la sal (panel central), y sal de ornitina de 15-HETrE (panel inferior).
- La FIG. 15 muestra una comparación de los espectros de RMN protónica para la ornitina (espectro superior), el ácido libre de 15-HETrE (espectro central) y la sal de ornitina de 15-HETrE (espectro inferior).
- La FIG. 16 muestra el espectro FT-IR de la sal de ornitina de 15-HETrE.
- 15 La FIG. 17 muestra el termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la sal de ornitina de 15-HETrE de 30°C a 300°C a una velocidad de 10°C/min.
- La FIG. 18 muestra una comparación de los patrones de difracción de rayos X en polvo del ácido libre de 15-HETrE (panel superior), piperazina (panel central), y sal de piperazina de 15-HETrE (panel inferior).
- 20 La FIG. 19 muestra una comparación de los espectros de RMN protónica para el ácido libre de 15-HETrE (espectro superior) y la sal de piperazina de 15-HETrE (espectro inferior).
- Las FIGURAS 20A-H muestran imágenes de 10 aumentos de sal de lisina de 15-HETrE con placa roja de primer orden (FIG. 20A) y con luz transversal polarizada (FIG. 20B), de sal sódica de 15-HETrE con placa roja de primer orden (FIG. 20C) y con luz transversal polarizada (FIG. 20D), de sal de ornitina de 15-HETrE con placa roja de primer orden (FIG. 20E) y con luz transversal polarizada (FIG. 20F), y de sal de piperazina de 15-HETrE con placa roja de primer orden (FIG. 20G) y con luz transversal polarizada (FIG. 20H).
- 25 La FIG. 21 muestra una comparación de los patrones de difracción de rayos X en polvo para la sal de lisina de 15-HETrE antes (panel superior) y después (panel inferior) del análisis de absorción dinámica de vapor (DVS).
- La FIG. 22 muestra el espectro de RMN protónica de la sal de lisina de 15-HETrE en d₄-metanol.
- 30 La FIG. 23 muestra un termograma termogravimétrico/de análisis térmico diferencial ("TG/DTA") de la sal de lisina de 15-HETrE.
- La FIG. 24 muestra el termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la sal de lisina de 15-HETrE de 30°C a 300°C a una velocidad de 10°C/min.
- Las FIGURAS 25A-D muestran imágenes de microscopía de platina caliente de sal de lisina de 15-HETrE a 30°C (FIG. 25A), a 120°C (FIG. 25B), a 200°C (FIG. 25C), y a temperatura ambiente después de la fusión (FIG. 25D).
- 35 La FIG. 26 muestra la isoterma de absorción dinámica de vapor (DVS) de la sal de lisina de 15-HETrE.
- La FIG. 27 muestra el espectro FT-IR de la sal de lisina de 15-HETrE.
- La FIG. 28 muestra la estabilidad del ácido libre de 15-HETrE ("15-HETrE FFA") cuando se lo almacena durante hasta 24 semanas a -20°C, a 2-8°C, y a 25°C, y de la sal de lisina de 15-HETrE cuando se la almacena con sobrecapa bajo gas nitrógeno a 40°C y un 75% de HR ("sal de lisina de 15-HETrE 40/75") y a 20°C y un 60% de HR ("sal de lisina de 15-HETrE 20/60").
- 40 La FIG. 29 muestra una comparación de los patrones de difracción de rayos X en polvo para sólidos aislados de 15-HETrE y meglumina (panel superior) y meglumina (panel inferior).
- La FIG. 30 muestra el espectro de RMN protónica de sólidos aislados de 15-HETrE y meglumina.
- 45 Las FIGURAS 31A-B muestran fotomicrografías de 10 aumentos de sal de meglumina de 15-HETrE capturada con placa roja de primer orden (FIG. 31A) y con luz transversal polarizada (FIG. 31B).

Descripción detallada

El 13-HODE se forma por la acción de la 15-LOX sobre el ácido linoleico. El ácido linoleico se oxida formando ácido 13-hidroperoxioctadeca-9Z,11E-dienoico (13-HODE). Según se lo usa en la presente memoria, el término "13-HODE" se refiere al 13-HODE en su forma de ácido libre.

- 5 El ácido 15-hidroxi-eicosa-8(Z),11(Z),13(E)-trienoico ("15-HETrE" o "HETrE") es un derivado de 15-LOX del ácido dihomo-gamma linolénico (DGLA). El 15-HETrE puede ser sintetizado a partir del DGLA según métodos de la técnica. Según se lo usa en la presente memoria, el término "15-HETrE" se refiere al 15-HETrE en su forma de ácido libre (por ejemplo, ácido 15-hidroxi-eicosa-8(Z),11(Z),13(E)-trienoico).

- 10 El ácido 15-hidroxi-eicosa-5(Z),8(Z),11(Z),13(E),17(Z)-pentaenoico ("15-OHEPA") es un derivado de 15-LOX de EPA. El 15-OHEPA puede ser sintetizado a partir del EPA según métodos conocidos de la técnica. Según se lo usa en la presente memoria, el término "15-OHEPA" se refiere al 15-OHEPA en su forma de ácido libre (por ejemplo, ácido 15-hidroxi-eicosa-5,8,11,13,17-pentaenoico).

- 15 Según se la usa en la presente memoria, la expresión "farmacéuticamente útil" se refiere a compuestos y/o composiciones que son química y físicamente compatibles (por ejemplo, sustancialmente miscibles y/o no reactivas) con otros componentes farmacéuticos, o a composiciones farmacéuticas que son generalmente estables en condiciones comunes de almacenamiento (por ejemplo, a temperatura ambiente o refrigeradas) durante un lapso de tiempo suficiente para proporcionar una vida útil comercialmente viable.

En la presente memoria se divulgan composiciones farmacéuticas, por ejemplo composiciones distribuibles de forma tópica, que comprenden uno o más de 13-HODE, 15-OHEPA, 15-HETrE o mezclas de los mismos.

- 20 Las composiciones farmacéuticas tópicas pueden comprender, por ejemplo, una cantidad (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz) de una forma salida de 13-HODE, 15-OHEPA, 15-HETrE o una combinación de los mismos. La composición farmacéutica puede comprender aproximadamente 0,1% en peso a aproximadamente 20% en peso de 13-HODE, 15-OHEPA, 15-HETrE, o una combinación de los mismos, por ejemplo aproximadamente 0,1% en peso, aproximadamente 0,2% en peso, aproximadamente 0,3% en peso, aproximadamente 0,4% en peso, aproximadamente 0,5% en peso, aproximadamente 0,6% en peso, aproximadamente 0,7% en peso, aproximadamente 0,8% en peso, aproximadamente 0,9% en peso, aproximadamente 1% en peso, aproximadamente 1,1% en peso, aproximadamente 1,2% en peso, aproximadamente 1,3% en peso, aproximadamente 1,4% en peso, aproximadamente 1,5% en peso, aproximadamente 1,6% en peso, aproximadamente 1,7% en peso, aproximadamente 1,8% en peso, aproximadamente 1,9% en peso, aproximadamente 2% en peso, aproximadamente 2,1% en peso, aproximadamente 2,2% en peso, aproximadamente 2,3% en peso, aproximadamente 2,4% en peso, aproximadamente 2,5% en peso, aproximadamente 2,6% en peso, aproximadamente 2,7% en peso, aproximadamente 2,8% en peso, aproximadamente 2,9% en peso, aproximadamente 3% en peso, aproximadamente 3,1% en peso, aproximadamente 3,2% en peso, aproximadamente 3,3% en peso, aproximadamente 3,4% en peso, aproximadamente 3,5% en peso, aproximadamente 3,6% en peso, aproximadamente 3,7% en peso, aproximadamente 3,8% en peso, aproximadamente 3,9% en peso, aproximadamente 4% en peso, aproximadamente 4,1% en peso, aproximadamente 4,2% en peso, aproximadamente 4,3% en peso, aproximadamente 4,4% en peso, aproximadamente 4,5% en peso, aproximadamente 4,6% en peso, aproximadamente 4,7% en peso, aproximadamente 4,8% en peso, aproximadamente 4,9% en peso, aproximadamente 5% en peso, aproximadamente 5,1% en peso, aproximadamente 5,2% en peso, aproximadamente 5,3% en peso, aproximadamente 5,4% en peso, aproximadamente 5,5% en peso, aproximadamente 5,6% en peso, aproximadamente 5,7% en peso, aproximadamente 5,8% en peso, aproximadamente 5,9% en peso, aproximadamente 6% en peso, aproximadamente 6,1% en peso, aproximadamente 6,2% en peso, aproximadamente 6,3% en peso, aproximadamente 6,4% en peso, aproximadamente 6,5% en peso, aproximadamente 6,6% en peso, aproximadamente 6,7% en peso, aproximadamente 6,8% en peso, aproximadamente 6,9% en peso, aproximadamente 7% en peso, aproximadamente 7,1% en peso, aproximadamente 7,2% en peso, aproximadamente 7,3% en peso, aproximadamente 7,4% en peso, aproximadamente 7,5% en peso, aproximadamente 7,6% en peso, aproximadamente 7,7% en peso, aproximadamente 7,8% en peso, aproximadamente 7,9% en peso, aproximadamente 8% en peso, aproximadamente 8,1% en peso, aproximadamente 8,2% en peso, aproximadamente 8,3% en peso, aproximadamente 8,4% en peso, aproximadamente 8,5% en peso, aproximadamente 8,6% en peso, aproximadamente 8,7% en peso, aproximadamente 8,8% en peso, aproximadamente 8,9% en peso, aproximadamente 9% en peso, aproximadamente 9,1% en peso, aproximadamente 9,2% en peso, aproximadamente 9,3% en peso, aproximadamente 9,4% en peso, aproximadamente 9,5% en peso, aproximadamente 9,6% en peso, aproximadamente 9,7% en peso, aproximadamente 9,8% en peso, aproximadamente 9,9% en peso, aproximadamente 10% en peso, aproximadamente 10,1% en peso, aproximadamente 10,2% en peso, aproximadamente 10,3% en peso, aproximadamente 10,4% en peso, aproximadamente 10,5% en peso, aproximadamente 10,6% en peso, aproximadamente 10,7% en peso, aproximadamente 10,8% en peso, aproximadamente 10,9% en peso, aproximadamente 11% en peso, aproximadamente 11,1% en peso, aproximadamente 11,2% en peso, aproximadamente 11,3% en peso, aproximadamente 11,4% en peso, aproximadamente 11,5% en peso, aproximadamente 11,6% en peso, aproximadamente 11,7% en peso, aproximadamente 11,8% en peso, aproximadamente 11,9% en peso, aproximadamente 12% en peso, aproximadamente 12,1% en peso, aproximadamente 12,2% en peso,

aproximadamente 12,3% en peso, aproximadamente 12,4% en peso, aproximadamente 12,5% en peso,
 aproximadamente 12,6% en peso, aproximadamente 12,7% en peso, aproximadamente 12,8% en peso,
 aproximadamente 12,9% en peso, aproximadamente 13% en peso, aproximadamente 13,1% en peso,
 5 aproximadamente 13,2% en peso, aproximadamente 13,3% en peso, aproximadamente 13,4% en peso,
 aproximadamente 13,5% en peso, aproximadamente 13,6% en peso, aproximadamente 13,7% en peso,
 aproximadamente 13,8% en peso, aproximadamente 13,9% en peso, aproximadamente 14% en peso,
 aproximadamente 14,1% en peso, aproximadamente 14,2% en peso, aproximadamente 14,3% en peso,
 aproximadamente 14,4% en peso, aproximadamente 14,5% en peso, aproximadamente 14,6% en peso,
 10 aproximadamente 14,7% en peso, aproximadamente 14,8% en peso, aproximadamente 14,9% en peso,
 aproximadamente 15% en peso, aproximadamente 15,1% en peso, aproximadamente 15,2% en peso,
 aproximadamente 15,3% en peso, aproximadamente 15,4% en peso, aproximadamente 15,5% en peso,
 aproximadamente 15,6% en peso, aproximadamente 15,7% en peso, aproximadamente 15,8% en peso,
 aproximadamente 15,9% en peso, aproximadamente 16% en peso, aproximadamente 16,1% en peso,
 15 aproximadamente 16,2% en peso, aproximadamente 16,3% en peso, aproximadamente 16,4% en peso,
 aproximadamente 16,5% en peso, aproximadamente 16,6% en peso, aproximadamente 16,7% en peso,
 aproximadamente 16,8% en peso, aproximadamente 16,9% en peso, aproximadamente 17% en peso,
 aproximadamente 17,1% en peso, aproximadamente 17,2% en peso, aproximadamente 17,3% en peso,
 aproximadamente 17,4% en peso, aproximadamente 17,5% en peso, aproximadamente 17,6% en peso,
 20 aproximadamente 17,7% en peso, aproximadamente 17,8% en peso, aproximadamente 17,9% en peso,
 aproximadamente 18% en peso, aproximadamente 18,1% en peso, aproximadamente 18,2% en peso,
 aproximadamente 18,3% en peso, aproximadamente 18,4% en peso, aproximadamente 18,5% en peso,
 aproximadamente 18,6% en peso, aproximadamente 18,7% en peso, aproximadamente 18,8% en peso,
 aproximadamente 18,9% en peso, aproximadamente 19% en peso, aproximadamente 19,1% en peso,
 25 aproximadamente 19,2% en peso, aproximadamente 19,3% en peso, aproximadamente 19,4% en peso,
 aproximadamente 19,5% en peso, aproximadamente 19,6% en peso, aproximadamente 19,7% en peso,
 aproximadamente 19,8% en peso, aproximadamente 19,9% en peso, o aproximadamente 20% en peso de 13-HODE,
 15-OHEPA, 15-HETrE, o una combinación de los mismos.

En las composiciones farmacéuticas según la presente divulgación puede usarse cualquier excipiente
 30 farmacéuticamente aceptable conocido a los expertos en la técnica. Cualquier excipiente seleccionado para ser usado
 en composiciones terapéuticas y cosméticas debería ser farmacéutica y/o cosméticamente aceptable y apropiado para
 la forma en la que se usará la composición terapéutica; por ejemplo, crema, gel, leche, aceite, loción y similares.
 Preferentemente, el excipiente tiene afinidad por la piel, es bien tolerado y estable cuando se usa en una cantidad
 adecuada para proporcionar la consistencia deseada y facilidad de aplicación. A título de ejemplo únicamente, una
 35 composición farmacéutica según la presente divulgación puede comprender uno o más de: tensioactivos,
 conservantes, aromatizantes, codisolventes, adyuvantes de viscosidad, adyuvantes de suspensión y fases lipófilas.

Una composición farmacéutica de la invención comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una sal de lisina
 de 15-HETrE. La forma salina de 15-HETrE puede ser el único ingrediente activo significativo en esa composición y
 en los métodos y los usos indicados en la presente memoria. La forma salina de 15-HETrE puede ser el único
 40 ingrediente activo. Alternativamente, la forma salina de 15-HETrE puede ser combinada para su coformulación o
 coadministración con otros agentes para tratar una enfermedad o un trastorno. Si ha de usarse un agente activo
 adicional, la forma salina de 15-HETrE puede ser coformulada como una sola unidad de dosificación o puede ser
 formulada como de dos a varias unidades de dosificación para una administración coordinada, combinada o
 concomitante.

En diversas realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas —por ejemplo, composiciones
 45 administrables oralmente— que comprenden la forma salina de 15-HETrE. En una realización, las composiciones
 comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de la forma salina de 15-HETrE. En una realización, la composición
 farmacéutica comprende aproximadamente 0,1% a aproximadamente 99,9%, aproximadamente 1% a
 aproximadamente 95%, o aproximadamente 5% a aproximadamente 90% en peso de la forma salina de 15-HETrE,
 50 por ejemplo, aproximadamente 1%, aproximadamente 2%, aproximadamente 3%, aproximadamente 4%,
 aproximadamente 5%, aproximadamente 6%, aproximadamente 7%, aproximadamente 8%, aproximadamente 9%,
 aproximadamente 10%, aproximadamente 11%, aproximadamente 12%, aproximadamente 13%, aproximadamente
 14%, aproximadamente 15%, aproximadamente 16%, aproximadamente 17%, aproximadamente 18%,
 aproximadamente 19%, aproximadamente 20%, aproximadamente 21%, aproximadamente 22%, aproximadamente
 23%, aproximadamente 24%, aproximadamente 25%, aproximadamente 26%, aproximadamente 27%,
 55 aproximadamente 28%, aproximadamente 29%, aproximadamente 30%, aproximadamente 31%, aproximadamente
 32%, aproximadamente 33%, aproximadamente 34%, aproximadamente 35%, aproximadamente 36%,
 aproximadamente 37%, aproximadamente 38%, aproximadamente 39%, aproximadamente 40%, aproximadamente
 41%, aproximadamente 42%, aproximadamente 43%, aproximadamente 44%, aproximadamente 45%,
 60 aproximadamente 46%, aproximadamente 47%, aproximadamente 48%, aproximadamente 49%, aproximadamente
 50%, aproximadamente 51%, aproximadamente 52%, aproximadamente 53%, aproximadamente 54%,
 aproximadamente 55%, aproximadamente 56%, aproximadamente 57%, aproximadamente 58%, aproximadamente
 59%, aproximadamente 60%, aproximadamente 61%, aproximadamente 62%, aproximadamente 63%,
 aproximadamente 64%, aproximadamente 65%, aproximadamente 66%, aproximadamente 67%, aproximadamente

5 68%, aproximadamente 69%, aproximadamente 70%, aproximadamente 71%, aproximadamente 72%, aproximadamente 73%, aproximadamente 74%, aproximadamente 75%, aproximadamente 76%, aproximadamente 77%, aproximadamente 78%, aproximadamente 79%, aproximadamente 80%, aproximadamente 81%, aproximadamente 82%, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, aproximadamente 99,5%, o aproximadamente 99,9% en peso de la forma salina de 15-HETrE.

10 En una realización, la composición farmacéutica comprende aproximadamente al menos aproximadamente 70%, %, al menos aproximadamente 71%, al menos aproximadamente 72%, al menos aproximadamente 73%, al menos aproximadamente 74%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 76%, al menos aproximadamente 77%, al menos aproximadamente 78%, al menos aproximadamente 79%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 81%, al menos aproximadamente 82%, al menos aproximadamente 83%, al menos aproximadamente 84%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 86%, al menos aproximadamente 87%, al menos aproximadamente 88%, al menos aproximadamente 89%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 99,5%, o aproximadamente 99,9%, en peso, de la forma salina de 15-HETrE.

En una realización, la composición farmacéutica comprende al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80% o al menos aproximadamente 90% en peso de la forma salina de 15-HETrE.

25 En otra realización, la forma salina de 15-HETrE está presente en una composición de la invención en una cantidad de aproximadamente 1mg a aproximadamente 10.000 mg, aproximadamente 25 mg a aproximadamente 7500 mg, aproximadamente 25 mg a aproximadamente 5000 mg, aproximadamente 50 mg a aproximadamente 5000 mg, aproximadamente 50 mg a aproximadamente 3000 mg, aproximadamente 75 mg a aproximadamente 2500 mg, o aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1000 mg, por ejemplo, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 7 mg, aproximadamente 8 mg, aproximadamente 9 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 11 mg, aproximadamente 12 mg, aproximadamente 13 mg, aproximadamente 14 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 16 mg, aproximadamente 17 mg, aproximadamente 18 mg, aproximadamente 19 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 21 mg, aproximadamente 22 mg, aproximadamente 23 mg, aproximadamente 24 mg, aproximadamente 25mg, aproximadamente 50mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 125 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 175 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 225 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 275 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 325 mg, aproximadamente 350 mg, aproximadamente 375 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 425 mg, aproximadamente 450 mg, aproximadamente 475 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 525 mg, aproximadamente 550 mg, aproximadamente 575 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 625 mg, aproximadamente 650 mg, aproximadamente 675 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 725 mg, aproximadamente 750 mg, aproximadamente 775 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 825 mg, aproximadamente 850 mg, aproximadamente 875 mg, aproximadamente 900 mg, aproximadamente 925 mg, aproximadamente 950 mg, aproximadamente 975 mg, aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 1025 mg, aproximadamente 1050 mg, aproximadamente 1075 mg, aproximadamente 1100 mg, aproximadamente 1025 mg, aproximadamente 1050 mg, aproximadamente 1075 mg, aproximadamente 1200 mg, aproximadamente 1225 mg, aproximadamente 1250 mg, aproximadamente 1275 mg, aproximadamente 1300 mg, aproximadamente 1325 mg, aproximadamente 1350 mg, aproximadamente 1375 mg, aproximadamente 1400 mg, aproximadamente 1425 mg, aproximadamente 1450 mg, aproximadamente 1475 mg, aproximadamente 1500 mg, aproximadamente 1525 mg, aproximadamente 1550 mg, aproximadamente 1575 mg, aproximadamente 1600 mg, aproximadamente 1625 mg, aproximadamente 1650 mg, aproximadamente 1675 mg, aproximadamente 1700 mg, aproximadamente 1725 mg, aproximadamente 1750 mg, aproximadamente 1775 mg, aproximadamente 1800 mg, aproximadamente 1825 mg, aproximadamente 1850 mg, aproximadamente 1875 mg, aproximadamente 1900 mg, aproximadamente 1925 mg, aproximadamente 1950 mg, aproximadamente 1975 mg, aproximadamente 2000 mg, aproximadamente 2025 mg, aproximadamente 2050 mg, aproximadamente 2075 mg, aproximadamente 2100 mg, aproximadamente 2125 mg, aproximadamente 2150 mg, aproximadamente 2175 mg, aproximadamente 2200 mg, aproximadamente 2225 mg, aproximadamente 2250 mg, aproximadamente 2275 mg, aproximadamente 2300 mg, aproximadamente 2325 mg, aproximadamente 2350 mg, aproximadamente 2375 mg, aproximadamente 2400 mg, aproximadamente 2425 mg, aproximadamente 2450 mg, aproximadamente 2475 mg, aproximadamente 2500 mg, 2525 mg, aproximadamente 2550 mg, aproximadamente 2575 mg, aproximadamente 2600 mg, aproximadamente 2625 mg, aproximadamente 2650 mg, aproximadamente 2675 mg, aproximadamente 2700 mg, aproximadamente 2725 mg, aproximadamente 2750 mg, aproximadamente 2775 mg, aproximadamente 2800 mg, aproximadamente 2825 mg, aproximadamente 2850 mg, aproximadamente 2875 mg, aproximadamente 2900 mg, aproximadamente 2925 mg, aproximadamente 2950 mg, aproximadamente

5 9475 mg, aproximadamente 9500 mg, aproximadamente 9525 mg, aproximadamente 9550 mg, aproximadamente 9575 mg, aproximadamente 9600 mg, aproximadamente 9625 mg, aproximadamente 9650 mg, aproximadamente 9675 mg, aproximadamente 9700 mg, aproximadamente 9725 mg, aproximadamente 9750 mg, aproximadamente 9775 mg, aproximadamente 9800 mg, aproximadamente 9825 mg, aproximadamente 9850 mg, aproximadamente 9875 mg, aproximadamente 9900 mg, aproximadamente 9925 mg, aproximadamente 9950 mg, aproximadamente 9975 mg o aproximadamente 10.000 mg.

10 En una realización, la forma salina de 15-HETrE presente en una composición de la invención comprende al menos 90% en peso de la forma salina de 15-HETrE. Las composiciones que contienen la forma salina de 15-HETrE pueden comprender una pureza aún mayor; por ejemplo, al menos 91% en peso, al menos 92% en peso, al menos 93% en peso, al menos 94% en peso, al menos 95% en peso, al menos 96% en peso o al menos 97% en peso de la forma salina de 15-HETrE.

15 La presente divulgación proporciona una sal de un producto de 15-lipoxigenasa. La sal puede ser una sal farmacéuticamente aceptable. La sal puede comprender una sal de lisina del producto de 15-lipoxigenasa. La sal puede comprender una sal sódica del producto de 15-lipoxigenasa. La sal puede comprender una sal de ornitina del producto de 15-lipoxigenasa. La sal puede comprender una sal de piperazina del producto de 15-lipoxigenasa. La sal puede comprender una sal de meglumina del producto de 15-lipoxigenasa. La sal puede comprender, además, el producto de 15-lipoxigenasa en forma de ácido libre. La sal puede ser seleccionada del grupo constituido por: sodio, lisina, ornitina, piperazina, meglumina y combinaciones de los mismos. El producto de 15-lipoxigenasa puede ser seleccionado del grupo constituido por: 13-HODE, 15-HETrE, 15-OHEPA, 15-HETE y combinaciones de los mismos.

20 La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una forma de sal de lisina del ácido 15-hidroxi-eicosa-8(Z),11(Z),13(E)-trienoico. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende, además, un excipiente.

25 En algunas realizaciones, después del almacenamiento durante al menos aproximadamente 4 semanas, la composición farmacéutica comprende al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o aproximadamente 100% de la cantidad inicial de la forma salina del producto de 15-lipoxigenasa. En algunas realizaciones, después del almacenamiento durante al menos aproximadamente 10 semanas, la composición farmacéutica comprende al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o aproximadamente 100% de una cantidad inicial de la forma salina del producto de 15-lipoxigenasa. En algunas realizaciones, después del almacenamiento durante al menos aproximadamente 24 semanas, la composición farmacéutica comprende al menos aproximadamente 86%, al menos aproximadamente 87%, al menos aproximadamente 88%, al menos aproximadamente 89%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o aproximadamente 100% de una cantidad inicial de la forma salina del producto de 15-lipoxigenasa. En cualquiera de las realizaciones precedentes, la composición farmacéutica puede ser almacenada a 2-8°C, a 20°C, a 25°C, o a 40°C. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es almacenada al 60% de HR o al 75% de HR.

35 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la sal del producto de 15-lipoxigenasa. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de la forma salina del producto de 15-lipoxigenasa se encuentra entre aproximadamente 0,1% en peso y aproximadamente 20% en peso.

40 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se encuentra en una forma adecuada para su administración tópica.

45 En algunas realizaciones, la forma salina del producto de 15-lipoxigenasa es el único ingrediente activo significativo o el único ingrediente activo en la composición farmacéutica. En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende, además, un agente activo adicional.

50 En algunas realizaciones, la forma salina del producto de 15-lipoxigenasa y el agente activo adicional son coformulados como una única unidad de dosificación. En algunas realizaciones, la forma salina del producto de 15-lipoxigenasa y el agente activo adicional son formulados como al menos dos unidades de dosificación para una administración coordinada, combinada o concomitante.

55 En la presente memoria se da a conocer, además, un método terapéutico para tratar o paliar una enfermedad o un trastorno que responde a un producto de 15-LOX en un sujeto necesitado del mismo que comprende la administración a un sujeto necesitado de ello de una cantidad eficaz de una forma salina de un producto de 15-LOX dado a conocer en la presente memoria.

Los métodos de administración incluyen la administración de una cantidad eficaz de un compuesto o una composición de la invención en diferentes momentos durante el curso de la terapia o concurrentemente en una forma combinada. Los métodos divulgados incluyen todas las posologías conocidas de tratamiento terapéutico.

5 “Cantidad eficaz” significa aquella cantidad de sustancia farmacológica (es decir, formas salinas de productos de 15-LOX de la presente divulgación) que provoca la respuesta biológica deseada en un sujeto. Tal respuesta incluye el alivio de los síntomas de la enfermedad o el trastorno que se esté tratando. La cantidad eficaz de una forma salina divulgada de un producto de 15-LOX en tal método terapéutico se encuentra entre aproximadamente 0,001 mg/kg/día y aproximadamente 100 mg/kg/día, entre 0,01 mg/kg/día y aproximadamente 10 mg/kg/día, preferentemente entre aproximadamente 0,5 mg/kg/día y 5 mg/kg/día.

10 En la presente memoria se da a conocer el uso de una forma salina divulgada de un producto de 15-LOX para la preparación de una composición para tratar o paliar un trastorno crónico o una enfermedad o una infección en un sujeto necesitado de la misma, comprendiendo la composición una mezcla de una o más de las formas salinas divulgadas de un producto de 15-LOX y un vehículo opcional farmacéuticamente aceptable.

15 “Vehículo farmacéuticamente aceptable” significa compuestos o composiciones que son de suficiente pureza y calidad para su uso en las formulaciones de una composición de la presente divulgación que, cuando son debidamente administrados a un animal o un ser humano, no producen una reacción adversa, y que son usados como un vehículo para una sustancia farmacológica (es decir, formas salinas de un producto de 15-LOX de la presente divulgación). “Vehículo farmacéuticamente aceptable” también incluirá un material que (i) es compatible con los demás ingredientes de la composición sin volver la composición inadecuada para su fin previsto, y (ii) es adecuado para su uso con sujetos según se proporciona en la presente memoria sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación y respuesta alérgica). Los efectos secundarios son “indebidos” cuando su riesgo es mayor que el beneficio proporcionado por la composición. Ejemplos no limitantes de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar, tales como soluciones salinas con tapón fosfato, suero fisiológico isotónico estéril, agua y emulsiones tal como, por ejemplo, emulsiones y microemulsiones de aceite/agua.

25 “Diluyente farmacéuticamente aceptable” significa compuestos y composiciones que son de suficiente pureza y calidad para ser usados en la formulación de una composición de la presente divulgación que, cuando son debidamente administrados a un animal o a un ser humano, no producen una reacción adversa y que son usados como diluyente para una sustancia farmacológica (es decir, formas salinas de un producto de 15-LOX de la presente divulgación).

30 En consecuencia, en algunas realizaciones la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de una enfermedad o un trastorno en un sujeto necesitado del mismo, comprendiendo el método la administración al sujeto de una composición farmacéutica divulgada en la presente memoria. En algunas realizaciones, la enfermedad o el trastorno se selecciona del grupo constituido por: acné, eritema, infección, hígado graso, neuropatía e inflamación de la piel. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es administrada a un sujeto en una cantidad suficiente para proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de la forma salina del producto de 15-lipoxigenasa. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz se encuentra entre aproximadamente 0,001 mg/kg/día y aproximadamente 100 mg/kg/día.

35 La presente divulgación incluye un método de creación del compuesto de 15-LOX (por ejemplo, 13-HODE, 15-HETrE o 15-OHEPA). El método puede comprender la puesta en contacto del correspondiente compuesto precursor de 15-LOX (por ejemplo, ácido linoleico, DGLA o EPA) con lipoxigenasa (por ejemplo, una composición que comprenda lipoxigenasa) en presencia de oxígeno. El oxígeno puede estar presente a una presión mayor que la presión atmosférica (por ejemplo, 200-300 kPa (2-3 bar)), opcionalmente en presencia de un agente reductor (por ejemplo, cisteína) para formar el compuesto de 15-LOX. Puede llevarse a cabo una etapa de formación de la sal que comprende la mezcla de un agente de formación de sal y el compuesto de 15-LOX. La etapa de formación de sal puede llevarse a cabo en condiciones libres de oxígeno o sustancialmente libres de oxígeno. La etapa de formación de sal puede llevarse a cabo en el mismo recipiente, o uno diferente, que la etapa de puesta en contacto del compuesto precursor de 15-LOX con la lipoxigenasa. El método puede comprender, además, el filtrado de la sal resultante del compuesto de 15-LOX. A veces, el método no incluye la purificación cromatográfica de la sal del compuesto de 15-LOX.

40 El método puede comprender la puesta en contacto de DGLA con un exceso estequiométrico de lipoxigenasa bajo una capa de oxígeno a presión (por ejemplo, a aproximadamente 200 kPa (2 bar), aproximadamente 250 kPa (2,5 bar) o aproximadamente 300 kPa (3 bar)) en presencia de un exceso estequiométrico de cisteína a un pH básico (de, por ejemplo, aproximadamente 9-10) y la agitación hasta que consumo del DGLA sea completo. El método puede comprender, además, la acidificación a aproximadamente pH 3-4 (por ejemplo, añadiendo una cantidad apropiada de ácido cítrico sólido) y el aislamiento del ácido libre de 15-HETrE contenido en el filtrado. El ácido libre de 15-HETrE aislado del filtrado puede ser sometido, a continuación, a una etapa de formación de sal; por ejemplo, por exposición a un agente formador de sal, tal como L-lisina en condiciones libres de oxígeno o sustancialmente libres de oxígeno en el mismo recipiente o uno separado. La sal resultante (por ejemplo, sal de lisina) puede ser lavada con un disolvente (por ejemplo, MtBE) de una a aproximadamente 4 veces. La sal de lisina de 15-HETrE resultante puede tener una pureza de al menos 90%, al menos aproximadamente 92% o al menos 95% sin el uso de una técnica de purificación cromatográfica.

Ejemplos**Ejemplo 1: Sales de 15-HETrE**

5 Se usaron veinticuatro coformadores y ácidos para seleccionar formas estables de 15-HETrE, pero la mayoría produjo aceites o geles. Las sales con propiedades mejoradas de manejo fueron aisladas de la selección: sodio, ornitina, lisina, meglumina y piperazina, pero todas eran poco cristalinas. Cuatro de las cinco sales son sólidos pegajosos, pero la sal de lisina existe como un polvo y es químicamente estable a temperatura ambiente al vacío durante 8 días.

Tabla 1: Coformadores/ácidos usados para la selección de sales y cocrystalos de 15-(S)-HETrE

bases (formadores de sales)	formadores cocrystalinos neutros	ácidos con propiedades deseables (orales y tópicos)
arginina	urea	4-hidroxibenzoico
colina	nicotinamida	ascórbico
lisina	cisteína	acelaico (nonanodioico)
meglumina	alantoína	benzoico
ornitina	-	cítrico
trometamina (TRIS)	-	gálico
NaHCO ₃	-	glicólico (hidroxiacético)
DABCO ¹	-	málico (L)
imidazol ¹	-	succínico (butanodioico)
piperazina	-	tartárico (L)

¹Estos coformadores no son farmacéuticamente aceptables, pero fueron examinados para ver si podía mejorarse el manejo para su fabricación.

Ejemplo 2: Caracterización del aceite de 15-HETrE

10 El 15-HETrE era un aceite viscoso y el análisis de XRPD confirmó que era amorfo a los rayos X (Figura 1). No se observó ningún evento térmico durante el análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) del material (Figura 2). Se observó una posición transición vítrea (T_g) del 15-HETrE por análisis híper DSC a -52°C. Se observaron eventos térmicos adicionales a mayor temperatura, pero sus causas son desconocidas sin análisis adicional (Figura 3). La espectroscopia ¹H-RMN del material demostró que era concordante con la estructura molecular (Figura 4). En la Figura 15 se muestra el espectro de FT-IR del 15-HETrE. El tramo de carbonilo del ácido libre es visible a 1707cm⁻¹.

Ejemplo 3: Selección de solubilidad del 15-HETrE tal cual se recibe

20 La solubilidad del 15-HETrE fue estimada en diez disolventes usando el método de adición de alícuotas. Se descubrió que el 15-HETrE es miscible en todos los disolventes objeto de ensayo, mostrando alta solubilidad en todos los casos. Sin embargo, cuando se lo combinaba con acrilato 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropílico ("HFIPA"), se observó un rápido cambio de color, pasando de incoloro transparente a rojo sangre y a morado intenso/negro. Se cree que esto es debido a la degradación del 15-HETrE; por lo tanto, no se usó HFIPA en ningún estudio ulterior de 15-HETrE. En la Tabla 2 se muestran, a continuación, los datos de solubilidad.

Tabla 2: Solubilidades estimadas del 15-HETrE en una gama de disolventes

Disolvente	Abreviatura	Intervalo de solubilidad mg/dl
Acetonitrilo	ACN	93-278
THF	-	332-996
Acetona	-	312-936
Dioxano	-	166-498
DCM	-	117-352
Acetato etílico	EtOAc	189-566
DMF	-	123-368
Etanol	EtOH	126-378
Metanol	MeOH	212-636

Los experimentos produjeron geles o aceites. El análisis de estos materiales mediante XRPD demostró que estaban compuestos de materiales amorfos a los rayos X o de un material amorfo a los rayos X y un coformador. Cuatro coformadores proporcionaron materiales que eran sólidos o semisólidos y poseen propiedades de manejo mejoradas con respecto al material de partida: NaHCO₃, ornitina, lisina y piperazina.

Ejemplo comparativo 1: Sal sódica de 15-HETrE

Se aisló material preparado según el Ejemplo 1 usando NaHCO₃ y 15-HETrE como un sólido ceroso blanquecino después de la evaporación del sistema cosolvente de etanol/agua. La disolución en etanol seguida por evaporación mejoró la manejabilidad del material. El material desordenado también se aisló mediante suspensión espesa con MTBE.

Cuando fue analizado por XRPD, se descubrió que el material estaba compuesto de material cristalino muy desordenado (Figura 6). También puede haber presente algún contenido amorfo.

El desplazamiento de picos observado en el espectro ¹H-RMN del material sugería la formación de sal sódica (Figura 7).

El análisis por FT-IR de una muestra de la sal sódica no mostró el tramo de carbonilo presente en el ácido libre a 1707 cm⁻¹, lo que sugiere la formación de sal (Figura 8).

El análisis por DSC de la sal sódica de 15-HETrE mostró una pequeña endoterma con una temperatura de inicio de 71,3°C (Figura 9). Esta endoterma no fue observada durante el análisis térmico del ácido libre (véanse, por ejemplo, las Figuras 2-3).

Ejemplo 4: Sal de lisina de 15-HETrE

Material preparado según el Ejemplo 1 usando lisina y 15-HETrE. El material fue aislado como un sólido pulverulento blanquizco a partir de la evaporación del sistema cosolvente de etanol/agua. La disolución en etanol seguida por evaporación mejoró la manejabilidad del material.

El material estaba compuesto de material cristalino desordenado cuando fue analizado por XRPD y puede contener algún contenido amorfo (Figura 10). Los picos de difracción separados por igual con un ángulo reducido sugieren la formación de una mesofase, tal como un cristal líquido.

Se observó el mismo patrón de XRPD en varios experimentos, incluyendo la evaporación, la trituration y la sonicación (puro y con disolvente).

El desplazamiento de picos del 15-HETrE y la lisina observado en el espectro ¹H-RMN del material indicaba la posible formación de sal (Figura 11). La proporción 15-HETrE:lisina fue 0,9:1.

El análisis por FT-IR de una muestra de la sal de lisina muestra que el claro tramo de carbonilo, presente en el ácido libre a 1707 cm^{-1} , se había desvanecido, lo que sugería la formación de sal (Figura 12).

5 El análisis por DSC de la sal de lisina de 15-HETrE mostró dos pequeñas endotermas con temperaturas de inicio de $87,1^{\circ}\text{C}$ y $115,5^{\circ}\text{C}$, respectivamente (Figura 13). Estas endotermas no fueron observadas durante el análisis térmico del ácido libre (véanse, por ejemplo, las Figuras 2-3).

Ejemplo comparativo 2: Sal de ornitina de 15-HETrE

10 Material preparado según el Ejemplo 1 usando ornitina y 15-HETrE fue aislado como un sólido ceroso/oleoso blancuzco después de la evaporación del sistema cosolvente de etanol/agua. La disolución en etanol seguida por evaporación mejoró la manejabilidad del material. El material estaba compuesto de material cristalino muy desordenado cuando fue analizado por XRPD y puede contener algún contenido amorfo (Figura 14).

Se observó el mismo patrón de XRPD en varios experimentos, incluyendo la evaporación, la trituración, la precipitación y la sonicación (puro y con disolvente).

En el espectro $^1\text{H-RMN}$ se observó un desplazamiento de picos tanto de 15-HETrE como de ornitina, indicando una probable formación de sal (Figura 15). La proporción HETrE:ornitina fue medida como 1:0,8.

15 El análisis por FT-IR de una muestra de la sal de ornitina muestra que el claro tramo de carbonilo, presente en el ácido libre a 1707 cm^{-1} , se había desvanecido, lo que sugería la formación de sal (Figura 16).

20 El análisis por DSC de la sal de lisina de 15-HETrE mostró dos pequeñas endotermas con temperaturas de inicio de $34,7^{\circ}\text{C}$ y $\sim 120^{\circ}\text{C}$, respectivamente (Figura 17). La primera endoterma puede ser debida a la fusión del material, mientras que la segunda endoterma mayor puede ser debida a la descomposición del material. Estas endotermas no fueron observadas durante el análisis térmico del ácido libre (véanse, por ejemplo, las Figuras 2-3).

Ejemplo comparativo 3: Sal de piperazina de HETrE

Se aisló un material semisólido amarillo a partir de la sonicación de piperazina pura y 15-HETrE, seguida por evaporación del sistema cosolvente 1:1 de acetato isobutílico y etanol.

25 El análisis por XRPD demostró que la sal estaba compuesta de un material cristalino muy desordenado (Figura 18). También puede haber presente algún contenido amorfo.

En el espectro $^1\text{H-RMN}$ de la presunta sal se observó un desplazamiento de picos, lo que sugería la formación de sal (Figura 19). La proporción 15-HETrE:piperazina fue 1:0,66.

Ejemplo 5: Propiedades de sales sódica, de lisina, ornitina y piperazina de 15-HETrE

30 Se compararon entre sí las propiedades de las sales de 15-HETrE preparadas según el Ejemplo 4 y el Ejemplo comparativo 1-3 y con el API de ácido libre de 15-HETrE. Las sales sódica, de ornitina y de piperazina eran cada una sólidos pegajosos o cerosos, pero la sal de lisina podía convertirse en polvo y fue químicamente estable a temperatura ambiente al vacío durante 8 días.

35 La Tabla 3 compara las propiedades de cada sal que fueron evaluadas durante la selección e incluye cristalinidad, aspecto, contenido de disolvente por RMN, estabilidad química, método de preparación y estequiometría por análisis de RMN.

La sal de lisina representa el mejor candidato para el desarrollo, ya que podía ser preparada como un polvo manejable y fue creada por diversos métodos. La formación de sal fue confirmada por $^1\text{H-RMN}$ y espectroscopia de FT-IR, y la sal presentaba una estequiometría equimolar.

Tabla 3: Tabla de propiedades de sólidos aislados de la selección de sales/cocristales

Compuesto	Cristalinidad	Aspecto	Contenido de disolvente	Estabilidad a los 8 días a 40/75% de HR	Método de preparación	Estequiometría (base:API)
Sal de lisina de HETrE	Muy desordenada	Polvo blancuzco	Traza de THF o EtOH	97% de pureza	Evaporación, suspensión espesa, sonicación	1:1

Compuesto	Cristalinidad	Aspecto	Contenido de disolvente	Estabilidad a los 8 días a 40/75% de HR	Método de preparación	Estequiometría (base:API)
Sal sódica de HETrE	Muy desordenada	Sólido ceroso blancuzco	Traza de EtOH	95% de pureza	Evaporación o suspensión espesa	No puede determinarse mediante RMN
Sal de ornitina de HETrE	Muy desordenada	Sólido ceroso blancuzco, coloración amarilla al almacenarse	Traza de THF o EtOH	96% de pureza	Evaporación, suspensión espesa, sonicación	0,9:1
Sal de piperazina de HETrE	Muy desordenada	Semisólido pegajoso amarillo	Traza de EtOH	No sometida a ensayo	Evaporación o sonicación	0,7:1
API de HETrE	amorfa	aceite	-	-	-	-

La sal sódica fue usada para un estudio ulterior como una candidata de reserva, ya que era un sólido ceroso y fue creada mediante varios métodos diferentes. La estequiometría no pudo ser determinada por espectroscopia de RMN.

5 La sal de ornitina no se recomendaba para un estudio ulterior, ya que era muy pegajosa y presentaba una coloración amarilla con el paso del tiempo. La sal de piperazina presentó las propiedades de manejo más deficientes y era un material semisólido pegajoso que parece fluir al quedar expuesto al aire a temperatura ambiente, probablemente debido a la captación de humedad.

10 En las Figuras 20A-H se muestran imágenes fotomicroscópicas de cada sal. Las imágenes de cada sal fueron captadas bajo luz transversal polarizada con y sin un filtro rojo de 1^{er} orden, que mejora el contraste entre el contenido cristalino y el amorfo. La longitud de la barra de escala representa 200µm. Los colores claros son evidencia de cristalinidad.

Ejemplo 6: Aumento de escala de la sal de lisina de 15-HETrE

15 Se encontró un método de suspensión espesa como una alternativa al método previamente usado de evaporación rotativa para preparar la sal de lisina usando EtOAc como disolvente, pero no llegaba a generar la sal cuando se aumentaba de escala. La adición de un 9% de MeOH al EtOAc generó la sal a una escala de 800mg, con una pureza del 96%. Se han iniciado estudios de estabilidad para la sal de lisina (20°C/60% de HR de aire/N₂ y 40°C/75% de HR de aire/N₂, viales abiertos/cerrados).

20 No pudo hallarse un método alternativo a preparar la sal sódica de 15-HETrE mediante suspensión espesa y evitar la necesidad de una evaporación rotativa. Si se usaba agua, la base se disolvía, pero la sal resultante también era muy soluble y, así, no precipitaba. Si se excluía el agua, la base no se disolvía y, por lo tanto, no reaccionaba con el 15-HETrE. El aumento de escala y la caracterización se completaron para la sal sódica de 15-HETrE usando evaporación rotativa a partir de EtOH acuoso al 10%, y luego EtOH. El material recuperado tenía coloración amarilla. La pureza medida mediante análisis de UPLC fue ~81%.

Ejemplo 7: Caracterización de la sal de lisina de 15-HETrE aumentada de escala

25 La sal de lisina de 15-HETrE preparada según el Ejemplo 6 fue analizada mediante XRPD y se descubrió que consistía en material cristalino desordenado (Figura 21).

La formación de sal fue confirmada por espectroscopia ¹H-RMN (disolvente: d₄-MeOD), puesta de evidencia por el desplazamiento de picos de protones tanto de lisina como del 14-HETrE (Figura 22). La proporción HETrE:lisina se midió como 1:1.

30 El análisis por TG/DTA de la sal de lisina de 15-HETrE presentó una pérdida insignificante de peso a <160°C, indicando que la sal era anhidra. Se observó una pequeña endoterma a 116°C (inicio), pero la causa es desconocida (Figura 23).

El termograma de DSC mostró varias endotermas pequeñas con inicios a 88°C y 115°C, seguidas por endotermas más anchas, que pueden ser asociadas con eventos de fusión y descomposición (Figura 24).

La microscopía de platina caliente de la sal entre 30°C y 200°C no mostró ninguna fusión observable hasta aproximadamente 140°C, pero el material no se había fundido completamente a 200°C (Figuras 25A-D).

El análisis de híper DSC del material indicó que la temperatura de transición vítrea (T_g) era 16°C (la mitad del valor de C_p , Figura 26).

- 5 El análisis de DVS de la sal de lisina de 15-HETrE mostró una ganancia de menos del 1% en peso por debajo del 70% de HR, pero ganó un 1% adicional entre 70-80% de HR (Figura 26) e indica que el material era higroscópico según la clasificación de la Farmacopea Europea. La ganancia de peso por encima del 80% de HR fue suficientemente grande como para sugerir que la muestra se licuó. El análisis de la muestra por XRPD posterior a la DVS mostró que era coherente con el del material de entrada (Figura 21).
- 10 La Figura 27 muestra el espectro de FT-IR de la sal de lisina de 15-HETrE preparada según el Ejemplo 6.

Ejemplo 8: Estudio de aumento de escala y operabilidad de la sal de lisina de 15-HETrE

- 15 Inicialmente, la sal de lisina de 15-HETrE fue aislada por evaporación rotatoria para eliminar el disolvente residual y reducir la pegajosidad de los sólidos. Sin embargo, se llevó a cabo un número pequeño de experimentos para encontrar un método más adecuado que pudiera ser usado para preparar las sales como sólidos secos a mayor escala.

Se realizaron experimentos en suspensiones espesas para formar la sal de lisina en diferentes condiciones. Los disolventes se añadieron según la siguiente Tabla 4. Las proporciones de disolvente:antidisolvente fueron 1:3.

Tabla 4: Experimentos en suspensiones espesas para preparar sal de lisina de HETrE

Muestra n°	Disolvente/antidisolvente	Observaciones	XRPD
1946-035-01	EtOAc	polvo blancuzco	igual que las sales de lisina anteriores
1946-035-02	Acetona-EtOAc	polvo blancuzco	igual que las sales de lisina anteriores, algunos picos nuevos
1946-035-03	EtOH-MTBE	polvo blancuzco con sólido ceroso amarillo	igual que las sales de lisina anteriores
1946-035-04	IPA-EtOAc	polvo blancuzco con sólido ceroso amarillo	igual que las sales de lisina anteriores
1946-043-01	EtOAc	sólido blanco en solución	igual que las sales de lisina anteriores
1946-047-01	EtOAc	sólido amarillo/melocotón	sal de lisina de HETrE + lisina libre
1946-055-01	EtOAc	sólido blanco/color crema	sal de lisina de HETrE
1946-055-02	EtOAc-EtOH	sólido blanco/color crema	sal de lisina de HETrE + lisina libre
1946-055-03	EtOAc-acetona	sólido blanco/color crema	sal de lisina de HETrE
1946-055-04	EtOAc-IPA	sólido blanco/color crema	sal de lisina de HETrE
1946-055-05	EtOAc-MeOH	sólido blanco/color crema	sal de lisina de HETrE

Muestra nº	Disolvente/antidisolvente	Observaciones	XRPD
1946-059-01	EtOAc	solución turbia	N/D
1946-059-02	EtOH	sólido blanco/color crema	sal de lisina de HETrE
1946-059-03	10:1 EtOAc:MeOH	sólido blanco/color crema	sal de lisina de HETrE
1946-059-04	Acetona	solución amarilla/parda	N/D
1946-059-05	IPA	sólido blanco/color crema	sal de lisina de HETrE
1946-063-01	10:1 EtOAc:MeOH	sólido amarillo pálido	sal de lisina de HETrE
1946-067-01	10:1 EtOAc:MeOH	sólido amarillo pálido	sal de lisina de HETrE

Las suspensiones espesas de lisina de 15-HETrE dieron polvos blancuzcos con algunos sólidos amarillos cerosos. El patrón de XRPD coincidía con los patrones previos de la sal de lisina de 15-HETrE. La muestra 1946-035-01 en EtOAc fue seleccionada para un aumento de escala hasta 100mg, seguido por una escala de 1g.

5 El material aumentó de escala con éxito a 100mg; sin embargo, se encontraron problemas cuando se preparó la sal a la escala de 1g.

Para completarse, la reacción llevó mucho más de lo previamente observado (6 días en contraposición con 1 día).

Parecía que el material era muy fino y no podía ser filtrado fácilmente. La sal de lisina de 15-HETrE fue aislada mediante centrifugación, decantada y secada al vacío. El material se aisló como un sólido amarillo, pero estaba contaminado con lisina residual.

10 Se efectuaron experimentos adicionales para encontrar un disolvente alternativo y se descubrió que EtOAc-MeOH (9:1) era sumamente adecuado, ya que la formación de sal se producía en menos de 1 hora de la adición. Otras combinaciones de disolventes generaban la sal, pero requería varias horas o un mezclado durante la noche. Los aumentos de escala hasta las escalas de 250mg y luego de 800mg tuvieron éxito, y la sal se formó en unas horas, se filtró y se secó.

15 La pureza por UPLC fue del 96% para el lote de la escala de 800mg y del 97% para el lote de la escala de 250mg.

20 La Figura 28 muestra la estabilidad de la sal de lisina de 15-HETrE en comparación con el ácido graso libre de 15-HETrE en diversas condiciones. El 15-HETrE libre es inestable y se degrada en todas las condiciones, con la excepción de -20°C. La sal de lisina de 15-HETrE es estable a 20°C y una humedad del 40%, así como a 40°C y un 75% de humedad, haciendo a la sal de lisina útil para aplicaciones farmacéuticas. Se preparó sal de lisina de 15-HETrE a mayor escala para la selección de cristalización como un polvo blanco. El análisis de XRPD indicó que estaba desordenada y que era muy similar a análisis anteriores.

Tabla 5: Selección de cristalización de la sal de lisina de 15-HETrE

Muestra nº (1922-)	Disolvente/antidisolvente	Condiciones	Observaciones
077-01	EtOH-agua	Evap. rotatorio	Preparación a gran escala
087-01	1:1:1 MeOH: ACN:Dioxano	evaporación	polvo blancuzco

ES 2 727 387 T3

Muestra nº (1922-)	Disolvente/antidisolvente	Condiciones	Observaciones
087-02	20:1 Dioxano:agua	evaporación	polvo blancuzco, polvo ligeramente pegajoso, cierta birrefringencia
087-03	3:1:3 MIBK: Acetona:MeOH	evaporación	sólido pulverulento con tintes anaranjados, ligeramente pegajoso con grumos, poca birrefringencia
091-01	EtOAc	estrés por vapor	polvo ligeramente pegajoso, birrefringencia menor
091-02	acetona	estrés por vapor	polvo ligeramente pegajoso, birrefringencia menor
091-03	DCM	estrés por vapor	polvo ligeramente pegajoso, birrefringencia menor
083-01	MTBE	suspensión espesa (TA)	sólido ceroso blancuzco. Mesofase, película de birrefringencia
083-02	acetato isobutílico	suspensión espesa (TA)	pasta blanca
083-03	ciclohexano	suspensión espesa (TA)	pasta blanca-mesofase. Película, cierta birrefringencia
083-02A	Et ₂ O/MTBE	suspensión espesa (TA)	sólido blanco
083-03A	EtOH/EtOAc	suspensión espesa (TA)	Gel birrefringente con sólido blanco
083-03A	-	Secado por vacío	sólido pegajoso blanco birrefringente
083-04	Et ₂ O	suspensión espesa (TA)	sólido ceroso amarillo. Mesofase. Esferulitas. Película, cierta birrefringencia
083-04A	Dioxano/EtOAc	suspensión espesa (TA)	Sólido pegajoso amarillo + solución
083-04A	-	Secado por vacío	Sólido amarillo birrefringente
087-01A	ACN/EtOAc	suspensión espesa (TA)	gel amarillo pálido
087-02A	Acetona/EtOAc	suspensión espesa (TA)	gel amarillo pálido con sólido
087-02A	-	Secado por vacío	sólido amarillo pálido
087-03A	Ciclohexano/EtOAc	suspensión espesa (TA)	sólido amarillo pálido con solución
087-03A	-	secado por vacío	sólido amarillo pálido
091-01A	DCM/EtOAc	suspensión espesa (TA)	sólido amarillo pálido con solución

Muestra nº (1922-)	Disolvente/antidisolvente	Condiciones	Observaciones
091-02A	MeOH/EtOAc	suspensión espesa (TA)	sólido amarillo pálido con algunos cristales
091-03A	Et ₂ O/EtOAc	suspensión espesa (TA)	sólido blanco en solución

Ejemplo comparativo 4: Estudio de aumento de escala y operabilidad de la sal sódica de 15-HETrE

La sal sódica de 15-HETrE estaba muy desordenada en el análisis de XRPD (Figura 9) y era un sólido ceroso.

5 El análisis del material por espectroscopia ¹H-RMN (disolvente: d₄-MeOD) indicó que se había producido la formación de sal, según ponía de evidencia el desplazamiento de picos de los protones de 15-HETrE (Figura 10). La espectroscopia ¹H-RMN no pudo determinar la estequiometría.

El análisis por TG/DTA de la sal sódica de 15-HETrE presentó una pérdida de peso gradual continua por encima de la temperatura ambiente, lo que no es inusual para materiales muy desordenados y es probablemente debida a la pérdida de componentes volátiles.

El termograma de DSC presentó una serie compleja de pequeños eventos térmicos, cuyas causas son desconocidas.

10 No se observó una clara señal de transición vítrea (T_g) a partir del termograma de hiper DSC.

El análisis por DVS de la sal sódica de 15-HETrE demostró que la muestra ganó menos de un 1% de peso por debajo del 40% de HR, pero aumentó exponencialmente de peso posteriormente y que se licuaba con una HR mayor. Esto indica que el material es muy higroscópico según las clasificaciones de la Farmacopea Europea. Dado que el material estaba licuado, no se realizó el análisis por XRPD posterior al de DVS.

15 La Figura 15 muestra el espectro de FT-IR para sal sódica de 15-HETrE preparada según este Ejemplo.

Inicialmente, la sal sódica de 15-HETrE fue aislada por evaporación rotatoria para eliminar disolvente residual y reducir la pegajosidad de los sólidos. Sin embargo, se efectuó un pequeño número de experimentos para encontrar un método más adecuado que pudiera usarse para preparar las sales como sólidos secos a mayor escala.

20 Se realizaron experimentos en suspensiones espesas para formar la sal sódica en diferentes condiciones. Los disolventes se añadieron según la tabla siguiente. Las proporciones de disolvente:antidisolvente fueron 1:3.

Para las suspensiones espesas no acuosas, la base fue añadida como un sólido, pero no se disolvió. También se intentó la adición de base como una solución acuosa, pero no se produjo la precipitación de sal y el disolvente tuvo que ser evaporado. Por lo tanto, no se encontró un método adecuado de suspensión espesa para preparar sal sódica de HETrE.

25 El aumento de escala se llevó a cabo usando evaporación rotatoria a escala de gramo y se generó la sal, pero el sólido presentó una coloración amarilla.

La pureza medida por UPLC fue ~81%.

Tabla 6: Intentos por preparar sal sódica de 15-HETrE mediante un método en suspensión espesa

Muestra nº	Disolvente/antidisolvente	Observaciones
1946-035-05	EtOAc ¹	solución turbia
1946-035-06	Acetona-EtOAc ¹	solución turbia
1946-035-07	EtOH-MTBE ¹	solución turbia
1946-035-08	IPA-EtOAc ¹	solución turbia
1946-035-09	MTBE-EtOH	solución turbia

Muestra nº	Disolvente/antidisolvente	Observaciones
1946-035-10	heptano-EtOH	solución turbia
1946-035-11	ciclohexano-EtOH	solución turbia
1946-035-12	IPOAc-EtOH	solución turbia
1946-035-05A	acetona	solución, no disuelta
1946-035-06A	ACN	solución, no disuelta, sólido amarillo
1946-035-07A	DMF	solución amarilla turbia, no disuelta
1946-035-08A	DMSO	solución amarilla pálida, no disuelta
1946-035-09A	EtOH	solución turbia, no disuelta
1946-035-10A	IPA	solución turbia, no disuelta
1946-035-11A	MeOH	solución turbia, no disuelta
1946-035-12A	THF	solución turbia, no disuelta
1946-035-05B	Acetona-H ₂ O	solución amarilla pálida, no disuelta
1946-035-12B	THF-H ₂ O	solución amarilla pálida, no disuelta
1946-045-01	Acetona ²	solución amarilla
1946-045-02	THF ²	solución ligeramente amarilla
Nota ¹ : Se añadieron 560µL adicionales de MTBE para intentar formar el precipitado.		
Nota ² : Se añadió a la suspensión espesa NaHCO ₃ acuoso saturado.		

Tabla 7: Selección de cristalización de la sal sódica de HETrE

Muestra (1922-)	nº	Disolvente/antidisolvente	Condiciones	Observaciones
075-01		EtOH-agua	Evaporación rotatoria	Preparación a gran escala
085-01		1:1:1 MeOH:ACN:Dioxano	evaporación	mesofase. Esferulitas, partículas ligeramente pegajosas, cierta birrefringencia
085-03		3:1:1 MIBK:Acetona:MeOH	evaporación	mesofase - se asemeja a agujitas en mesofase
085-02		20:1 Dioxano:agua	evaporación	mesofase, partículas ligeramente pegajosas, cierta birrefringencia

ES 2 727 387 T3

Muestra (1922-)	n°	Disolvente/antidisolvente	Condiciones	Observaciones
089-01		EtOAc	estrés por vapor	ligeramente pegajosa con cierta birrefringencia, polvo
089-02		acetona	estrés por vapor	ligeramente pegajosa con cierta birrefringencia
089-03		DCM	estrés por vapor	ligeramente pegajosa con cierta birrefringencia
079-01		MTBE	suspensión espesa (TA)	sólido ceroso blanquizco - colores vivos, película de birrefringencia
079-02		Acetato isobutílico	Suspensión espesa (TA)	pasta o gel blanco, colores vivos
079-02A		EtOH-MTBE	suspensión espesa (TA)	gel blanco
079-03		ciclohexano	suspensión espesa (TA)	pasta blanca en el fondo. Lados redondos sólidos, polvo pegajoso
079-03A		Dioxano-MTBE	suspensión espesa (TA)	sólido amarillo, gel
079-04		Et ₂ O	suspensión espesa (TA)	sólido ceroso blanco/transparente, birrefringente, película de birrefringencia
085-01A		ACN- MTBE	suspensión espesa (TA)	Sólido ceroso birrefringente
085-01A		-	secado por vacío	sólido ceroso birrefringente
085-02A		Acetona- MTBE	suspensión espesa (TA)	Sólido ceroso birrefringente
085-02A		-	secado por vacío	sólido ceroso birrefringente
089-01A		Ciclohexano-MTBE	suspensión espesa (TA)	Sólido blanquizco ceroso birrefringente
089-01A		-	secado por vacío	Sólido blanquizco ceroso birrefringente
089-02A		DCM-MTBE	suspensión espesa (TA)	Sólido blanco ceroso birrefringente
089-02A		-	secado por vacío	Sólido blanco ceroso birrefringente
089-03A		MeOH-MTBE	suspensión espesa (TA)	Sólido pegajoso amarillo, cierta birrefringencia
089-03A		-	secado por vacío	Sólido pegajoso amarillo, cierta birrefringencia

Ejemplo comparativo 5: Estudio de aumento de escala y operabilidad de la sal de meglumina sódica de 15-HETrE

5 Una muestra preparada a partir de 15-HETrE con N-metil-D-glucamina (meglumina) produjo un gel, que fue almacenado en condiciones refrigeradas para promover la cristalización. Después de cierto tiempo, se observó que el material se había solidificado y el patrón de XRPD indicó la presencia de cristalinidad, aunque también había algún contenido amorfo (Figura 29). El patrón de XRPD era diferente del de la meglumina, indicando la formación de una forma sólida única.

El espectro de RMN protónica indicó una estequiometría 1:1 y se observó un desplazamiento de picos, lo que indicaba la formación de sal (Figura 30). Se detectó un mol de EtOH, lo que puede indicar la formación de solvato.

10 Aunque el patrón de XRPD indicó que la muestra más cristalina generada de la selección, la muestra era un sólido pegajoso y fluía cuando era presionado entre portaobjetos de microscopio, lo que indicaba propiedades cristalinas líquidas (Figuras 31A-B). La barra de escala en las Figuras 31A-B representa 200µm. El material se secó durante la noche al vacío para eliminar el EtOH residual y la muestra seguía siendo pegajosa.

Para la selección de cristalización, se preparó sal de meglumina de 15-HETrE a mayor escala como un aceite viscoso.

15 A continuación, la sal de meglumina fue subdividida en múltiples viales y sometida a diferentes condiciones de estrés, y las muestras fueron purgadas con nitrógeno (Tabla 8). Se emplearon condiciones acuosas y no acuosas y los disolventes fueron secados usando cribas moleculares. Los disolventes también se purgaron con nitrógeno.

20 La mayoría de las muestras siguieron siendo geles cuando fueron sometidas a estrés en diferentes condiciones. Sin embargo, una muestra cristalizó parcialmente en el frigorífico a partir de ACN-EtOH. La muestra fue usada para la siembra de otras muestras, pero no se observó ninguna cristalización ulterior.

Tabla 8: Selección de cristalización para la sal de meglumina de 15-HETrE

Muestra nº	Disolvente/antidisolvente	Condiciones	Observaciones
1922-073-01	EtOH-agua	Evaporación rotatoria	Preparación a gran escala
1922-081-09	-	40°C/75% de HR	gel amarillo oscuro
1922-095-06	-	estrés por temperatura	gel amarillo pálido
1922-093-01	EtOAc-EtOH	estrés por vapor	solución
1922-093-01	-	secado por vacío	gel amarillo pálido
1922-093-02	acetona-EtOH	estrés por vapor	Solución
1922-093-02	-	secado por vacío	gel amarillo pálido
1922-093-03	DCM-EtOH	estrés por vapor	solución
1922-093-03	-	secado por vacío	gel amarillo pálido

ES 2 727 387 T3

Muestra nº	Disolvente/antidisolvente	Condiciones	Observaciones
1922-093-04	ACN-EtOH	estrés por vapor	sólido blanco, agujas birrefringentes. Se derrite cuando se saca del frigorífico. Usado como semillas. Se solidifica en el frigorífico convirtiéndose en un sólido blanco pegajoso que se aglomera
1922-093-05	THF-EtOH	estrés por vapor	solución
1922-093-05	-	secado por vacío	gel amarillo pálido
1922-093-10	agua-EtOH	estrés por vapor	solución
1922-093-10	-	secado por vacío	gel amarillo pálido
1922-081-07	EtOH-agua	suspensión espesa (TA)	solución
1922-081-08	EtOH:IPOAc	suspensión espesa (TA)	solución
1946-003-01	agua-EtOH	suspensión espesa (TA)	solución
1946-003-01	-	secado por vacío	gel amarillo pálido
1946-003-02	IPOAc-EtOH	suspensión espesa (TA)	solución
1946-003-02	-	secado por vacío	gel amarillo pálido
1946-003-03	ACN-MTBE	suspensión espesa (TA)	solución
1946-003-03	-	secado por vacío	gel amarillo pálido
1946-003-04	acetona-MTBE	suspensión espesa (TA)	gel. Sembrado con 1922-093-04
1946-003-04A	-	seeding	gel amarillo con siembra
1946-003-05	ciclohexano-MTBE	suspensión espesa (TA)	gel. Sembrado con 1922-093-04
1946-003-05A	-	siembra	gel amarillo con siembra

Muestra n°	Disolvente/antidisolvente	Condiciones	Observaciones
1946-003-06			
1946-003-06	-	secado por vacío	gel amarillo pálido
1946-003-07	dioxano-EtOAc	suspensión espesa (TA)	Solución
1946-003-07	-	secado por vacío	gel amarillo pálido

En función de estos resultados, las sales de lisina de 15-HETrE y sódica siguen representando las mejores candidatas para un estudio ulterior, ya que son menos pegajosas que la sal de meglumina. Sin embargo, las propiedades de la sal de meglumina pueden mostrar mejora con un procesamiento ulterior.

5 Ejemplo 9: Preparación de 15-(S)-HETrE a partir de DGLA

Se preparó tampón borato sódico (0,1 M) cargando ácido bórico (61,8 g, 1 mol) y NaOH (120,0 g, 3 mol) en agua (10 L). Se cargó un recipiente de Hastelloy de 20 L con 10,0 L del tampón borato sódico, seguido por cisteína (237,2 g, 1,958 mol, 2,0 equiv). Una vez que el tampón y la cisteína se disolvieron completamente con agitación, se añadió DGLA (300 g, 9,79 mol) y la mezcla se enfrió hasta 0-5°C a un pH 9,6. Se añadió enzima LPX1 en polvo (2,66 g, 8,85 mg/g DGLA, 1,8 Unidades/g DGLA, 0,88% en peso) y el recipiente fue presurizado hasta 250 kPa (2,5 bar) con oxígeno puro. Después de agitar durante una hora, se liberó lentamente la presión de descarga del oxígeno para evitar la formación de espuma. Se extrajo una parte alícuota y se la acidificó hasta un pH de 3 con una solución de ácido cítrico (25% p/v). La parte alícuota fue extraída con cloroformo deuterado, secada sobre sulfato sódico, secada sobre sulfato sódico, filtrada y analizada por RMN.

Se añadieron enzima LPX1 adicional en polvo (0,503 g, 1,8 mg/g DGLA, 0,36 Unidades/g DGLA, 0,18% en peso) y un equivalente adicional de cisteína (117,0 g, 0,979 mol) y la mezcla fue agitada bajo oxígeno durante otra hora. El análisis de otra parte alícuota según se ha indicado anteriormente indicó que la reacción se había completado.

La mezcla fue purgada con nitrógeno (200 kPa (2 bar), 2 ciclos) y agitada a 900 rpm durante la noche bajo una capa de nitrógeno. La mezcla fue cargada a continuación en un bidón de 10 L cubierto de nitrógeno. A continuación, la mezcla se añadió a un reactor de 20 L bajo una capa de argón y se añadió ácido cítrico sólido en porciones de 50 g hasta que el pH cayó hasta 3,5.

El sólido precipitado fue recogido con un embudo sinterizado bajo argón. Después de volver a transferir los sólidos al reactor, se añadieron 3 L de éter metil t-butílico (MtBE) y la mezcla fue agitada a 400 rpm durante 10 minutos. Estas etapas se repitieron dos veces más antes de que se evaporara el disolvente residual a 25 kPa (250 mbar) con un baño de 40°C (evaporador rotatorio) hasta que no se observó más destilado. El evaporador rotatorio fue evacuado con argón.

Ejemplo 10: Purificación de 15-(S)-HETrE en bruto mediante cromatografía

La mitad del 15-(S)-HETrE en bruto preparado en el Ejemplo 9 fue disuelta en 130 mL de una mezcla disolvente de MtBE/ciclohexano (20:80 v/v). La solución se dividió en dos porciones; cada porción fue purificada usando un cartucho de sílice Biotage 75L que había sido eluida de antemano con ciclohexano. La elución del 15-(S)-HETrE se logró en 5 etapas: (1) MtBE/ciclohexano (10:90): 4 L; (2) MtBE/ciclohexano (20:80): 3 L; (3) MtBE/ciclohexano (30:70): 2 L; (4) MtBE/ciclohexano (50:50): 4 L; y (5) MtBE: 2 L. Las fracciones que incluían 15-(S)-HETrE según un análisis de TLC (fracciones 4-9) fueron combinadas y concentradas mediante evaporador rotatorio (25 kPa (250 mbar) a 40°C), en argón, hasta que no se observó más destilado. La pureza fue del 95,5% (según ¹H-RMN) o del 96,4% (según uHPLC).

35 Ejemplo 11: Preparación de la sal de L-lisina de 15-(S)-HETrE

Se suspendió monohidrato de L-lisina (399 ± 2 mg) en alcohol (Tabla 9) en un vial de 20 mL de tapón a presión, se disolvió 15-(S)-HETrE (803 ± 2 mg) en el disolvente no polar (4 mL) y se lo añadió a la suspensión de lisina en agitación; se usó más disolvente no polar (2 mL) para enjuagar el vial de HETrE y se lo añadió a la suspensión de lisina/HETrE. A continuación, se añadió el resto del disolvente no polar (el volumen total de disolvente añadido fue de 8 mL), se añadió la siembra en este punto para los experimentos 3 a 10, y se agitó a 250 rpm durante la noche.

Tabla 9. Sistemas de disolventes

Reacción nº	Disolvente (no polar)	Disolvente (polar)	Proporción
2032-001-1	Acetato etílico	metanol	95:5
2032-001-2	Acetato etílico	metanol	90:10
2032-001-3	Acetato etílico	etanol	90:10
2032-001-4	Acetato etílico	Alcohol <i>isopropílico</i>	80:20
2032-001-5	Acetato etílico	acetona	80:20
2032-001-6	Acetato <i>isopropílico</i>	metanol	95:5
2032-001-7	Acetato <i>isopropílico</i>	metanol	90:10
2032-001-8	Acetato <i>isopropílico</i>	etanol	90:10
2032-001-9	Acetato <i>isopropílico</i>	Alcohol <i>isopropílico</i>	80:20
2032-001-10	Acetato <i>isopropílico</i>	acetona	80:20

Las reacciones nºs 1 y 2 no fueron sembradas; las reacciones nºs 3 a 10 fueron sembradas con semillas obtenidas de la torta del filtro de la reacción nº 1.

- 5 Los productos de cada una de las reacciones tenían aspecto blanco. La filtración se llevó a cabo con un embudo sinterizado (nº 3, de 10 mm de diámetro) a un vacío leve. Algunos productos de la torta del filtro tenían aspecto amarillo. Los primeros ~200 µL del filtrado fueron transferidos a un vial de HPLC. La filtración de la mezcla de reacción restante (alternando entre un vacío elevado y medio) produjeron una torta de filtro que fue transferida a una cámara de vacío y secada durante la noche antes de ser almacenada en un congelador. La propia sal es insoluble en cloroformo y DMSO, pero se disuelve fácilmente en el agua.

10 Se usó el análisis de RMN en D₂O para determinar el contenido en lisina de la sal (Tabla 10) calibrando el protón alfa de la lisina a 1.

Tabla 10. Contenido en lisina de las sales de L-lisina de 15(S)-HETrE

Reacción nº	Señal lisina	HETrE a 5,6 ppm	Diferencia	HETrE a 6 ppm	Diferencia
2032-001-1	1	0,9493	0,01941	0,94	0,00698
2032-001-2	1	0,9095	-0,02039	0,9164	-0,01662
2032-001-3	1	0,9277	-0,00219	0,9622	0,02918
2032-001-4	1	0,9283	-0,00159	0,9237	-0,00932
2032-001-5	1	0,9488	0,01891	0,9371	0,00408
2032-001-6	1	0,9503	0,02041	0,9451	0,01208
2032-001-7	1	0,9247	-0,00519	0,9115	-0,02152

ES 2 727 387 T3

Reacción nº	Señal lisina	HETrE a 5,6 ppm	Diferencia	HETrE a 6 ppm	Diferencia
2032-001-8	1	0,9032	-0,02669	0,9434	0,01038
2032-001-9	1	0,9407	0,01081	0,9311	-0,00192
2032-001-10	1	0,9164	-0,01349	0,9197	-0,01332
media =		0,92989		0,93302	

Las observaciones de las reacciones están compendiadas en la Tabla 11.

Tabla 11

Reacción nº	Disolvente	Proporción	Peso de la torta (mg)	Pureza de la torta (%)	Pureza del filtrado (%)	Tiempo aproximado de filtración (minutos)	Aspecto de la torta de filtro	Movilidad de la suspensión espesa	Drenaje
2032-001-1	Acetato etílico/metanol	95:5	921	97,1	83,05	35	Y, H	4	3
2032-001-2	Acetato etílico/metanol	90:10	990	97,1	82,77	30	W,P	4	3
2032-001-3	Acetato etílico/etanol	90:10	945	97,1	82,61	25	Y, H	4	3
2032-001-4	Acetato etílico/alcohol isopropílico	80:20	813	97,1	82,13	30	Y, H	4	3
2032-001-5	Acetato etílico/acetona	80:20	1113	96,8	-	50	Y, H	5	4
2032-001-6	Acetato isopropílico/metanol	95:5	932	97,2	86,91	30	Y, H	4	3
2032-001-7	Acetato isopropílico/metanol	90:10	1000	96,8	81,04	35	W, P	4	3
2032-001-8	Acetato isopropílico/etanol	90:10	951	97,1	83,39	35	Y, H	4	3
2032-001-9	Acetato isopropílico/alcohol isopropílico	80:20	932	96,9	80,24	35	Y, H	4	3
2032-001-10	Acetato isopropílico/acetona	80:20	910	96,8	79,64	50	Y, H	5	4

Tiempo de filtración: tiempo que lleva a la torta alcanzar el estado semiseco, no mojado

Aspecto de la torta de filtro: aspecto de la torta después de secar, w=blanca, y=amarilla (color de la torta), H=dura, P=pulverulenta

Movilidad de la suspensión espesa: 1 = rala, muy móvil, 2 = de espesor medio, móvil, 3 = espesa, pero transferencia fundamentalmente antes del enjuague, 4 = espesa, no fácilmente transferible, 5 = muy espesa, ningún flujo sin más diluyente

Drenaje (filtración de succión): 1 = fácil, 2 = medio, 3 = difícil, 4 = ninguno

ES 2 727 387 T3

Los perfiles de impurezas de las reacciones nºs 1 a 10 se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Perfiles de impurezas

	RRT	Tiempo de retención	Área de picos (%)	001-1 (sal)	001-1 (licor)	001-2 (sal)	001-2 (licor)	001-3 (sal)	001-3 (licor)
IMP 1	0,62	4,35	0,13	0,03	0,35	0,02	0,25	0,02	0,31
IMP 2	0,64	4,44	0,19	0,05	0,5	0,04	0,36	0,04	0,47
IMP 3	0,69	4,81	0,31	0,07	0,78	0,05	0,56	0,06	0,71
IMP 4	0,91	6,34	1,22	0,95	2,9	1,01	2,61	0,99	3,23
HETrE	1	6,97	97,3	97,07	83,05	97,09	82,77	97,11	82,61
IMP 5	1,03	7,2	0	0,11	0,8	0,1	0,89	0,12	1,09
IMP 6	1,1	7,7	1,5	1,48	1,54	1,45	1,54	1,48	1,57
IMP 7	1,75	12,25	desconocida	0,1	2,87	0,1	3,3	0,11	3,56
	RRT	Tiempo de retención	Área de picos (%)	001-4 (sal)	001-4 (licor)	001-5 (sal)	001-5 (licor)	001-6 (sal)	001-6 (licor)
IMP 1	0,62	4,35	0,13	0,03	0,42	0,03	-	0,03	0,19
IMP 2	0,64	4,44	0,19	0,04	0,51	0,05	-	0,04	0,27
IMP 3	0,69	4,81	0,31	0,06	0,86	0,07	-	0,06	0,43
IMP 4	0,91	6,34	1,22	0,99	3,59	0,99	-	0,96	2,32
HETrE	1	6,97	97,3	97,07	82,13	96,77	-	97,17	86,91
IMP 5	1,03	7,2	0	0,12	1,17	0,12	-	0,12	0,62
IMP 6	1,1	7,7	1,5	1,47	1,7	1,46	-	1,42	1,67
IMP 7	1,75	12,25	desconocida	0,13	3,77	0,18	-	0,12	2,15
	RRT	Tiempo de retención	Área de picos (%)	001-7 (sal)	001-7 (licor)	001-8 (sal)	001-8 (licor)	001-9 (sal)	001-9 (licor)
IMP 1	0,62	4,35	0,13	0,03	0,4	0,02	0,33	0,02	0,43
IMP 2	0,64	4,44	0,19	0,05	0,43	0,04	0,51	0,05	0,64
IMP 3	0,69	4,81	0,31	0,05	0,67	0,05	0,75	0,06	0,92

	RRT	Tiempo de retención	Área de picos (%)	001-7 (sal)	001-7 (licor)	001-8 (sal)	001-8 (licor)	001-9 (sal)	001-9 (licor)
IMP 4	0,91	6,34	1,22	1,07	2,65	0,96	2,9	1,01	3,07
HETrE	1	6,97	97,3	96,83	81,04	97,1	83,39	96,92	80,24
IMP 5	1,03	7,2	0	0,12	1,17	0,12	0,86	0,12	1,06
IMP 6	1,1	7,7	1,5	1,48	1,62	1,44	1,62	1,48	1,6
IMP 7	1,75	12,25	desconocida	0,13	4,08	0,11	3,36	0,13	4,08

	RRT	Tiempo de retención	Área de picos (%)	001-10 (sal)	001-10 (licor)
IMP 1	0,62	4,35	0,13	0,03	0,42
IMP 2	0,64	4,44	0,19	0,07	0,59
IMP 3	0,69	4,81	0,31	0,07	0,82
IMP 4	0,91	6,34	1,22	0,99	3,1
HETrE	1	6,97	97,3	96,8	79,64
IMP 5	1,03	7,2	0	0,11	1,01
IMP 6	1,1	7,7	1,5	1,46	1,68
IMP 7	1,75	12,25	desconocida	0,18	3,43

Ejemplo 12: Investigación del metanol como codisolvente

En función de los resultados del Ejemplo 11, se investigaron las proporciones de metanol con acetato etílico o acetato isopropílico para determinar sus efectos en la producción del 15-(S)-HETrE, según se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13

Exp. nº	Disolvente (no polar)	Disolvente (polar)	Proporción
009-1	Acetato etílico	metanol	90:10
009-2	Acetato etílico	metanol	85:15
009-3	Acetato etílico	metanol	80:20
009-4	Acetato isopropílico	metanol	90:10
009-5	Acetato isopropílico	metanol	85:15
009-6	Acetato isopropílico	metanol	80:20

Los resultados de las reacciones se compendian en la Tabla 14.

Tabla 14

Exp. n°	Peso de la torta (mg)	Pureza de la torta (%)	Pureza del filtrado (%)	Tiempo aproximado de filtración (minutos)	Aspecto de la torta de filtro	Movilidad de la suspensión espesa	Drenaje
009-1	876*	96,69	78,09	30	W, P	4	3
009-2	996	96,73	79,28	35	W, P	4	3
009-3	999	96,66	77,39	35	W, P	4	3
009-4	943	96,66	79,23	30	W, P	4	3
009-5	1000	96,41	79,38	35	W, P	4	3
009-6	987	96,51	76,69	30	W, P#	4	3

*= reacción filtrada a través de un filtro mayor inicialmente pero transferida a un embudo menor sinterizado.

#= la torta tenía características duras y amarillas en el borde de la torta.

Tiempo de filtración: tiempo que lleva a la torta alcanzar el estado semiseco, no mojado

Aspecto de la torta de filtro: aspecto de la torta después de secar, w=blanca, y=amarilla (color de la torta), H=dura, P=pulverulenta

Movilidad de la suspensión espesa: 1 = rala, muy móvil, 2 = de espesor medio, móvil, 3 = espesa, pero transferencia fundamentalmente antes del enjuague, 4 = espesa, no fácilmente transferible, 5 = muy espesa, ningún flujo sin más diluyente

Drenaje (filtración de succión): 1 = fácil, 2 = medio, 3 = difícil, 4 = ninguno

5 Los perfiles de impurezas de la sal de lisina y las porciones de licor de los experimentos se compendian en la Tabla 15.

Tabla 15. Perfiles de impurezas

	RRT	Tiempo retención de	Área de picos (%)	009-1 (sal)	009-1 (licor)	009-2 (sal)	009-2 (licor)	009-3 (sal)	009-3 (licor)
IMP 1	0,62	4,35	0,13	0,04	0,15	0,03	0,17	0,04	0,19
IMP 2	0,64	4,44	0,19	0,09	0,49	0,09	0,49	0,09	0,52
IMP 3	0,69	4,81	0,31	0,11	1,13	0,11	1,14	0,11	1,23
IMP 4	0,91	6,34	1,22	1,04	2,46	0,98	2,55	1,01	2,52
HETrE	1	6,97	97,3	96,69	78,09	96,73	79,28	96,66	77,39

	RRT	Tiempo de retención	de	Área de picos (%)	009-1 (sal)	009-1 (licor)	009-2 (sal)	009-2 (licor)	009-3 (sal)	009-3 (licor)
IMP 5	1,03	7,2		0	0,14	0,85	0,14	0,88	0,15	0,87
IMP 6	1,1	7,7		1,5	1,42	1,36	1,39	1,47	1,39	1,37
IMP 7	1,75	12,25		desconocida	0,23	4,44	0,25	4,24	0,26	4,45
	RRT	Tiempo de retención	de	Área de picos (%)	009-4 (sal)	009-4 (licor)	009-5 (sal)	009-5 (licor)	009-6 (sal)	009-6 (licor)
IMP 1	0,62	4,35		0,13	0,04	0,22	0,05	0,23	0,03	0,32
IMP 2	0,64	4,44		0,19	0,13	0,49	0,13	0,51	0,04	0,52
IMP 3	0,69	4,81		0,31	0,14	1,1	0,07	1,17	0,14	1,18
IMP 4	0,91	6,34		1,22	1,01	2,54	0,99	2,57	1,06	2,61
HETrE	1	6,97		97,3	96,66	79,23	96,41	79,38	96,51	76,69
IMP 5	1,03	7,2		0	0,14	0,89	0,12	0,84	0,14	1,14
IMP 6	1,1	7,7		1,5	1,39	1,56	1,46	1,5	1,39	1,46
IMP 7	1,75	12,25		desconocida	0,2	4,43	0,18	4,28	0,31	4,84

Ejemplo 13. Proporción entre lisina y 15-(S)-HETrE

Se investigó el efecto de la proporción entre lisina y 15-(S)-HETrE usando el protocolo del Ejemplo 11. En la Tabla 16 se muestran las proporciones iniciales de lisina y 15-(S)-HETrE usadas.

5

Tabla 16

Reacción nº	Disolvente (no polar)	Disolvente (polar)	Proporción	Lisina (% molar)
013-1	Acetato etílico	Metanol	85:15	97,5
013-2	Acetato etílico	Metanol	85:15	95
013-3	Acetato isopropílico	Metanol	85:15	97,5
013-4	Acetato isopropílico	Metanol	85:15	95
013-5	Acetato etílico	Metanol	80:20	97,5
013-6	Acetato etílico	Metanol	80:20	95

Los resultados de las seis reacciones están compendiados en la Tabla 17.

Tabla 17

Reacción nº	Peso de la torta (mg)	Pureza de la torta (%)	Pureza del filtrado (%)	Tiempo aproximado de filtración (minutos)	Aspecto de la torta de filtro	Movilidad de la suspensión espesa	Drenaje
013-1	972	96,43	85,66	30	W, P	4	3
013-2	975	96,67	86,41	35	W, P	4	3
013-3	1011	96,83	86,73	35	W, P	4	3
013-4	926	96,61	87,31	35	W, P	4	3
013-5	934	96,61	86,00	30	W, P	4	3
013-6	827	96,47	85,85	35	W, P	4	3

Tiempo de filtración: tiempo que lleva a la torta alcanzar el estado semiseco, no mojado

Aspecto de la torta de filtro: aspecto de la torta después de secar, w=blanca, y=amarilla (color de la torta), H=dura, P=pulverulenta

Movilidad de la suspensión espesa: 1 = rala, muy móvil, 2 = de espesor medio, móvil, 3 = espesa, pero transferencia fundamentalmente antes del enjuague, 4 = espesa, no fácilmente transferible, 5 = muy espesa, ningún flujo sin más diluyente

La proporción final entre lisina y 15-(S)-HETrE fue determinada por RMN, según se muestra en la Tabla 18.

Tabla 18

Reacción nº	Pico de lisina	Pico a 5,6 ppm	Diferencia	Pico a 6 ppm	Diferencia
013-1	1	0,9604	-0,00785	0,9435	-0,00335
013-2	1	0,9653	-0,00295	0,9426	-0,00425
013-3	1	0,9726	0,00435	0,9591	0,01225
013-4	1	0,9973	0,02905	0,9528	0,00595
013-5	1	0,958	-0,01025	0,9478	0,00095
013-6	1	0,9559	-0,01235	0,9353	-0,01155
media =		0,96825		0,94685	

En la Tabla 19 se muestran los perfiles de impurezas para las seis reacciones.

5

Tabla 19. Perfiles de impurezas

	RRT	Tiempo retención de	Área de picos (%) de	013-1 (sal)	013-1 (licor)	013-2 (sal)	013-2 (licor)	013-3 (sal)	013-3 (licor)
IMP 1	0,62	4,35	0,20	0,06	0,18	0,06	0,16	0,05	0,18
IMP 2	0,64	4,44	0,125	0,1	1,44	0,10	1,49	0,03	0,92

	RRT	Tiempo de retención	de Área de picos (%)	de 013-1 (sal)	013-1 (licor)	013-2 (sal)	013-2 (licor)	013-3 (sal)	013-3 (licor)
IMP 3	0,69	4,81	0,27	0,6	1,44	0,06	1,48	0,04	1,42
IMP 4	0,91	6,34	1,30	1,11	2,73	1,04	2,88	1,04	2,82
HETrE	1	6,97	95,67	96,43	85,66	96,67	86,41	96,83	86,73
IMP 5	1,03	7,2	0	0,14	0,97	0,14	0,92	0,13	0,93
IMP 6	1,1	7,7	1,44	1,41	1,39	1,40	1,46	1,4	1,49
IMP 7	1,75	12,25	0,55	0,25	3,97	ND	3,22	0,16	2,69

	RRT	Tiempo de retención	de Área de picos (%)	de 013-4 (sal)	013-4 (licor)	013-5 (sal)	013-5 (licor)	013-6 (sal)	013-6 (licor)
IMP 1	0,62	4,35	0,20	0,05	0,28	0,05	0,3	0,09	0,45
IMP 2	0,64	4,44	0,125	0,09	0,92	0,09	0,98	0,11	1,66
IMP 3	0,69	4,81	0,27	0,05	1,27	0,05	1,3	0,09	1,65
IMP 4	0,91	6,34	1,30	1,05	2,84	1,02	2,81	1,00	2,88
HETrE	1	6,97	95,67	96,61	87,31	96,61	86,00	96,47	85,85
IMP 5	1,03	7,2	0	0,13	0,89	0,13	0,92	0,14	0,86
IMP 6	1,1	7,7	1,44	1,37	1,53	1,32	1,32	1,31	1,43
IMP 7	1,75	12,25	0,55	0,18	2,05	0,21	3,04	0,25	2,72

Ejemplo 14. Eliminación de DGLA en condiciones de formación de sal de 15-(S)-HETrE

Para determinar si las condiciones de formación de sal podían purgar simultáneamente el DGLA residual de la mezcla de reacción, se dopó el 15-(S)-HETrE con cantidades de DGLA en diversos sistemas de disolventes según la Tabla 20 antes de la adición de lisina metanólica según el Ejemplo 11.

5

Tabla 20

Reacción nº	Disolvente (no polar)	Disolvente (polar)	Proporción	DGLA (% en peso)
017-1	Acetato etílico	Metanol	85:15	1,25
017-2	Acetato etílico	Metanol	85:15	2,5
017-3	Acetato etílico	Metanol	85:15	5
017-4	Acetato isopropílico	Metanol	85:15	1,25

Reacción nº	Disolvente (no polar)	Disolvente (polar)	Proporción	DGLA (% en peso)
017-5	Acetato <i>isopropílico</i>	Metanol	85:15	2,5
017-6	Acetato <i>isopropílico</i>	Metanol	85:15	5

Los resultados de las seis reacciones se compendian en la Tabla 21.

Tabla 21

Reacción nº	Peso de la torta (mg)	Pureza de la torta (%)	Pureza del filtrado (%)	Tiempo aproximado de filtración (minutos)	Aspecto de la torta de filtro	Movilidad de la suspensión espesa	Drenaje
017-1	868	96,26	84,49	35	W, P	4	3
017-2	928	96,42	81,55	35	W, P	4	3
017-3	880	96,36	85,09	35	W, P	4	3
017-4	957	95,70	85,79	30	W, P	4	3
017-5	945	95,67	83,93	30	W, P	4	3
017-6	976	95,92	83,05	35	W, P	4	3

Tiempo de filtración: tiempo que lleva a la torta alcanzar el estado semiseco, no mojado

Aspecto de la torta de filtro: aspecto de la torta después de secar, w=blanca, y=amarilla (color de la torta), H=dura, P=pulverulenta

Movilidad de la suspensión espesa: 1 = rala, muy móvil, 2 = de espesor medio, móvil, 3 = espesa, pero transferencia fundamentalmente antes del enjuague, 4 = espesa, no fácilmente transferible, 5 = muy espesa, ningún flujo sin más diluyente

La proporción final entre lisina y 15-(S)-HETrE fue determinada por RMN, según se muestra en la Tabla 22.

5

Tabla 22

Reacción nº	Pico de lisina	Pico a 5,6 ppm	Diferencia	Pico a 6 ppm	Diferencia
017-1	1	0,9469	0,009916667	0,9338	0,009116667
017-2	1	0,9326	-0,004383333	0,9216	-0,003083333
017-3	1	0,9266	-0,010383333	0,9093	-0,015383333
017-4	1	0,9482	0,011216667	0,9366	0,011916667
017-5	1	0,9407	0,003716667	0,9245	-0,000183333
017-6	1	0,9269	-0,010083333	0,9223	-0,002383333
media =		0,936983333		0,924683333	

En la Tabla 23 se muestran los datos de impurezas para las seis reacciones.

Tabla 23. Datos de impurezas

	RRT	Tiempo de retención	Área de picos (%)	017-1 (sal)	017-1 (licor)	017-2 (sal)	017-2 (licor)	017-3 (sal)	017-3 (licor)
IMP 1	0,62	4,35	0,20	0,04	0,18	0,05	0,22	0,04	0,18
IMP 2	0,64	4,44	0,12	0,15	21,4	0,16	2,55	0,13	2,20
IMP 3	0,69	4,81	0,27	0,22	2,07	0,22	2,44	0,21	2,14
IMP 4	0,91	6,34	1,30	1,07	2,78	1,08	2,89	1,01	2,86
HETrE	1	6,97	95,67	96,29	84,49	96,42	81,55	96,36	85,09
IMP 5	1,03	7,2	0	0,09	0,84	0,07	1,07	0,07	0,78
IMP 6	1,1	7,7	1,44	1,49	1,65	1,62	1,63	1,62	1,65
IMP 7	1,75	12,25	0,55	0,21	2,95	0,17	3,51	0,17	2,32

	RRT	Tiempo de retención	Área de picos (%)	017-4 (sal)	017-4 (licor)	017-5 (sal)	017-5 (licor)	017-6 (sal)	017-6 (licor)
IMP 1	0,62	4,35	0,20	0,06	0,28	0,06	0,37	0,06	0,34
IMP 2	0,64	4,44	0,125	0,10	3,52	0,31	4,12	0,20	4,17
IMP 3	0,69	4,81	0,27	0,24	3,39	0,30	3,95	0,30	3,98
IMP 4	0,91	6,34	1,30	1,34	2,92	1,11	3,21	1,03	3,18
HETrE	1	6,97	95,67	95,70	85,79	95,67	83,93	95,92	83,01
IMP 5	1,03	7,2	0	0,08	0,77	0,10	0,95	0,07	0,93
IMP 6	1,1	7,7	1,44	1,62	1,71	1,76	1,56	1,57	1,58
IMP 7	1,75	12,25	0,55	0,23	0,2	0,06	0,03	0,17	0,04

El contenido de DGLA de la sal de lisina de 15-(S)-HETrE fue determinado por CAD, según se muestra en la Tabla 24.

5

Tabla 24. Contenido de DGLA de la sal de lisina de 15-(S)-HETrE

Reacción nº	DGLA añadido (p/p)	Conc. de la muestra (mg/mL)	Área de picos	DGLA (determinado) en la sal (p/p)
DGLA		0,1625	3449760	

Reacción nº	DGLA añadido (p/p)	Conc. de la muestra (mg/mL)	Área de picos	DGLA (determinado) en la sal (p/p)
017-1	1,25	1,51	244710	0,76
017-2	2,5	1,5	448768	1,41
017-3	5	1,47	954206	3,06
017-4	1,25	1,49	233803	0,74
017-5	2,5	1,63	523225	1,51
017-6	5	1,59	1003375	2,97

Ejemplo 15. Experimentos de resuspensión

5 Se realizó un experimento para determinar si la proporción entre 15-(S)-HETrE y lisina cambiaría después de la exposición a acetato etílico. Se suspendió sal de lisina de 15-(S)-HETrE (100 mg) en acetato etílico (1 mL) de calidad HPLC y se la agitó vigorosamente durante la noche a temperatura ambiente. A continuación, la suspensión fue filtrada según se ha descrito en ejemplos anteriores. En la Tabla 25 se muestran los perfiles de impurezas de la sal de lisina de 15-(S)-HETrE inicial (“antes de la resuspensión”) y de la sal filtrada suspendida (“después de la resuspensión”).

Tabla 25

	RRT	Tiempo de retención	Antes de la resuspensión	Después de la resuspensión
IMP 1	0,62	4,35	0,04	0,16
IMP 2	0,64	4,44	0,09	0,39
IMP 3	0,69	4,81	0,11	0,16
IMP 4	0,91	6,34	1,01	1,08
HETrE	1	6,97	96,66	95,69
IMP 5	1,03	7,2	0,15	0,07
IMP 6	1,1	7,7	1,39	1,47
IMP 7	1,75	12,25	0,26	0,11

10 La espectroscopia de RMN confirmó la ausencia de cambio en la proporción entre 15-(S)-HETrE y lisina.

Ejemplo 16. Degradación de la sal de lisina de 15-(S)-HETrE inducida por disolventes

15 Experimento para determinar la degradación de la sal de lisina de 15-(S)-HETrE, en caso de que la haya, cuando es puesta en contacto con acetato etílico o metanol. Se disolvió sal de lisina de 15-(S)-HETrE (100 mg) en disolvente (1 mL) y se la agitó durante la noche. En la Tabla 26 se muestra el análisis por UPLC de las mezclas resultantes comparado con la sal de lisina de 15-(S)-HETrE original.

Tabla 26

	RRT	Tiempo de retención	Área de picos (%)	En metanol	En acetato etílico
IMP 1	0,62	4,35	0,20	0,03	0,05
IMP 2	0,64	4,44	0,12	0,24	0,86
IMP 3	0,69	4,81	0,27	0,45	0,96
IMP 4	0,91	6,34	1,30	1,16	1,30
HETrE	1	6,97	95,67	95,40	94,20
IMP 5	1,03	7,2	0	0,13	0,29
IMP 6	1,1	7,7	1,44	1,34	1,35
IMP 7	1,75	12,25	0,55	0,31	0,14

Ejemplo 17. Tiempo de la siembra

Se realizaron experimentos para determinar el momento para la adición eficaz de la semilla. Se efectuaron dos experimentos similares al Ejemplo 11. Se añadió 15-(S)-HETrE disuelto en acetato etílico como un porcentaje de la carga total de acetato etílico (véase la Tabla 27), y se lo añadió a una suspensión en agitación de hidrato de lisina (399 ± 2 mg) en metanol (1,2 mL) y se observó durante un periodo de tiempo.

Tabla 27

Experimento	15-(S)-HETrE (% de carga)
1	10
2	20

En cada uno de los Experimentos 1 y 2, la adición de una solución de 15-(S)-HETrE a la suspensión de lisina creó una suspensión viscosa no móvil.

10 Ejemplo 18. Preparación de éster metílico de 15-(S)-HETrE

Se preparó éster metílico de 15-(S)-HETrE combinando 15-(S)-HETrE (100 mg), carbonato potásico (129 mg, 3 equiv.) y yoduro metílico (220 mg, 5 equiv.) en DMF (0,5 mL). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 18 horas. Tras el apagado con agua (5 mL), la fase orgánica fue extraída con MtBE (2 × 5 mL) y las fases orgánicas combinadas fueron lavadas con salmuera (5 mL), secadas y concentradas.

15 Ejemplo 19. Preparación de la sal de lisina de 15-(S)-HETrE

Se efectuó una serie de experimentos para determinar diversos parámetros del procedimiento.

Reacción 021-A: L-Lisina suspendida en metanol

Se suspendió monohidrato de L-lisina (798 ± 2 mg) en metanol desgasificado (3,2 mL) en un matraz de fondo redondo (RBF) de 3 bocas de 50 mL lleno de nitrógeno. Se disolvió 15-(S)-HETrE (1606 ± 2 mg) en acetato etílico desgasificado (12,8 mL) y se lo añadió a la suspensión en agitación de lisina. Subsiguientemente, se añadió semilla (100 mg) y se agitó a 250 rpm durante la noche. La suspensión fue filtrada bajo nitrógeno a través de un embudo de vidrio sinterizado de tamaño 3 (40 mm de diámetro) y lavada con porciones de acetato etílico (12 mL, 3 × 4 mL).

Reacción 021-B: L-lisina suspendida en acetato etílico

Se suspendió monohidrato de L-lisina (798 ± 2 mg) en acetato etílico desgasificado (12,8 mL) en un RBF de 3 bocas de 50 mL lleno de nitrógeno. Se disolvió 15-(S)-HETrE (1606 ± 2 mg) en metanol desgasificado (3,2 mL) y se lo añadió a la suspensión en agitación de lisina. Subsiguientemente, se añadió semilla (100 mg) y se agitó a 250 rpm durante

la noche. La suspensión fue filtrada bajo nitrógeno a través de un embudo de vidrio sinterizado de tamaño 3 (40 mm de diámetro) y lavada con porciones de acetato etílico (12 mL, 3 × 4 mL).

Reacción 021-C: Adición de 15-(S)-HETrE caliente

5 Se llevó a cabo un experimento como el anterior, salvo que la solución de 15-(S)-HETrE fue calentada hasta 45°C antes de la adición a la suspensión de lisina.

Reacción 021-D: Adición de 15-(S)-HETrE a la suspensión de lisina caliente

10 Se llevó a cabo un experimento como anteriormente, salvo que la solución de lisina fue calentada hasta 45°C durante 15 minutos para equilibrarse antes de que se añadiera la solución de 15-(S)-HETrE. A continuación, se añadió la semilla (100 mg), y la mezcla fue agitada durante 5 minutos y se la dejó enfriar hasta la temperatura ambiente en el baño de aceite.

Reacción 021-E: Ausencia de la adición de semilla

Se llevó a cabo un experimento idéntico al de la Reacción 021-D, salvo que no se añadió la semilla.

Reacción 021-F: Ciclo adicional de temperaturas

15 Se repitió la Reacción 021-E con un ciclo adicional de temperaturas como sigue: después de que se produjera la formación de sal a 45°C, la mezcla fue enfriada hasta 20°C, luego recalentada hasta 45°C y mantenida durante 2 horas. El enfriamiento final hasta 20°C se produjo durante la noche.

Reacción 021-G: Tiempo adicional de agitación

Se repitió la Reacción 021-E, salvo que la mezcla fue enfriada de 45°C a 20°C y agitada durante 6 horas antes de la recogida de la sal de lisina de 15-(S)-HETrE.

20 En la Tabla 28 se muestran los resultados de las Reacciones 021-A a 021-G.

Tabla 28

Reacción n°	Proporción	Peso de la torta (mg)	Pureza de la torta (%)	Pureza del filtrado (%)	Tiempo aproximado de filtración (minutos)	Aspecto de la torta de filtro	Movilidad de la suspensión espesa
021-A	80:20	1672	95,34	15	W, P	4	3
021-B	80:20	1587	95,24	15	Y,H (W,P cuando se rompió la torta)	4	3
021-C	80:20	1509	94,99	15	Y,H (W,P cuando se rompió la torta)	4	3
021-D	80:20	1678	95,06	10-12	W,P	2 (la suspensión espesa podía ser vertida desde el RBF)	2
021-E	80:20	1627	95,21	10-12	Y,H (W,P cuando se rompió la torta)	2	2
021-F	80:20	1498	94,20	10-12	Y,H (W,P cuando se rompió la torta)	2	2
021-G	80:20	1680	94,94	15	W,P (corteza amarilla)	2	2

La proporción entre la lisina y el 15-(S)-HETrE fue determinada por RMN, según se muestra en la Tabla 29.

Tabla 29

Reacción nº	Pico de lisina	Pico a 5,6 ppm	Diferencia	Pico a 6 ppm	Diferencia
021-A	1	0,9454	0,0157	0,9034	0,00054
021-B	1	0,9581	0,0284	0,9221	0,01924
021-C	1	0,8764	-0,0533	0,8629	-0,03996
021-D	1	0,9249	-0,0048	0,9154	0,01254
021-E	1	0,915	-0,0147	0,8928	-0,01006
021-F	1	0,92	-0,0097	0,9016	-0,00126
021-G	1	0,9681	0,9681	0,9218	0,92180
media =		0,9297		0,902857143	

En la Tabla 30 se muestran los perfiles de impurezas de cada reacción.

Tabla 30. Perfiles de impurezas

	RRT	Tiempo de retención	Área de picos (%)	021-A	021-B	021-C	021-D	021-E	021-F	021-G (sal)	021-G (licor)
IMP 1	0,62	4,35	0,12	0,17	0,22	0,24	0,19	0,17	0,27	ND	0,74
IMP 2	0,64	4,44	0,51	0,08	0,12	0,10	0,08	0,18	0,20	0,24	1,38
IMP 3	0,66	4,64	0,89	0,33	0,44	0,40	0,38	0,44	0,55	0,52	3,57
IMP 4	0,69	4,81	0,13	0,18	0,22	0,23	0,21	0,18	0,28	0,26	0,57
IMP 5	0,72	4,99	1,29	0,19	0,24	0,2	0,19	0,31	0,44	0,46	3,94
IMP 6	0,85	5,92	0,16	0,08	0,08	0,13	0,09	0,08	0,12	0,08	0,57
IMP 7	0,91	6,34	1,17	1,06	0,75	0,95	1,08	0,98	0,96	1,01	1,91
IMP 8	0,98	6,84	0,29	0,09	0,29	0,16	0,11	0,14	0,14	0,89	0,51
HETrE	1	6,97	91,38	95,34	95,24	94,99	95,06	95,21	94,20	94,94	69,51
IMP 9	1,03	7,32	0,18	0,15	0,13	0,14	0,16	0,16	0,15	0,16	0,85
IMP 10	1,1	7,41	0,23	1,41	1,32	1,26	1,39	1,24	1,30	1,36	1,00
IMP 11	1,75	12,25	0,88	0,18	0,11	0,23	0,25	0,25	0,38	0,31	6,63

5

La sal preparada en la Reacción 021-D (400 mg) fue resuspendida en acetato etílico/metanol (80/20, 2 mL) en las condiciones siguientes:

021-D-A: agitada durante 6 horas a 20°C.

021-D-B: agitada mientras aumentaba la temperatura de 20°C a 45°C, luego agitada durante 2 horas a 45°C antes de enfriarse hasta 20°C (tiempo total de agitación: 6 horas).

En las Tablas 31 y 32 se muestran los datos de RMN y de impurezas, respectivamente.

5

Tabla 31

Reacción	Pico de lisina	Pico a 5,6 ppm	Diferencia	Pico a 6 ppm	Diferencia
021-D-A	1	1,1043	0,03065	03,9818	-0,00765
021-D-B	1	1,043	-0,03065	0,9971	0,00765
Media =		1,07365		0,98945	

Tabla 32

	RRT	Tiempo de retención	Área de picos (%) 021-D	021-D-A	021-D-B
IMP 1	0,62	4,35	0,19	0,22	0,22
IMP 2	0,64	4,44	0,08	0,05	0,05
IMP 3	0,66	4,64	0,38	0,36	0,35
IMP 4	0,69	4,81	0,21	0,23	0,21
IMP 5	0,72	4,99	0,19	0,11	0,10
IMP 6	0,85	5,92	0,09	0,08	0,08
IMP 7	0,91	6,34	1,08	1,09	1,04
IMP 8	0,98	6,84	0,11	0,09	0,09
HETrE	1	6,97	95,06	95,50	95,64
IMP 9	1,03	7,32	0,16	0,16	0,16
IMP 10	1,1	7,41	1,39	1,42	1,37
IMP 11	1,75	12,25	0,25	0,16	0,18

Se repitieron las Reacciones 021-D y 021-E, con filtración de la sal final llevada a cabo usando un filtro presurizado. En las Tablas 33-35 se muestran la producción y la pureza de la sal, datos de RMN y perfiles de impurezas, respectivamente.

10

Tabla 33

Experimento	Peso de la torta (mg)	Pureza de la torta (%)	Tiempo aproximado de filtración (minutos)	Aspecto de la torta de filtro	Movilidad de la suspensión espesa	Drenaje
029-A	1795	94,10	15	Y, H (polvo blanco cuando es molida)	2	2
029-B	1933	93,83	15	Y, H (polvo blanco cuando es molida)	2	2

Tabla 34

Experimento	Pico de lisina	Pico a 5,6 ppm	Diferencia	Pico a 6 ppm	Diferencia
029-A	1	1,0165	0,00035	0,9869	-0,00070
029-B	1	1,0158	-0,00035	0,9883	0,00070
media =		1,01615		0,9876	

Tabla 35

	RRT	Tiempo de retención	Área de picos (%)	029-A (sal)	029-A (licor)	029-B (sal)	029-B (licor)
IMP 1	0,62	4,35	0,12	0,23	0,93	0,27	0,93
IMP 2	0,64	4,44	0,51	0,32	1,37	0,29	1,37
IMP 3	0,66	4,64	0,89	0,67	3,67	0,74	3,73
IMP 4	0,69	4,81	0,13	0,24	0,99	0,29	0,99
IMP 5	0,72	4,99	1,29	0,77	3,97	0,33	3,78
IMP 6	0,85	5,92	0,16	0,02	1,01	0,02	0,96
IMP 7	0,91	6,34	1,17	1,05	1,93	1,06	1,95
IMP 8	0,98	6,84	0,29	0,26	0,65	0,21	0,65
HETrE	1	6,97	91,38	94,10	65,65	93,83	66,17
IMP 9	1,03	7,32	0,18	0,19	0,13	0,18	0,13
IMP 10	1,1	7,41	1,41	1,42	1,26	1,34	1,36
IMP 11	1,75	12,25	0,88	0,36	6,99	0,01	6,92

Ejemplo 20. Disolventes de lavado

- 5 Se realizó un experimento para determinar los efectos de diferentes disolventes de lavado (véase la Tabla 36) sobre la producción y la pureza de la sal de lisina de 15-(S)-HETrE.

Tabla 36

Experimento	Disolvente de lavado	Peso de la torta (mg)	Pureza de la torta (%)	Tiempo aproximado de filtración (minutos)	Aspecto de la torta de filtro	Movilidad de la suspensión espesa	Drenaje
023-A	Acetato etílico:metanol (80/20)	777	94,32	10	Y, H (polvo blanco cuando es molida)	2	2
023-B	Acetato etílico	826	94,10	10	Y, H (polvo blanco cuando es molida)	2	2
023-C	metanol	760	94,34	10	Y, H (polvo blanco cuando es molida)	2	2

En las Tablas 37 y 38 se muestran datos de RMN y de impurezas, respectivamente.

Tabla 37

Experimento	Pico de lisina	Pico a 5,6 ppm	Diferencia	Pico a 6 ppm	Diferencia
023-A	1	1,0124	0,000933333	0,9814	-0,00707
023-B	1	1,0104	-0,001066667	0,9965	0,00803
023-C	1	1,0116	0,000133333	0,9875	-0,00097
media =		1,011466667		0,988466667	

5

Tabla 38

	RRT	Tiempo de retención	Área de picos (%)	023-A	023-B	023-C
IMP 1	0,62	4,35	0,12	0,01	0,01	0,01
IMP 2	0,64	4,44	0,51	0,38	0,38	0,38
IMP 3	0,66	4,64	0,89	0,66	0,65	0,62
IMP 4	0,69	4,81	0,13	0,40	0,40	0,40
IMP 5	0,72	4,99	1,29	0,48	0,48	0,51
IMP 6	0,85	5,92	0,16	0,03	0,02	0,04
IMP 7	0,91	6,34	1,17	1,00	1,07	1,18
IMP 8	0,98	6,84	0,29	0,23	0,21	0,21

	RRT	Tiempo de retención	Área de picos (%)	023-A	023-B	023-C
HETrE	1	6,97	91,38	94,32	94,10	94,34
IMP 9	1,03	7,32	0,18	0,18	0,18	0,19
IMP 10	1,1	7,41	1,41	1,4	1,40	1,49
IMP 11	1,75	12,25	0,88	0,33	0,47	0,52

Ejemplo 21. Acetato *isopropílico*

Se realizó un experimento para examinar si se observaría cualquier degradación tras exponer el 15-(S)-HETrE a acetato *isopropílico*. Se disolvió 15-(S)-HETrE (100 mg) en acetato *isopropílico* (1 mL) y se agitó durante la noche. Esto fue muestreado directamente para un análisis por UPLC (Tabla 39).

5

Tabla 39

	RRT	Tiempo de retención	Área de picos (%)	Ejemplo 26
IMP 1	0,62	4,35	0,12	0,22
IMP 2	0,64	4,44	0,51	1,48
IMP 3	0,66	4,64	0,89	1,47
IMP 4	0,69	4,81	0,13	0,19
IMP 5	0,72	4,99	1,29	3,02
IMP 6	0,85	5,92	0,16	0,43
IMP 7	0,91	6,34	1,17	1,56
IMP 8	0,98	6,84	0,29	0,62
HETrE	1	6,97	91,38	85,56
IMP 9	1,03	7,32	0,18	0,28
IMP 10	1,1	7,41	1,41	1,79
IMP 11	1,75	12,25	0,88	1,14

Ejemplo 22. Formaciones de sal de lisina de 15-(S)-HETrE semipurificado y en bruto

Se realizó un experimento para determinar el impacto de la formación de sal sobre la pureza del material de partida de 15-(S)-HETrE. La cantidad de lisina usada se ajustó en función de la pureza del 15-(S)-HETrE determinada mediante análisis por UPLC. Se cargó 15-(S)-HETrE (10 g) en una columna prehumectada y se eluyó con ciclohexano:MtBE (50:50) (350 mL) hasta que ya no era evidente la mancha de 15-(S)-HETrE por TLC. Se concentraron las fracciones relevantes. En la Tabla 40 se muestran datos de producción y pureza; en las Tablas 41-42 se muestran los perfiles de RMN e impurezas, respectivamente.

10

15

Tabla 40

Experimento	15-(S)-HETrE	Peso de la torta (mg)	Pureza de la torta (%)	Tiempo aproximado de filtración (minutos)	Aspecto de la torta de filtro	Movilidad de la suspensión espesa	Drenaje
027-A	Bruto (91,6% de pureza)	1896	94,75	7	Y, H (polvo blanco cuando es molida)	2	1
027-B	Semipurificado (92,3% de pureza)	1820	95,37	15	Y, H (polvo blanco cuando es molida)	2	2

Tabla 41

Experimento	Pico de lisina	Pico a 5,6 ppm	Diferencia	Pico a 6 ppm	Diferencia
027-A	1	1,0014	-0,0082	0,994	-0,01140
027-B	1	1,0178	0,0082	1,0168	0,01140
media =		1,0096		1,0054	

Tabla 42

	RRT	Tiempo de retención	Área de picos (bruta), %	027-A (sal)	027-A (licor)	Área de picos (semipura), %	027-B (sal)	027-B (licor)
IMP 1	0,62	4,35	0,05	0,07	0,52	0,09	0,03	0,26
IMP 2	0,64	4,44	0,05	0,05	0,34	0,10	0,05	0,2
IMP 3	0,66	4,64	0,55	0,57	15,68	0,63	0,24	18,84
IMP 4	0,69	4,81	0,13	0,17	0,63	0,14	0,12	0,62
IMP 5	0,72	4,99	0,15	0,15	0,84	0,1	0,27	0,14
IMP 6	0,85	5,92	0,84	0,14	17,40	0,08	0,09	21,78
IMP 7	0,91	6,34	1,18	1,09	0,95	1,09	1,14	0,56
IMP 8	0,98	6,84	0,05	0,01	0,98	0,01	0,01	0,02
HETrE	1	6,97	91,6	94,75	28,09	92,3	95,37	20,37
IMP 9	1,03	7,32	0,31	0,1	5,50	0,36	0,19	6,45
IMP 10	1,1	7,41	1,48	1,38	7,21	1,46	1,45	8,58
IMP 11	1,75	12,25	0,35	0,24	4,88	0,56	0,43	5,68

Ejemplo 23. Formación de sal a 0°C

Se suspendió monohidrato de L-lisina (820 mg) en acetato etílico (desgasificado, 3,2 mL) en un RBF de 25-mL y se calentó hasta 45°C. Se disolvió 15-(S)-HETrE (1606 ± 2 mg) en metanol (12,8 mL) y se añadió a la suspensión de lisina en agitación. Se dejó que la suspensión enfriara hasta la temperatura ambiente en un baño de aceite y, a continuación, el matraz fue transferido a un baño de agua y enfriado durante un periodo de tiempo hasta 0°C, después de lo cual fue agitado durante 2 horas adicionales. La sal fue recogida por filtración a presión y lavada con el agua madre. En la Tabla 43 se muestran los datos de producción y de rendimiento de la filtración.

Tabla 43

Peso de la torta (mg)	Pureza de la torta (%)	Tiempo aproximado de filtración (minutos)	Aspecto de la torta de filtro	Movilidad de la suspensión espesa	Drenaje
2009	No especificada	7-10	W,P (dura y amarilla pálida cuando se secó adicionalmente)	2	1

Ejemplo 24. Formación de sal en metanol o etanol

Se suspendió monohidrato de L-lisina (399 ± 2 mg) en 1,6 mL ya fuera de metanol (Reacción 031-A) o etanol (Reacción 031-B) en un vial de 20 mL de tapón a presión, se disolvió 15-(S)-HETrE (803 ± 2 mg) en el mismo alcohol (6,4 mL) y se lo añadió a la suspensión de lisina en agitación, y se agitó a 250 rpm durante la noche. No se observó formación alguna de sal en el sistema disolvente de metanol. La siembra con sal de un experimento anterior no indujo la formación de sal. La sal de lisina se formó en el sistema de etanol. En la Tabla 44 se muestran los datos de producción y pureza; en las Tablas 45-46 se muestran los perfiles de RMN e impurezas, respectivamente.

Tabla 44

Experimento	Disolvente	Peso de la torta (mg)	Pureza de la torta (%)	Tiempo aproximado de filtración (minutos)	Aspecto de la torta de filtro	Movilidad de la suspensión espesa	Drenaje
031-B	etanol	833	93,13	10	Y, H (polvo blanco cuando se tritura)	2	2

Tabla 45

Experimento	Pico de lisina	Pico a 5,6 ppm	Diferencia	Pico a 6 ppm	Diferencia
031-B	1	1,03	-	1,002	-

Tabla 46

	RRT	Tiempo de retención	Área de picos (%)	031-B (sal)	031-B (licor)
IMP 1	0,62	4,35	0,12	0,31	1,88
IMP 2	0,64	4,44	0,51	0,60	1,62
IMP 3	0,66	4,64	0,89	0,62	4,32
IMP 4	0,69	4,81	0,13	0,34	1,73
IMP 5	0,72	4,99	1,29	0,49	3,39
IMP 6	0,85	5,92	0,16	0,01	0,56

	RRT	Tiempo de retención	Área de picos (%)	031-B (sal)	031-B (licor)
IMP 7	0,91	6,34	1,17	1,01	1,76
IMP 8	0,98	6,84	0,29	0,02	0,27
HETrE	1	6,97	91,38	93,13	71,78
IMP 9	1,03	7,32	0,18	0,15	0,59
IMP 10	1,1	7,41	1,41	1,39	1,19
IMP 11	1,75	12,25	0,88	0,60	3,6

Ejemplo 25. Perfiles de impurezas de diversos materiales de partida de 15-(S)-HETrE

Se prepararon sales de lisina de 15-(S)-HETrE según un método coherente con el Ejemplo 11 de materiales de partida de 15-(S)-HETrE (abreviados "FA" a continuación) que tenían diversos niveles de impurezas. En la Tabla 47 se muestran los perfiles de impurezas de las sales de lisina resultantes (abreviadas "HLS" a continuación), determinados por UPLC.

5

Tabla 47. Perfiles de impurezas

	Tiempo de retención	FA purificadas	HLS-1	FA semipurificadas	HLS-2	FA brutas	HLS-3	Notas
IMP 1	4,35	0,01	0,04	0,01	0,03	0,05	0,07	
IMP 2	4,44	0,10	0,06	0,09	0,06	0,06	0,05	
IMP 3	4,64	0,16	0,09	0,10	0,11	0,62	0,56	
IMP 4	4,81	0,02	0,04	0,63	0,24	0,78	0,18	
IMP 5	4,89	0,01	0,03	0,01	0,02	0,14	0,17	
IMP 6	4,99	0,29	0,11	0,13	0,07	0,16	0,11	
IMP 7	5,44	-	-	0,02	0,04	0,06	0,01	(1)
IMP 8	5,53	-	-	0,06	0,03	0,07	0,05	(1)
IMP 9	5,92	0,14	0,02	0,79	0,27	0,84	0,14	(2)
IMP 10	6,34	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04	
IMP 11	6,46	1,3	1,04	1,14	1,13	1,22	1,09	
HETrE	6,97	95,37	96,69	92,28	94,27	91,63	94,61	
IMP 12	7,32	0,10	0,14	0,17	0,19	0,20	0,09	
IMP 13	7,41	0,10	0,05	0,37	0,15	0,42	0,10	(2)
IMP 14	7,78	1,43	1,42	1,48	1,44	1,49	1,38	

	Tiempo de retención	FA purificadas	HLS-1	FA semipurificadas	HLS-2	FA brutas	HLS-3	Notas
IMP 15	7,98	-	-	0,34	0,02	0,55	0,02	(1)
IMP 16	8,311	-	-	0,04	-	0,04	0,04	(1)
IMP 17	8,57	-	-	0,1	0,08	0,10	0,07	(1)
IMP 18	9,57	-	-	0,07	0,07	0,06	0,04	(1)
IMP 19	9,67	-	-	0,09	0,07	0,09	0,09	(1)
IMP 20	9,77	-	-	0,35	0,29	0,35	0,16	(1)
IMP 21	9,93	-	-	0,09	0,06	0,09	0,01	(1)
IMP 22	10,31	-	-	0,24	0,17	0,24	0,19	(1)
IMP 23	12,11	0,56	0,23	0,56	0,43	0,34	0,24	

Notas de la Tabla 47:

(1) Impureza que se purga durante la cromatografía en columna.

(2) Impureza que disminuyó en concentración tras la formación de sal.

Compuestos adicionales de la divulgación

Compuesto adicional 1: Una sal de un producto de 15-lipoxigenasa.

Compuesto adicional 2: La sal del Compuesto adicional 1, siendo la sal una sal farmacéuticamente aceptable.

- 5 Compuesto adicional 3: La sal del Compuesto adicional 1 o del Compuesto adicional 2, comprendiendo la sal una sal de lisina del producto de 15-lipoxigenasa.

Compuesto adicional 4: La sal de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 1-3, comprendiendo la sal una sal sódica del producto de 15-lipoxigenasa.

- 10 Compuesto adicional 5: La sal de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 1-4, comprendiendo la sal una sal de ornitina del producto de 15-lipoxigenasa.

Compuesto adicional 6: La sal de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 1-5, comprendiendo la sal una sal de piperazina del producto de 15-lipoxigenasa.

Compuesto adicional 7: La sal de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 1-6, comprendiendo la sal una sal de meglumina del producto de 15-lipoxigenasa.

- 15 Compuesto adicional 8: La sal de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 1-7 que, además, comprende el producto de 15-lipoxigenasa en forma de ácido libre.

Compuesto adicional 9: La sal de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 1-8, seleccionándose la sal del grupo constituido por: sodio, lisina, ornitina, piperazina, meglumina y combinaciones de los mismos.

Compuesto adicional 10: La sal de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 1-9, siendo la sal de sodio.

- 20 Compuesto adicional 11: La sal de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 1-9, siendo la sal de lisina.

Compuesto adicional 12: La sal de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 1-9, siendo la sal de ornitina.

Compuesto adicional 13: La sal de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 1-9, siendo la sal de piperazina.

Compuesto adicional 14: La sal de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 1-9, siendo la sal de meglumina.

- Compuesto adicional 15: La sal de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 1-14 en la que el producto de 15-lipoxigenasa se selecciona del grupo constituido por: 13-HODE, 15-HETrE, 15-OHEPA, 15-HETE y combinaciones de los mismos.
- 5 Compuesto adicional 16: La sal de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 1-15 en la que el producto de 15-lipoxigenasa es 13-HODE.
- Compuesto adicional 17: La sal de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 1-15 en la que el producto de 15-lipoxigenasa es 15-HETrE.
- Compuesto adicional 18: La sal de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 1-15 en la que el producto de 15-lipoxigenasa es 15-OHEPA.
- 10 Compuesto adicional 19: La sal de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 1-15 en la que el producto de 15-lipoxigenasa es 15-HETE.
- Compuesto adicional 20: Sal sódica del ácido 13-hidroperoxioctadeca-9Z,11E-dienoico.
- Compuesto adicional 21: Sal de lisina del ácido 13-hidroperoxioctadeca-9Z,11E-dienoico.
- Compuesto adicional 22: Sal de ornitina del ácido 13-hidroperoxioctadeca-9Z,11E-dienoico.
- 15 Compuesto adicional 23: Sal de piperazina del ácido 13-hidroperoxioctadeca-9Z,11E-dienoico.
- Compuesto adicional 24: Sal de meglumina del ácido 13-hidroperoxioctadeca-9Z,11E-dienoico.
- Compuesto adicional 25: Sal sódica del ácido 15-hidroperoxi-eicosa-8(Z),11(Z),13(E)-trienoico.
- Compuesto adicional 26: Sal de lisina del ácido 15-hidroperoxi-eicosa-8(Z),11(Z),13(E)-trienoico.
- Compuesto adicional 27: Sal de ornitina del ácido 15-hidroperoxi-eicosa-8(Z),11(Z),13(E)-trienoico.
- 20 Compuesto adicional 28: Sal de piperazina del ácido 15-hidroperoxi-eicosa-8(Z),11(Z),13(E)-trienoico.
- Compuesto adicional 29: Sal de meglumina del ácido 15-hidroperoxi-eicosa-8(Z),11(Z),13(E)-trienoico.
- Compuesto adicional 30: Sal sódica del ácido 15-hidroperoxi-eicosa-5(Z),8(Z),11(Z),13(E),17(Z)-pentaenoico.
- Compuesto adicional 31: Sal de lisina del ácido 15-hidroperoxi-eicosa-5(Z),8(Z),11(Z),13(E),17(Z)-pentaenoico.
- Compuesto adicional 32: Sal de ornitina del ácido 15-hidroperoxi-eicosa-5(Z),8(Z),11(Z),13(E),17(Z)-pentaenoico.
- 25 Compuesto adicional 33: Sal de piperazina del ácido 15-hidroperoxi-eicosa-5(Z),8(Z),11(Z),13(E),17(Z)-pentaenoico.
- Compuesto adicional 34: Sal de meglumina del ácido 15-hidroperoxi-eicosa-5(Z),8(Z),11(Z),13(E),17(Z)-pentaenoico.
- Compuesto adicional 35: Sal sódica del ácido 15-hidroperoxi-5,8,11,13-eicosatetraenoico.
- Compuesto adicional 36: Sal de lisina del ácido 15-hidroperoxi-5,8,11,13-eicosatetraenoico.
- Compuesto adicional 37: Sal de ornitina del ácido 15-hidroperoxi-5,8,11,13-eicosatetraenoico.
- 30 Compuesto adicional 38: Sal de piperazina del ácido 15-hidroperoxi-5,8,11,13-eicosatetraenoico.
- Compuesto adicional 39: Sal de meglumina del ácido 15-hidroperoxi-5,8,11,13-eicosatetraenoico.
- Compuesto adicional 40: Sal sódica del ácido 13-hidroperoxioctadeca-9Z,11E-dienoico.
- Compuesto adicional 41: Sal de lisina del ácido 13-hidroperoxioctadeca-9Z,11E-dienoico.
- Compuesto adicional 42: Sal de ornitina del ácido 13-hidroperoxioctadeca-9Z,11E-dienoico.
- 35 Compuesto adicional 43: Sal de piperazina del ácido 13-hidroperoxioctadeca-9Z,11E-dienoico.
- Compuesto adicional 44: Sal de meglumina del ácido 13-hidroperoxioctadeca-9Z,11E-dienoico.
- Compuesto adicional 45: Sal sódica del ácido 15-hidroxi-eicosa-8(Z),11(Z),13(E)-trienoico.
- Compuesto adicional 46: Sal de lisina del ácido 15-hidroxi-eicosa-8(Z),11(Z),13(E)-trienoico.
- Compuesto adicional 47: Sal de ornitina del ácido 15-hidroxi-eicosa-8(Z),11(Z),13(E)-trienoico.

- Compuesto adicional 48: Sal de piperazina del ácido 15-hidroxi-eicosa-8(Z),11(Z),13(E)-trienoico.
- Compuesto adicional 49: Sal de meglumina del ácido 15-hidroxi-eicosa-8(Z),11(Z),13(E)-trienoico.
- Compuesto adicional 50: Sal sódica del ácido 15-hidroxi-eicosa-5(Z),8(Z),11(Z),13(E),17(Z)-pentaenoico.
- Compuesto adicional 51: Sal de lisina del ácido 15-hidroxi-eicosa-5(Z),8(Z),11(Z),13(E),17(Z)-pentaenoico.
- 5 Compuesto adicional 52: Sal de ornitina del ácido 15-hidroxi-eicosa-5(Z),8(Z),11(Z),13(E),17(Z)-pentaenoico.
- Compuesto adicional 53: Sal de piperazina del ácido 15-hidroxi-eicosa-5(Z),8(Z),11(Z),13(E),17(Z)-pentaenoico.
- Compuesto adicional 54: Sal de meglumina del ácido 15-hidroxi-eicosa-5(Z),8(Z),11(Z),13(E),17(Z)-pentaenoico.
- Compuesto adicional 55: Sal sódica del ácido 15-hidroxi-5,8,11,13-eicosatetraenoico.
- Compuesto adicional 56: Sal de lisina del ácido 15-hidroxi-5,8,11,13-eicosatetraenoico.
- 10 Compuesto adicional 57: Sal de ornitina del ácido 15-hidroxi-5,8,11,13-eicosatetraenoico.
- Compuesto adicional 58: Sal de piperazina del ácido 15-hidroxi-5,8,11,13-eicosatetraenoico.
- Compuesto adicional 59: Sal de meglumina del ácido 15-hidroxi-5,8,11,13-eicosatetraenoico.
- Compuesto adicional 60: Una composición que comprende la sal de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 1-59.
- 15 Compuesto adicional 61: Una composición que comprende una forma salina de un producto de 15-lipoxigenasa.
- Compuesto adicional 62: La composición farmacéutica del Compuesto adicional 61 en la que la forma salina del producto de 15-lipoxigenasa comprende la sal de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 1-59.
- Compuesto adicional 63: La composición farmacéutica del Compuesto adicional 61 o del Compuesto adicional 62 que, además, comprende un excipiente.
- 20 Compuesto adicional 64: La composición farmacéutica de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 61-63 en la que, después del almacenamiento durante al menos aproximadamente 4 semanas, la composición farmacéutica comprende al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o aproximadamente 100% de una cantidad inicial de la forma salina del producto de 15-lipoxigenasa.
- Compuesto adicional 65: La composición farmacéutica de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 61-64 en la que, después del almacenamiento durante al menos aproximadamente 10 semanas, la composición farmacéutica comprende al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o aproximadamente 100% de una cantidad inicial de la forma salina del producto de 15-lipoxigenasa.
- 25
- 30
- Compuesto adicional 66: La composición farmacéutica de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 61-65 en la que, después del almacenamiento durante al menos aproximadamente 24 semanas, la composición farmacéutica comprende al menos aproximadamente 86%, al menos aproximadamente 87%, al menos aproximadamente 88%, al menos aproximadamente 89%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o aproximadamente 100% de una cantidad inicial de la forma salina del producto de 15-lipoxigenasa.
- 35
- Compuesto adicional 67: La composición farmacéutica de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 64-66, siendo almacenada la composición farmacéutica a 2-8°C, a 20°C, a 25°C o a 40°C.
- 40
- Compuesto adicional 68: La composición farmacéutica de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 64-67, siendo almacenada la composición farmacéutica al 60% de HR o al 75% de HR.
- Compuesto adicional 69: La composición farmacéutica de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 61-68, comprendiendo la composición farmacéutica una cantidad terapéuticamente eficaz de la sal del producto de 15-lipoxigenasa.
- 45

Compuesto adicional 70: La composición farmacéutica del Compuesto adicional 69 en la que la cantidad terapéuticamente eficaz de la forma salina del producto de 15-lipoxigenasa se encuentra entre aproximadamente un 0,1% en peso y aproximadamente un 20% en peso.

5 Compuesto adicional 71: La composición farmacéutica de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 61-70, estando la composición farmacéutica en una forma adecuada para su administración tópica.

Compuesto adicional 72: La composición farmacéutica de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 61-71 en la que la forma salina del producto de 15-lipoxigenasa es el único ingrediente activo significativo o el único ingrediente activo en la composición farmacéutica.

10 Compuesto adicional 73: La composición farmacéutica de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 61-71 que, además, comprende un agente activo adicional.

Compuesto adicional 74: La composición farmacéutica del Compuesto adicional 73 en la que la forma salina del producto de 15-lipoxigenasa y el agente activo adicional son coformulados como una única unidad de dosificación.

15 Compuesto adicional 75: La composición farmacéutica del Compuesto adicional 73 en la que la forma salina del producto de 15-lipoxigenasa y el agente activo adicional son formulados como al menos dos unidades de dosificación para su administración coordinada, combinada o concomitante.

Un método de tratamiento de una enfermedad o un trastorno en un sujeto necesitado del mismo puede comprender la administración al sujeto de la composición farmacéutica de uno cualquiera de los Compuestos adicionales 61-75.

La enfermedad o el trastorno puede seleccionarse del grupo constituido por: acné, eritema, infección, hígado graso, neuropatía e inflamación de la piel.

20 La composición farmacéutica puede ser administrada al sujeto en una cantidad suficiente para proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de la forma salina del producto de 15-lipoxigenasa.

La cantidad terapéuticamente eficaz puede encontrarse entre aproximadamente 0,001 mg/kg/día y aproximadamente 100 mg/kg/día.

25

REIVINDICACIONES

1. Una sal de lisina de ácido 15-hidroxi-8(Z),11(Z),13(E)-eicosatrienoico (15-HETrE).
2. Una composición farmacéutica que comprende una sal de lisina de la reivindicación 1.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2 que, además, comprende un excipiente.
- 5 4. La composición farmacéutica de la reivindicación 2 o 3, estando la composición farmacéutica en forma adecuada para la administración tópica.
5. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4 en la que la sal de lisina es el único ingrediente activo en la composición farmacéutica.
- 10 6. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4 que, además, comprende un agente activo adicional.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6 en la que la sal de lisina y el agente activo adicional son coformulados como una sola unidad de dosificación.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 6 en la que la forma de sal de lisina y el agente activo adicional son formulados como al menos dos unidades de dosificación para una administración coordinada, combinada o concomitante.
- 15 9. Una sal de lisina o composición farmacéutica según cualquier reivindicación precedente para ser usada en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno seleccionado entre: acné, eritema, infección, hígado graso, neuropatía e inflamación de la piel.
- 20 10. La sal de lisina o composición farmacéutica para ser usada según la reivindicación 9 para su administración en una cantidad terapéuticamente eficaz de 0,001 mg/kg/día a 100 mg/kg/día.

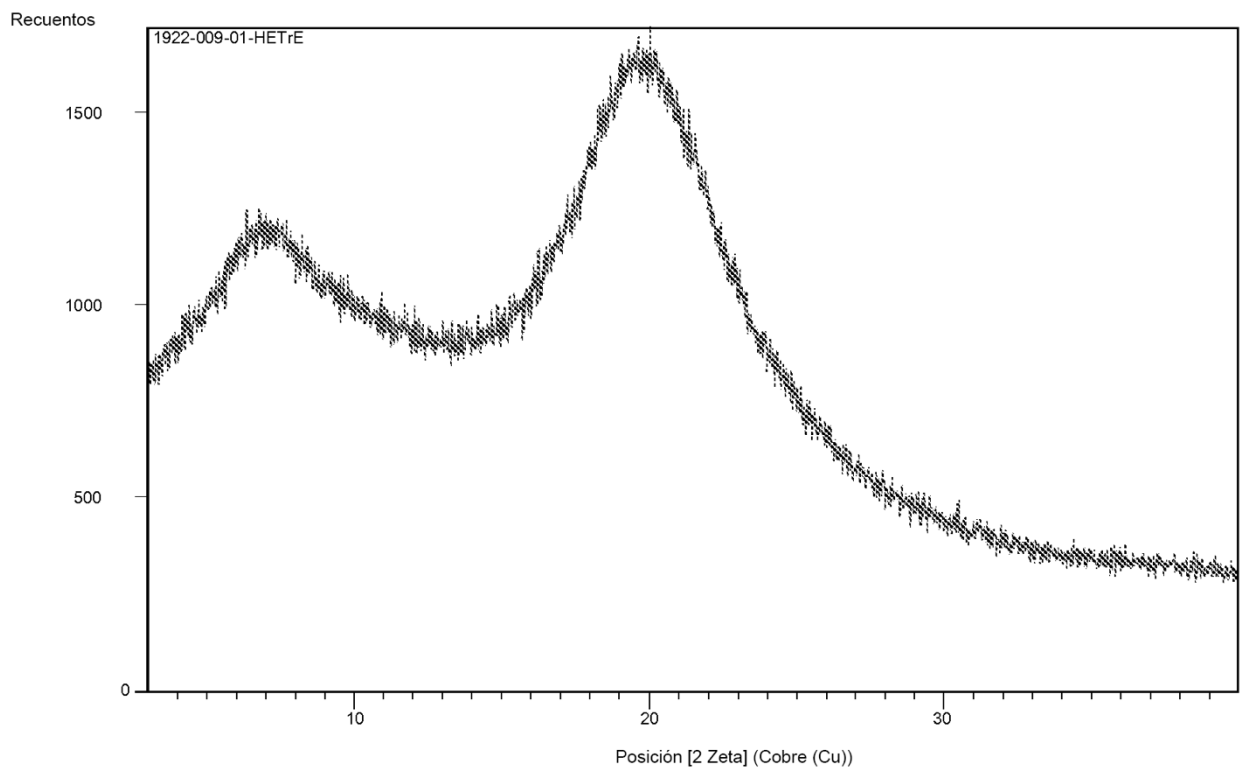


FIG. 1

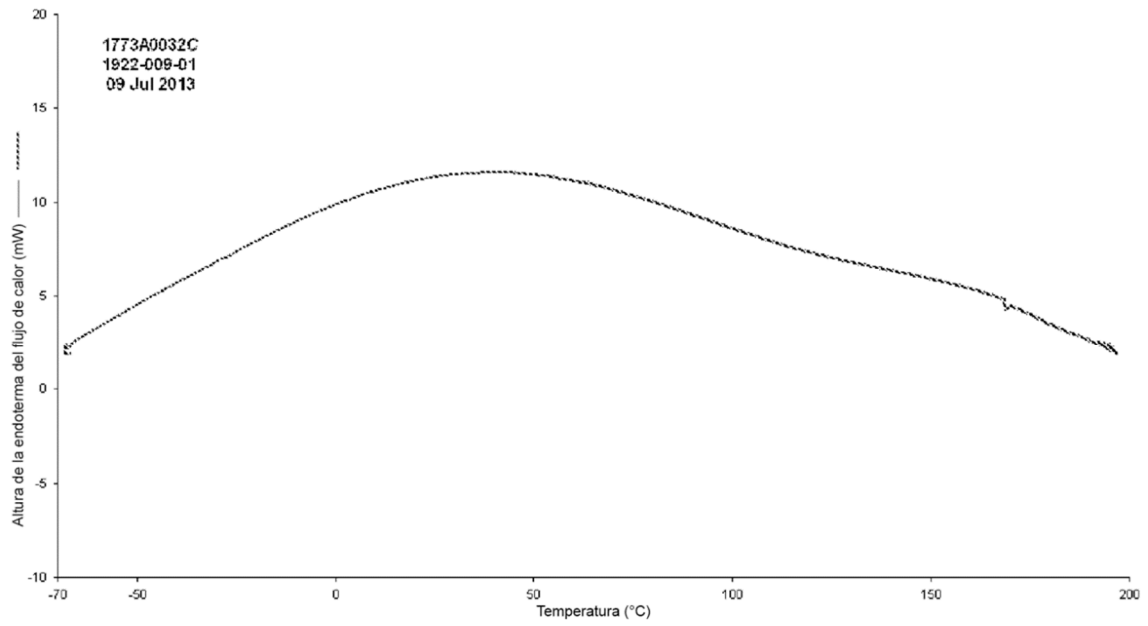


FIG. 2

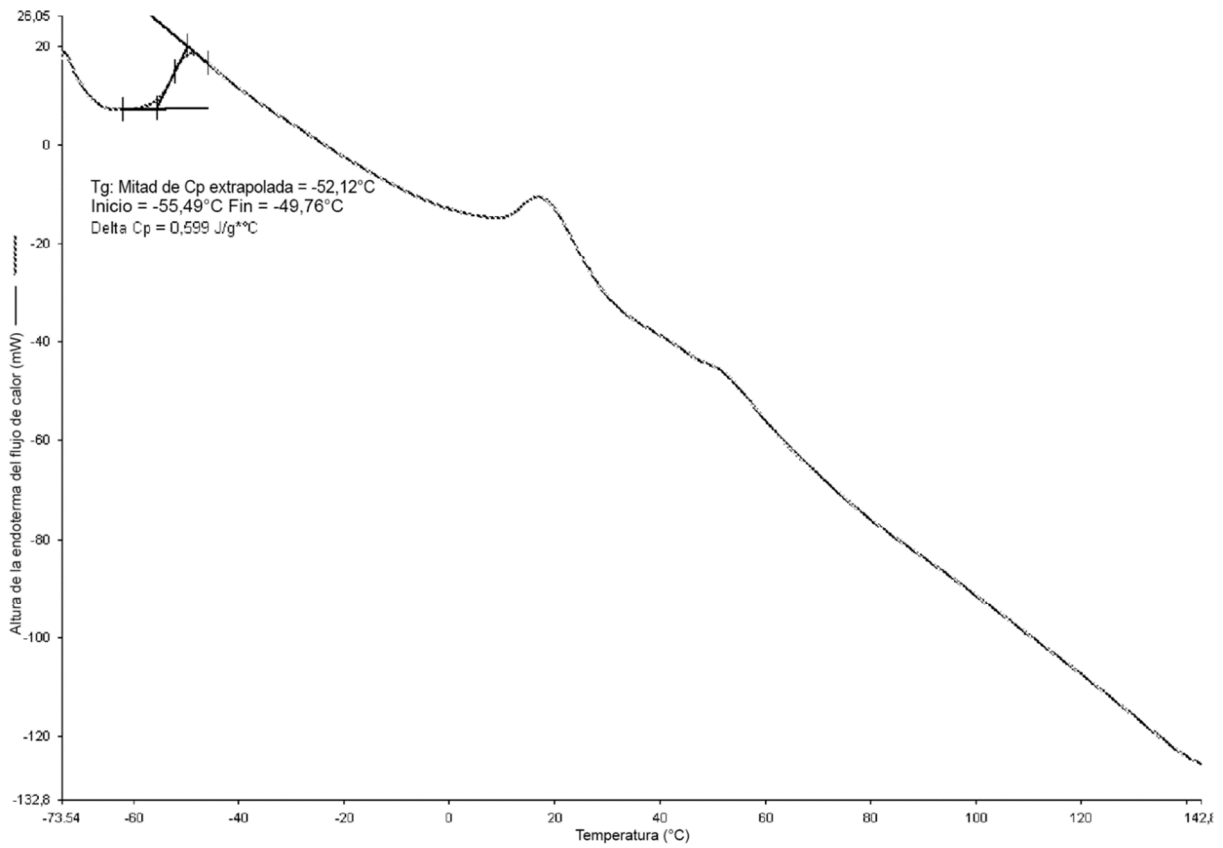


FIG. 3

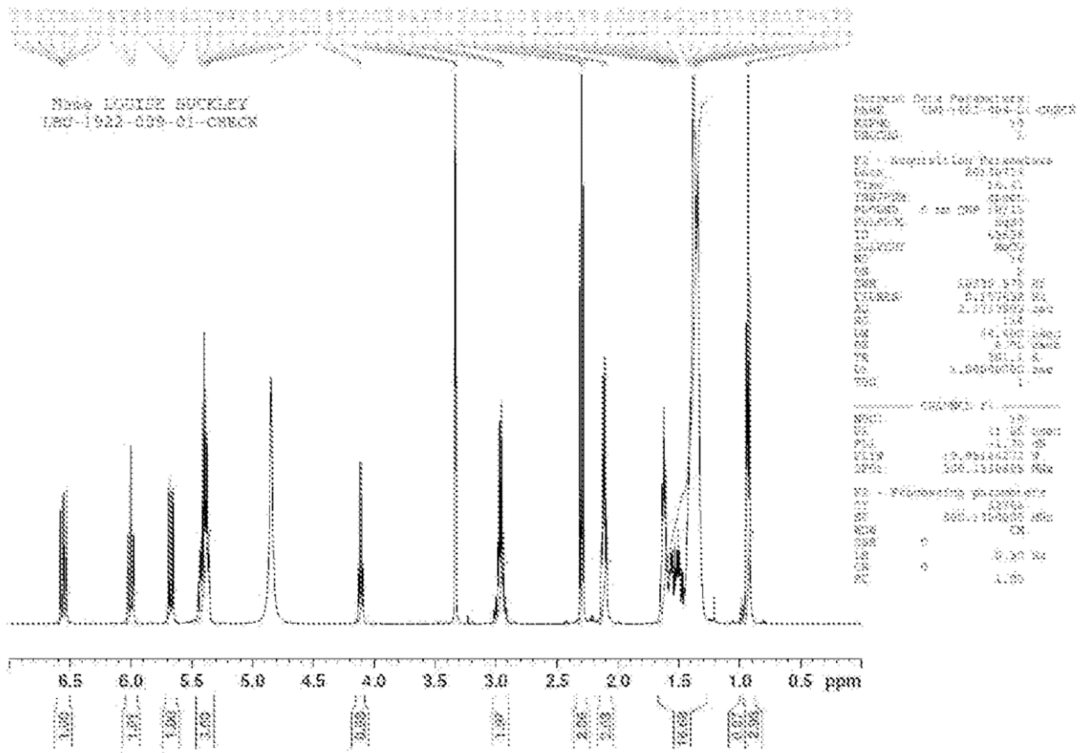


FIG. 4

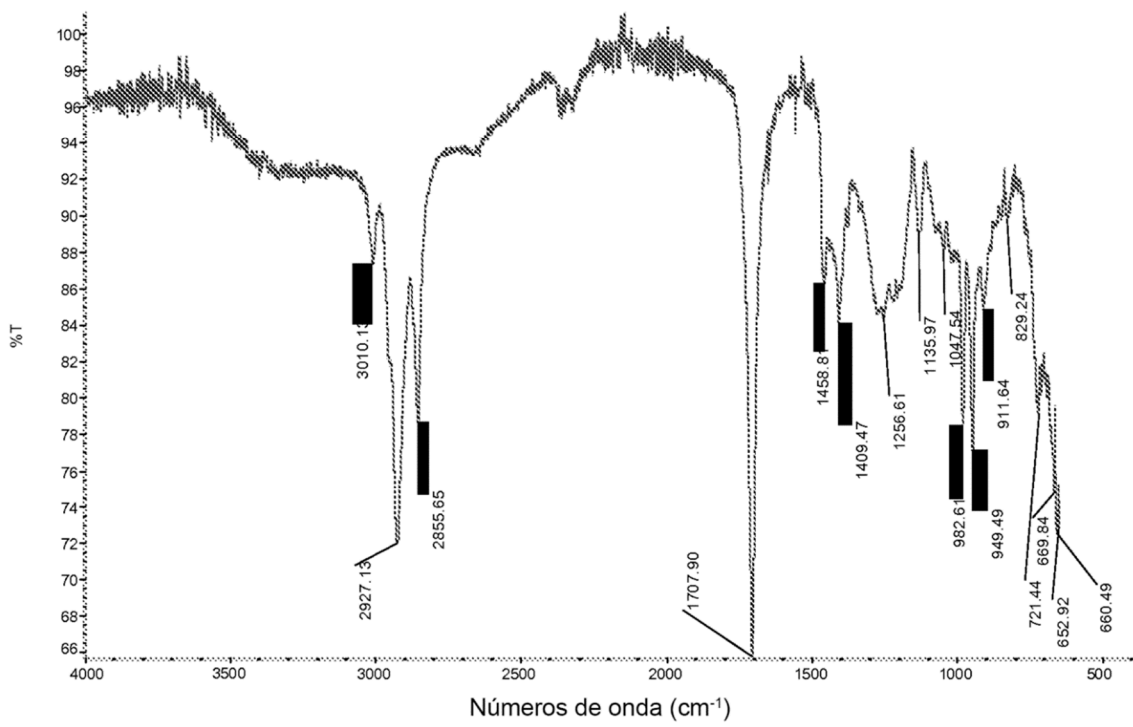


FIG. 5

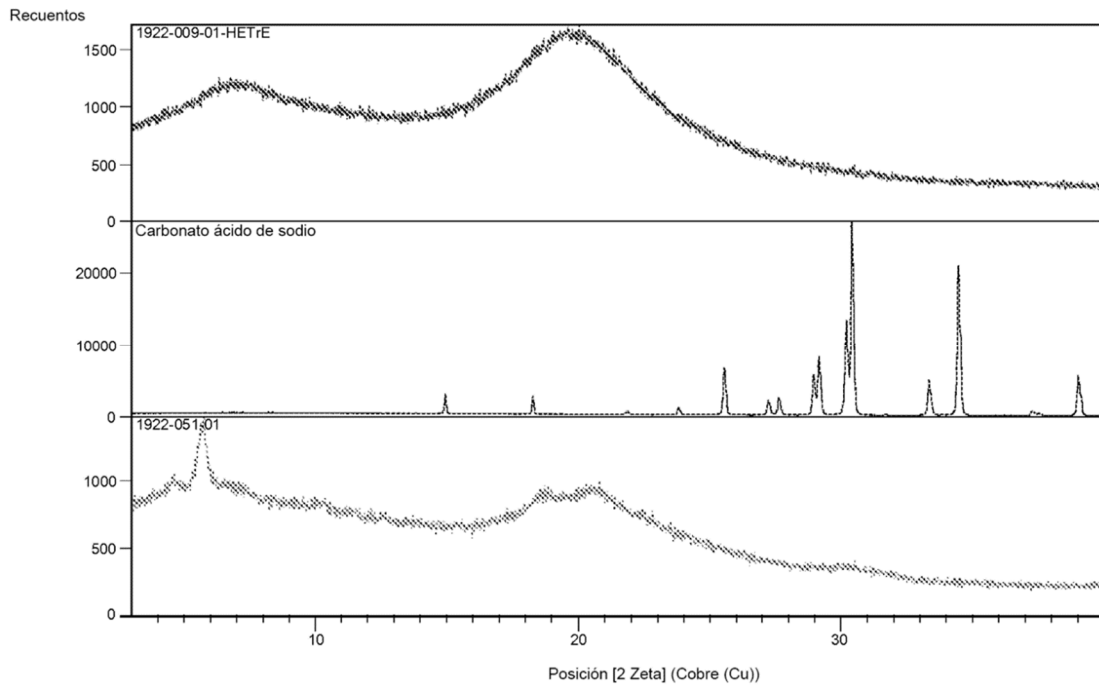


FIG. 6

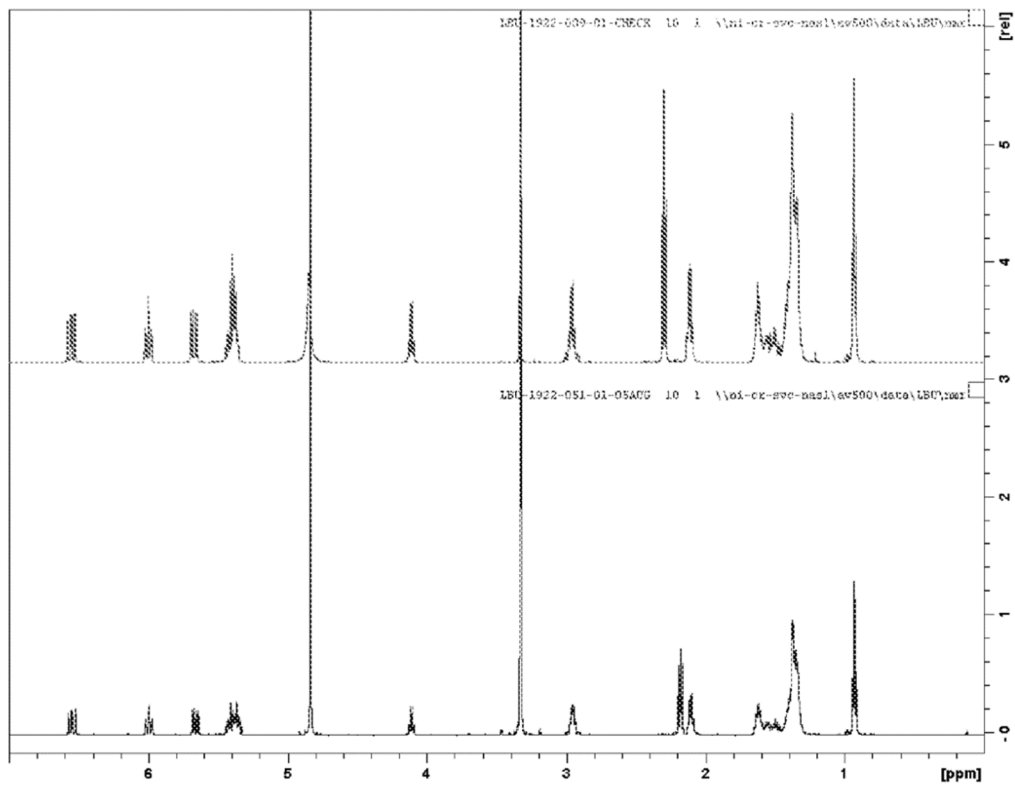


FIG. 7

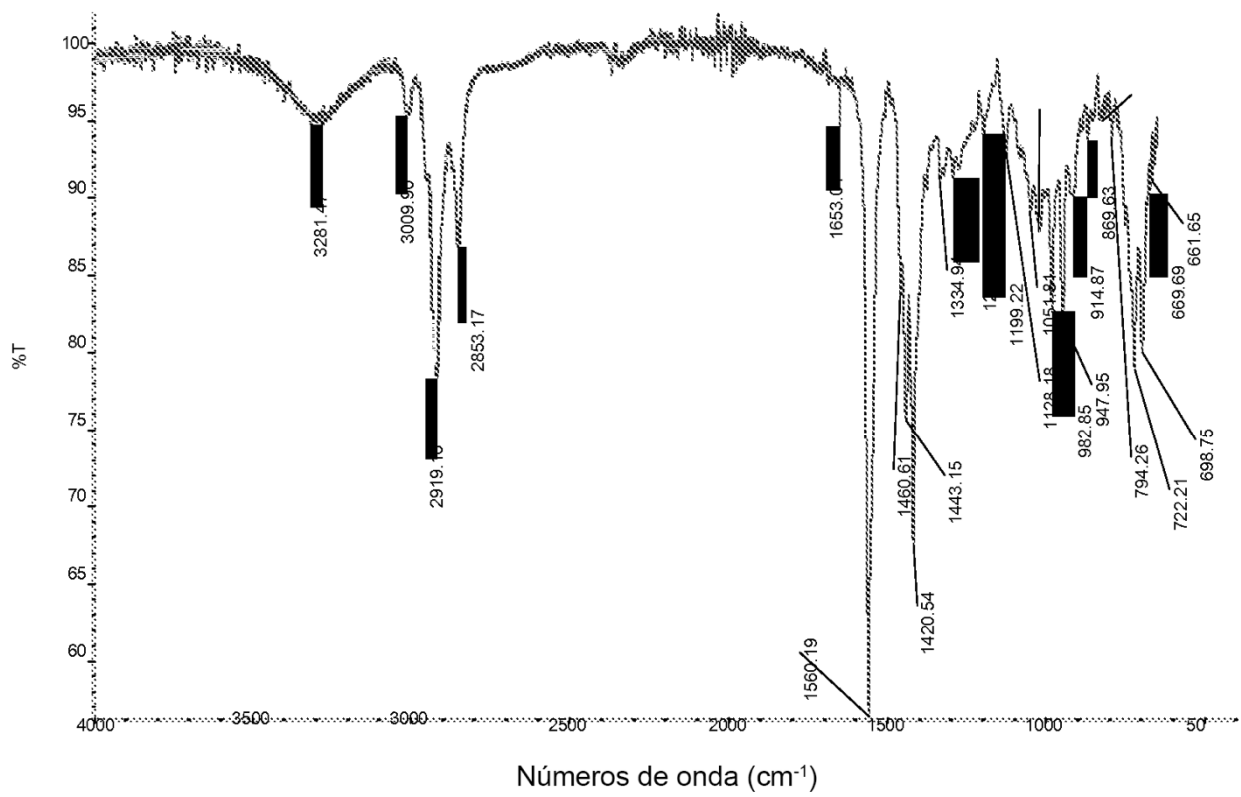


FIG. 8

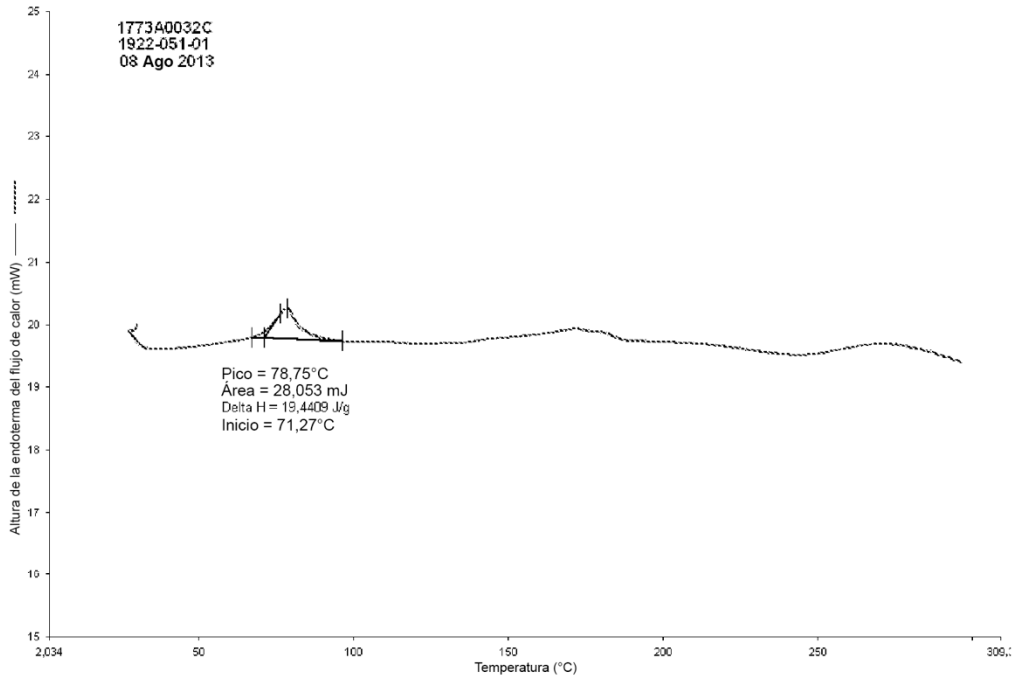


FIG. 9

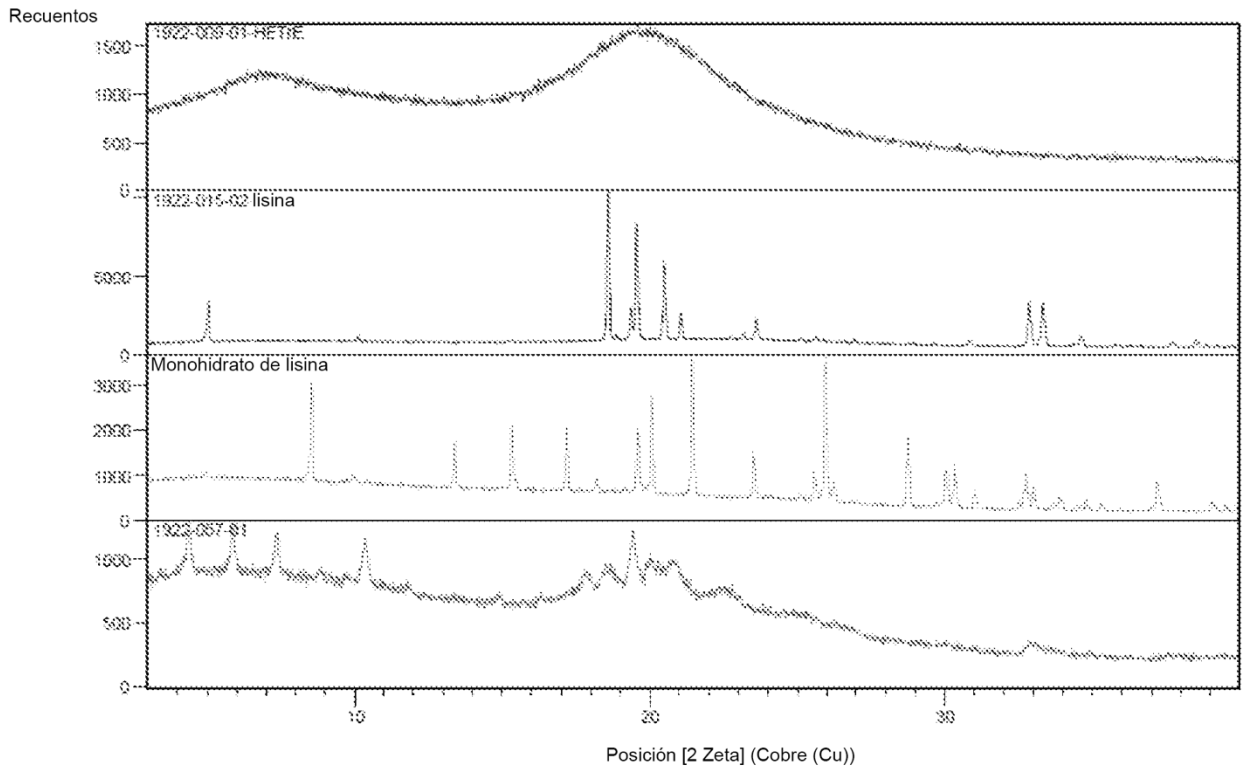


FIG. 10

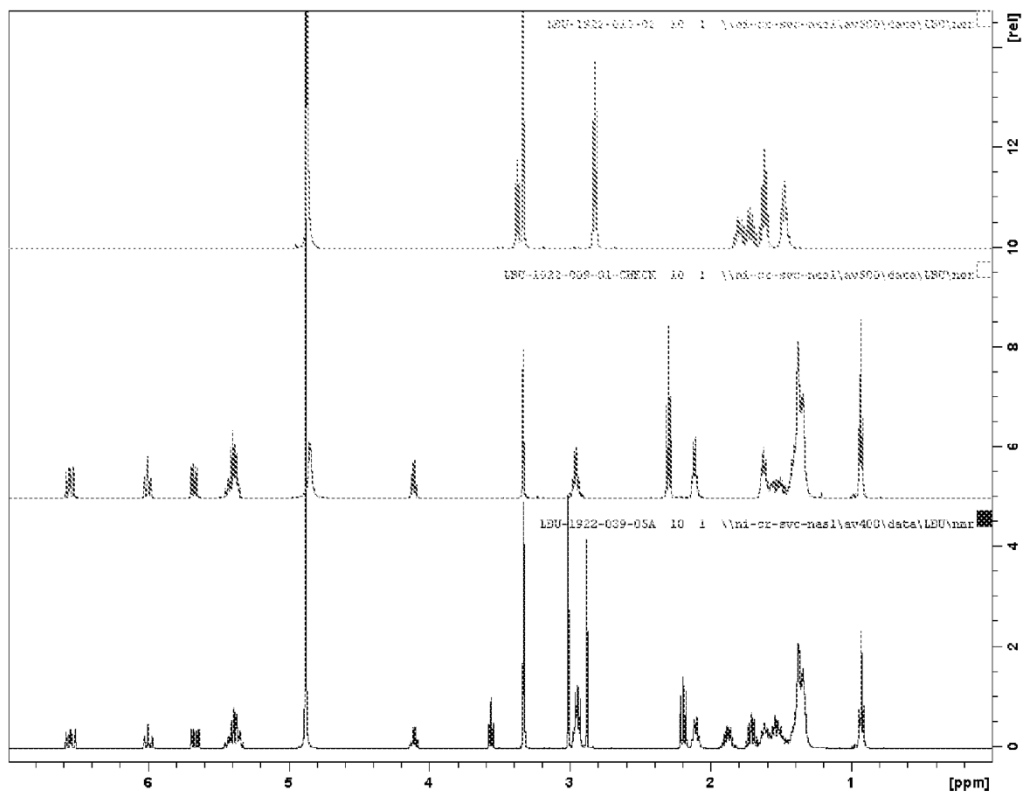


FIG. 11

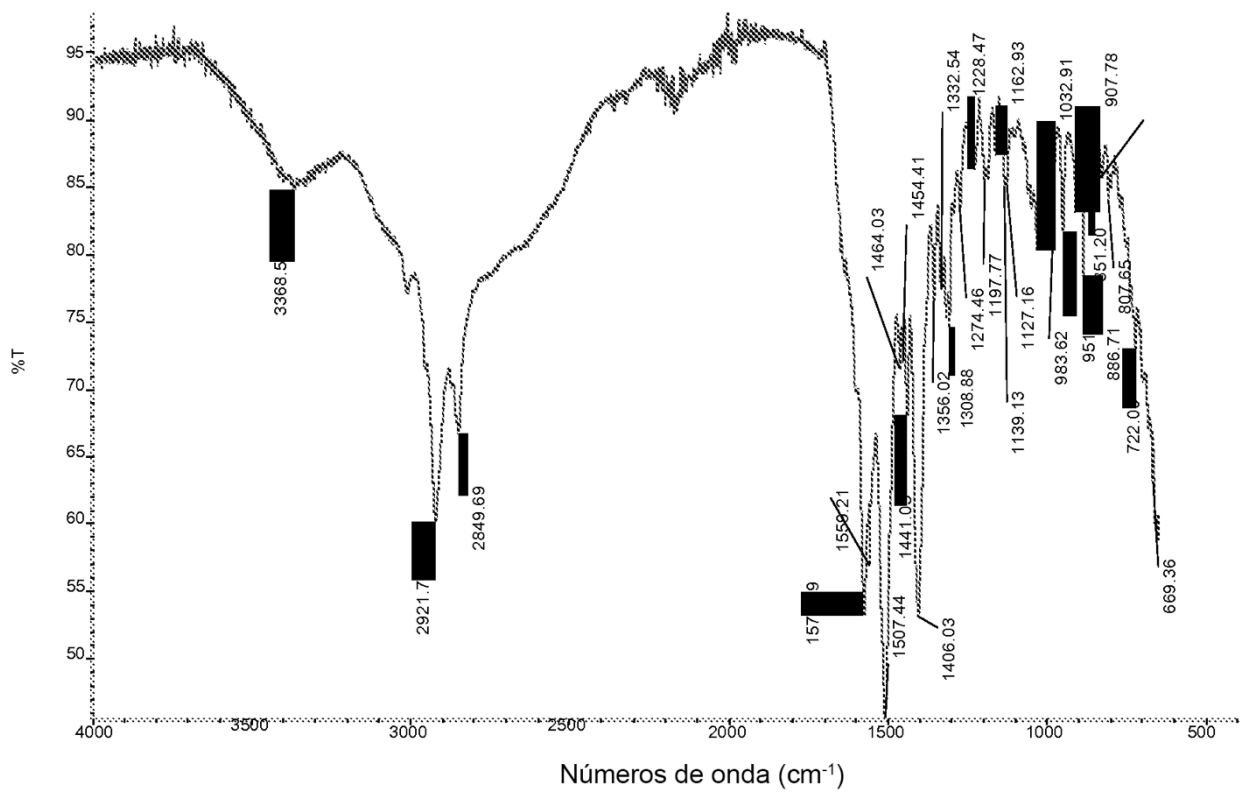


FIG. 12

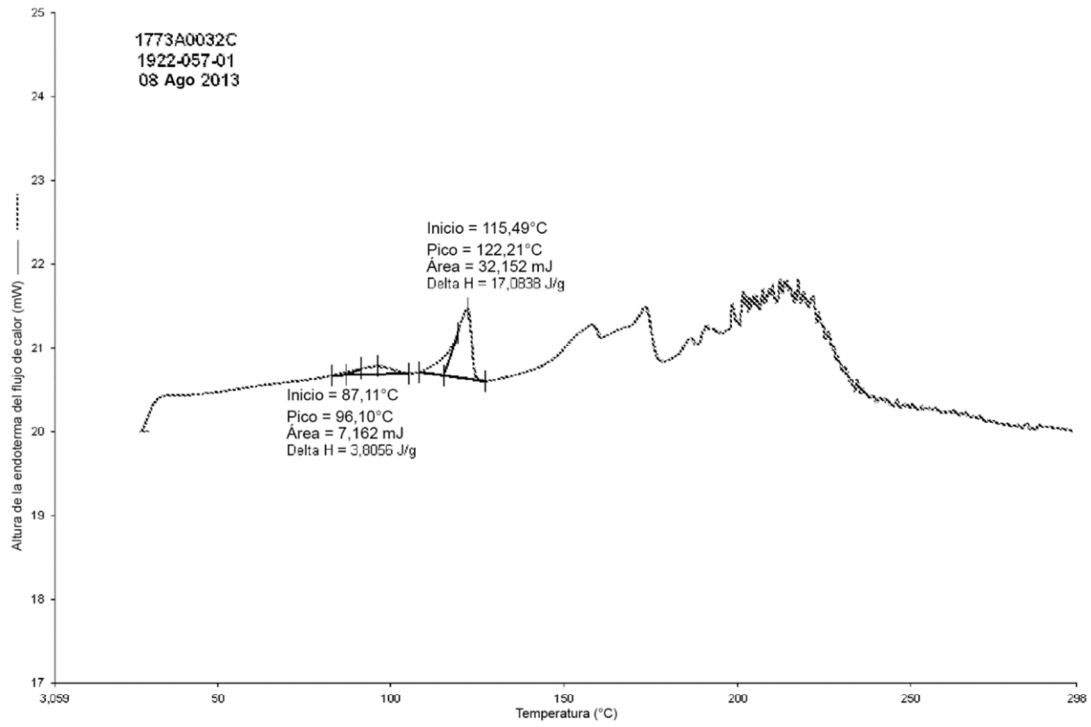


FIG. 13

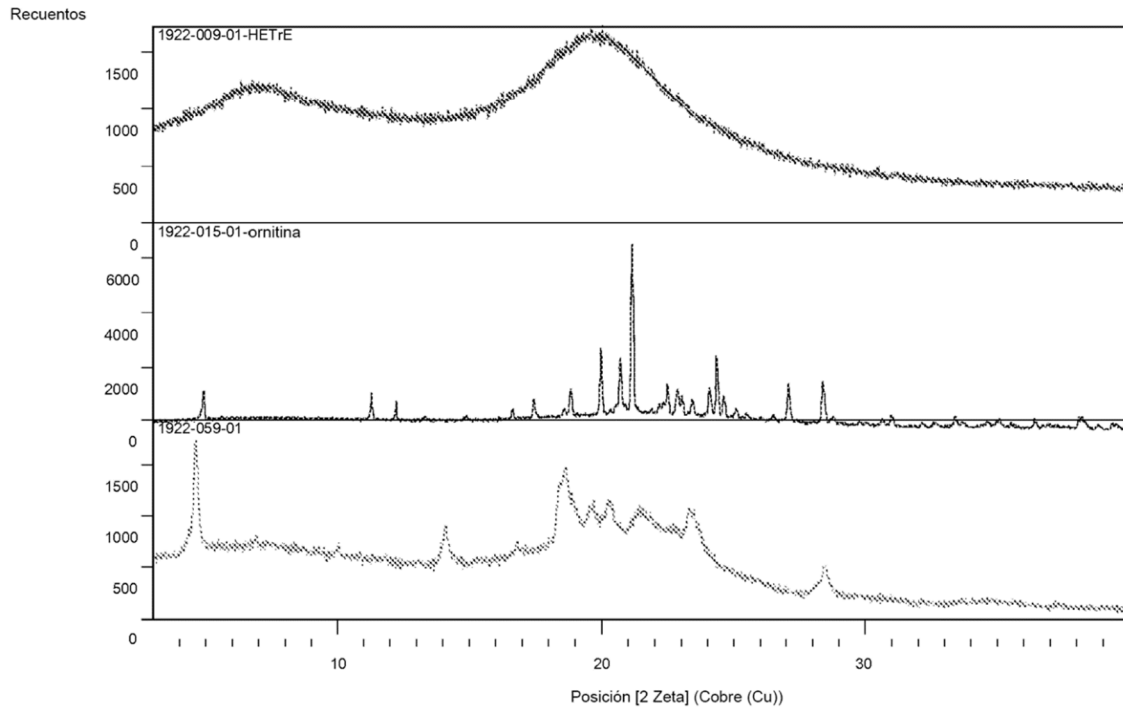


FIG. 14

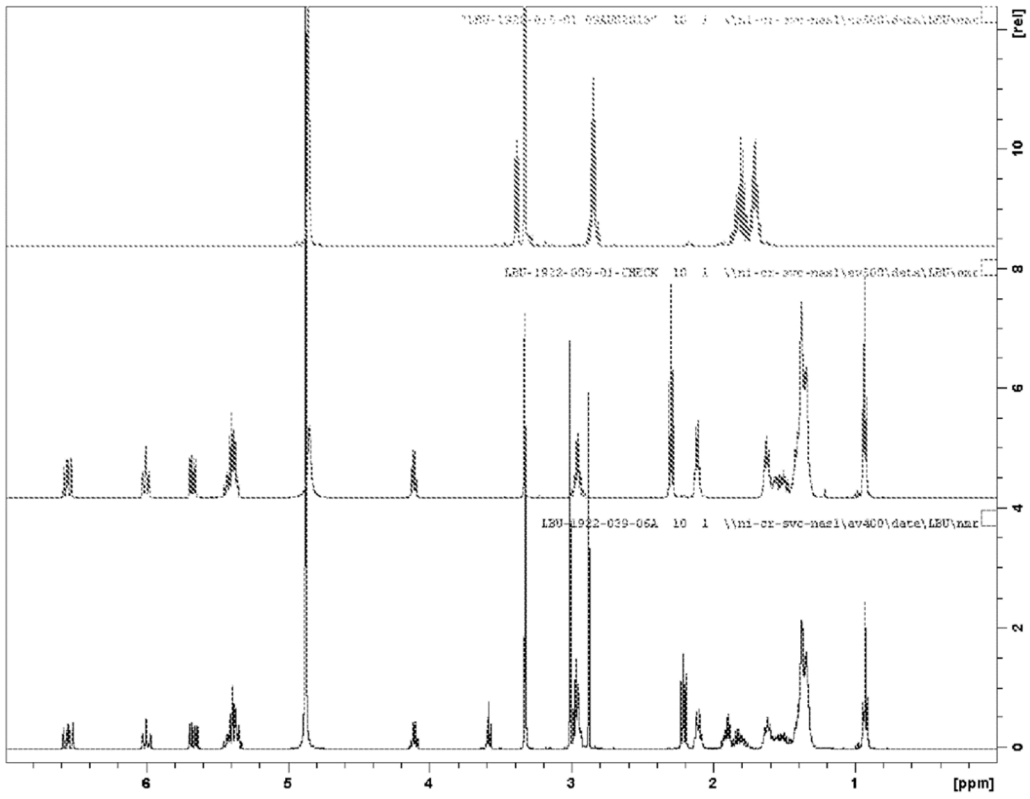


FIG. 15

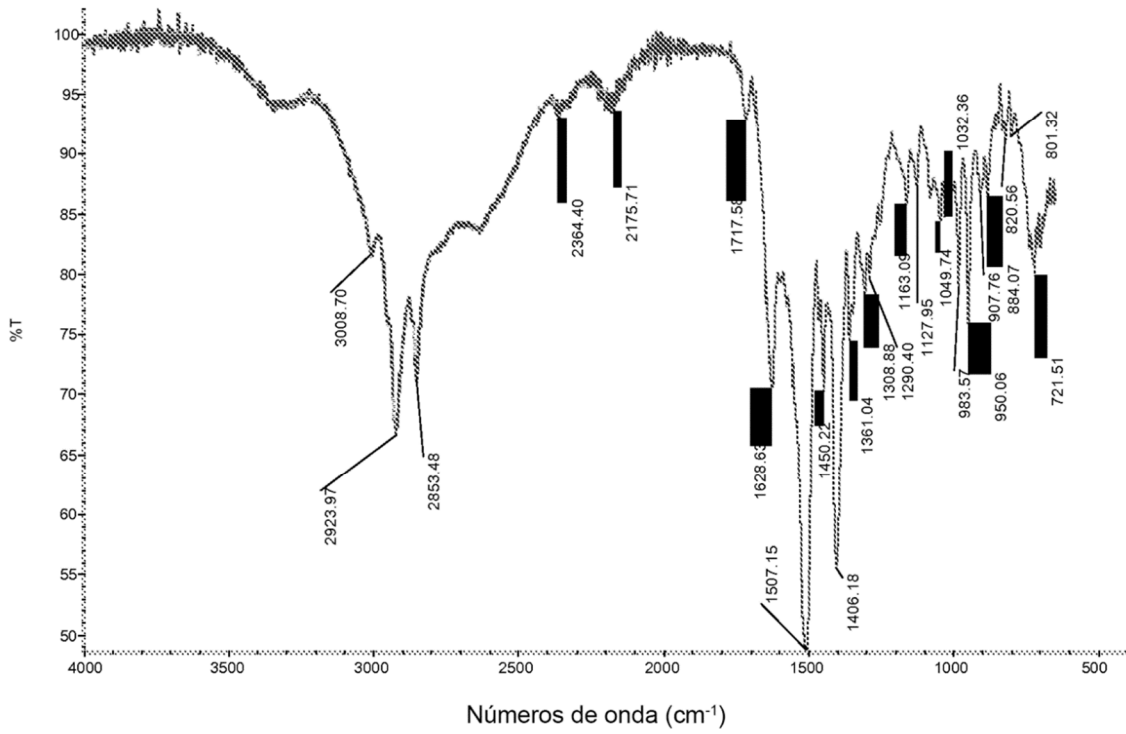


FIG. 16

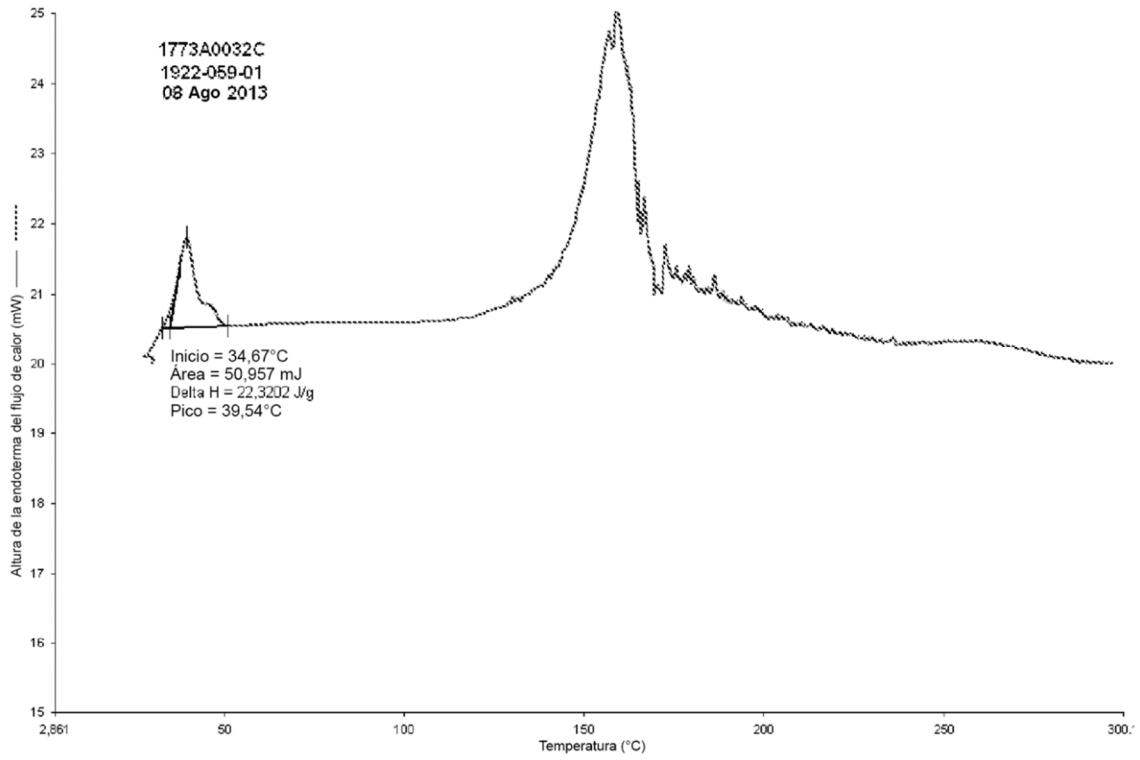


FIG. 17

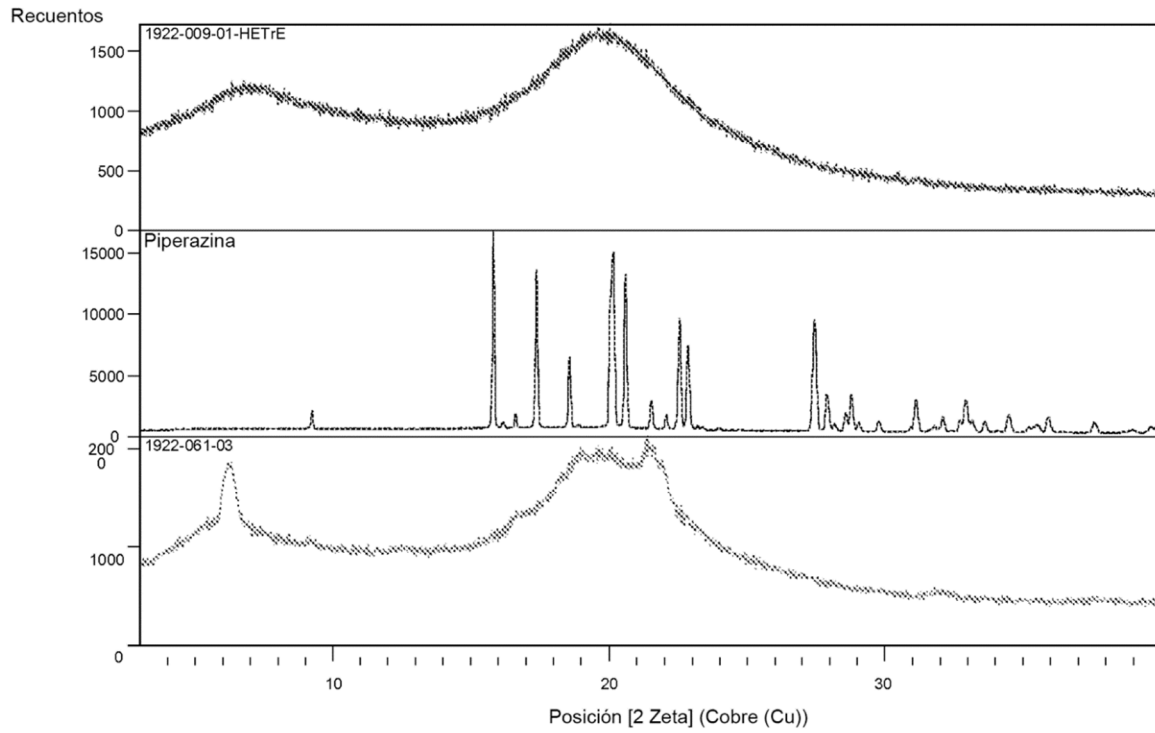


FIG. 18

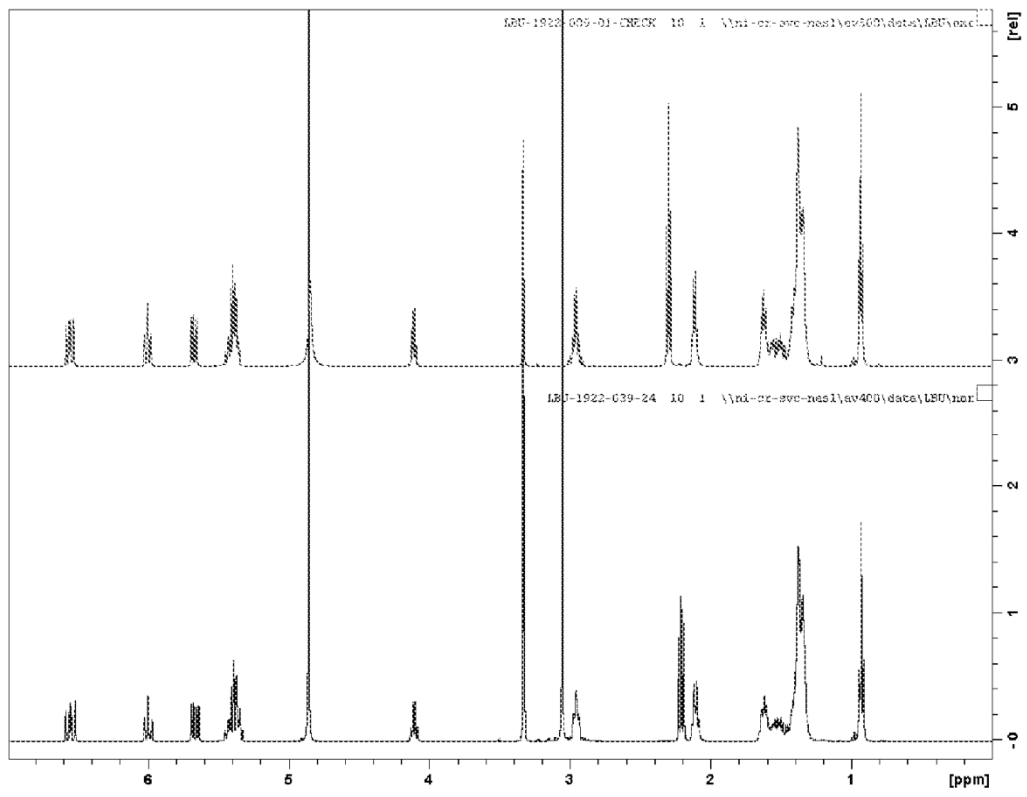


FIG. 19

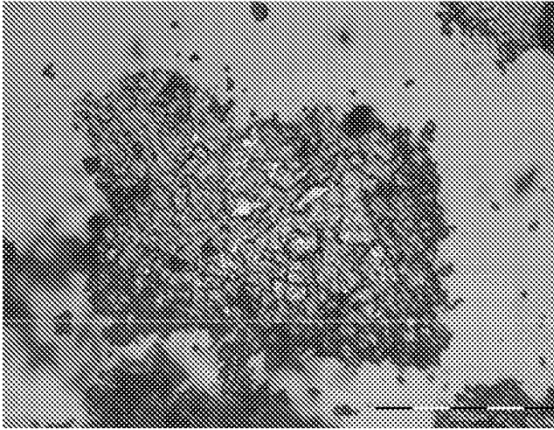


FIG. 20A

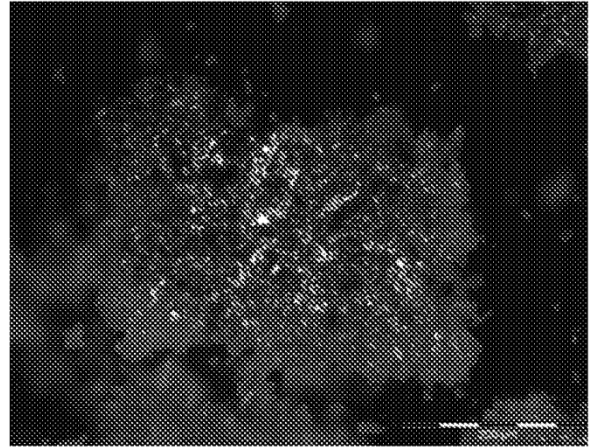


FIG. 20B

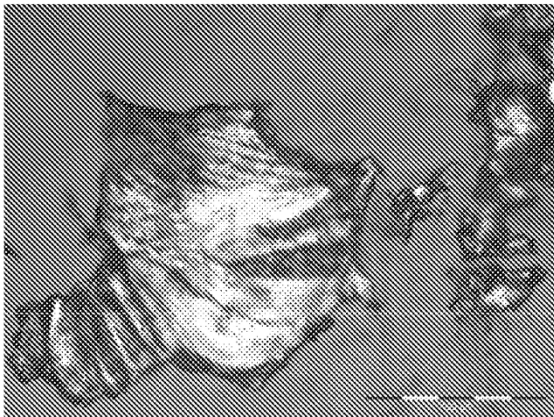


FIG. 20C

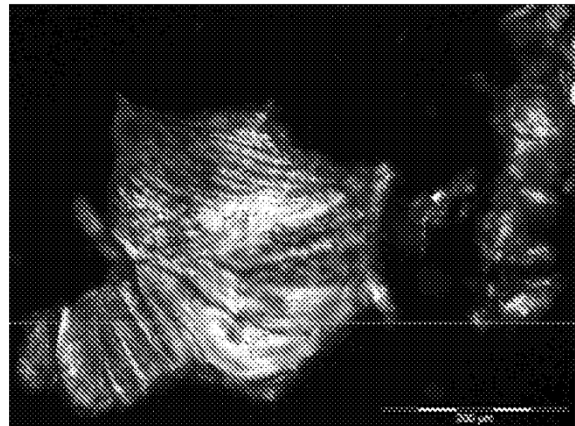


FIG. 20D

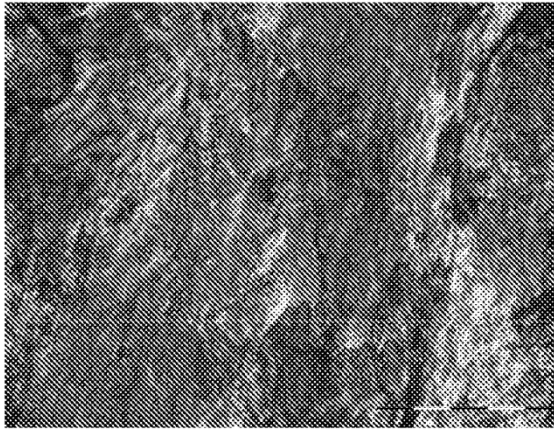


FIG. 20E

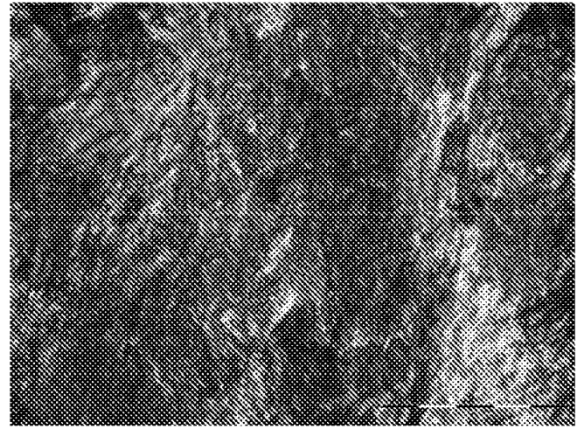


FIG. 20F

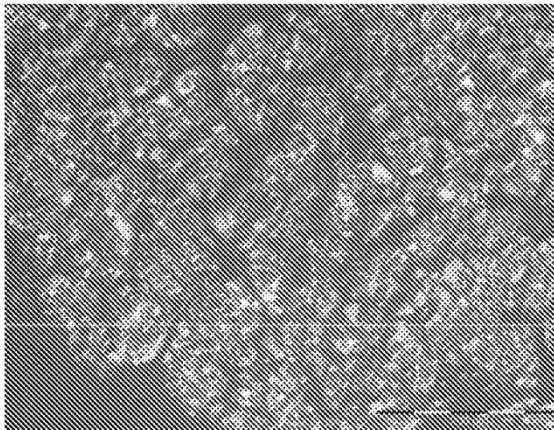


FIG. 20G

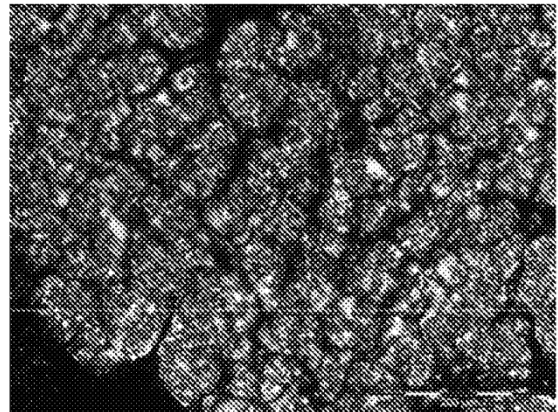


FIG. 20H

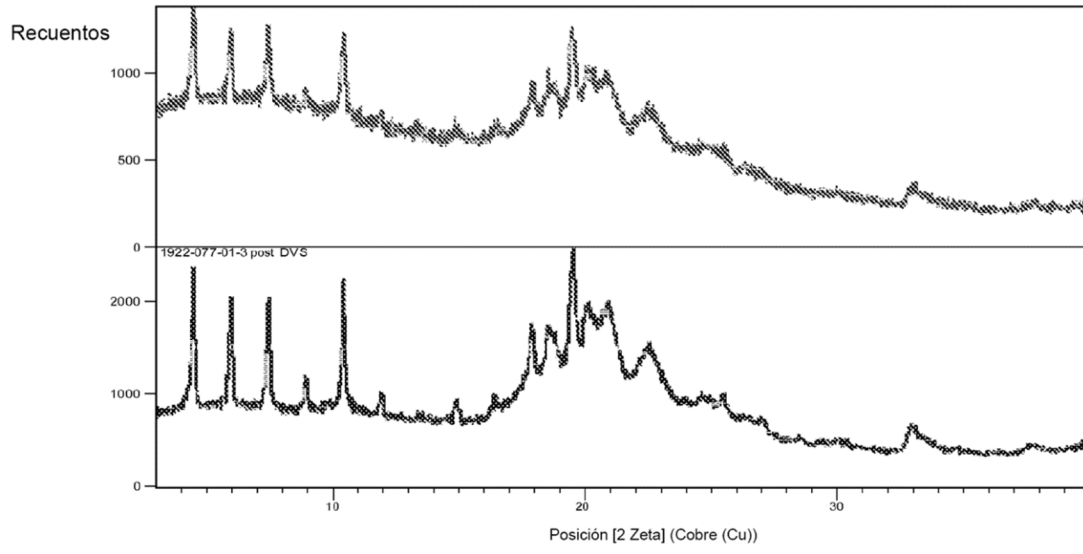


FIG. 21

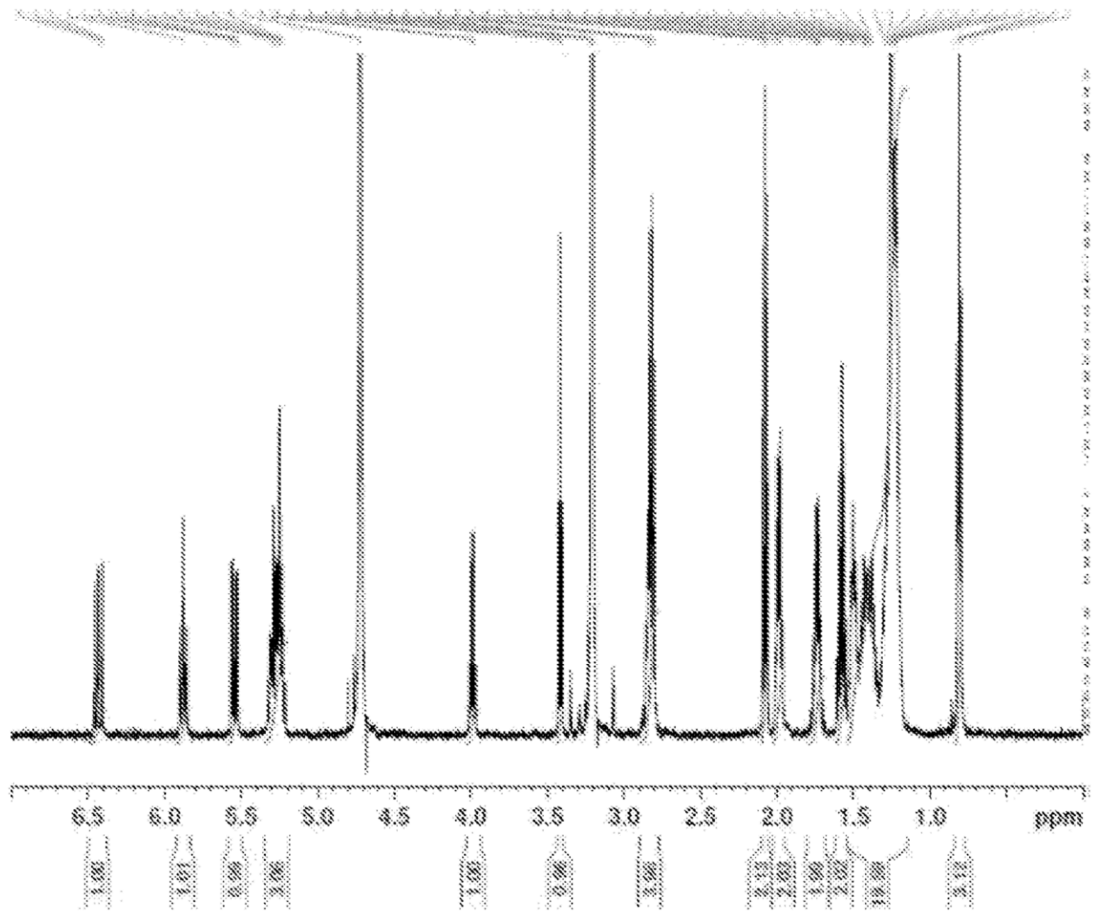


FIG. 22

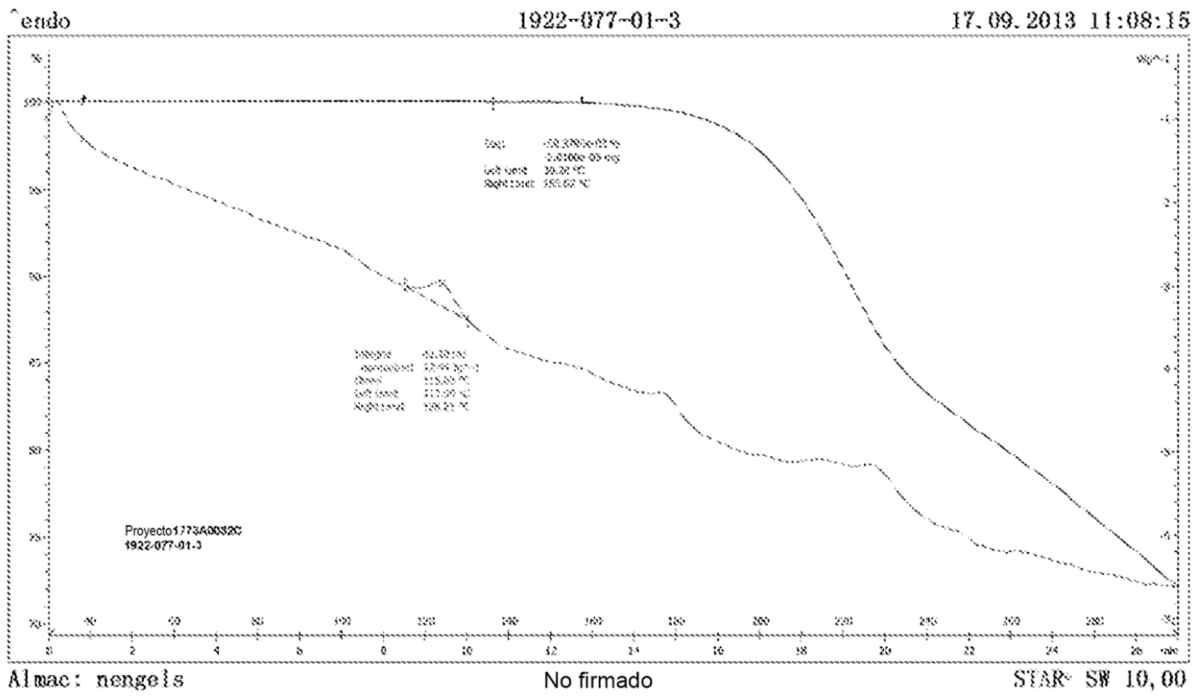


FIG. 23

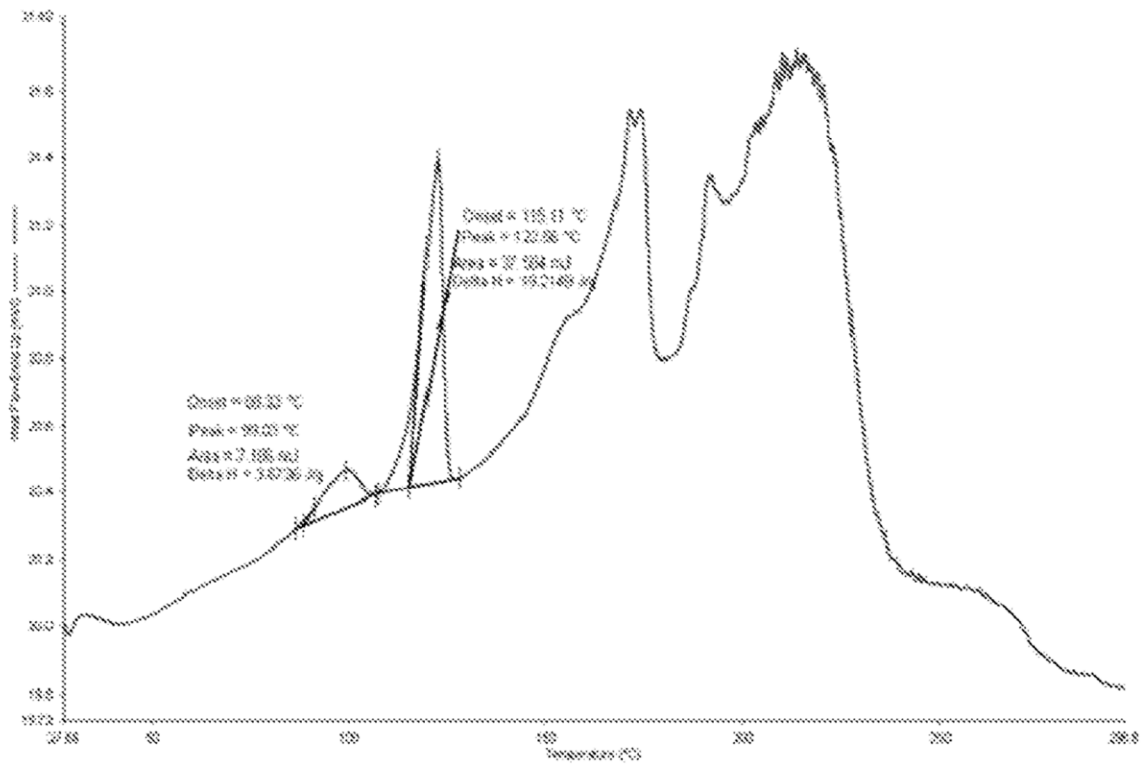


FIG. 24

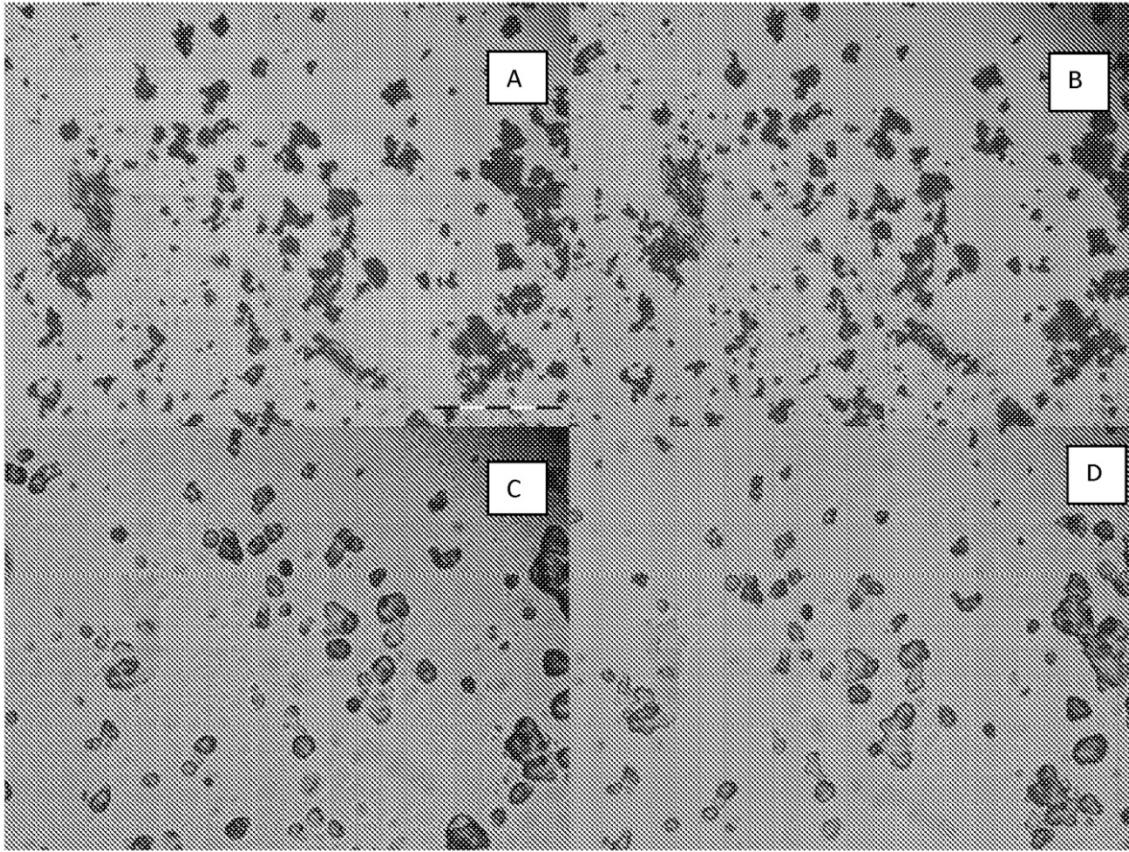


FIG. 25

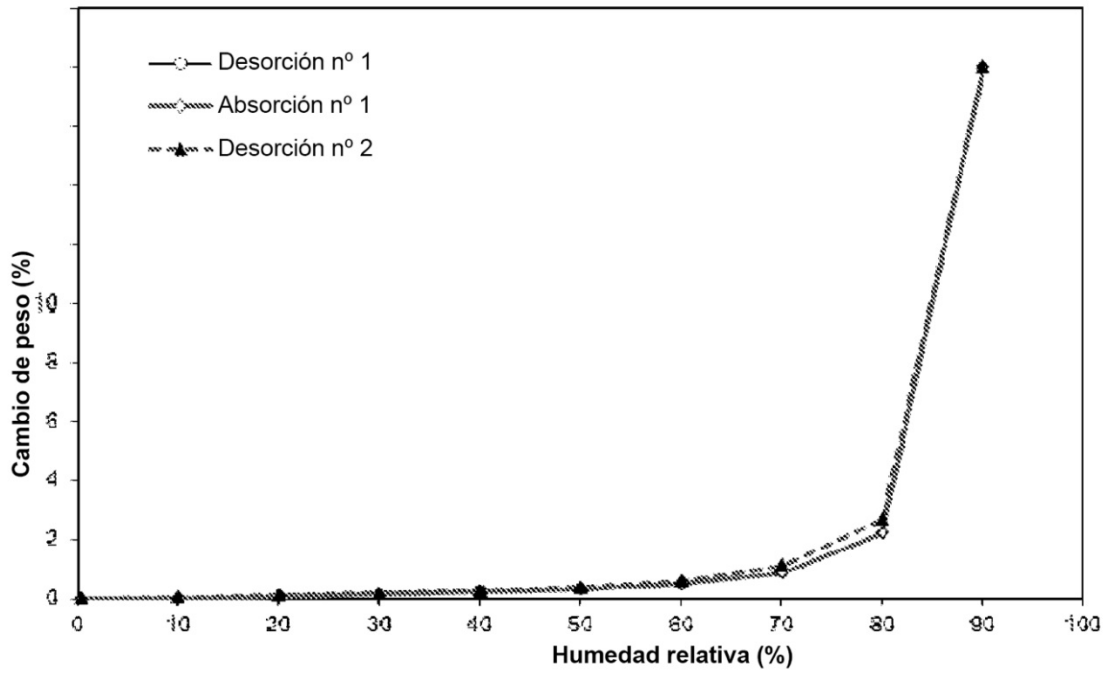


FIG. 26

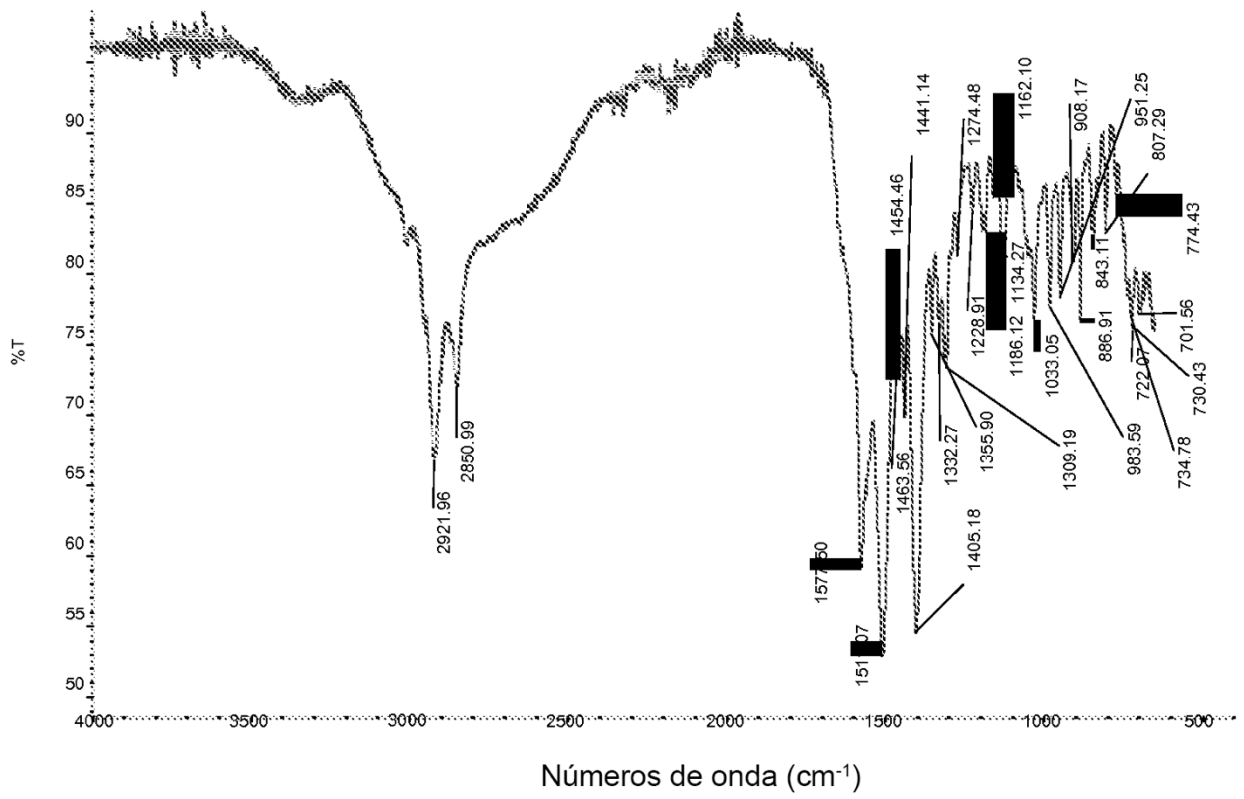


FIG. 27

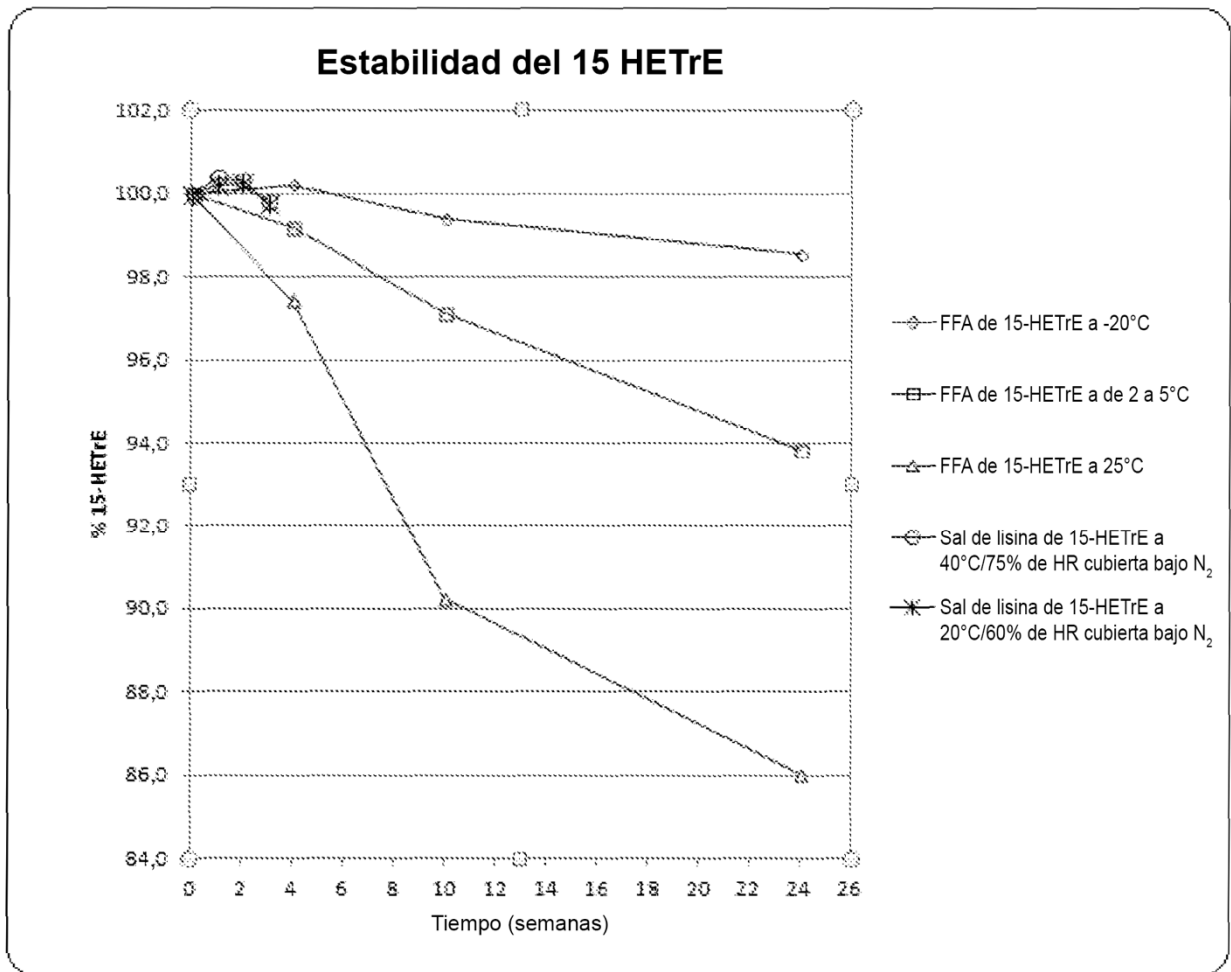


FIG. 28

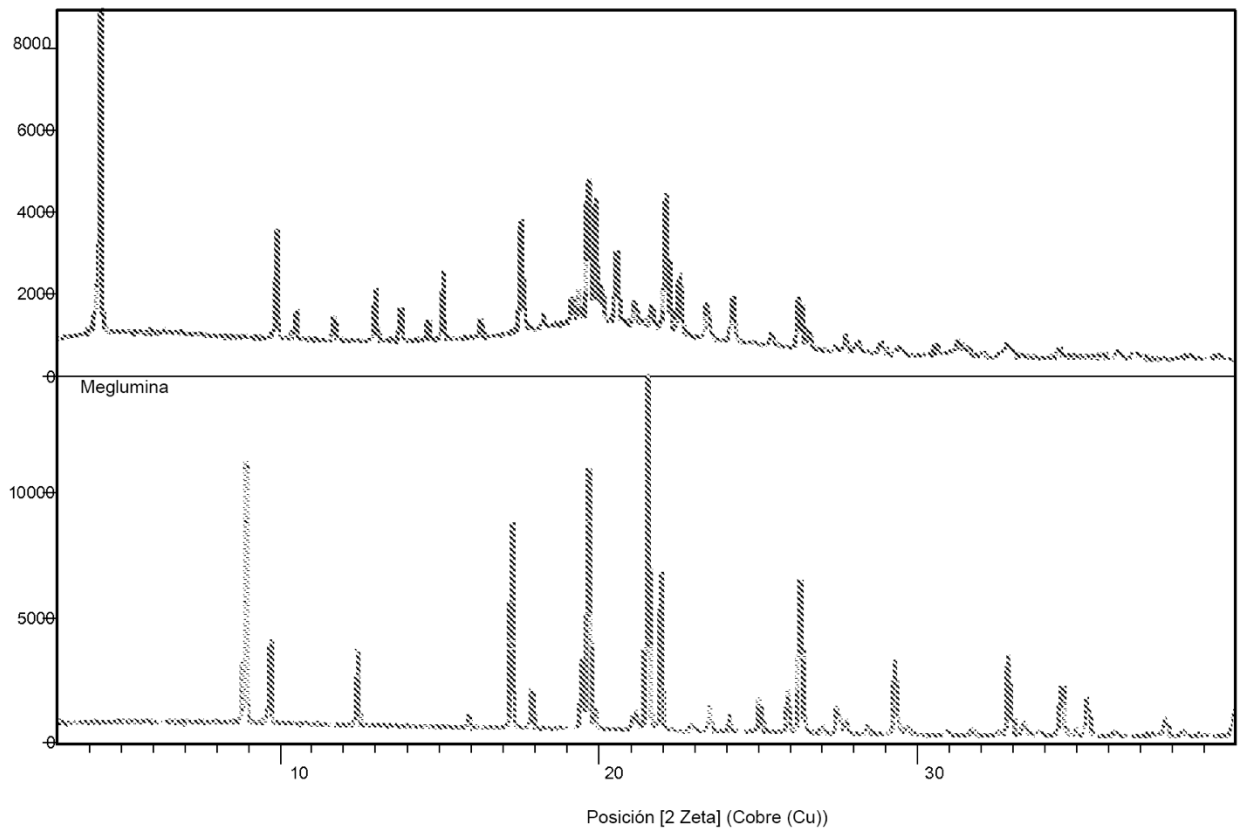


FIG. 29

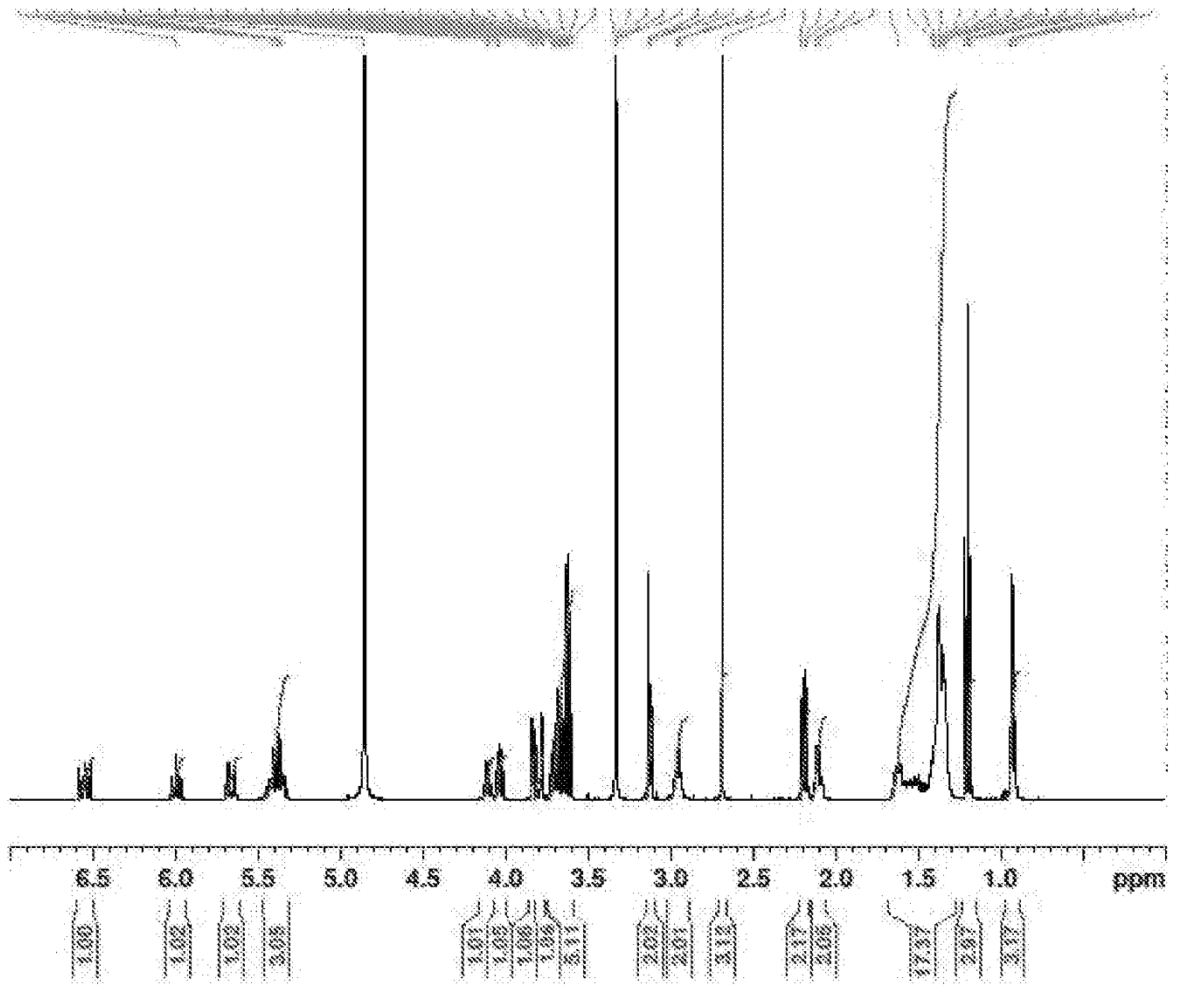


FIG. 30

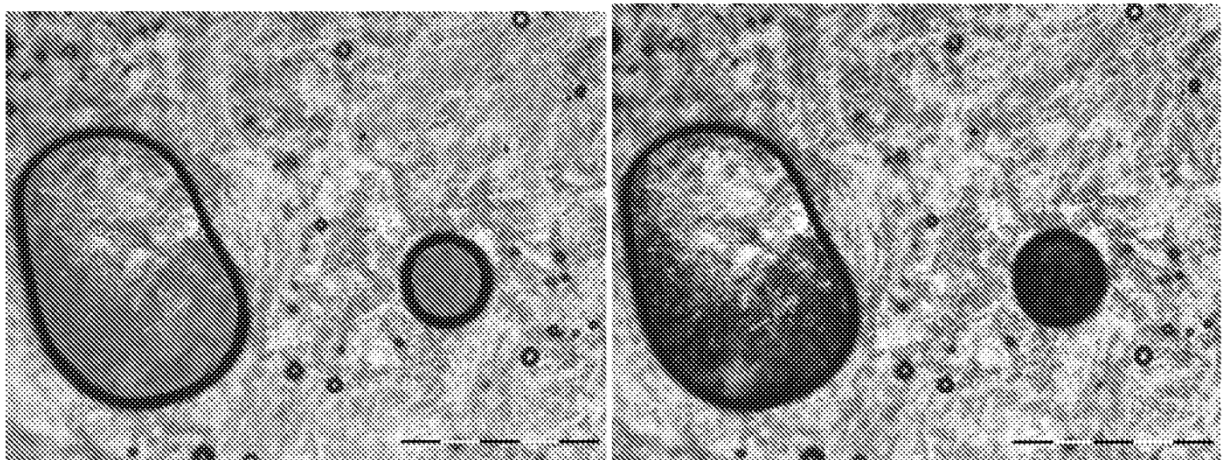


FIG. 31A

FIG. 31B