

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 996 688**

51 Int. Cl.:

A61K 31/201 (2006.01)
A61K 31/202 (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)
A61K 31/575 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.12.2018** **PCT/IB2018/001459**
87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2019** **WO19111048**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2018** **E 18833289 (4)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2024** **EP 3720431**

54 Título: **Derivados de ácidos grasos para el tratamiento de la esteatohepatitis no alcohólica**

30 Prioridad:

06.12.2017 NO 20171944
06.12.2017 NO 20171945
09.10.2018 US 201862743013 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2025

73 Titular/es:

BASF AS (100.00%)
Lilleakerveien 2B
0283 Oslo, NO

72 Inventor/es:

STEINEGER, HILDE HERMANSEN;
FRASER, DAVID ALAN y
SKJÆRET, TORE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 996 688 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados de ácidos grasos para el tratamiento de la esteatohepatitis no alcohólica

Campo de la invención

- 5 La presente divulgación se refiere a un compuesto, y a una composición que comprende el compuesto, para su uso en el tratamiento de la esteatohepatitis (NASH) no alcohólica caracterizada por fibrosis en un sujeto que lo necesita. El compuesto para uso de acuerdo con la invención, es un ácido graso insaturado con un oxígeno incorporado en la posición β y que comprende además un sustituyente α .

Antecedentes de la invención

- 10 Los ácidos grasos omega-3 de cadena larga, por ejemplo, el ácido (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaenoico (EPA) y el ácido (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoico (DHA), tienen amplios efectos biológicos que influyen en los niveles de lípido plasmático, las funciones cardiovascular e inmunológica, la acción de la insulina, el desarrollo neuronal y la función visual. Actualmente se prescriben dosis altas de EPA/DHA para el tratamiento de la hipertrigliceridemia (HTG) grave. Estos efectos están mediados, al menos parcialmente, por efectos sobre el metabolismo de los ácidos grasos en el hígado.
- 15 En la técnica anterior se ha sugerido el uso de compuestos omega-3 como EPA y DHA para tratar la esteatohepatitis (NASH) no alcohólica. A modo de ejemplo, el documento WO 2014/057522 de Mochida se refiere a composiciones que comprenden icosapentato de etilo para su uso en el tratamiento o alivio de los síntomas de NASH.
- 20 Dignity Science LTD (documento WO2014/118097) ha sugerido el uso de compuestos omega-3 modificados, como el ácido 15-hidroxiicosapentaenoico (15-OHEPA), para tratar trastornos del hígado graso, como la enfermedad (NAFLD) del hígado graso no alcohólico y la NASH. Krisani Biosciences (documento WO2014/045293) también ha propuesto el uso de compuestos omega-3 modificados, para tratar diferentes enfermedades, incluyendo la NASH. Más recientemente, Pronova Biopharma AS (WO2016173923 A1) propuso el uso de ácidos grasos estructuralmente modificados que contienen azufre, para el tratamiento de la NASH.
- 25 El documento WO 2014/132134 divulga composiciones que comprenden ácido 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaenilo)butanoico; un triglicérido; y un tensioactivo, así como procedimientos para su uso. El documento WO 2012/059818 divulga un procedimiento para reducir el desarrollo de aterosclerosis en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de ácido 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaenilo)butanoico.
- 30 Enfermedad (NAFLD) del hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis (NASH) no alcohólica se utilizan con frecuencia de manera intercambiable, a pesar del hecho de que la NAFLD abarca un espectro mucho más amplio de enfermedad hepática, incluyendo la esteatosis hepática aislada (> 5 % de los hepatocitos histológicamente). La esteatosis hepática es muy probablemente un trastorno relativamente benigno cuando no está acompañada de una respuesta inflamatoria y daño celular. Sin embargo, un subgrupo de pacientes con
- 35 NAFLD presenta lesión e inflamación de las células hepáticas además de esteatosis hepática, una afección conocida como esteatohepatitis (NASH) no alcohólica. La NASH es virtualmente indistinguible histológicamente de la esteatohepatitis alcohólica (ASH). Mientras la esteatosis simple observada en la NAFLD no se correlaciona con un aumento de la morbilidad o la mortalidad a corto plazo, la NASH aumenta drásticamente los riesgos de cirrosis, insuficiencia hepática y carcinoma hepatocelular (HCC). La cirrosis debida a NASH es
- 40 una razón crecientemente frecuente de trasplante de hígado. Mientras la morbilidad y la mortalidad por causas hepáticas aumentan considerablemente en pacientes con NASH, se correlacionan aún más fuertemente con la morbilidad y la mortalidad por enfermedad cardiovascular.
- Aún se debaten criterios uniformes para diagnosticar y presentar la NASH (ver detalles en secciones posteriores). Los componentes histológicos clave de la NASH son esteatosis, abombamiento hepatocelular e
- 45 inflamación lobulillar; la fibrosis no es parte de la definición histológica de la NASH. Sin embargo, el grado de fibrosis en la biopsia hepática (etapa) predice el pronóstico, mientras el grado de inflamación y necrosis en la biopsia hepática (grado) no lo son.
- Respecto a los diversos componentes histológicos, se ha demostrado que el tratamiento con ácidos grasos omega-3 reduce eficazmente la esteatosis hepática en pacientes con NAFLD (Scorletti E, et al., Effects of
- 50 purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in non-alcoholic fatty liver disease: Results from the *WELCOM study, Hepatology. octubre de 2014;60(4):1211-2 nd, si el tratamiento se establece en una etapa temprana de la enfermedad, es concebible que esto pueda retrasar la progresión a las etapas posteriores más graves de la enfermedad. Sin embargo, es cuestionable si los ácidos grasos omega-3 son lo suficientemente potentes para tratar y/o revertir la NASH cuando se han desarrollado cambios histológicos/inflamatorios
- 55 pronunciados (Sanyal AJ, et al; Grupo de estudio EPE-A, Gastroenterology. Agosto de 2014; 147(2):377-84.e1).

La eficacia moderada de los ácidos grasos omega-3 en el tratamiento de la NASH puede ser secundaria a sus efectos leves sobre otras vías que subyacen a la patogénesis de la NASH. Las investigaciones en modelos humanos y animales de NASH han demostrado de manera convincente que existen múltiples factores involucrados en el desarrollo de esteatohepatitis y fibrosis en contraposición a la esteatosis hepática aislada. Estos incluyen resistencia a la insulina, estrés oxidativo, inflamación, endotoxinas derivadas del intestino y exceso de colesterol hepático y ácidos biliares. Se ha demostrado que todos estos factores desempeñan un papel contribuyente importante en individuos genéticamente susceptibles y, en consecuencia, se están desarrollando fármacos dirigidos a estas vías para el tratamiento de la NASH.

Al igual que con la NASH, la enfermedad hepática alcohólica (ALD) se puede agrupar en estadios histológicos que representan una transición desde el hígado graso o la esteatosis simple a la hepatitis alcohólica (es decir, ASH) y, finalmente, a la hepatitis crónica con fibrosis hepática o cirrosis. Por lo tanto, aunque los orígenes de la ASH y la NASH pueden diferir, la respuesta hepática a la respectiva agresión crónica tiene muchas similitudes, incluyendo las cascadas proinflamatorias y profibróticas que involucran la activación de macrófagos y la producción de citoquinas y las células en forma de estrella activadas resultantes, es decir, los miofibroblastos proliferativos. (Ver, *por ejemplo*, Friedman, SL; Alcoholism: Clinical and Experimental Research. Mayo de 1999; 23(5):904-910.)

Un desafío en el desarrollo de fármacos dirigidos a NASH y ASH es la falta de modelos preclínicos que representen individualmente estas enfermedades en humanos. Los modelos de roedores que pueden ser más representativos de los trastornos metabólicos que típicamente acompañan a la NASH, como la dislipidemia y la resistencia a la insulina, se caracterizan por inflamación hepática y fibrosis muy leves. En el otro extremo del espectro se encuentran los modelos de fibrosis inducida químicamente, por ejemplo, el tetracloruro de carbono (CCl₄) o fibrosis inducida por tioacetamida, que desarrollan una fibrosis más severa pero pueden carecer de traducción a los humanos respecto a ambos componentes metabólicos, como la resistencia a la insulina y la obesidad. Por lo tanto, se necesitan múltiples modelos preclínicos que aborden ambos extremos del espectro etiopatogénico (perturbaciones metabólicas-respuesta inflamatoria-fibrosis) para la identificación de potenciales fármacos para NASH y ASH.

Otro elemento que es importante considerar al comparar la fibrosis hepática en roedores con la de humanos, es la ubicación y la relevancia funcional de la fibrosis inducida. Por ejemplo, los modelos de fibrosis grave de duración más corta pueden representar únicamente los grandes tractos portales densos en colágeno en lugar de los depósitos de colágeno parenquimatoso, que son funcionalmente más relevantes y con frecuencia representan la mayor parte del colágeno del hígado. Por lo tanto, el uso de una combinación de evaluación bioquímica (p. ej., hidroxiprolina) e histológica (p. ej., morfometría Sirius Red) de la fibrosis en modelos de roedores es óptimo respecto a la cantidad, la ubicación y la relevancia funcional de los depósitos de colágeno hepático.

La identificación de fármacos que se dirijan al componente de fibrosis de la NASH y la ASH es crucial, ya que la fibrosis hepática puede progresar a cirrosis, que a su vez se asocia con una morbilidad y una mortalidad muy aumentadas. También representa el principal criterio de valoración final en los estudios clínicos de enfermedades hepáticas crónicas. Por ejemplo, los datos emergentes sugieren que la fibrosis, en lugar de NASH *per se*, sea el predictor histológico más importante de muerte, tanto relacionada con el hígado como de no hígado. Además, la cirrosis es un cofactor importante del cáncer de hígado primario. Por lo tanto, es imperativo que los nuevos fármacos en desarrollo para el tratamiento de la NASH y la ASH sean lo suficientemente potentes para prevenir el desarrollo y/o revertir la progresión de la fibrosis establecida.

El documento WO2016173923A1 de Pronova Biopharma Norge AS divulga que los ácidos grasos modificados estructuralmente que contienen azufre, como el ácido 2-etil-2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaenil)butanoico (Compuesto N), pueden ser útiles en el tratamiento de la NASH. Esto se basó en el hallazgo de que el Compuesto N era superior a la rosiglitazona, un agonista de PPAR-gamma, para prevenir la fibrosis hepática inducida por la dieta. También indicó que el Compuesto N previno la entrada de células inflamatorias al hígado. Se demostró que el compuesto N tuvo eficacia para reducir la fibrosis (medida por la relación hidroxiprolina/prolina) en ratones APOE*3Leiden.CETP. De manera importante, los ratones APOE*3Leiden.CETP solo desarrollan una respuesta fibrótica hepática muy leve (un aumento del 20-30 % en la matriz extracelular), medida mediante un ensayo bioquímico que evalúa el contenido de hidroxiprolina (HYP). Además, en el modelo específico descrito en el documento WO2016173923A1, la cantidad de fibrosis hepática medida mediante morfometría Sirius Red (SR) fue mucho menor que la encontrada en 5 estudios previos que utilizaron una configuración experimental similar. En esos estudios, se encontró alrededor de un 4-5 % de fibrosis después de 20 semanas y de un 7-8 % después de 25-30 semanas, medido mediante morfometría SR, en comparación con el 1.5 % en el estudio presentado en el documento WO2016173923A1. Para medir la fibrosis, la morfometría SR es más sensible que el análisis bioquímico (HYP), que puede subestimar el colágeno funcionalmente más relevante que es principalmente parenquimatoso, en contraste con el colágeno portal funcionalmente menos relevante pero cuantitativamente predominante.

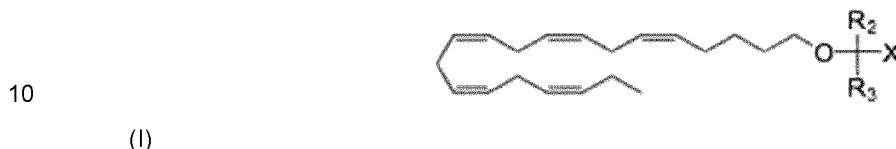
Así, sobre la base de la necesidad de fármacos potentes para el tratamiento de la NASH y la ASH, como para tratar o revertir de manera profiláctica la fibrosis hepática, se han realizado varios estudios nuevos para

identificar compuestos que se puedan usar en el tratamiento de estos aspectos de la enfermedad hepática, y para confirmar el efecto sobre la base de nuevas evaluaciones y mejores modelos con un mayor nivel de fibrosis.

- 5 En base a la necesidad de fármacos potentes para el tratamiento de NASH y ASH, como para tratar profilácticamente o revertir la fibrosis hepática, se han realizado varios estudios nuevos para identificar compuestos que puedan usarse en el tratamiento de estos aspectos de la enfermedad hepática y para confirmar el efecto basándose en nuevas evaluaciones y mejores modelos.

Breve resumen de la invención

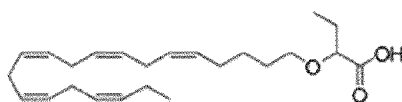
La presente divulgación proporciona un compuesto de la Fórmula (I):



en donde R_2 y R_3 son iguales o diferentes y se seleccionan entre un átomo de hidrógeno y un grupo alquilo C_1-C_6 ; y

X es un ácido carboxílico o un éster de alquilo C_1-C_6 ;

- 15 o una sal, solvato o solvato de dicha sal del mismo, farmacéuticamente aceptables, para uso en el tratamiento terapéutico de la esteatohepatitis no alcohólica caracterizada por fibrosis.



(Compuesto A)

- 20 La presente divulgación también proporciona ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-yl)oxy)butanoico (Compuesto A) o una sal o éster farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso en el tratamiento de la esteatohepatitis no alcohólica caracterizada por fibrosis.

Breve descripción de los dibujos

Las Figs. 1A-1C representan el efecto del compuesto A sobre el número de fibras de colágeno (Fig. 1A), espesor (Fig. 1B), y longitud (Fig. 1C) en un modelo de ratón con dieta CDAA/alta en grasa.

- 25 Las Figs. 2A-2D representan los efectos del Compuesto A sobre el contenido lipídico hepático de triglicéridos (TG, Fig. 2A), diglicéridos (DG, Fig. 2B), ácidos grasos libres (FFA, Fig. 2C) y éster de colesterol (Fig. 2D) en un modelo de ratón con dieta CDAA/alta en grasa.

- 30 Las Figs. 3A-3D muestran que el compuesto A no tiene un efecto significativo en el peso corporal de los ratones alimentados con AMLN ob/ob (Fig. 3A) o el peso del hígado (Fig. 3B) después de 4 semanas de tratamiento o peso corporal (Fig. 3C) o el peso del hígado (Fig. 3D) después de 8 semanas de tratamiento.

Las Figs. 4A-4F representan el efecto de 4 semanas de tratamiento con el Compuesto A sobre la expresión de genes canónicos que regulan la fibrogénesis hepática en ratones alimentados con AMLN ob/ob.

- 35 Las Figs. 5A-5D representan el efecto de 4 semanas de tratamiento con el Compuesto A sobre la expresión de genes que regulan la estabilidad de la matriz (ECM) extracelular o la fibrólisis en ratones alimentados con AMLN ob/ob.

Las Figs. 6A-6F muestran que 8 semanas de tratamiento con el Compuesto A reducen la α -SMA hepática (Figs. 6A-6B), contenido de col1a1 (Figs. 6C-6D), y de colágeno (Figs. 6E-6F) en ratones alimentados con AMLN ob/ob.

- 40 Las Figs. 7A-7B muestran que 8 semanas de tratamiento con el Compuesto A en ratones alimentados con AMLN ob/ob disminuyeron el número de células hepáticas en forma de estrella activadas (miofibroblastos) e indujeron la regresión de la fibrosis, como lo demuestra una disminución en la α -SMA hepática (Fig. 7A) y contenido de col1a1 (Fig. 7B) respectivamente en comparación con los niveles previos al tratamiento.

Las Figs. 8A-8F muestran que 4 semanas de tratamiento con 112 mg/kg del Compuesto A dieron como resultado una menor expresión de genes hepáticos asociados con la inflamación en ratones AMLN ob/ob.

Las Figs. 9A-9B representan los efectos de 8 semanas de tratamiento con el Compuesto A sobre los niveles hepáticos de Galectina-3 (Gal-3) en ratones AMLN *ob/ob*.

5 Las Figs. 10A-10B representan los efectos de 8 semanas de tratamiento con el Compuesto A sobre el daño hepatocelular en ratones AMLN *ob/ob* de acuerdo con lo determinado por los niveles de enzimas hepáticas aminotransferasa (ALT) (Fig. 10A) y aspartato transaminasa (AST) (Fig. 10B).

Las Figs. 11A-11E representan el efecto de 8 semanas de tratamiento con el Compuesto A sobre la esteatosis hepática determinado por el porcentaje de área (Fig. 11A), niveles de lípidos hepáticos totales (Fig. 11B), contenido de colesterol (Fig. 11C), niveles de triglicéridos plasmáticos (Fig. 11D) y de colesterol (Fig. 11E) en ratones AMLN *ob/ob*.

10 Las Figs. 12A-12C representan los efectos de 3 semanas de tratamiento con el Compuesto A sobre el control glucémico en ratones AMLN *ob/ob*.

Las Figs. 13A-13B representan los efectos del compuesto A en las células hepáticas en forma de estrella humanas (LX-2) *in vitro*.

Descripción detallada

15 La invención se define en las reivindicaciones.

Se debería tener en cuenta que las realizaciones y rasgos descritos en el contexto de un aspecto de la presente divulgación también aplican a los otros aspectos de la invención. En algunas realizaciones, el compuesto, o la composición que comprende el compuesto, se administra en combinación con uno o más agentes activos adicionales.

20 A continuación se describen con mayor detalle aspectos particulares de la divulgación. Los términos y definiciones, como se utilizan en la presente solicitud y como se aclaran en este documento, pretenden representar el significado dentro de la presente divulgación.

Las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen referencia plural a menos que el contexto lo indique de otro modo.

25 Los términos "aproximadamente" y "alrededor de" significan ser casi lo mismo que un número o valor de referencia. Como se utilizan en este documento, los términos "aproximadamente" y "alrededor de" deberían ser entendidos generalmente como abarcando $\pm 5\%$ de una cantidad, frecuencia o valor especificados.

30 Los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento" incluyen cualquier aplicación terapéutica o profiláctica que pueda beneficiar a un mamífero humano o no humano. Tanto los tratamientos humanos como los veterinarios están dentro del alcance de la presente divulgación. El tratamiento puede responder a una afección existente o puede ser profiláctico, es decir, preventivo.

35 Los términos "administrar", "administración" y "administrando" como se utilizan en este documento se refieren a (1) proporcionar, dar, dosificar y/o prescribir por parte de un profesional de la salud o su agente autorizado o bajo su dirección, un compuesto o composición de acuerdo con la presente divulgación, y (2) poner dentro, tomar o consumir por el paciente humano o la persona misma, o un mamífero no humano, un compuesto o composición de acuerdo con la presente divulgación.

40 Los términos "prevenir y/o tratar" y "tratamiento terapéutico y/o profiláctico de" pueden ser usados de manera intercambiable. Típicamente, los compuestos de la Fórmula (I) se utilizarán para el tratamiento, es decir, el tratamiento terapéutico de la NASH. Sin embargo, también se prevé que en algunos casos los compuestos de la Fórmula (I) se utilizarán para el tratamiento profiláctico de la NASH, por ejemplo en casos en los que un paciente tiene uno o múltiples factores de riesgo asociados con la NASH.

45 Los términos "administrado en combinación" y "coadministración" o "coadministración" son usados de manera intercambiable y se refieren a la administración de un (a) compuesto de la Fórmula (I), o una sal, solvato, o solvato de dicha sal del mismo, farmacéuticamente aceptables; y (b) al menos un agente activo adicional, juntos de manera coordinada. Por ejemplo, la coadministración puede ser administración simultánea, administración secuencial, administración superpuesta, administración a intervalos, administración continua o una combinación de ellas. El modo de administración puede ser diferente para los compuestos y el(los) agente(s) adicional(es), y la coadministración incluye cualquier modo de administración, tal como oral, subcutánea, sublingual, transmucosal, parenteral, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, bucal, sublingual, tópica, vaginal, rectal, oftálmica, ótica, nasal, inhalada y transdérmica, o una combinación de las mismas. Los ejemplos
50 de administración parenteral incluyen, pero no están limitados a, administración intravenosa (IV), administración intraarterial, administración intramuscular, administración subcutánea, administración intraósea, administración intratecal o una combinación de las mismas. El compuesto de la Fórmula (I) y el agente activo adicional se pueden administrar independientemente, por ejemplo por vía oral o parenteral. En una realización, el

compuesto de la Fórmula (I) se administra por vía oral; y el agente activo adicional se administra por vía parenteral. La administración parenteral puede realizarse mediante inyección o infusión. En algunas realizaciones, el procedimiento y/o uso de la presente divulgación están dirigidos al tratamiento terapéutico y/o profiláctico de NASH o ASH utilizando al menos dos agentes activos diferentes, el compuesto de la Fórmula (I) y un agente activo adicional, respectivamente. Los al menos dos agentes activos pueden considerarse un "Producto combinado", en donde los agentes están, por ejemplo, empacados por separado y en donde ambos agentes son necesarios para lograr el efecto óptimo pretendido.

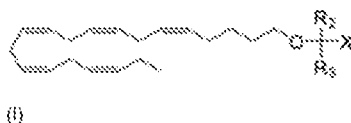
El término "cantidad farmacéuticamente eficaz" significa una cantidad suficiente para lograr los efectos farmacológicos y/o terapéuticos deseados, es decir, una cantidad del compuesto divulgado que es eficaz para su propósito previsto. Mientras las necesidades individuales del sujeto/paciente pueden variar, la determinación de intervalos óptimos para cantidades eficaces del compuesto divulgado está dentro del conocimiento de la técnica. En general, el régimen de dosificación para tratar una enfermedad y/o afección con los compuestos aquí divulgados puede determinarse de acuerdo con una variedad de factores tales como tipo, edad, peso, sexo, dieta y/o condición médica del sujeto/paciente.

El término "composición farmacéutica" significa un compuesto de acuerdo con la presente divulgación en cualquier forma adecuada para uso médico.

Los compuestos de la Fórmula (I) pueden existir en diversas formas de estereoisómeros, incluyendo enantiómeros, diastereoisómeros o mezclas de los mismos. Se entenderá que la invención abarca todos los isómeros ópticos de los compuestos de la Fórmula (I) así como sus mezclas. Por lo tanto, los compuestos de la Fórmula (I) que existen como diastereoisómeros, racematos y/o enantiómeros, están dentro del alcance de la presente divulgación.

El compuesto de la Fórmula (I) puede administrarse como monoterapia o en combinación con uno o más agentes activos adicionales.

La presente divulgación proporciona un compuesto de la Fórmula (I):



en donde R_2 , R_3 y X se definen como en la reivindicación 1.

para su uso en el tratamiento de la esteatohepatitis no alcohólica caracterizada por fibrosis.

R_2 y R_3 se eligen independientemente entre un átomo de hidrógeno o grupos alquilo C_1 - C_6 lineales, ramificados y/o cíclicos;

X es un ácido carboxílico o un éster carboxílico; o una sal, solvato o solvato de dicha sal del mismo, farmacéuticamente aceptables.

En aquellos casos en que R_2 y R_3 son diferentes, los compuestos de la Fórmula (I) son capaces de existir en formas estereoisoméricas. Se entenderá que la invención abarca todos los isómeros ópticos de los compuestos de la Fórmula (I) y mezclas de los mismos.

En al menos una realización, R_2 y R_3 se seleccionan independientemente del grupo de un átomo de hidrógeno, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo butilo y un grupo pentilo.

En al menos una realización, R_2 y R_3 se seleccionan independientemente del grupo de un átomo de hidrógeno, un grupo metilo y un grupo etilo.

En al menos una realización, uno de R_2 y R_3 es un átomo de hidrógeno y el otro de R_2 y R_3 se elige de un grupo alquilo C_1 - C_3 . En una realización, uno de R_2 y R_3 es un átomo de hidrógeno y el otro de R_2 y R_3 se selecciona del grupo de un grupo metilo y un grupo etilo, y más preferiblemente, uno de R_2 y R_3 es un átomo de hidrógeno y el otro es un grupo etilo.

Para los compuestos de la Fórmula I, R_2 y R_3 son, en algunas realizaciones, independientemente grupos alquilo C_1 - C_6 . En algunas realizaciones, ambos R_2 y R_3 son grupos alquilo C_1 - C_3 . En algunas realizaciones, R_2 y R_3 son iguales o diferentes y cada uno se elige independientemente entre un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo o un grupo isopropilo. En algunas realizaciones R_2 y R_3 son iguales y se seleccionan entre un par de grupos metilo, un par de grupos etilo, un par de grupos n-propilo o un par de grupos isopropilo. En al menos una realización preferida R_2 y R_3 son grupos etilo. En algunas realizaciones, uno de R_2 y R_3 es un grupo metilo y el otro es un grupo etilo. En algunas realizaciones, uno de R_2 y R_3 es un grupo etilo y el otro es un grupo n-propilo.

En al menos una realización, el compuesto está presente en sus diversas formas estereoisoméricas, tales como un enantiómero (R o S), un diastereoisómero o mezclas de los mismos. En al menos una realización, el compuesto está presente en forma racémica.

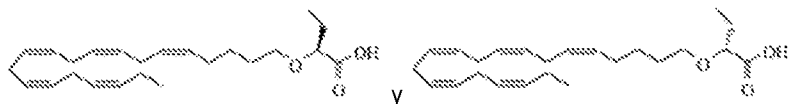
En los casos donde el compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) es una sal de un contraión con al menos un centro estereogénico, o un éster de un alcohol con al menos un centro estereogénico, el compuesto puede tener múltiples estereocentros. En esas situaciones, los compuestos de la presente divulgación pueden existir como diastereoisómeros. Por tanto, en al menos una realización, los compuestos de la presente divulgación están presentes como al menos un diastereoisómero.

En al menos una realización, el compuesto de la presente divulgación es ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (Compuesto A):



(Compuesto A)

En al menos una realización, el compuesto de la presente divulgación es ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (Compuesto A) presente en su forma S y/o R representada por las fórmulas:



En algunas realizaciones, el ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (Compuesto A) se administra como monoterapia. En algunas realizaciones, el ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (Compuesto A) se administra en combinación con uno o más agentes activos adicionales.

Como se describió anteriormente, múltiples componentes metabólicos, inflamatorios y, en última instancia, fibróticos independientes e interdependientes convergen en el desarrollo de la NASH humana. Es probable que se requiera que cualquier tratamiento exitoso aborde múltiples aspectos de la NASH, preferiblemente a través de objetivos metabólicos/inflamatorios corriente arriba. Sin embargo, como el desarrollo de fibrosis está asociado con resultados clínicos, una terapia ideal para la NASH debería apuntar al componente inflamatorio y también, idealmente, reducir o tratar profilácticamente tanto el desarrollo de fibrosis como revertir la fibrosis existente. Los ejemplos adjuntos muestran los sorprendentes e inesperadamente potentes efectos antiinflamatorios y antifibróticos de los ácidos grasos modificados estructuralmente que contienen oxígeno, como el Compuesto A. Estos hallazgos, que se demostraron en múltiples modelos preclínicos de NASH, respaldan el uso de compuestos que contienen oxígeno de la divulgación en el tratamiento terapéutico y profiláctico de NASH y ASH en sujetos humanos.

Fue sorprendente encontrar que el Compuesto A es notablemente activo en la reducción o el tratamiento profiláctico del desarrollo de la fibrosis y la reversión de la fibrosis hepática, por ejemplo, de acuerdo con lo medido por un ensayo bioquímico que evalúa el contenido de hidroxiprolina en el modelo de ratón de fibrosis inducida por dieta CDAA (l-aminoácido deficiente en colina definido) (aumento del 2 - 400 % en la matriz (ECM) extracelular frente a un aumento del 20 - 30 % en la ECM en el modelo de ratón APOE*3Leiden.CETP más leve).

Un hallazgo novedoso en el modelo NASH inducido por CDAA fue que, además, el compuesto A también redujo la fibrosis hepática, medida histológicamente mediante morfometría Sirius Red (morfometría SR). A diferencia de la evaluación bioquímica del contenido de hidroxiprolina (HYP) que mide el colágeno en los vasos grandes, la morfometría SR cuantifica los depósitos de colágeno sinusoidales funcionalmente más relevantes.

Dada la importancia fundamental de la fibrosis en la morbilidad y la mortalidad asociadas a la NASH, los resultados del modelo de NASH inducido por CDAA respaldan la noción de que los ácidos grasos estructuralmente modificados que contienen oxígeno, como el Compuesto A, son eficaces para el tratamiento de las complicaciones relacionadas con la NASH. Este hallazgo también fue respaldado por cambios en la expresión del gen hepático asociado a la fibrosis (Col1a1) y en las respuestas inflamatorias (expresión del gen TNF- α hepático). La reducción significativa del colágeno sinusoidal funcionalmente más relevante, medida mediante morfometría SR, también respalda la prueba y el uso del Compuesto A en la NASH humana.

A pesar de la importancia crítica de la fibrosis en los resultados clínicos, la aprobación regulatoria de nuevos fármacos eficaces para el tratamiento de la NASH está relacionada con la resolución de la NASH sin empeoramiento de la fibrosis. También es importante que las mejoras en los componentes de la calificación

NAS mejoren mediante nuevos compuestos. Por lo tanto, lo ideal sería que, además de la mejora deseada de la fibrosis, debieran ocurrir mejoras en la esteatosis, la inflamación lobular y el abombamiento hepatocelular.

Un hallazgo novedoso en otro modelo de NASH, el modelo de ratón STAM, fue que además de mejoras en la esteatosis y la inflamación, el Compuesto A mejoró el abombamiento hepatocelular. El abombamiento hepatocelular generalmente se define como un agrandamiento celular de 1.5 - 2 veces el diámetro normal del hepatocito, con citoplasma enrarecido y ha mostrado que se correlaciona con fibrosis y está asociado con lesión hepática.

El compuesto A también previno el agrandamiento celular (definido como hipertrofia hepatocelular) en ratones doblemente transgénicos APOE*3L.CETP. La definición de hipertrofia frente al abombamiento se relaciona con las diferencias histológicas específicas de los hepatocitos de roedores frente a los humanos.

En combinación con los efectos antiinflamatorios descritos, estos nuevos hallazgos relacionados con la hipertrofia/abombamiento hepatocelular resaltan la utilidad potencial del Compuesto A para mejorar todos los componentes de la calificación NAS, lo que a su vez debería contribuir a un resultado positivo en el desarrollo clínico y la posterior aprobación regulatoria.

Fue sorprendente descubrir la eficacia del Compuesto A para modular los componentes inflamatorios y fibróticos en múltiples modelos de roedores con NASH de distinta gravedad, como se describió anteriormente y se muestra en los Ejemplos.

La compleja interacción entre el reclutamiento, la activación, la diferenciación y la proliferación de células inmunes adaptativas y no adaptativas en la NASH implica que la confianza en un cualquier parámetro inflamatorio requiere una medición concomitante de la fibrosis para interpretar la significancia funcional de dichas lecturas. Por lo tanto, los efectos antifibróticos del Compuesto A en el modelo CDAA pueden reforzar la relevancia clínica de los efectos antiinflamatorios observados con ácidos grasos modificados estructuralmente sustituidos con oxígeno.

Dado que la aprobación regulatoria de nuevos fármacos eficaces para el tratamiento de la NASH depende de la resolución de la NASH sin empeoramiento de la fibrosis), las mejoras en la hipertrofia/abombamiento hepatocelular observadas con el tratamiento con el Compuesto A en dos modelos distintos de roedores con NASH, también son un hallazgo importante y novedoso (la hipertrofia/abombamiento no medidos en el modelo de ratón CDAA).

En combinación con los efectos antiinflamatorios descritos, estos nuevos hallazgos relacionados con la hipertrofia/abombamiento hepatocelular resaltan la utilidad potencial del Compuesto A para mejorar todos los componentes de la calificación NAS, lo que a su vez debería contribuir a un resultado positivo en el desarrollo clínico y la posterior aprobación regulatoria.

De manera importante, la capacidad de los compuestos, como el Compuesto A, para mejorar todos los componentes de la calificación NAS y la fibrosis asociada con los tractos portales y el parénquima en múltiples modelos preclínicos de NASH de diferente etiopatogénesis, proporciona un fuerte respaldo para su prueba en sujetos humanos con NASH.

Además, debido a que una proporción significativa de pacientes con NASH también tienen diabetes tipo 2, es importante estudiar el efecto del inicio tardío del tratamiento con un agente, como el Compuesto A, sobre la esteatosis hepática, la inflamación y la fibrosis, así como el efecto sobre el control glucémico, en un modelo de NASH inducido por una dieta de obesidad. Los efectos antiinflamatorios, antifibróticos y reductores de la esteatosis del Compuesto A descritos anteriormente se demostraron además en un modelo de NASH inducido por una dieta de obesidad (ratones alimentados con alto contenido de grasa AMLN ob/ob). El compuesto A también tuvo efectos positivos sobre el control glucémico en este modelo sin afectar el peso corporal, a diferencia de las tiazolidindionas (por ejemplo, pioglitazona), que afectan negativamente el peso corporal. Además, el Compuesto A redujo los niveles plasmáticos de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato transaminasa (AST), lo que indica que se redujo la lesión y/o daño hepatocelulares.

Con base en estos hallazgos, los compuestos de la Fórmula (I) pueden administrarse para tratar y/o revertir la esteatohepatitis (NASH) no alcohólica caracterizada por fibrosis. En algunas realizaciones, el tratamiento de NASH puede ser profiláctico. Además, los compuestos pueden administrarse para tratar al menos una enfermedad, afección o factor de riesgo asociado con NASH. En algunas realizaciones, el tratamiento de al menos una enfermedad, afección o factor de riesgo asociado con NASH puede ser profiláctico.

En vista de la similitud de los mecanismos proinflamatorios y profibróticos entre la NASH y la esteatohepatitis alcohólica (ASH), los efectos antiinflamatorios y antifibróticos de los compuestos descritos en este documento en los modelos de NASH y en experimentos *in vitro* son así relevantes para el tratamiento y/o reversión de la ASH, en particular, la prevención de la progresión y la inducción de la regresión de la ASH avanzada y la fibrosis asociada. Por ejemplo, los efectos inhibidores del Compuesto A sobre la proliferación de células LX-2 (humanas en forma de estrella) aisladas *in vitro*, fue independiente de la señalización paracrina de las células

parenquimales y/o células de Kupffer, lo que sugiere que los efectos antifibróticos del Compuesto A podrían lograrse independientemente de si los estímulos corriente arriba derivan de agresiones hepáticas asociadas a NASH o ASH.

En consecuencia, se divulga un procedimiento para reducir o tratar profilácticamente el desarrollo de la fibrosis hepática y reducir la fibrosis hepática existente. Mediante el procedimiento, la fibrosis se trata reduciendo el área fibrótica, el contenido fibrótico o la gravedad de la fibrosis. El procedimiento puede proporcionar una disminución, tal como una disminución significativa, en el porcentaje del área de superficie de la fibrosis hepática. El procedimiento puede proporcionar una disminución en la calificación NAS compuesta, como una disminución significativa en la calificación NAS. Además, el procedimiento puede abarcar una reducción de la inflamación hepática, como la inflamación lobular; una reducción del abombamiento hepatocelular; y reducción de la esteatohepatitis; además de mejorar la condición fibrótica.

En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce el área fibrótica hepática en 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 % o 70 % de acuerdo con lo determinado por morfometría Sirius Red. En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce el área fibrótica hepática en 20 - 30 %, 30 - 40 %, 10 - 40 %, 40 - 50 %, 40 - 60 %, 50 - 60 %, 50 - 70 % o 60 - 70 %. En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce el contenido de fibrosis hepática en 20 %, 25 %, 30 %, 35 % o 40 % de acuerdo con lo determinado por el contenido de hidroxiprolina hepática. En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce el contenido de fibrosis hepática en 20 - 30 %, 20 - 25 %, 24 - 30 % o 30 - 40 %, 30 - 35 % o 35 - 40 %. En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce el contenido de colágeno hepático en 20 %, 25 %, 30 %, 35 % o 40 %. En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce el contenido de colágeno hepático en 20 - 30 %, 20 - 25 %, 25 - 30 %, 30 - 40 %, 30 - 35 % o 35 - 40 %. En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce el área de contenido de α - SMA hepática en comparación con los niveles previos al tratamiento, en 3 %.

En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce la esteatosis en 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 %. En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce la esteatosis en 40 - 50 %, en 50 - 60 %, en 60 - 70 %, en 50 - 70 %, en 70 - 80 %, en 60 - 80 %, en 70 - 90 % o en 80 - 90 %. En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce el contenido total de lípidos hepáticos en 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 %. En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce el contenido total de lípidos hepáticos en 20 - 30 %, en 30 - 40 % o en 40 - 50 %.

En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce el abombamiento hepatocelular en 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 %. En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce la hipertrofia hepatocelular en 30 - 40 %, 30 - 35 %, 35 - 40 %, 40 - 50 %, 40 - 45 % o 45 - 50 %. En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce la hipertrofia hepatocelular en 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % u 80 %. En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce la hipertrofia hepatocelular en 40 - 50 %, 50 - 60 %, 60 - 70 % o 70 - 80 %. En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce la calificación NAS en 30 %, en 35 %, en 40 %, en 45 %, en 50 %, en 55 %, en 60 %, en 65 % o en 70 %. En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce la calificación NAS en 30 - 40 %, en 40 - 50 %, en 30 - 50 %, en 50 - 60 %, en 60 - 70 % o en 50 - 70 %.

En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce la inflamación hepática en 20 %, 30 % o 40 % de acuerdo con lo determinado por los niveles de galectina (Gal - 3). En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce la inflamación hepática en 20 - 30 %, 20 - 25 %, 25 - 30 %, 30 - 40 %, 30 - 35 % o 35 - 40 %. En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce los niveles plasmáticos de alanina aminotransferasa (ALT) en 20 %, 35 %, 30 %, 35 % o 40 %. En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce los niveles de ALT en 20 - 30 %, 20 - 25 %, 25 - 30 %, 30 - 40 %, 30 - 35 % o 35 - 40 %. En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce los niveles plasmáticos de aspartato transaminasa (AST) en 10 %, 15 % o 20 %. En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación reduce los niveles de AST en 10 - 15 %, en 10 - 20 % o en 15 - 20 %.

En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación y/o el tratamiento con un compuesto de la presente divulgación, por ejemplo, el Compuesto A, mejora una calificación NAS de una biopsia de hígado, una evaluación de MRI LiverMultiScan PDFF y cT1, prueba(s) de función hepática, HOMA-IR y/o biomarcador(es) de inflamación y fibrosis (incluyendo hsCRP, Pro-C3, panel ELF y otros biomarcadores adecuados) en comparación con un control.

En algunas realizaciones, un compuesto de la presente divulgación y/o tratamiento con un compuesto de la presente divulgación, por ejemplo, Compuesto A, da como resultado la mejora, por ejemplo, reducción, del abombamiento (por ejemplo, calificación = 0), por ejemplo, con una calificación de inflamación lobular de 0 o 1 y sin empeoramiento de la fibrosis en comparación con un control. En algunas realizaciones, un compuesto de

la presente divulgación y/o tratamiento con un compuesto de la presente divulgación, por ejemplo, Compuesto A, da como resultado cambios, por ejemplo, mejoras, desde la línea base en la calificación NAS de las biopsias de hígado, en las calificaciones histológicas individuales para esteatosis, abombamiento, inflamación y fibrosis, en las enzimas hepáticas, en los parámetros de imágenes y/o en biomarcadores (incluyendo hsCRP, Pro-C3, panel ELF, citoquinas y otros biomarcadores adecuados) en comparación con un control.

En algunas realizaciones, la seguridad y tolerabilidad de un compuesto de la presente divulgación, por ejemplo, el Compuesto A, en pacientes puede ser evaluada mediante el monitoreo de eventos adversos en pacientes, el monitoreo de valores de laboratorio (hematología, bioquímica y análisis de orina), signos vitales (presión arterial, frecuencia del pulso y temperatura), hsCRP y/o ECGs de 12 derivaciones en reposo en comparación con un control. La farmacocinética del Compuesto A en pacientes puede ser estudiada, por ejemplo, mediante la comparación de las concentraciones plasmáticas mínimas medias en estado estacionario para el Compuesto A tomado a intervalos regulares. Por ejemplo, se pueden tomar las concentraciones plasmáticas mínimas medias a intervalos de 8 semanas para determinar la farmacocinética del Compuesto A.

Los pacientes que cumplen uno o más de los siguientes criterios pueden mostrar una respuesta mejorada al tratamiento con Compuesto A, en comparación con los pacientes que no cumplen los mismos uno o más criterios: un diagnóstico histológico de NASH, calificación de fibrosis de 1-3 inclusive (F1 limitada al 30 %), PDFF >10 % en MRI, enfermedad hepática compensada con los siguientes criterios hematológicos y bioquímicos al ingresar al protocolo: ALT < 5 x ULN, AST >30, Hemoglobina > 11 g/dL para mujeres y > 12 g/dL para hombres, Glóbulos blancos (WBC) > 2.5 K/ μ L, Recuento de neutrófilos > 1.5 K/ μ L, Plaquetas > 100 K/ μ L, Bilirrubina total <35 μ mol/L (aunque los pacientes con bilirrubina > 35 μ mol/L pueden incluirse si la bilirrubina no conjugada en el ajuste de un síndrome de Gilbert), Albúmina > 36 g/L, Relación Internacional Normalizada (INR) < 1.4, creatinina Sérica <1.3 mg/dL (hombres) o <1.1 (mujeres) o tasa de filtración glomerular estimada $\geq$ 60 ml/min/1.73 m², ninguna otra causa de enfermedad hepática crónica (p. ej., autoinmune, colangitis biliar primaria, HBV, HCV, de Wilson, deficiencia de α -1-antitripsina, hemocromatosis) y/o, si corresponde, diabetes tipo 2 estable (definida como HgbA1c < 9.5 % y glucemia en ayunas <10 mmol/L, sin cambios en la medicación en los 6 meses anteriores y/o sin síntomas nuevos asociados con diabetes descompensada en los 3 meses anteriores).

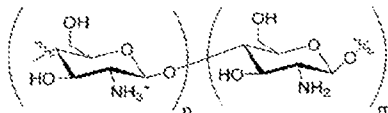
Por el contrario, los pacientes que cumplen uno o más de los siguientes criterios pueden no mostrar respuesta al tratamiento con Compuesto A, en comparación con los pacientes en los que está ausente uno o más de los mismos criterios: antecedentes de ingestión excesiva sostenida de alcohol, una condición metabólica inestable (p. ej., definida por una ganancia o pérdida de peso de más de 5 kg en los últimos tres meses, diabetes con mal control glicémico (HgbA1c > 9.5 %), o introducción de un antidiabético o de un fármaco antiobesidad/cirugía bariátrica (pérdida de peso) de mala absorción o restrictiva en los últimos 6 meses antes de la selección), antecedentes de cirugía bariátrica gastrointestinal de mala absorción en menos de 5 años o ingestión de fármacos de los que se sabe que producen esteatosis hepática, incluyendo corticosteroides, estrógenos en dosis altas, metotrexato, tetraciclina o amiodarona en los 6 meses anteriores, antígeno HB > 0, PCR de HCV > 0 (los pacientes con antecedentes de infección por HCV pueden incluirse si la PCR de HCV es negativa durante más de 3 años), o infección por HIV, diabetes tipo 1 o diabetes tipo 2 tratada con insulina, cetoacidosis diabética, triglicéridos en ayunas > 300 mg/dL, trastornos de la hemostasis o tratamiento actual con anticoagulantes, antecedentes de o arritmias cardíacas actuales y/o antecedentes de enfermedad cardiovascular, incluyendo infarto de miocardio, excepto en pacientes con hipertensión bien controlada, y cualquier anomalía clínicamente significativa en el ECG, y/o toma de antidiabéticos de los que se sabe que tienen actividad contra la NASH, por ejemplo, pioglitazona y agonistas del receptor de GLP-1.

Los compuestos de la Fórmula (I) se pueden preparar como se describe, por ejemplo, en Solicitudes PCT WO2009/061208, WO2010/128401, WO2011/089529, WO2016/156912 y de acuerdo con los ejemplos a continuación. Además, se puede preparar el Compuesto A como se describe, por ejemplo, en los documentos PCT WO2010/128401 y WO2014/132135 y de acuerdo con el Ejemplo 2 a continuación.

Los ejemplos que se proporcionan a continuación son ejemplares y un experto en la técnica entendería cómo aplicar estos procedimientos generales para llegar a otros compuestos dentro del alcance de la Fórmula (I). Los compuestos de la presente divulgación pueden estar en forma de una sal o éster farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, los compuestos de la Fórmula (I) pueden estar en forma de ésteres, tales como un fosfolípido, un glicérido o un éster de alquilo C₁-C₆. En al menos una realización, el éster se elige entre un glicérido o un éster de alquilo C₁-C₆. En al menos una realización, el éster se elige entre un triglicérido, un 1,2-diglicérido, un 1,3-diglicérido, un 1-monoglicérido, un 2-monoglicérido, un éster etílico, un éster propílico, un éster isopropílico, un éster n-butílico y un éster terc-butílico. En al menos una realización, el compuesto de la Fórmula (I) está presente como un éster metílico, un éster etílico, un éster isopropílico, un éster n-butílico o un éster terc-butílico, por ejemplo como un éster metílico o un éster etílico. típicamente, los ésteres representados por la Fórmula (I) (por ejemplo, ésteres etílicos) se hidrolizarán en el tracto gastrointestinal.

Las sales adecuadas para la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, sales de NH⁴⁺; iones metálicos como Li⁺, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, o Ca²⁺; una amina primaria protonada tal como tercbutilamonio, (3S,5S,7S)-

adamantan-1-amonio, 1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-amonio, una aminopiridina protonada (por ejemplo, piridina-2-amonio); una amina secundaria protonada tal como dietilamonio, 2,3,4,5,6-pentahidroxi-N-metilhexan-1-amonio, N-etilnaftalen-1-amonio, una amina terciaria protonada tal como 4-metilmorfolin-4-io, una amina cuaternaria protonada tal como 2-hidroxi-N,N,N-trimetiletan-1-amonio y una guanidina protonada tal como amino((4-amino-4-carboxibutil)amino)metaniminio o un heterociclo protonado tal como 1H-imidazol-3-io. Ejemplos adicionales de sales adecuadas incluyen sales de una diamina diprotonada tal como etano-1,2-diamonio o piperazina-1,4-dio. Otras sales de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender Quitosano protonado:



- 10 En al menos una realización, las sales se eligen entre una sal de sodio, una sal de calcio y una sal de colina. En una realización, la sal es una sal de sodio o una sal de calcio.

La presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar la NASH en un sujeto que lo necesita, comprendiendo administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de la Fórmula (I). El sujeto puede ser un humano o un mamífero no humano. Los compuestos aquí divulgados pueden administrarse como un fármaco, tal como en una composición farmacéutica. En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la Fórmula (I), tal como el Compuesto A, para su uso en el tratamiento de la esteatohepatitis no alcohólica. La composición aquí divulgada puede comprender al menos un compuesto como el divulgado y opcionalmente al menos un ingrediente farmacéutico no activo, es decir, un excipiente. Los ingredientes no activos pueden solubilizar, suspender, espesar, diluir, emulsionar, estabilizar, conservar, proteger, colorear, dar sabor y/o dar forma a los ingredientes activos en una preparación aplicable y eficaz, de modo que pueda ser segura, conveniente y/o aceptable para su uso. Los ejemplos de excipientes incluyen, pero no se limitan a, solventes, vehículos, diluyentes, aglutinantes, rellenos, edulcorantes, aromas, modificadores de pH, modificadores de viscosidad, antioxidantes, extensores, humectantes, agentes de desintegración, agentes retardantes de solución, aceleradores de absorción, agentes humectantes, absorbentes, lubricantes, agentes colorantes, agentes dispersantes y conservantes. Los excipientes pueden tener más de una función o papel o pueden clasificarse en más de un grupo; las clasificaciones son sólo descriptivas y no pretenden ser limitantes. En algunas realizaciones, por ejemplo, el al menos un excipiente puede elegirse entre almidón de maíz, lactosa, glucosa, celulosa microcristalina, estearato de magnesio, polivinilpirrolidona, ácido cítrico, ácido tartárico, agua, etanol, glicerol, sorbitol, polietilenglicol, propilenglicol, alcohol cetilestearílico, carboximetilcelulosa y sustancias grasas tales como grasa dura o mezclas adecuadas de las mismas. En algunas realizaciones, las composiciones actualmente divulgadas comprenden al menos una de la Fórmula (I) y al menos un antioxidante farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, tocoferol tal como alfa-tocoferol, beta-tocoferol, gamma-tocoferol y delta-tocoferol, o mezclas de los mismos, BHA tal como 2-terc-butil-4-hidroxianisol y 3-terc-butil-4-hidroxianisol, o mezclas de los mismos y BHT (3,5-di-terc-butil-4-hidroxitolueno), o mezclas de los mismos.

Las composiciones aquí divulgadas pueden formularse en formas de administración oral, por ejemplo, comprimidos o cápsulas blandas o duras de gelatina. La forma de dosificación puede ser de cualquier forma adecuada para la administración oral, como esférica, ovalada, elipsoidal, cúbica, regular y/o irregular. Se pueden utilizar técnicas de formulación convencionales conocidas en la técnica para formular los compuestos de acuerdo con la presente divulgación. En algunas realizaciones, la composición puede estar en forma de una cápsula de gelatina o un comprimido.

Una dosificación diaria adecuada de un compuesto como el descrito, tal como un compuesto de la Fórmula (I), puede variar de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 4 g, tal como de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 2 g. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la dosis diaria varía de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1.5 g, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 1 g, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1 g, de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 900 mg, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 800 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 800 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 600 mg, de aproximadamente 150 a aproximadamente 550 mg, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 500 mg. En al menos una realización, la dosis diaria varía de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 600 mg. En al menos una realización, la dosis diaria es de aproximadamente 50 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 350 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 450 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 550 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 650 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 750 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 850 mg o aproximadamente 900 mg. El(los) compuesto(s) puede(n) ser administrado(s), por ejemplo, una, dos o tres veces al día.

En al menos una realización, el compuesto de la Fórmula (I) se administra en una cantidad que varía de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 800 mg por dosis. En al menos una realización, el compuesto

de la Fórmula (I) se administra una vez al día. En al menos una realización, el compuesto de la Fórmula (I) se administra una vez al día a una dosis de 750 mg. En algunas realizaciones, el compuesto de la Fórmula (I) se administra una vez al día a una dosis de 600 mg. En algunas realizaciones, el compuesto de la Fórmula (I) se administra una vez al día a una dosis de 500 mg. En algunas realizaciones, el compuesto de la Fórmula (I) se administra una vez al día a una dosis de 300 mg. En algunas realizaciones, el compuesto de la Fórmula (I) se administra una vez al día a una dosis de 250 mg. Preferentemente, el compuesto de la Fórmula (I) se administra una vez al día a una dosis de 300 mg o 600 mg.

De acuerdo con la presente divulgación, el compuesto de la Fórmula (I) puede administrarse como monoterapia o en combinación con uno o más agentes activos adicionales. Para la coadministración, el agente activo adicional es preferiblemente un agente terapéuticamente activo, tal como un fármaco, y este preferiblemente tiene un efecto terapéutico sobre NASH o ASH, tal como sobre uno o más de los factores involucrados en el desarrollo y/o empeoramiento de NASH o ASH. Preferiblemente, el uso del producto combinado, es decir, el compuesto de la Fórmula (I) en combinación con uno o más agentes activos adicionales, tiene un efecto sinérgico en la prevención y/o tratamiento de NASH o ASH. En una realización, el uno o más agentes terapéuticos adicionales se seleccionan independientemente del grupo de inhibidores alostéricos de la acetil-CoA carboxilasa (ACC), antagonistas del receptor de angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), inhibidores de la quinasa-1 reguladora de la señal de apoptosis (ASK1), inhibidores de la caspasa, inhibidores de la cathepsina B, antagonistas de la quimioquina CCR2, antagonistas de la quimioquina CCR5, estimuladores del canal de cloruro, agentes de solubilidad de colesterol, inhibidores de la diacilglicerol O-aciltransferasa 1 (DGAT1), inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV), agonistas del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)-21, agonistas del receptor farnesoide X (FXR), mAb anti-CD3, inhibidores de la galectina-3, agonistas del péptido 1 similar al glucagón (GLP1), precursores del glutatión, inhibidores de la proteasa NS3 del virus de la hepatitis C, inhibidores de la reductasa de HMG CoA, inhibidores de la 1 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (1 β -HSDI), inhibidores de la proteína (Hsp)47 de choque térmico, antagonistas de IL-1 β , antagonistas de IL-6, agonistas de IL-10, antagonistas de IL-17, inhibidores del cotransportador de ácido biliar de sodio ileal, análogos de leptina, inhibidores de la 5 - lipoxigenasa, estimuladores del gen LPL, inhibidores del homólogo 2 de la lisil oxidasa (LOXL2), antagonistas del receptor del ácido lisofosfatídico 1 (LPA1), ácidos grasos omega-3, inhibidores de la PDE3. inhibidores de la PDE4. inhibidores de la fosfolipasa C (PLC), agonistas de PPAR α , agonistas de PPAR γ , agonistas de PPAR δ , proteína (PRF-1) pentraxina-2 humana recombinante, inhibidores de la proteína quinasa 2 asociada a Rho (ROCK2), inhibidores de la aminooxidasa sensible a semicarbazida (SSAO), inhibidores del transportador de sodio y glucosa-2 (SGLT2), inhibidores de la esteroil CoA desaturasa-1. agonistas del receptor β de la hormona tiroidea, inhibidores del ligando del factor α (TNF α) de necrosis tumoral, inhibidores de la transglutaminasa, precursores de inhibidor de la transglutaminasa y ARN activador pequeño (ARNsa).

En particular, en algunas realizaciones, los uno o más agentes activos adicionales se seleccionan del grupo de un agonista del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1); un inhibidor de la dipeptidil peptidasa (antagonistas de DPP-4) y ácidos grasos omega-3 (n-3).

Los agonistas del receptor del péptido-1 similar al glucagón, también conocidos como agonistas del receptor GLP-1 o miméticos de incretina, son agonistas del receptor GLP-1. Esta clase de fármacos se utiliza típicamente para el tratamiento de la diabetes tipo 2. Una lista de ejemplos no limitante de agonistas de GLP incluye: exenatida, liraglutida, lixisenatida, albiglutida, dulaglutida, taspoglutida y semaglutida.

En algunas realizaciones, el agente activo adicional es un inhibidor de la dipeptidil peptidasa (antagonista de DPP-4). Los antagonistas de DPP-4 son una clase de hipoglucemiantes orales que bloquean la DPP-4 (DPP-IV). Se pueden utilizar para tratar la diabetes mellitus tipo 2. El glucagón aumenta los niveles de glucosa en sangre y los inhibidores de DPP-4 reducen los niveles de glucagón y glucosa en sangre. El mecanismo de los inhibidores de DPP-4 es aumentar los niveles de incretina (GLP-1 y GIP), que inhiben la liberación de glucagón, lo que a su vez aumenta la secreción de insulina, disminuye el vaciamiento gástrico y disminuye los niveles de glucosa en sangre. Una lista de ejemplos no limitante de inhibidores de la dipeptidil peptidasa incluye: Sitagliptina, Vildagliptina, Saxagliptina, Linagliptina, Gemigliptina, Anagliptina, Teneligliptina, Alogliptina, Trelagliptina, Omarigliptina, Evogliptina, Dutogliptina.

En algunas realizaciones, el agente adicional es un ácido graso omega-3. Cuando el agente activo adicional es un ácido graso omega-3, el ácido graso omega-3 es típicamente un ácido graso omega-3 poliinsaturado de cadena larga (LC n-3 PUFA). Preferiblemente, esto incluye al menos uno de ácido (omega-3 todo-Z)-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA) y ácido (omega-3 todo-Z)-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (DHA), o derivados de los mismos. Los PUFAs n-3, incluyendo el EPA y el DHA, pueden estar en diferentes formas y se presentan en al menos una de forma de ácido graso libre; forma esterificada, como ésteres de alquilo C1-C4, y preferiblemente éster etílico; fosfolípidos; mono/di/triglicéridos; y sales de los mismos. El ácido graso omega-3 puede proporcionarse en forma de una composición, tal como una composición para administración oral. Dicha composición puede comprender al menos 40 %, tal como al menos 50 %, 60 %, 70 % u 80 % del ácido graso omega-3 activo. En algunas realizaciones, el agente activo adicional es una composición que comprende al menos uno de EPA y DHA, preferiblemente en forma de éster etílico, en una concentración de al menos 70 %.

En algunas realizaciones, los uno o más agentes activos adicionales se seleccionan independientemente del grupo de ácido acetilsalicílico, alipogen tiparvovec, aramcol, atorvastatina, B! 1467335, BLX-1002, BMS-986036, BMS-986020, cenicriviroc, cobiprostona, colesevelam, emricasan, enalapril, foramulab, GFT-505, GR-MD-02, GS-0976, GS-9674, hidroclorotiazida, icosapento etil éster (ácido etil eicosapentaenoico, éster etílico de EPA), IMM-124E, IVA337, K-877, KD-025, linagliptina, liraglutida, mercaptamina, MGL-3196, ND-L02-s0201, ácido obeticólico, olesoxi-ima, peg-ilodecaquina, pioglitazona, PRM-151, PX-102, remogliflozina etabonato, selonsertib, simtuzumab, SHP-626, solitromicina, tipelukast, TRX-318, ácido ursodesoxicólico y VBY-376. El primer componente del producto combinado, es decir, el compuesto de la Fórmula (I), puede administrarse o formularse de cualquier manera como se describió anteriormente. El segundo componente del producto combinado, el agente activo adicional, puede formularse de la forma adecuada para el tipo de agente que es y depende de varios factores, incluyendo el modo de administración del agente. La dosis del agente activo adicional depende del tipo de agente seleccionado y debería estar de acuerdo con las cantidades aprobadas para el agente específico. Como se proporciona en los Ejemplos, el uso del modelo de NASH inducido por dieta CDAA (l-aminoácido deficiente en colina definido) proporciona un modelo tanto para la fibrosis hepática como para la inflamación. Como lo respaldan los ejemplos, la combinación de un agonista de GLP-1 con un compuesto de la Fórmula (I), como el Compuesto A, tiene un efecto superior en comparación con el tratamiento con GLP-1 solo, para la fibrosis y la inflamación relacionadas con NASH. Dado que la fibrosis hepática es en gran medida una respuesta a las respuestas inflamatorias, esto también está respaldado por los cambios demostrados en la expresión del gen hepático asociado a la inflamación (TNF- α), que demuestran la superioridad de los ácidos grasos estructuralmente modificados que contienen oxígeno (Compuesto A) en combinación con un agonista de GLP-1, frente a un agonista de GLP-1 solo. En general, los datos sugieren que una combinación de un agonista de GLP-1 (o alternativamente antagonistas de DPP-4) con un compuesto de la divulgación puede lograr un efecto sinérgico para el tratamiento tanto de la inflamación hepática como de la fibrosis.

Aunque la esteatosis hepática puede ser una afección benigna en sí misma, puede sensibilizar al hígado a un "2º impacto" de otros factores que inducen una respuesta inflamatoria. Por lo tanto, es deseable una reducción de la esteatosis tanto respecto a su contribución a la calificación NAS, como a la resolución de la NASH como un posible factor "preparatorio" para otras o agresiones hepáticas continuas. Las mejoras novedosas y notables en los lípidos hepáticos logradas con una combinación de ésteres etílicos de omega-3 en dosis altas y una dosis baja de un ácido graso estructuralmente modificado que contiene oxígeno (Compuesto A) sugieren firmemente que se logra un efecto sinérgico, especialmente porque ninguno de los compuestos logró solo una reducción significativa en los triglicéridos (TG) hepáticos, en ratones transgénicos ApoE*3L-CETP.

Notablemente, el Compuesto A, en una fracción de la dosis de los ésteres etílicos de omega-3, reguló hacia arriba o hacia abajo significativamente > 1094 sondas de expresión de genes en el hígado de ratones transgénicos APOE*3.CETP frente a < 10 para los ésteres etílicos de omega-3 (datos no mostrados). Sin estar atados por la teoría, este efecto divergente sobre el transcriptoma hepático puede sugerir que el efecto sinérgico observado es secundario a la focalización de diferentes vías, en lugar de un efecto de dosis acumulativa. Los efectos significativos sobre el contenido de colesterol hepático también pueden tener efectos positivos sobre las respuestas inflamatorias relevantes para la patogénesis de la NASH y la ASH. En general, los datos en ratones APOE*3.CETP respaldan la combinación de formulaciones de PUFA omega-3, como ésteres etílicos de EPA, y un ácido graso modificado estructuralmente que contiene oxígeno de acuerdo con la Fórmula (I), como una terapia potente para la reducción de la esteatosis hepática y, por lo tanto, el tratamiento de NASH y/o ASH.

Los compuestos de la Fórmula (I) pueden administrarse como monoterapia o en combinación con al menos un agente activo adicional, para tratar y/o revertir la esteatohepatitis (NASH) no alcohólica o la esteatohepatitis alcohólica (ASH). En algunas realizaciones, el al menos un agente activo adicional es un agonista de GLP- 1. Además, con base en los hallazgos en los ratones transgénicos APOE*3.CETP, los compuestos de la Fórmula (I) pueden administrarse en combinación con al menos un agente activo adicional para tratar y/o revertir terapéuticamente y/o profilácticamente la esteatosis hepática (contenido de triglicéridos y/o colesterol). En algunas realizaciones, el al menos un agente activo adicional es un ácido graso omega-3, tal como un éster etílico de PUFA omega 3.

Los ejemplos anteriores resaltan el potencial de los ácidos grasos modificados estructuralmente que contienen oxígeno para combinarse con varios otros agentes activos para el tratamiento de NASH y/o ASH. Estas combinaciones pueden no solo mejorar los resultados relacionados con la eficacia frente a la monoterapia, sino que también pueden mejorar la seguridad. Como un ejemplo de esto último, se ha demostrado que el Compuesto A reduce significativamente la expresión de CETP en ratones APOE*3.CETP y mejora los perfiles lipídicos tanto en roedores como en humanos. Esto puede ser ventajoso para una combinación con ácido obeticólico (un agonista de FXR) que, a diferencia del Compuesto A, aumenta la expresión de CETP y empeora los perfiles lipídicos tanto en ratones APOE*3.CETP como en humanos.

Los presentes inventores han encontrado que los compuestos de la Fórmula (I), tales como el ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico, tienen una actividad farmacéutica notablemente buena. Sorprendentemente, los compuestos de la Fórmula (I) divulgados en el presente exhiben

una actividad biológica mejorada en comparación con un agonista del receptor del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1R), para tratar la fibrosis hepática y la inflamación asociadas a NASH. Los compuestos de la Fórmula (I) también exhiben posiblemente efectos sinérgicos cuando se administran en combinación con agentes activos adicionales.

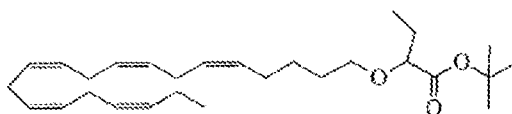
5 Ejemplos

La presente divulgación puede describirse además mediante los siguientes ejemplos no limitativos, en los que se pueden utilizar técnicas estándar conocidas por el químico experto y técnicas análogas a las descritas en estos ejemplos, cuando sea apropiado.

A menos que se indique de otro modo, las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, típicamente en el intervalo entre 18 - 25°C con solventes de grado HPLC en condiciones anhidras. Las evaporaciones se realizaron mediante evaporación rotatoria al vacío. La cromatografía en columna se realizó mediante el procedimiento instantáneo sobre gel de sílice de 40 - 63 µm (Merck) o mediante un Armen Spotlight utilizando las columnas de gel de sílice preempacadas "MiniVarioFlash", "SuperVarioFlash", "SuperVarioPrep" o "EasyVarioPrep" (Merck). Los valores de desplazamiento de resonancia magnética nuclear (RMN) se registraron en un instrumento Bruker Avance DPX 200 o 300 con multiplicidades de pico descritas como sigue: s, singlete; d, doblete; dd, doblete; t, triplete; q, cuarteto; p, pentete; m, multiplete; br, ancho. Los espectros de masas se registraron con un espectrómetro LC/MS. La separación se realizó utilizando un módulo Agilent serie 1100 en una columna Eclipse XDB-C18 de 2.1 x 150 mm con elución en gradiente. Como eluyente se utilizó un gradiente de 5-95 % de acetonitrilo en amortiguadores que contenían 0.01 % de ácido trifluoroacético o 0.005 % de formiato de sodio. Los espectros de masas se registraron con un espectrómetro de masas GI956A (electroatomización, 3000 V) cambiando el modo de ionización positiva y negativa. Los rendimientos informados son ilustrativos y no representan necesariamente el rendimiento máximo alcanzable.

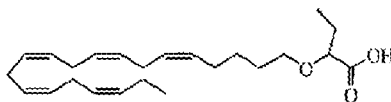
Preparación de compuestos

Ejemplo 1: Preparación de 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanoato de terc-butilo:

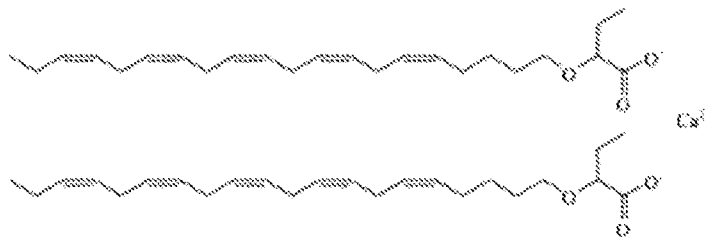


Se añadió cloruro de tetrabutilamonio (0.55 g, 1.98 mmol) a una solución de (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-ol, (3.50 g, 12.1 mmol) en tolueno (35 mL) a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se añadió una solución acuosa de hidróxido de sodio (50 % (p/p), 11.7 mL) bajo agitación vigorosa a temperatura ambiente, seguido de 2-bromobutirato de t-butilo (5.41 g, 24.3 mmol). La mezcla resultante se calentó a 50 °C y se añadió 2-bromobutirato de tbutilo adicional después de 1.5 horas (2.70 g, 12.1 mmol), 3.5 horas (2.70 g, 12.1 mmol) y 4.5 horas (2.70 g, 12.1 mmol) y se agitó durante 12 horas en total. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió agua helada (25 mL) y se separaron las dos fases resultantes. La fase orgánica se lavó con una mezcla de NaOH (5 %) y salmuera, se secó (MgSO₄), filtró y concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientemente polares de heptano y acetato de etilo (100:0 -> 95:5) como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 1.87 g (rendimiento del 36 %) del compuesto del título en forma de aceite. ¹RMN de H (300 MHz, CDCl₃): δ 0.85-1.10 (m, 6H), 1.35-1.54 (m, 11H), 1.53-1.87 (m, 4H), 1.96-2.26 (m, 4H), 2.70-3.02 (m, 8H), 3.31 (dt, 1H), 3.51-3.67 (m, 2H), 5.10-5.58 (m, 10H).

Ejemplo 2: Preparación de ácido 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaeniloxi)butanoico (Compuesto A):

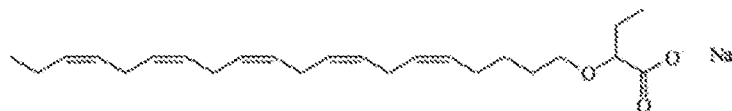


Se disolvió 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanoato de terc-Butilo (19.6 g, 45.5 mmol) en diclorometano (200 mL) y se colocó bajo nitrógeno. Se añadió ácido trifluoroacético (50 mL) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante una hora. Se añadió agua y la fase acuosa fue sometida a extracción dos veces con diclorometano. El extracto orgánico combinado se lavó con salmuera, se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró. El residuo fue sometido a cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas cada vez más polares de heptano, acetato de etilo y ácido fórmico (90: 10:1 -> 80:20:1) como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 12.1 g (rendimiento del 71 %) del compuesto del título en forma de aceite. ¹RMN de H (300 MHz, CDCl₃): δ 0.90-1.00 (m, 6H), 1.50 (m, 2H), 1.70 (m, 2H), 1.80 (m, 2H), 2.10 (m, 4H), 2.80-2.90 (m, 8H), 3.50 (m, 1H), 3.60 (m, 1H), 3.75 (t, 1H), 5.30-5.50 (m, 10H); MS (electroatomización): 373.2 [M-H].

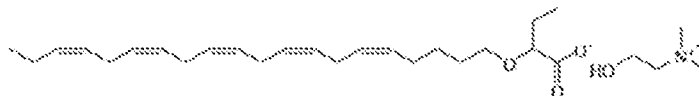
Ejemplo 3: Preparación de 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato de calcio

Se mezcló ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-Icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (1.87 g, 4.99 mmol, 93 %) con CaCO_3 (0.25 g, 2.50 mmol). Se añadió agua (1 ml) y se agitó la mezcla con agitación mecánica a TA durante 1 hora. Se desarrolla CO_2 . Se formó una pasta densa y homogénea. Con agitación se añadió acetona (7 ml). Un material sólido se separa. El material sólido se filtró y se secó sobre nitrógeno, se selló y se almacenó en el refrigerador a 4 °C. Rendimiento: 1.86 gramos (95 %). El sólido no se caracterizó más mediante procedimientos analíticos o espectroscópicos, pero se realizaron algunos experimentos que indican que se formó la sal de calcio:

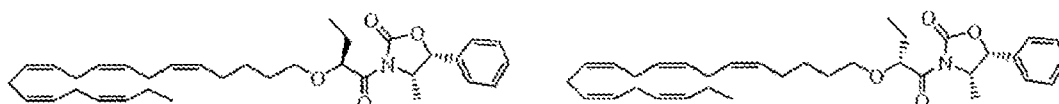
- El material sólido funde en una placa caliente por debajo de 100 °C. No se determinó un punto de fusión preciso.
- El material no libera CO_2 con la adición de ácido, pero se "disuelve" y precipita como un aceite

Ejemplo 4: Preparación de 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato de sodio

Se mezcló ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-Icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (1.87 g, 4.99 mmol, 93 %) con NaHCO_3 (0.420 g, 5.00 mmol). Se añadió agua (1 ml) y se agitó la mezcla con agitación mecánica a TA durante 1 hora. Se desarrolla CO_2 y se forma una pasta espesa y homogénea. Con agitación, se añadió etanol (7 ml) al matraz de reacción. La sal de sodio formada a partir del ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-Icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico se disuelve tras la adición de etanol (7 ml). Se filtraron pequeñas cantidades de NaHCO_3 sin reaccionar y la solución se evaporó hasta sequedad. El aceite crudo ligeramente viscoso se evaporó dos veces con etanol al 96 % para eliminar los restos de agua.

Ejemplo 5: Preparación de 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato de 2-hidroxi-N,N,N-trimetiletan-1-aminio

Se pipeteó hidróxido de colina (327.7 μL) en agua en un vial de centelleo con aproximadamente 2.5 mL de MTBE y 7.5 mL de n-Heptano. Dentro de una cámara de nitrógeno, se transfirió ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (500 mg, 95.8 %) al vial. Dentro de una cámara de nitrógeno, se añadió aproximadamente 1.0 mL de agua al vial lentamente y bajo agitación. Luego se selló el frasco. Se agitó la mezcla de reacción durante aproximadamente 30 minutos. La sal de colina del ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico formada era un material rígido, similar a un gel, que se filtró en un embudo Buchner. El material húmedo del filtro se lavó 3 veces utilizando 1 mL de MTBE. El material lavado apareció como un sólido rígido similar a un gel.

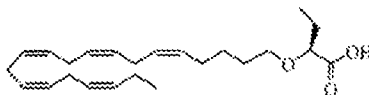
Ejemplo 6 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de (4S,5R)-3-((S)-2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaeniloxi)butanoil)-4-metil-5-feniloxazolidin-2-ona y (4S,5R)-3-((R)-2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaeniloxi)butanoil)-4-metil-5-feniloxazolidin-2-ona:

Se añadieron DMAP (1.10 g, 8.90 mmol) y DCC (1.90 g, 9.30 mmol) a una mezcla de ácido 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaenilo)butanoico (3.20 g, 8.50 mmol) en diclorometano seco (100 mL) mantenido a 0 °C bajo nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a 0 °C durante 20 minutos. Se añadió (4S,5R)-4-metil-5-feniloxazolidin-2-ona (1.50 g, 8.50 mmol) y la mezcla turbia resultante se agitó a temperatura ambiente durante cinco días. La mezcla se filtró y se concentró a presión reducida para dar un producto crudo que contenía el producto deseado como una mezcla de dos diastereoisómeros. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo al 15 % en heptano como eluyente. Se separaron los dos diastereoisómeros y se concentraron las fracciones apropiadas. El (4S,5R)-3-((S)-2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaenilo)butanoil)-4-metil-5-feniloxazolidin-2-ona eluyó primero y se obtuvo en 1.1 g (rendimiento del 40 %) como un aceite. Se obtuvo (4S,5R)-3-((R)-2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaenilo)butanoil)-4-metil-5-feniloxazolidin-2-ona en 0.95 g (rendimiento del 34 %) como un aceite.

(4S,5R)-3-((S)-2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaenilo)butanoil)-4-metil-5-feniloxazolidin-2-ona (E1): ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.90 (d, 3H), 1.00 (t, 3H), 1.07 (t, 3H), 1.45-1.57 (m, 2H), 1.62-1.76 (m, 3H), 1.85-1.95 (m, 1H), 2.05-2.15 (m, 4H), 2.87 (m, 8H), 3.39 (m, 1H), 3.57 (m, 1H), 4.85-4.92 (m, 2H), 5.30-5.45 (m, 10H), 5.75 (d, 1H), 7.32 (m, 2H), 7.43 (m, 3H).

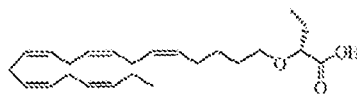
(4S,5R)-3-((R)-2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaenilo)butanoil)-4-metil-5-feniloxazolidin-2-ona (E2): ¹H-RMN de (300 MHz, CDCl₃): δ 0.98 (d, 3H), 0.99 (t, 3H), 1.08 (t, 3H), 1.40-1.52 (m, 2H), 1.55-1.75 (m, 3H), 1.80-1.90 (m, 1H), 2.05-2.15 (m, 4H), 2.84 (m, 8H), 3.39 (m, 1H), 3.56 (m, 1H), 4.79 (pent, 1H), 4.97 (dd, 1H), 5.30-5.45 (m, 10H), 5.71 (d, 1H), 7.33 (m, 2H), 7.43 (m, 3H).

Ejemplo 7: Preparación de ácido (S)-2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaenilo)butanoico:



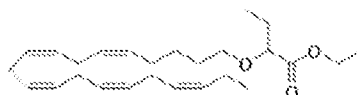
Se añadió peróxido de hidrógeno (35 % en agua, 0.75 mL, 8.54 mmol) e hidróxido de litio monohidrato (0.18 g, 4.27 mmol) a una solución de (4S,5R)-3-((S)-2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaenilo)butanoil)-4-metil-5-feniloxazolidin-2-ona (1.10 g, 2.13 mmol) en tetrahidrofurano (12 mL) y agua (4 mL) mantenida a 0 °C bajo nitrógeno. Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C durante 30 minutos. Se añadió Na₂SO₃ al 10 % (ac.) (30 mL), se ajustó el pH a ~2 con HCl 2M y la mezcla fue sometida a extracción dos veces con heptano (30 mL). Se secó (Na₂SO₄) el extracto orgánico combinado, se filtró y concentró. El residuo fue sometido a cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientemente polares de heptano y acetato de etilo (98:8 - > 1:1), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 0.48 g (rendimiento del 60 %) del compuesto del título, como un aceite. ¹HRMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.90-1.00 (m, 6H), 1.48 (m, 2H), 1.65 (m, 2H), 1.85 (m, 2H), 2.10 (m, 4H), 2.80-2.90 (m, 8H), 3.55 (m, 1H), 3.60 (m, 1H), 3.88 (t, 1H), 5.35-5.45 (m, 10H); MS (electroatomización): 373.3 [MH]; [α]_D -37° (c=0.104, etanol).

Ejemplo 8: Preparación de ácido (R)-2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaenilo)butanoico:



Se añadió peróxido de hidrógeno (35 % en agua, 0.65 mL, 7.37 mmol) e hidróxido de litio monohidrato (0.15 g, 3.69 mmol) a una solución de (4S,5R)-3-((R)-2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaenilo)butanoil)-4-metil-5-feniloxazolidin-2-ona (0.95 g, 1.84 mmol) en tetrahidrofurano (12 mL) y agua (4 mL) mantenida a 0 °C bajo nitrógeno. Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C durante 30 minutos. Se añadió Na₂SO₃ al 10 % (ac.) (30 mL), se ajustó el pH a 2 con HCl 2M y la mezcla fue sometida a extracción dos veces con heptano (30 mL). Se secó (Na₂SO₄) el extracto orgánico combinado, se filtró y concentró. El residuo fue sometido a cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientemente polares de heptano y acetato de etilo (98:8 - > 50:50), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 0.19 g (rendimiento del 29 %) del compuesto del título, como un aceite. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.90-1.00 (m, 6H), 1.48 (m, 2H), 1.65 (m, 2H), 1.85 (m, 2H), 2.10 (m, 4H), 2.80-2.90 (m, 8H), 3.55 (m, 1H), 3.60 (m, 1H), 3.88 (t, 1H), 5.35-5.45 (m, 10H); MS (electroatomización): 373.3 [MH]; [α]_D -31° (c=0.088, etanol).

Ejemplo 9: Preparación de 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato de etilo:



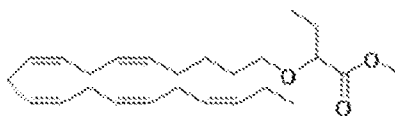
Se añadieron diciclohexilmetanodiimina (DCC) (304 mg, 1.47 mmol) y *N,N*-dimetilpiridin-4-amina (DMAP) (10 mg, 0.067 mmol) a una solución agitada de ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (501.3 mg, 1.335 mmol) en diclorometano (DCM) (4 mL) a 0 °C bajo atmósfera de N₂. Se agitó la mezcla durante 5 minutos, antes de agregar etanol (EtOH) (0.16 mL, 2.67 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 20 horas. Se purificó la mezcla de reacción mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientes de heptano y acetato de etilo (100:0 → 99:1), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 473 mg (rendimiento del 88 %) del compuesto del título, como un aceite. ¹H RMN (300 MHz, cloroformo-*d*) δ 0.95 (2 x t, 6H), 1.37-1.48 (m, 2H), 1.54-1.79 (m, 4H), 2.01-2.10 (m, 4H), 2.77-2.84 (m, 8H), 3.27-3.34 (m, 1H), 3.53-3.60 (m, 1H), 3.69-3.73 (dd, 1H), 4.13-4.24 (m, 2H), 5.25-5.33 (m, 10H), MS (electroatomización): 425.3 [M+Na]⁺; HRMS (electroatomización): Se encontraron 425.3021 [M+Na]⁺, calc. para [C₂₆H₄₂O₃+Na]⁺ 425.3031.

Ejemplo 10: Preparación de 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato de isopropilo



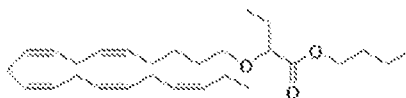
Se añadieron DCC (310 mg, 1.47 mmol) y DMAP (9 mg, 0.067 mmol) a una solución agitada de ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (501 mg, 1.335 mmol) en DCM (4 mL) a 0°C bajo atmósfera de N₂. Se agitó la mezcla durante 5 minutos, antes de agregar isopropanol (iPrOH) (0.16 mL, 2.67 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 20 horas. Se filtró la mezcla y se concentró al vacío. Al residuo se le añadió heptano (50 mL), se filtró y se concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo al 1 % en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 496 mg (rendimiento del 89 %) del compuesto del título, como un aceite. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.97 (2 x t, 6H), 1.25 (m, 6H), 1.42-1.50 (m, 2H), 1.61-1.70 (m, 2H), 1.70-1.77 (m, 2H), 2.05-2.12 (m, 4H), 2.79-2.86 (m, 8H), 3.29-3.34 (m, 1H), 3.54-3.59 (m, 1H), 3.67-3.71 (m, 1H), 5.06-5.10 (m, 1H), 5.31-5.42 (m, 10 H); MS (electroatomización): 439.3 [M+Na]⁺.

Ejemplo 11: Preparación de 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato de metilo



Se añadió ácido sulfúrico (0.049 mL, 0.918 mmol) a una solución de ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico ((385 mg, 1.028 mmol) en metanol (20 mL) a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂ y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante la noche. MS (electroatomización): 389.3 [M+1]⁺.

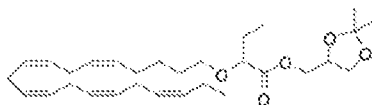
Ejemplo 12: Preparación de 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato de butilo



Se añadió ácido sulfúrico (0.049 mL, 0.918 mmol) a una solución de ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico ((33 g, 88 mmol) en butan-1-ol (400 mL, 4.37 mol) a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂ y se agitó la mezcla de reacción durante 120 horas. Se añadió heptano (400 mL) y acetato de etilo (400 mL) y se lavó la solución con NaHCO₃ ac. saturado (3x300 mL) y agua (2x300 mL). La fase acuosa combinada fue sometida a extracción con heptano/éter (1:1) (2x300 mL). La fase orgánica combinada se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea utilizando mezclas crecientes de heptano y acetato de etilo (99:1 → 96:4), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 26.3 g (rendimiento del 67 %) del compuesto del título, como un aceite. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 0.93-1.02 (m, 9H), 1.36-1.51 (m, 4H), 1.60-1.70 (m, 4H), 1.72-1.84 (m, 2H), 2.05-2.16 (m, 4H), 2.78-2.92 (m, 8H), 3.28-3.39 (m, 1H), 3.54-3.65 (m, 1H), 3.70-3.82 (m, 1H), 4.08-4.24 (m, 2H), 5.27-5.48 (m, 10H), MS (electroatomización): 453.2 [M+Na]⁺.

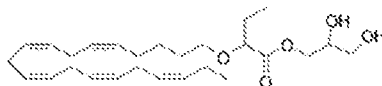
Ejemplo 13 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato de 2,3-dihidroxipropilo

Paso a) Preparación de 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato de (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metilo



Se añadieron ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (25 g, 66,7 mmol) y DMAP (8.15 g, 66.7 mmol) a una solución de 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol (7.54 mL, 60.7 mmol) en cloroformo (150 mL) bajo atmósfera de nitrógeno. Luego se añadió gota a gota una solución de DCC (13.77 g, 66.7 mmol) en cloroformo (65 mL) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla durante la noche y se concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientemente polares de acetato de etilo al 10 % en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 19.6 g (rendimiento del 66 %) del producto del título, como un aceite. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.99 (t, 6H), 1.37-1.40 (m, 3H), 1.41-1.53 (m, 5H), 1.59-1.71 (m, 2H), 1.72-1.85 (m, 2H), 2.05-2.14 (m, 4H), 2.74-2.95 (m, 8H), 3.31-3.38 (m, 1H), 3.57-3.65 (m, 1H), 3.72-3.86 (m, 2H), 4.07-4.12 (m, 1H), 4.15-4.27 (m, 2H), 4.29-4.40 (m, 1H), 5.23-5.50 (m, 10H). MS (electroatomización): 511.3 [M+Na]⁺.

Paso b) Preparación de 2,3-dihidroxiopropil 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato



A una solución de 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato de (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metilo (27.5 g, 56.3 mmol) en dioxano (280 mL) a temperatura ambiente bajo nitrógeno se añadió HCl ac. (37 % (p/p), 28 mL, 341 mmol) y se agitó la mezcla durante 60 minutos. Luego se vertió la mezcla cuidadosamente en NaHCO₃ ac. sat. (500 mL) y fue sometida a extracción con EtOAc (2x300 mL). Se lavó la fase orgánica con HCl 1 M (200 mL), salmuera (200 mL), se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando heptano y acetato de etilo (50:50), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 19 g del producto del título, como un aceite, contaminado con ~10 % del isómero 1,3-dihidroxiopropan-2-il 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato. El material se mezcló con 1.35 gramos de otro lote, antes de purificarlo adicionalmente mediante HPLC preparativa. Se utilizó, como eluyente una mezcla isocrática 17:83 de agua/acetonitrilo (9:1) a acetonitrilo (100 %). La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 11.3 g (rendimiento del 38 %) del producto del título, como un aceite. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.97-1.03 (m, 6H), 1.41-1.51 (m, 2H), 1.59-1.69 (m, 2H), 1.72-1.87 (m, 2H), 2.05-2.14 (m, 5H), 2.56 (s, 1H), 2.73-2.94 (m, 8H), 3.33-3.40 (m, 1H), 3.55-3.68 (m, 2H), 3.69-3.77 (m, 1H), 3.79-3.85 (m, 1H), 3.93-4.03 (m, 1H), 4.15-4.37 (m, 2H), 5.25-5.51 (m, 10H). MS (electroatomización): 471.3 [M+Na]⁺.

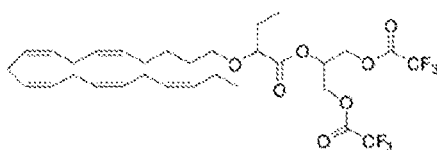
Ejemplo 14 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 1,3-dihidroxiopropan-2-il 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato

Paso a) Preparación de 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato de oxiran-2-ilmetilo



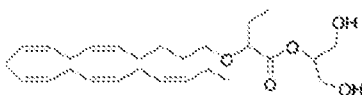
Una mezcla de ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (800 mg, 2.14 mmol), glicidol (0.17 mL, 2.56 mmol), clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC*HCl) (491 mg, 2.56 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (313 mg, 2.56 mmol) en DCM seco (7 mL) se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientemente polares de heptano y acetato de etilo (99:1 → 95:5), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 527 mg (rendimiento del 57 %) del producto del título, como un aceite. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 0.94-0.98 (m, 6H), 1.40-1.44 (m, 2H), 1.57-1.64 (m, 2H), 1.70-1.82 (m, 2H), 2.02-2.12 (m, 4H), 2.63 (bs, 1H), 2.78-2.84 (m, 9H), 3.20 (bs, 1H), 3.30-3.35 (m, 1H), 3.55-3.61 (m, 1H), 3.77-3.80 (m, 1H), 3.94-4.01 (m, 1H), 4.42-4.48 (m, 1H), 5.36-5.26 (m, 10H). MS (electroatomización): 453.3 [M+Na]⁺.

Paso b) Preparación de 2-((2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoil)oxi)propano-1,3-diil bis(2,2,2-trifluoroacetato)



Se añadió anhídrido trifluoroacético (TFAA) (0.55 mL, 3.96 mmol) en DCM seco (3 mL) en porciones a una solución preenfriada de oxiran-2-ilmetil 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato (286 mg, 0.66 mmol) en DCM seco (3 mL) a -20 °C bajo atmósfera de N₂. Se retiró el baño de enfriamiento y se agitó la mezcla durante 19 horas a temperatura ambiente, antes de concentrar la mezcla de reacción en presión de vacío. Se disolvió el residuo en tolueno (6 mL) y se pasó a través de una capa de sílice (6.5 g) eluyendo con tolueno (150 mL). La concentración al vacío proporcionó 357 mg (rendimiento del 84 %) del compuesto del título, como un aceite. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 0.95 (2xt, 6H), 1.38-1.45 (m, 2H), 1.57-1.63 (m, 2H), 1.66-1.78 (m, 2H), 2.09-2.02 (m, 4H), 2.78-2.84 (m, 8H), 3.27-3.33 (m, 1H), 3.51-3.56 (m, 1H), 3.77 (dd, 1H), 4.30-4.53 (m, 2H), 4.60-4.69 (m, 2H), 5.17-5.43 (m, 10H), 5.43-5.55 (m, 1H). MS (electroatomización): 661.1 [M+Na]⁺.

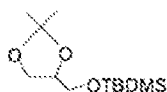
Paso c) Preparación de 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato de 1,3-dihidroxipropano-2-ilo



Se añadió gota a gota una solución de piridina (0.4 mL, 4.95 mmol) y metanol (0.3 mL, 7.41 mmol) en pentano/DCM (2:1) (4.5 mL) a una solución de 2-((2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoil)oxi)propano-1,3-diil bis(2,2,2-trifluoroacetato) (354 mg, 0.552 mmol) en pentano/DCM (2:1) (5 mL) enfriada a -20 °C bajo atmósfera de N₂. Se retiró el baño de enfriamiento y se agitó la mezcla durante 3 horas a temperatura ambiente, antes de concentrarla al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientemente polares de heptano y acetato de etilo (95:5 → 90:10 → 80:20 → 50:50), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 223 mg del producto del título como aceite crudo. La purificación por HPLC preparativa proporcionó 58 mg (rendimiento del 22 %) del compuesto del título, como un aceite. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 0.95 (t, 3H), 0.96 (t, 3H), 1.38-1.45 (m, 2H), 1.54-1.64 (m, 2H), 1.67-1.84 (m, 2H), 2.01-2.09 (m, 4H), 2.45 (bs, 2H), 2.83-2.77 (m, 8H), 3.36-3.30 (m, 1H), 3.60-3.55 (m, 1H), 3.84-3.78 (m, 5H), 4.98-4.93 (m, 1H), 5.65-5.09 (m, 10H). MS (electroatomización): 471.1 [M+Na]⁺.

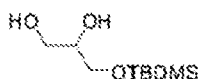
Ejemplo 15 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 3-hidroxipropano-1,2-diil bis(2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato)

Paso a) Preparación de terc-butil((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi)dimetilsilano



Se añadió tert-butil-clorodimetilsilano (14.41 g, 91 mmol) a una solución de (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metanol (10 g, 76 mmol) e imidazol (7.73 g, 114 mmol) en THF (100 mL) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Se agitó la mezcla durante 1.5 horas, se vertió en agua (200 mL) y fue sometida a extracción con terc-butil metil éter (2x150 mL). Se separaron las fases y la capa orgánica se lavó con agua (100 mL), salmuera (100 mL), se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo al 3 % en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 18 g (rendimiento del 97 %) del compuesto del título, como un aceite. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.02-0.05 (m, 6H), 0.85-0.89 (m, 9H), 1.31-1.35 (m, 3H), 1.35-1.40 (m, 3H), 3.50-3.60 (m, 1H), 3.63-3.72 (m, 1H), 3.75-3.85 (m, 1H), 3.96-4.05 (m, 1H), 4.07-4.18 (m, 1H). MS (electroatomización): 229.2 [M+Na]⁺.

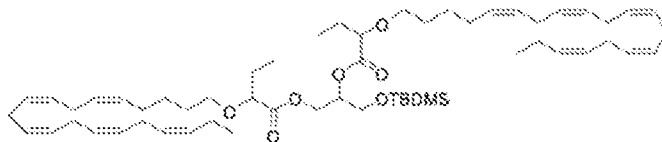
Paso b) Preparación de 3-((terc-butildimetilsilil)oxi)propano-1,2-diol



A una solución de terc-butil((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi)dimetilsilano en cloroformo (60 mL) se añadió FeCl₃·6H₂O absorbido en gel de sílice (30 g, 11.9 mmol) y se agitó la mezcla durante la noche. Se filtró la mezcla y se concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientemente polares de heptano y acetato de etilo (50:50 → 25:75), como eluyente. La

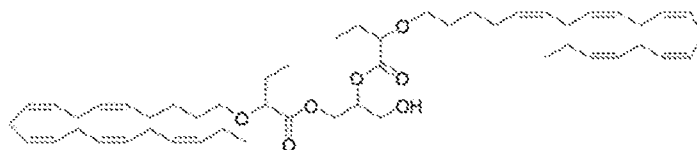
concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 760 mg (rendimiento del 9 %) del compuesto del título, como un aceite. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 0.09-0.12 (m, 6H), 0.91-0.95 (m, 9H), 2.11-2.17 (m, 1H), 2.60 (d, 1H), 3.57-3.85 (m, 5H). MS (electroatomización): 229.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Paso c) Preparación de 3-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)propano-1,2-diil bis(2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato)



A una solución de 3-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)propano-1,2-diol (0.91 g, 4.41 mmol) en DMF (20 ml) bajo atmósfera de N_2 a temperatura ambiente se añadieron ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (3.47 g, 9.3 mmol), DMAP (1.13 g, 9.3 mmol), clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (DCI) (1.776 g, 9.26 mmol) y DCM seco (60 ml). Se agitó la mezcla durante la noche, antes de diluir la mezcla de reacción con éter dietílico (200 mL). La mezcla se lavó con HCl 1 M (100 mL) y salmuera (100 mL), se secó (Na_2SO_4), filtró y concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo al 3 % en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 2.26 g (rendimiento del 56 %) del compuesto del título, como un aceite. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 0.08 (s, 6H), 0.90 (d, 9H), 0.95-1.03 (m, 12H), 1.40-1.52 (m, 4H), 1.58-1.69 (m, 4H), 1.70-1.83 (m, 4H), 2.04-2.15 (m, 8H), 2.77-2.92 (m, 16H), 3.27-3.37 (m, 2H), 3.57-3.67 (m, 2H), 3.72-3.80 (m, 4H), 4.14-4.32 (m, 1H), 4.41-4.56 (m, 1H), 5.09-5.22 (m, 1H), 5.23-5.49 (m, 20H). MS (electroatomización): 941.6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

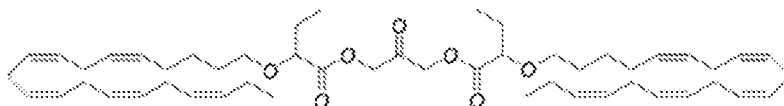
Paso d) Preparación de bis(2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato) de 3-hidroxipropano-1,2-diilo



A una solución de ((bis(2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato) de 3-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)propano-1,2-diilo (2.26 g, 2.46 mmol) en dioxano (100 mL) Se añadió HCl ac. (37 % (p/p, 2 mL) y Se agitó la mezcla durante 3 horas bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente, antes de concentrarla al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo al 15 % en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 0.83 g (rendimiento del 42 %) del compuesto del título, como un aceite. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 0.96-1.03 (m, 12H), 1.40-1.53 (m, 4H), 1.58-1.68 (m, 4H), 1.70-1.85 (m, 4H), 1.87-2.01 (m, 1H), 2.05-2.15 (m, 8H), 2.75-2.95 (m, 16H), 3.28-3.41 (m, 2H), 3.56-3.65 (m, 2H), 3.73-3.85 (m, 4H), 4.24-4.37 (m, 1H), 4.42-4.53 (m, 1H), 5.14-5.23 (m, 1H), 5.26-5.51 (m, 20H). MS (electroatomización): 827.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

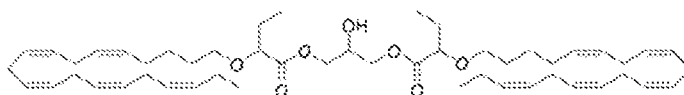
Ejemplo 16 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de bis(2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato) de 2-hidroxipropano-1,3-diilo:

Paso a) 2-oxopropano-1,3-diil bis(2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato)



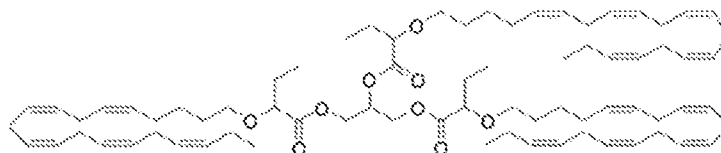
Se añadieron ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (5.0 g, 13.4 mmol) y DMAP (1.63 g, 13.4 mmol) a una solución de dímero de 1,3-dihidroxiacetona (1.145 g, 6.36 mmol) en cloroformo (25 mL) bajo atmósfera de nitrógeno. Luego se añadió gota a gota una solución de DCC (2.75 g, 13.35 mmol) en cloroformo (10 mL) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente, antes de concentrarla al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientemente polares de heptano y acetato de etilo (90:10 $\rightarrow$ 88:12), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 2.4 g (rendimiento del 47 %) del compuesto del título, como un aceite. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 0.97-1.06 (m, 12H), 1.38-1.53 (m, 4H), 1.57-1.73 (m, 4H), 1.73-1.96 (m, 4H), 2.03-2.17 (m, 8H), 2.76-2.92 (m, 16H), 3.35-3.42 (m, 2H), 3.63-3.70 (m, 2H), 3.89 (dd, 2H), 4.75-4.93 (m, 4H), 5.27-5.49 (m, 20H). MS (electroatomización): 827.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Paso b) bis(2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato) de 2-hidroxipropano-1,3-diilo



Se añadió NaBH₄ (0.336 g, 8.87 mmol) cuidadosamente a una solución de bis(2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-yl)oxy)butanoato) de 2-oxopropano-1,3-diilo (3.24 g, 4.03 mmol) en THF (55 mL) y agua (4 mL) a 0 °C. Se agitó la mezcla durante 15 minutos a 0 °C. A continuación, se añadió cuidadosamente ácido acético (1 mL) seguido de acetato de etilo (100 mL). Se lavó la mezcla con agua (100 mL), NaHCO₃ ac. saturado (100 mL) y salmuera, antes de secar (Na₂SO₄), filtrar y concentrar al vacío. El residuo se combinó con otro lote del material antes de purificarlo mediante cromatografía instantánea en gel de sílice utilizando acetato de etilo al 15 % en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 1.62 g (rendimiento del 50 %) del compuesto del título, como un aceite. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.97-1.03 (m, 12H), 1.41-1.52 (m, 4H), 1.58-1.69 (m, 6H), 1.71-1.87 (m, 4H), 2.05-2.14 (m, 8H), 2.38-2.42 (m, 1H), 2.78-2.92 (m, 16H), 3.32-3.39 (m, 2H), 3.57-3.64 (m, 2H), 3.80-3.84 (m, 2H), 4.05-4.34 (m, 5H), 5.26-5.49 (m, 20H). MS (electroatomización): 827.5 [M+Na]⁺.

Ejemplo 17 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de tris(2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-yl)oxy)butanoato de propano-1,2,3-triilo



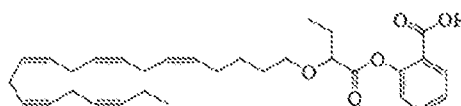
Se añadió ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-yl)oxy)butanoico (4.0 g, 10.7 mmol), 4-dimetilaminopiridina (1.305 g, 10.7 mmol), clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (2.047 g, 10.7 mmol) y DCM seco (30 ml) a una solución de glicerol (0.173 mL, 2.373 mmol) en DMF (10 mL) bajo atmósfera de N₂ a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla durante la noche, antes de diluir la mezcla de reacción con éter dietílico (250 mL). La mezcla se lavó con HCl ac. 1M (100 mL) y salmuera (100 mL), antes de secar (Na₂SO₄), filtrar y evaporar al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo al 5 % en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 2.1 g (rendimiento del 73 %) del compuesto del título, como un aceite. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.91-1.05 (m, 18H), 1.40-1.52 (m, 6H), 1.57-1.69 (m, 6H), 1.69-1.86 (m, 6H), 2.01-2.17 (m, 12H), 2.69-2.96 (m, 24H), 3.27-3.38 (m, 3H), 3.53-3.67 (m, 3H), 3.73-3.81 (m, 3H), 4.17-4.27 (m, 2H), 4.37-4.54 (m, 2H), 5.28-5.47 (m, 30H). MS (electroatomización): 1183.8 [M+Na]⁺.

Ejemplo 18 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 2-((2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-yl)oxy)butanoil)oxy)benzoato de terc-butilo:



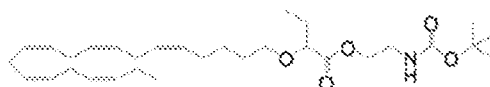
Se añadieron 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (316 mg, 1.65 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (20 mg, 0.15 mmol) a una solución de ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-yl)oxy)butanoico (561 mg, 1.5 mmol) en DCM (10 mL) y se agitó la mezcla de reacción durante 10 minutos. Se añadió 2-hidroxibenzoato de terc-Butilo (291 mg, 1.5 mmol) y se agitó la mezcla durante 3 horas. Se añadió salmuera y se separaron las dos fases resultantes. La fase acuosa fue sometida a extracción con DCM y las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea utilizando una mezcla de 5 % de EtOAc en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 500 mg (rendimiento del 61 %) del compuesto del título. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.98 (t, 3H), 1.11 (t, 3H), 1.13 (t, 3H), 1.45-1.75 (m, 4H), 1.56 (s, 9H), 1.90-2.20 (m, 6H), 2.80-2.90 (m, 8H), 3.45-3.60 (m, 1H), 3.80-3.90 (m, 1H), 4.05-4.15 (m, 1H), 5.25-5.50 (m, 10H), 7.06 (m, 1H), 7.28 (m, 1H), 7.52 (m, 1H), 7.89 (m, 1H). MS (ESI): 573 [M+Na]⁺.

Ejemplo 19 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido 2-((2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-yl)oxy)butanoil)oxy)benzoico:



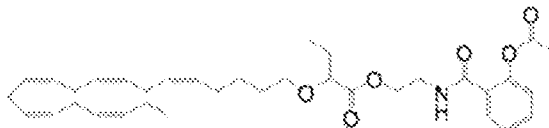
Una solución de 2-((2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanoil)oxi)benzoato de terc-butilo (500 mg, 0.9 mmol) en FA (10 mL) se agitó durante 2 días. Se eliminó el solvente bajo presión reducida y el residuo fue sometido a cromatografía instantánea utilizando un gradiente de 1 - 5 % de EtOAc (que contiene 5 % de FA) en heptano (que también contiene 5 % de FA), como eluyente. Las fracciones apropiadas se reunieron y se concentraron y se purificó el residuo adicionalmente mediante una segunda cromatografía instantánea utilizando un gradiente de 1 - 10 % de EtOAc en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 75 mg (rendimiento del 17 %) del compuesto del título. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.99 (t, 3H), 1.13 (t, 3H), 1.45-1.60 (m, 2H), 1.65-1.70 (m, 2H), 1.90-2.15 (m, 6H), 2.80-2.90 (m, 8H), 3.45-3.55 (m, 1H), 3.80-3.90 (m, 1H), 4.05-4.15 (m, 1H), 5.30-5.45 (m, 10H), 7.14 (d, 1H), 7.35-7.45 (m, 1H), 7.60-7.70 (m, 1H), 8.10-8.15 (m, 1H). MS (ESI): 517 [M+Na]⁺.

Ejemplo 20 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanoato de 2-((terc-butoxicarbonil)amino)etilo:



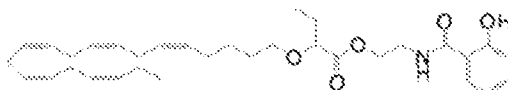
Se añadieron hexafluorofosfato de O-(7-Azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N' tetrametiluronio (HATU) (800 mg, 2.1 mmol) y TEA (0.56 mL, 4 mmol) a una solución de ácido 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanoico (748 mg, 2 mmol) en DCM (10 mL) y se agitó la mezcla de reacción durante 20 minutos. Se añadió una solución de terc-butyl N-(2-hidroxietil) carbamato (340 mg, 2.1 mmol) en DCM (1 mL) y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió Et₂O (100 mL) y se lavó la mezcla con agua, HCl (ac.) 1M, NaHCO₃ (ac.) saturado y salmuera, se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea utilizando un gradiente de 10 - 20 % EtOAc en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 780 mg (rendimiento del 76 %) del compuesto del título. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.98 (t, 6H), 1.40-1.55 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.60-1.85 (m, 4H), 2.05-2.20 (m, 4H), 2.75-2.90 (m, 8H), 3.30-3.45 (m, 3H), 3.55-3.65 (m, 1H), 3.75-3.80 (m, 1H), 4.20-4.25 (m, 2H), 4.76 (br s, 1H), 5.30-5.45 (m, 10H). MS (ESI): 540 [M+Na]⁺.

Ejemplo 21 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanoato de 2-(2-acetoxibenzamido)etilo



Se añadió cloruro de acetilo (1 mL) a una solución de 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanoato de 2-((terc-butoxicarbonil)amino)etilo (300 mg, 0.58 mmol) en MeOH (5 mL) a 0 °C y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Se concentró la mezcla al vacío para proporcionar la sal de HCl de 2-aminoetil 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanoato (286 mg) como producto crudo. Se añadió TEA (109 µL, 0.78 mmol) a una solución de ácido acetilsalicílico (137 mg, 0.76 mmol) en DCM (10 mL) y se enfrió la mezcla a 0 °C. Se añadió cloroformiato de etilo (75 µL, 0.78 mmol) gota a gota y se agitó la mezcla de reacción durante 2 horas. Luego, esta solución se añadió a una solución del producto crudo de la sal de HCl de 2-aminoetil 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanoato, en una mezcla de DCM (10 mL) y TEA (2 mL). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 3.5 horas y luego se añadió agua. Las dos fases resultantes se separaron y la fase acuosa fue sometida a extracción dos veces con DCM. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con HCl (ac.) 1M, NaHCO₃ (ac.) saturado y agua, se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea utilizando EtOAc al 20 % en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 90 mg (rendimiento del 23 %) del compuesto del título. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.95-1.05 (m, 6H), 1.35-1.45 (m, 2H), 1.55-1.70 (m, 2H), 1.70-1.85 (m, 2H), 2.05-2.15 (m, 4H), 2.35 (s, 3H), 2.80-2.90 (m, 8H), 3.30-3.40 (m, 1H), 3.55-3.65 (m, 1H), 3.70-3.85 (m, 3H), 4.33 (t, 2H), 5.30-5.45 (m, 10H), 6.61 (br s, 1H), 7.10-7.15 (m, 1H), 7.25-7.35 (m, 1H), 7.45-7.50 (m, 1H), 7.70-7.75 (m, 1H). MS (ESI): 602 [M+Na]⁺.

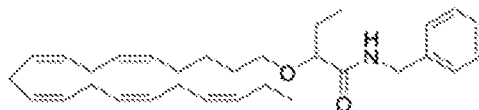
Ejemplo 22 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanoato de 2-(2-hidroxibenzamido)etilo:



Se añadió amoníaco (ac. 28 %, 20 gotas) gota a gota a una solución de 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanoato de 2-(2-acetoxibenzamido)etilo (99 mg, 0.17 mmol) en 2-propanol (9

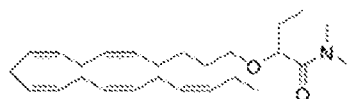
mL) y agua (3 mL) y se agitó la mezcla de reacción durante 10 minutos. Se añadió agua y la mezcla resultante fue sometida a extracción dos veces con Et₂O. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea utilizando un gradiente de 0 - 40 % EtOAc en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 33 mg (rendimiento del 36 %) del compuesto del título. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.95-1.05 (m, 6H), 1.35-1.45 (m, 2H), 1.60-1.70 (m, 2H), 1.70-1.85 (m, 2H), 2.05-2.20 (m, 4H), 2.80-2.90 (m, 8H), 3.35-3.45 (m, 1H), 3.50-3.60 (m, 1H), 3.75-3.85 (m, 3H), 4.40-4.50 (m, 2H), 5.30-5.45 (m, 10H), 6.80-6.90 (m, 2H), 6.95-7.05 (m, 1H), 7.35-7.45 (m, 1H), 12.22 (s, 1H). MS (ESI): 560 [M+Na]⁺.

Ejemplo 23 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de N-bencil-2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanamida



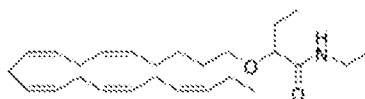
A una solución de ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (302.1 mg, 0.807 mmol) y tetrafluoroborato de o-Benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU) (285 mg, 0.888 mmol) en DCM (10 mL) a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂ se añadió trietilamina (123 µL, 0.887 mmol). Después de agitar durante 15 minutos, se añadió a la mezcla Bencilamina (97 µL, 0.887 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió NaHCO₃ saturado (25 mL) y la mezcla fue sometida a extracción con metil terc-butil metil éter (2x50 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron (Na₂SO₄), filtraron y evaporaron al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientemente polares de heptano y acetato de etilo (95:5 → 50:50), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 0.253 g (rendimiento del 66 %) del compuesto del título, como un aceite. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 0.97 - 0.90 (m, 6H), 1.41 - 1.35 (m, 2H), 1.59 - 1.52 (m, 2H), 1.75 - 1.68 (m, 1H), 1.86 - 1.80 (m, 1H), 2.09 - 2.03 (m, 4H), 2.82 - 2.77 (m, 8H), 3.44 (t, J = 6.4, 2H), 3.72 - 3.71 (m, 1H), 4.46 (d, J = 5.8, 2H), 5.36 - 5.28 (m, 10H), 6.83 (s, 1H), 7.26 - 7.24 (m, 3H), 7.33 - 7.30 (m, 2H).

Ejemplo 24 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)-N,N-dimetilbutanamida



A una solución de ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (300.2 mg, 0.801 mmol) y tetrafluoroborato de o-Benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU) (286.4 mg, 0.892 mmol) en DCM (10 mL) a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂ se añadió trietilamina (123 µL, 0.884 mmol). Después de agitar durante 15 minutos, se añadió a la mezcla Dimetilamina (2.0 M en THF) (0.80 mL, 1.60 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió NaHCO₃ saturado (25 mL) y la mezcla fue sometida a extracción con metil terc-butil metil éter (2x50 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron (Na₂SO₄), filtraron y evaporaron al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientemente polares de heptano y acetato de etilo (95:5 → 50:50), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 0.268 g (rendimiento del 81 %) del compuesto del título, como un aceite. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.95 (t, 3 H), 0.96 (t, 3 H), 1.35 - 1.46 (m, 2H), 1.53 - 1.63 (m, 2H), 1.66 - 1.79 (m, 2H), 2.01 - 2.10 (m, 4H), 2.77 - 2.87 (m, 8H), 2.93 (s, 3H), 3.10 (s, 3H), 3.28 (dt, J = 9.1, 6.5, 1H), 3.46 (dt, J = 9.1, 6.3, 1H), 3.96 (dd, J = 7.7, 6.1, 1H), 4.97 - 5.70 (m, 10H).

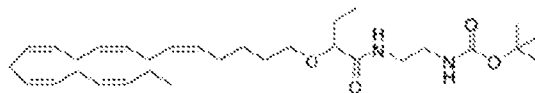
Ejemplo 25 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de N-etil-2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanamida



A una solución de ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (304.6 mg, 0.813 mmol) y tetrafluoroborato de o-Benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU) (286.9 mg, 0.894 mmol) en DCM (10 mL) a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂ se añadió trietilamina (123 µL, 0.884 mmol). Después de agitar durante 15 minutos, se añadió a la mezcla etilamina (2.0 M en THF) (0.80 mL, 1.60 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió NaHCO₃ saturado (25 mL) y la mezcla fue sometida a extracción con metil terc-butil metil éter (2x50 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se evaporaron al vacío. Se purificó el residuo mediante

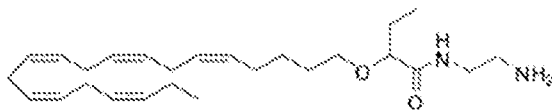
cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientemente polares de heptano y acetato de etilo (95:5 → 50:50), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 0.186 g (rendimiento del 56 %) del compuesto del título, como un aceite. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.90 (t, 3H), 0.95 (t, 3H), 1.13 (t, 3H), 1.55- 1.62 (m, 2H), 1.64-1.66 (m, 2H), 1.69-1.69 (m, 1H), 1.74-1.83 (m, 1H), 2.01-2.12 (m, 4H), 2.78-2.84 (m, 8H), 3.25-3.34 (m, 2H), 3.44 (t, 2H), 3.64 (dd, 1H), 5.50-5.13 (m, 10H), 6.50 (s, 1H).

Ejemplo 26 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de (2-(2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanamido)etil)carbamato de terc-butilo



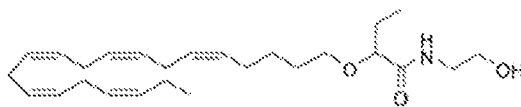
Se añadieron diciclohexilmetanodilimina (DCC) (1.73 g, 8.4 mmol) y 1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-ol (HOBt) (1.14 g, 8.4 mmol) a una solución agitada de ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (3.14 g, 8.4 mmol) en THF (25 mL) a 0 °C bajo atmósfera de N₂. Se agitó la mezcla durante 20 minutos, antes de que se agregara gota a gota una solución de *N*-Boc-etilendiamina (1.12 gramos) en THF (1 mL). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 1.5 horas. Se añadió éter dietílico (200 mL) y se lavó la mezcla con agua, HCl 1 M, NaHCO₃ saturado y salmuera. La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. Se purificó el residuo por cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo al 25 % en heptano (añadido con HCOOH al 0.5 %), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 3.0 g (rendimiento del 83 %) del compuesto del título. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.90 (t, 3H), 0.96 (t, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.40 - 1.80 (m, 6H), 2.05 - 2.20 (m, 4H), 2.75 - 2.90 (m, 8H), 3.20 - 3.60 (m, 6H), 3.65 - 3.75 (m, 1H), 5.02 (br s, 1H), 5.30 - 5.45 (m, 10H), 7.01 (br s, 1H). MS (electroatomización); 539 [M+Na]⁺

Ejemplo 27 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de N-(2-aminoetil)-2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanamida



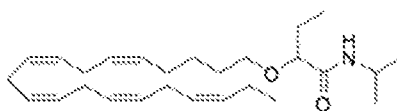
A una solución de (2-(2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanamido)etil)carbamato de terc-butilo (774 mg, 1.5 mmol) en DCM (8 mL) bajo atmósfera de N₂ a temperatura ambiente se añadió TFA (2 mL) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se concentró al vacío. Se añadió éter dietílico (50 mL) y NaOH (ac., 1M, 50 mL) al residuo y se agitó la mezcla vigorosamente durante 30 minutos. Se separaron las fases y se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó (NaSO₄), filtró y concentró al vacío para proporcionar 560 mg (90 %) del compuesto del título. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.85 - 1.05 (2xt, 6H), 1.35 - 1.50 (m, 2H), 1.55 - 1.85 (m, 4H), 2.05 - 2.20 (m, 4H), 2.75 - 2.95 (m, 8H), 3.10 - 3.20 (m, 1H), 3.30 - 3.80 (m, 6H), 4.05 - 4.20 (m ancho, 1H), 4.25 - 4.75 (br s, 2H), 5.30 - 5.50 (m, 10H). MS (electroatomización); 417 [MH], 439 [M+Na]⁺

Ejemplo 28 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de N-(2-hidroxi-etil)-2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanamida



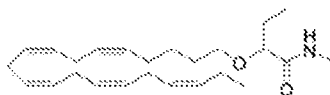
A una solución de ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (4.5 g, 12 mmol) en DCM (100 mL) bajo atmósfera de N₂ a temperatura ambiente se añadió cloruro de oxalilo (8.4 mL, 100 mmol) seguido de 2 gotas de DMF. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente y se concentró al vacío. Se disolvió el residuo en DCM (100 mL) bajo atmósfera de N₂. Se añadió trietilamina (3.34 mL, 24 mmol) seguida de etanolamina (1.08 mL, 18 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadió agua (300 mL) y la mezcla fue sometida a extracción dos veces con diclorometano. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientemente polares de heptano y acetato de etilo (50:50 → 20:80), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 4.6 g (rendimiento del 92 %) del compuesto del título. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.90 - 1.05 (m, 6H), 1.40 - 1.55 (m, 2H), 1.60 - 1.90 (m, 4H), 2.05 - 2.20 (m, 4H), 2.75 - 2.90 (m, 8H), 3.05 (br s, 1H), 3.40 - 3.55 (m, 4H), 3.70 - 3.80 (m, 3H), 5.30 - 5.45 (m, 10H), 7.04 (br s, 1H). MS (electroatomización); 440 [M+Na]⁺

Ejemplo 29 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)-N-isopropilbutanamida



A una solución de ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (300 mg, 0.801 mmol) y tetrafluoroborato de o-Benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU) (284 mg, 0.884 mmol) en DCM (10 mL) a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂ se añadió trietilamina (123 µL, 0.884 mmol). Después de agitar durante 15 minutos a temperatura ambiente bajo una atmósfera de N₂ se añadió isopropilamina (76 µL, 0.884 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió NaHCO₃ saturado (25 mL) y la mezcla fue sometida a extracción con metil terc-butil metil éter (2x50 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se evaporaron al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientemente polares de heptano y acetato de etilo (95:5 → 50:50), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 0.207 g (rendimiento del 59 %) del compuesto del título, como un aceite. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 0.83 - 0.93 (m, 3H), 0.95 (t, J = 7.5. 3H), 1.14 (t, J = 6.1. 6H), 1.39 - 1.47 (m, 2H), 1.56 - 1.73 (m, 3H), 1.73 - 1.83 (m, 1H), 2.02 - 2.11 (m, 4H), 2.80 - 2.84 (m, 8H), 3.43 (t, J = 6.4. 2H), 3.60 (dd, J = 6.6. 4.4. 1H), 4.02 - 4.11 (m, 1H), 5.66 - 5.01 (m, 10H), 6.33 (d, J = 5.9, 1H).

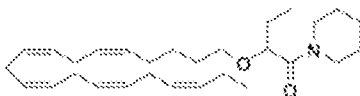
Ejemplo 30 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)-N-metilbutanamida



A una solución de ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (303.6 mg, 0.811 mmol) y tetrafluoroborato de o-Benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU) (285.3 mg, 0.889 mmol) en DCM (10 mL) a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂ se añadió trietilamina (123 µL, 0.884 mmol). Después de agitar durante 15 minutos a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂ se añadió metilamina 2.0 M en THF (0.8 ml, 1.600 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió NaHCO₃ saturado (25 mL) y la mezcla fue sometida a extracción con metil terc-butil metil éter (2x50 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se evaporaron al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientemente polares de heptano y acetato de etilo (95:5 → 50:50), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 0.235 g (rendimiento del 72 %) del compuesto del título, como un aceite.

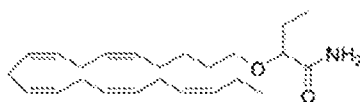
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.89 (t, J = 7.4. 3H), 0.95 (t, J = 7.5 (m, 3H), 1.37 - 1.47 (m, 2H), 1.56 - 1.72 (m, 3H), 1.74 - 1.84 (m, 1H), 2.01 - 2.15 (m, 4H), 2.78 - 2.84 (m, 11H), 3.44 (t, J = 6.4. 2H), 3.66 (dd, J = 6.4. 4.4. 1H), 5.18 - 5.52 (m, 10H), 6.51 (s, 1H).

Ejemplo 31 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)-1-(piperidin-1-il)butan-1-ona



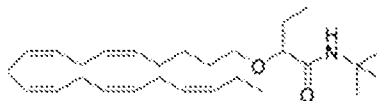
A una solución de ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (302.2 mg, 0.807 mmol) y tetrafluoroborato de o-Benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU) (284 mg, 0.884 mmol) en DCM (8 mL) a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂ se añadió trietilamina (123 µL, 0.884 mmol). Después de agitar durante 15 minutos a temperatura ambiente bajo una atmósfera de N₂ se añadió piperidina (87 µL, 0.884 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió NaHCO₃ saturado (25 mL) y la mezcla fue sometida a extracción con metil terc-butil metil éter (2x50 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se evaporaron al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientemente polares de heptano y acetato de etilo (95:5 → 50:50), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 0.270 g (rendimiento del 73 %) del compuesto del título, como un aceite. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 0.93 - 0.98 (m, 6H), 1.37 - 1.46 (m, 2H), 1.51 - 1.62 (m, 8H), 1.66 - 1.77 (m, 2H), 2.02 - 2.09 (m, 4H), 2.77 - 2.83 (m, 8H), 3.30 (dt, J = 9.1. 6.6. 1H), 3.47 - 3.52 (m, 2H), 3.54 - 3.62 (m, 3H), 3.95 (dd, J = 7.9. 6.1. 1H), 5.02 - 5.65 (m, 10H).

Ejemplo 32 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanamida:



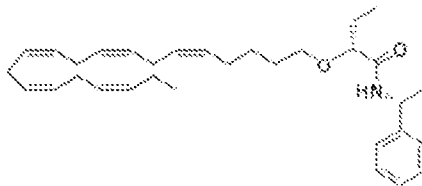
A una solución de ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (320 g, 854 mmol) en tolueno (2500 mL) se añadió Cloruro de oxalilo (276 mL, 3.15 mL). Luego se añadió cuidadosamente DMF (10 mL) gota a gota, antes de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora y concentrarla al vacío. Se disolvió el residuo en DCM (750 mL) y se agregó lentamente a una solución agitada y enfriada (0 °C) de Amoníaco (28 %, ac.) (528 mL, 6.84 moles). Se agitó la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se separaron las fases y la fase acuosa fue sometida a extracción con metil terc-butil éter (700 mL). La fase orgánica combinada se lavó con HCl 3 M (2x300 mL), NaHCO₃ sat. ac. (500 mL), salmuera (2x300 mL), se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientemente polares de heptano y acetato de etilo (70:30 → 60:40), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 249.8 gramos (rendimiento del 76 %) del compuesto del título, como un aceite. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 0.87 - 0.92 (m, 6H), 1.32 - 1.46 (m, 2H), 1.52 - 1.59 (m, 2H), 1.62 - 1.79 (m, 2H), 1.97 - 2.06 (m, 4H), 2.68 - 2.85 (m, 8H), 3.34 - 3.51 (m, 2H), 3.60 (dd, J = 6.5, 4.5, 1H), 5.18 - 5.42 (m, 10H), 5.61 (s, 1H), 6.42 (s, 1H).

Ejemplo 33 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de N-(terc-butil)-2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanamida:



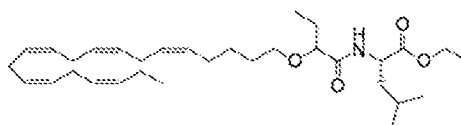
A una solución de ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (301.3 mg, 0.804 mmol) en DCM (10 mL) a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂ se añadió tetrafluoroborato de o-Benzotriazol-1-il-N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU) (285.6 mg, 0.889 mmol) seguido de trietilamina (0.123 ml, 0.885 mmol). Se agitó la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente bajo una atmósfera de N₂ antes de agregar 2-Amino-2-metilpropano (0.10 mL, 0.952 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió NaHCO₃ saturado (25 mL) y la mezcla fue sometida a extracción con metil terc-butil metil éter (2x50 mL). La fase orgánica combinada se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientemente polares de heptano y acetato de etilo (95:5 → 50:50), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 244.1 mg (rendimiento del 70 %) del compuesto del título, como un aceite. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 0.89 (t, J = 7.4, 3H), 0.96 (t, J = 7.5 (s, 3H), 1.34 (s, 9H), 1.41 - 1.46 (m, 2H), 1.57 - 1.70 (m, 3H), 1.74 - 1.81 (m, 1H), 2.02 - 2.11 (m, 4H), 2.80 - 2.83 (m, 8H), 3.27 - 3.48 (m, 2H), 3.48 - 3.56 (m, 1H), 4.93 - 5.55 (m, 10H), 6.38 (s, 1H).

Ejemplo 34 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de (R)-2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)-N-((R)-1-feniletil)butanamida



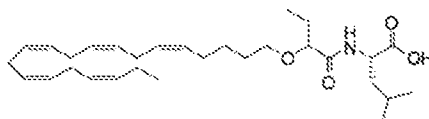
A una solución de ácido (R)-2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (40 mg, 0.11 mmol) y (R)-1-feniletan-1-amina (14 µL, 0.11 mmol) en DMF seco (3 mL) a 0 °C bajo nitrógeno se añadió N-metilmorfolina (14 µL, 0.13 mmol), seguido de hexafluorofosfato de o-(Benzotriazol-1-il)-N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU) (45 mg, 0.14 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de N₂ durante 30 minutos. Se añadió agua (10 mL) y la mezcla fue sometida a extracción con heptano (10 mL). Se separaron las fases y la fase acuosa fue sometida a extracción con heptano (10 mL), seguido de éter dietílico (10 mL). Los compuestos orgánicos se combinaron y se lavaron con NH₄Cl ac. sat. (10 mL) y salmuera (10 mL). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar el compuesto del título (20 mg 0.042 mmol, rendimiento del 38 %), como un aceite.

Ejemplo 35 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de (2S)-2-(2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanamido)-4-metilpentanoato de etilo:



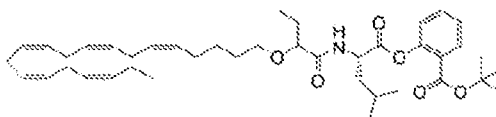
Se añadieron *N,N'*-Diciclohexilcarbodiimida (DCC) (1.13 g, 5.5 mmol), hidroxibenzotriazol (HOBt) (0.74 g, 5.5 mmol) y trietilamina (TEA) (1.58 mL, 11.4 mmol) a una solución de ácido 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanoico (1.87 g, 5.0 mmol) en tetrahidrofurano (THF) (20 mL) y se agitó la mezcla durante 10 minutos. Se añadió clorhidrato de éster etílico de L-Leucina (0.89 g, 4.6 mmol) y se agitó la mezcla resultante durante 2 horas. Se concentró la mezcla al vacío, se disolvió en Et₂O (100 mL) y se lavó con HCl (ac.) 1M, NaHCO₃ (ac.) saturado y salmuera. La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea utilizando un gradiente de 10 - 15 % de EtOAc en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 1.88 g (rendimiento del 80 %) del compuesto del título. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.90-1.05 (m, 12H), 1.25-1.35 (m, 3H), 1.45-1.85 (m, 9H), 2.05-2.20 (m, 4H), 2.80-2.90 (m, 8H), 3.40-3.70 (m, 3H), 4.18 (q, 2H), 4.55-4.70 (m, 1H), 5.30-5.45 (m, 10H), 6.80-6.95 (m, 1H). MS (ESI): 538 [M+Na]⁺.

Ejemplo 36 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido (2S)-2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)-4-metilpentanoico:



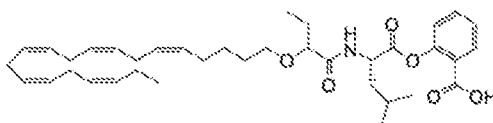
Se añadió una solución de LiOH (700 mg, 29 mmol) en agua (10 mL) a una solución de (2S)-2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)-4-metilpentanoato de etilo (1.88 g, 3.65 mmol) en EtOH (20 mL) y se agitó la mezcla de reacción a 40°C durante 1 hora. Se enfrió la mezcla a temperatura ambiente y se añadió HCl 3M (ac.) hasta pH-2. La mezcla resultante fue sometida a extracción dos veces con Et₂O y las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para proporcionar 1.55 g (rendimiento del 87 %) del compuesto del título. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.90-1.05 (m, 12H), 1.45-1.55 (m, 2H), 1.65-1.85 (m, 7H), 2.05-2.20 (m, 4H), 2.80-2.90 (m, 8H), 3.45-3.65 (m, 2H), 3.70-3.80 (m, 1H), 4.55-4.70 (m, 1H), 5.30-5.45 (m, 10H), 6.85-7.00 (m, 1H), 10.30 (br s, 1H). MS (ESI): 510 [M+Na]⁺.

Ejemplo 37 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 2-(((2S)-2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)-4-metilpentanoil)oxi)benzoato de terc-butilo:



Se añadieron éster terc-butílico del ácido 2-Hidroxi-benzoico (291 mg, 1.5 mmol), TEA (0.46 mL, 3.3 mmol) y hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N,N'* tetrametiluronio (TBTU) (500 mg, 1.65 mmol) a una solución de ácido (2S)-2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)-4-metilpentanoico (730 mg, 1.5 mmol) en dimetilformamida (DMF) (10 mL). La mezcla de reacción se calentó durante 2 horas a 65 °C, se enfrió a TA y se agregó Et₂O (100 mL). Las dos fases resultantes se separaron y se lavó la fase orgánica con NH₄Cl (ac.) al 10 % y salmuera, se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea utilizando EtOAc al 10 % en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 404 mg (rendimiento del 41 %) del compuesto del título. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.90-1.05 (m, 12H), 1.40-1.55 (m, 2H), 1.57 (s, 9H), 1.60-1.85 (m, 6H), 2.00-2.20 (m, 5H), 2.80-2.90 (m, 8H), 3.40-3.60 (m, 2H), 3.70-3.80 (m, 1H), 4.90-5.05 (m, 1H), 5.30-5.45 (m, 10H), 7.10 (d, 2H), 7.25-7.35 (m, 1H), 7.50-7.55 (m, 1H), 7.85-7.95 (m, 1H). MS (ESI): 686 [M+Na]⁺.

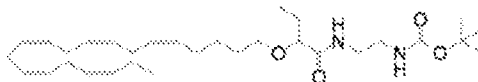
Ejemplo 38 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido 2-(((2S)-2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)-4-metilpentanoil)oxi)benzoico:



Se añadió TFA (1 mL) a una solución de 2-(((2S)-2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)-4-metilpentanoil)oxi)benzoato de terc-butilo (150 mg, 0.23 mmol) en DCM (4 mL) a 0 °C y se

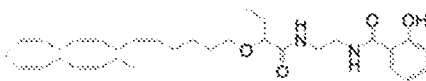
agitó la mezcla de reacción durante 40 minutos. Se añadió tolueno (10 mL) y se concentró la mezcla al vacío. Se purificó el residuo por cromatografía instantánea utilizando EtOAc al 13 % (que contenía 0.1 % de FA) en heptano (que también contenía 0.1 % de FA), como eluyente. Las fracciones apropiadas se concentraron y el residuo (100 mg) se disolvió en Et₂O (50 mL). Se lavó la solución con NaHCO₃ (ac.) saturado, se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío para proporcionar 60 mg del producto deseado. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.85-1.05 (m, 12H), 1.35-2.15 (m, 13H), 2.75-2.90 (m, 8H), 3.40-3.60 (m, 2H), 3.70-3.80 (m, 1H), 4.85-5.05 (m, 1H), 5.30-5.45 (m, 10H), 7.0-7.20 (m, 2H), 7.25-7.40 (m, 1H), 7.50-7.65 (m, 1H), 8.00-8.15 (m, 1H). MS (ESI): 630 [M+Na]⁺. HR-MS(ESI): calc. para C₃₇H₅₃NO₆+Na: 630.3770, encontrado: 630.3786.

Ejemplo 39 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de (2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)etil)carbamato de terc-butilo:



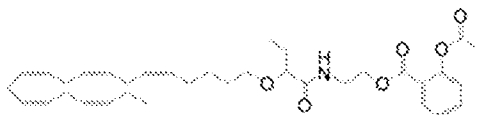
Se añadieron DCC (1.73 g, 8.4 mmol) y HOBt (1.14 g, 8.4 mmol) a una solución de ácido 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanoico (3.14 g, 8.4 mmol) en THF (25 mL) a 0 °C y se agitó la mezcla durante 20 minutos. Se añadió gota a gota una solución de N-Boc-etilendiamina en THF (1 mL) y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 1.5 horas. Se añadió Et₂O (200 mL) y se lavó la mezcla con agua, HCl (ac.) 1 M, NaHCO₃ (ac.) saturado y salmuera. La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. Se purificó el residuo por cromatografía instantánea utilizando EtOAc al 25 % (que contenía 0.5 % de FA) en heptano (que también contenía 0.5 % de FA), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 3.0 g (rendimiento del 83 %) del compuesto del título. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.90 (t, 3H), 0.96 (t, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.40-1.80 (m, 6H), 2.05-2.20 (m, 4H), 2.75-2.90 (m, 8H), 3.20-3.60 (m, 6H), 3.65-3.75 (m, 1H), 5.02 (br s, 1H), 5.30-5.45 (m, 10H), 7.01 (br s, 1H). MS (ESI): 539 [M+Na]⁺.

Ejemplo 40 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 2-hidroxi-N-(2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)etil)benzamida:



Se añadió TFA (2 mL) a una solución de terc-butyl (2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)etil)carbamato (668 mg, 1.3 mmol) en DCM (8 mL) y se agitó la mezcla resultante durante 1.5 horas. Se concentró la mezcla al vacío para dar la sal de TFA de N-(2-aminoetil)-2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamida como producto crudo (800 mg, MS (ESI): 417 [M+H]⁺, 439 [M+Na]⁺). Se disolvió el residuo en DCM (10 mL) y se añadió DCC (320 mg, 1.55 mmol), TEA (0.36 mL, 2.6 mmol) y HOBt (210 mg, 1.55 mmol). Después de 15 minutos, se añadió gota a gota una solución de ácido salicílico (214 mg, 1.55 mmol) en DCM (1 mL) y se agitó la mezcla resultante durante la noche. La mezcla se concentró y se disolvió el residuo en Et₂O (100 mL), se lavó con agua, HCl (ac.) 1M, NaHCO₃ (ac.) saturado y salmuera. La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. El aceite crudo se purificó mediante cromatografía instantánea utilizando un gradiente de 4 - 15 % de EtOAc (que contenía 5 % de FA) en heptano (que también contenía 5 % de FA), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 110 mg (rendimiento del 16 % en dos pasos) del compuesto del título. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.89 (t, 3H), 0.99 (t, 3H), 1.35-1.50 (m, 2H), 1.60-1.90 (m, 4H), 2.05-2.20 (m, 4H), 2.8-2.9 (m, 8H), 3.47 (t, 2H), 3.50-3.70 (m, 4H), 3.70-3.80 (m, 1H), 5.30-5.45 (m, 10H), 6.85-6.95 (m, 1H), 6.97 (dd, 1H), 7.14 (br s, 1H), 7.35-7.45 (m, 1H), 7.48 (dd, 1H), 7.95 (br s, 1H), 12.51 (br s, 1H). MS (ESI): 537 [M+H]⁺, 559 [M+Na]⁺.

Ejemplo 41 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 2-acetoxibenzoato de 2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)etilo:



Se añadieron TBTU (0.85 g, 2.64 mmol) y TEA (0.8 mL, 5.3 mmol) a una solución de ácido acetilsalicílico (0.4 g, 2.4 mmol) en DCM (20 mL) y se agitó la mezcla durante 10 minutos. Se añadió una solución de N-(2-hidroxi)etil)-2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamida (1.0 g, 1.4 mmol) en DCM (10 mL) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se calentó a reflujo durante la noche. Se añadió agua y la mezcla resultante fue sometida a extracción dos veces con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea utilizando un gradiente de 0 - 20 % de EtOAc en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 900 mg (rendimiento del 65 %) del compuesto del

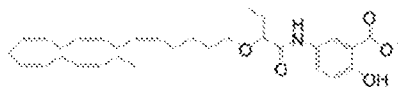
título. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0.85-1.00 (m, 6H), 1.35-1.50 (m, 2H), 1.50-1.85 (m, 4H), 2.00-2.20 (m, 4H), 2.37 (s, 3H), 2.75-2.90 (m, 8H), 3.40-3.55 (m, 2H), 3.55-3.75 (m, 3H), 4.15-4.45 (m, 2H), 5.30-5.50 (m, 10H), 6.80-95 (m, 1H), 7.10-7.15 (m, 1H), 7.30-7.40 (m, 1H), 7.55-7.65 (m, 1H), 8.00-8.05 (m, 1H). MS (ESI): 602 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

5 **Ejemplo 42 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 2-hidroxibenzoato de 2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)etilo:**



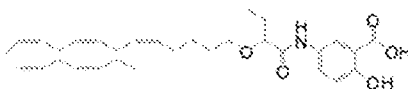
Se añadió amoníaco (ac., 28 %, 3 mL) gota a gota a una solución de 2-acetoxibenzoato de 2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)etilo (390 mg, 0.67 mmol) en 2-propanol (27 mL) y agua (9 mL) y se agitó la mezcla durante 10 minutos. Se añadió agua y la mezcla resultante fue sometida a extracción dos veces con Et_2O . Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (Na_2SO_4), filtraron y concentraron al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea utilizando un gradiente de 0-20 % de EtOAc en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 63 mg (rendimiento del 18 %) del compuesto del título. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0.91 (t, 3H), 0.97 (t, 3H), 1.35-1.45 (m, 2H), 1.55-1.90 (m, 4H), 2.00-2.15 (m, 4H), 2.80-2.90 (m, 8H), 3.44 (t, 2H), 3.65-3.80 (m, 3H), 4.40-4.50 (m, 2H), 5.30-5.45 (m, 10H), 6.85-6.95 (m, 2H), 6.95-7.05 (m, 1H), 7.40-7.50 (m, 1H), 7.80-7.85 (m, 1H), 10.63 (s, 1H). MS (ESI): 560 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Ejemplo 43 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 2-hidroxi-5-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)benzoato de metilo:



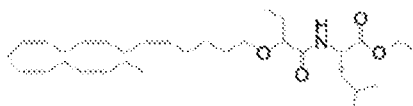
Se disolvieron ácido 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanoico (300 mg, 0.80 mmol), 5-aminosalicilato de metilo (140 mg, 0.83 mmol) y TEA (0.22 mL, 1.60 mmol) en MeCN (3 mL). Se añadió HATU (320 mg, 0.83 mmol) y se agitó la mezcla de reacción durante la noche. Luego, la mezcla se concentró bajo presión reducida y el residuo se repartió entre Et_2O (30 mL) y salmuera (20 mL). La fase acuosa fue sometida a extracción con Et_2O (20 mL) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con HCl 2M (ac., 15 mL), NaHCO_3 saturado (ac., 15 mL) y salmuera (15 mL), se secaron (Na_2SO_4), filtraron y concentraron al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea utilizando EtOAc al 5 % en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 320 mg (rendimiento del 77 %) del compuesto del título. MS (ESI): 546 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Ejemplo 44 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido 2-hidroxi-5-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)benzoico:



Se añadió NaOH 2M (ac., 6 mL) a una solución de 2-hidroxi-5-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)benzoato de metilo (320 mg, 0.61 mmol) en MeOH (3 mL) y se calentó la mezcla de reacción a 50°C durante la noche. Se enfrió la mezcla a temperatura ambiente y se acidificó a pH ~2 con HCl 5M (ac.). La mezcla resultante fue sometida a extracción con EtOAc y la fase orgánica se secó (Na_2SO_4), filtró y concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea utilizando un gradiente de 1 - 2 % de MeOH en EtOAc , como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 85 mg (rendimiento del 27 %) del compuesto del título. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0.90-1.05 (t, 3H), 1.20-1.30 (m, 1H), 1.45-1.60 (m, 2H), 1.65-1.75 (m, 2H), 1.80-1.95 (m, 2H), 2.05-2.20 (m, 4H), 2.80-2.90 (m, 8H), 3.50-3.65 (m, 2H), 3.85-3.95 (m, 1H), 5.30-5.45 (m, 10H), 6.90-7.00 (m, 1H), 7.58 (br s, 1H), 8.11 (br s, 1H), 8.40 (s, 1H). MS (ESI): 508 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

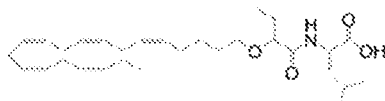
Ejemplo 45 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de (2S)-2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)-4-metilpentanoato de etilo:



Se añadieron DCC (1.13 g, 5.5 mmol) y HOBt (0.74 g, 5.5 mmol) seguido de TEA (1.58 mL, 11.4 mmol) a una solución de ácido 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanoico (1.87 g, 5.0 mmol) en

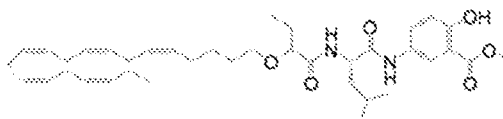
THF (20 mL) y se agitó la mezcla durante 10 minutos. Se añadió clorhidrato de éster etílico de L-Leucina (0.89 g, 4.6 mmol) y se agitó la mezcla resultante durante 2 horas. Se añadió EtOAc (100 mL) y se lavó la mezcla con agua, HCl (ac.) 1M, NaHCO₃ (ac.) saturado y salmuera. La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea utilizando un gradiente de 10 - 15 % de EtOAc en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 1.84 g (rendimiento del 79 %) del compuesto del título. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.85-1.05 (m, 12H), 1.25-1.35 (m, 3H), 1.40-1.85 (m, 9H), 2.05-2.20 (m, 4H), 2.80-2.90 (m, 8H), 3.45-3.75 (m, 3H), 4.15-4.25 (m, 2H), 4.55-4.75 (m, 1H), 5.30-5.45 (m, 10H), 6.80-6.95 (m, 1H). MS (ESI): 538 [M+Na]⁺.

Ejemplo 46 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido (2S)-2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)-4-metilpentanoico:



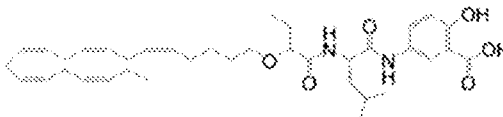
Se añadió LiOH 1M (ac., 28 mL) a una solución de (2S)-2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)-4-metilpentanoato de etilo (1.79 g, 3.5 mmol) en EtOH (50 mL) y se calentó la mezcla de reacción a 50°C durante 2 horas. Se enfrió la mezcla a temperatura ambiente y se añadió HCl (ac.) 6M a pH~2. La mezcla resultante fue sometida a extracción dos veces con Et₂O y las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), filtraron y se concentraron bajo presión reducida para proporcionar 1.61 g (rendimiento del 95 %) del compuesto del título. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.85-1.05 (m, 12H), 1.45-1.55 (m, 2H), 1.60-1.85 (m, 7H), 2.05-2.20 (m, 4H), 2.80-2.90 (m, 8H), 3.45-3.65 (m, 2H), 3.70-3.80 (m, 1H), 4.60-4.75 (m, 1H), 5.30-5.45 (m, 10H), 6.90-7.05 (m, 1H), 10.15 (br s, 1H). MS (ESI): 486 [M-H].

Ejemplo 47 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 2-hidroxi-5-((2S)-2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)-4-metilpentanamido)benzoato de metilo:



Se añadieron DCC (248 mg, 1.2 mmol) y HOBT (163 mg, 1.2 mmol) a una solución de ácido (2S)-2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)-4-metilpentanoico (487 mg, 1.0 mmol) en THF (8 mL) a 0 °C. Se añadió gota a gota una solución de 5-amino salicilato de metilo (201 mg, 1.2 mmol) en THF (1 mL) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 horas. Se añadió Et₂O (100 mL) y se lavó la mezcla con agua, HCl (ac.) 1M, NaHCO₃ (ac.) saturado y salmuera. La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea utilizando un gradiente de 3 - 15 % de EtOAc (que contenía 5 % de FA) en heptano (que también contenía 5 % de FA), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 197 mg (rendimiento del 31 %) del compuesto del título. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.85-1.05 (m, 12H), 1.40-1.50 (m, 2H), 1.60-1.90 (m, 7H), 2.05-2.20 (m, 4H), 2.80-2.90 (m, 8H), 3.45-3.55 (m, 2H), 3.75-3.80 (m, 1H), 3.94 (s, 1H), 4.55-4.65 (m, 1H), 5.30-5.45 (m, 10H), 6.90-7.00 (m, 2H), 7.45-7.50 (m, 1H), 8.00-8.10 (m, 1H), 8.66 (s, 1H), 10.59 (y, 1H). MS (ESI): 659 [M+Na]⁺.

Ejemplo 48 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido 2-hidroxi-5-((2S)-2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)-4-metilpentanamido)benzoico:



Se añadió LiOH 1M (ac., 2.5 mL) a una solución de 2-hidroxi-5-((2S)-2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)-4-metilpentanamido)benzoato de metilo (190 mg, 0.3 mmol) en MeOH (5 mL). La mezcla de reacción se calentó a 50°C durante 5 horas y luego se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla se acidificó con HCl (ac.) 6M a pH~2 y se eliminó la mayor parte del solvente al vacío. El residuo fue sometido a extracción dos veces con Et₂O y las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea utilizando un gradiente de 5-25 % de EtOAc (que contenía 5 % FA) en heptano (que también contenía 5 % FA), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 100 mg (rendimiento del 54 %) del compuesto del título. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.90-1.05 (m, 12H), 1.40-1.50 (m, 2H), 1.60-1.90 (m, 7H), 2.05-2.20 (m, 4H), 2.80-2.90 (m, 8H), 3.45-3.60 (m, 2H), 3.80-3.90 (m, 1H), 4.60-

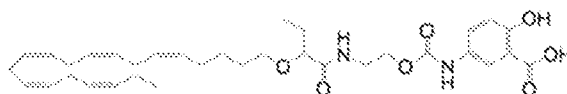
4.75 (m, 1H), 5.30-5.45 (m, 10H), 6.89 (d, 1H), 7.24 (d, 1H), 7.70-7.90 (m, 2H), 9.02 (d, 1H), 10.37 (d, 1H). MS (ESI): 623 [M+H]⁺.

Ejemplo 49 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 2-hidroxi-5-(((2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)etoxi)carbonil)amino)benzoato de metilo:



Se añadieron difosgeno (0.16 mL, 1.3 mmol) y diisopropilamina (0.16 mL, 0.96 mmol) a una solución de N-(2-hidroxi-5-(((2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)etoxi)carbonil)amino)benzoato de metilo (0.4 g, 0.96 mmol) en DCM (15 mL) a 0 °C. Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C durante 1 hora y luego a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se concentró bajo presión reducida y el residuo se suspendió en THF (20 mL). La suspensión se filtró y el filtrado se concentró bajo presión reducida. Luego el residuo se suspendió en Et₂O, se filtró a través de una capa de sílice y concentró al vacío para proporcionar 0.66 g de 2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)etil carbonocloridato como un producto crudo. Se disolvió el residuo en DCM (15 mL) y se añadió 5-aminosalicilato de metilo (0.13 g, 0.77 mmol) y TEA (0.2 mL, 1.54 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante 2 horas y luego se añadió agua. La mezcla resultante fue sometida a extracción dos veces con DCM y las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea utilizando un gradiente de 30 - 50 % de EtOAc en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 145 mg (rendimiento del 30 %) del compuesto del título. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.85-1.00 (m, 6H), 1.35-1.50 (m, 2H), 1.50-1.85 (m, 4H), 2.00-2.20 (m, 4H), 2.75-2.90 (m, 8H), 3.40-3.55 (m, 2H), 3.55-3.75 (m, 3H), 3.95 (s, 3H), 4.25-4.35 (m, 2H), 5.25-5.45 (m, 10H), 6.68 (br s, 1H), 6.85-7.00 (m, 2H), 7.35-7.45 (m, 1H), 7.91 (br s, 1H), 10.57 (s, 1H). MS (ESI): 633 [M+Na]⁺.

Ejemplo 50 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido 2-hidroxi-5-(((2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)etoxi)carbonil)amino)benzoico:



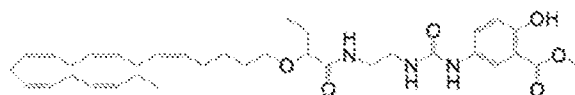
Se añadió LiOH 1M (ac., 1.9 mL) a una solución de 2-hidroxi-5-(((2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)etoxi)carbonil)amino)benzoato de metilo (145 mg, 0.24 mmol) en MeOH (20 mL) y se calentó la mezcla a 50 °C durante la noche. Se acidificó la mezcla de reacción con HCl (ac.) 1M a pH~2 y luego fue sometida a extracción dos veces con Et₂O. Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea utilizando EtOAc al 20 % (que contenía FA al 5 %) en heptano (que también contenía FA al 5 %), como eluyente. Se agruparon las fracciones apropiadas y concentraron. El residuo (46 mg) se purificó adicionalmente mediante HPLC preparativa utilizando un gradiente de 30 - 95 % de MeCN en agua (que contenía 5 % de MeCN y 0.01 % de TFA), como eluyente. Se agruparon las fracciones apropiadas y se concentraron y se disolvió el residuo en tolueno. La concentración de la solución proporcionó 24 mg (rendimiento del 17 %) del compuesto del título. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.91-1.01 (m, 6H), 1.35-1.50 (m, 2H), 1.55-1.90 (m, 4H), 2.05-2.15 (m, 4H), 2.80-2.90 (m, 8H), 3.45-3.55 (m, 2H), 3.65-3.75 (m, 2H), 3.75-3.85 (m, 1H), 4.25-4.35 (m, 2H), 5.30-5.45 (m, 10H), 6.90-7.00 (m, 2H), 7.00-7.10 (m, 1H), 7.63 (br s, 1H), 7.83 (s, 1H), 10.43 (br s, 1H). MS (ESI): 597 [[M+H]⁺.

Ejemplo 51 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)-N-(2-isocianatoetil)butanamida:



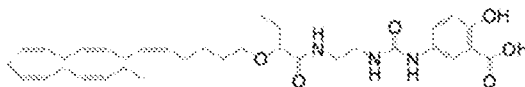
Se añadió 1,8-Bis(dimetilamino)naftaleno (577 mg, 2.7 mmol) a una solución de N-(2-aminoetil)-2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamida (560 mg, 1.35 mmol) en DCM (10 mL) y se enfrió la mezcla a 0 °C. Se añadió cloroformiato de triclorometilo (98 µL, 0.81 mmol) gota a gota antes de retirar el baño de enfriamiento y se agitó la mezcla durante 15 minutos. Se añadió HCl 1M (ac., 30 mL) y DCM (30 mL). Las dos fases resultantes se separaron y se lavó la fase orgánica 4 veces con HCl (ac.) 1M y una vez con NaOH (ac.) 1M, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró bajo presión reducida para proporcionar 500 mg (rendimiento del 84 %) del compuesto del título como producto crudo. MS (ESI): 465 [M+Na]⁺.

Ejemplo 52 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 2-hidroxi-5-(3-(2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)etil)ureido)benzoato de metilo:



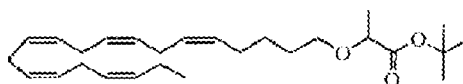
Se añadió 5-aminosalicinato de metilo (189 mg, 1.13 mmol) a una solución de 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)-N-(2-isocianatoetil)butanamida (500 mg, 1.13 mmol) en DCM (5 mL). Se agitó la mezcla de reacción durante 2 horas y luego se concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea utilizando un gradiente de 40 - 0 % de heptano en EtOAc, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 230 mg (rendimiento del 33 %) del compuesto del título. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.85-1.05 (2xt, 6H), 1.35-1.50 (m, 2H), 1.55-1.85 (m, 4H), 2.05-2.20 (m, 4H), 2.75-2.95 (m, 8H), 3.35-3.50 (m, 6H), 3.65-3.75 (m, 1H), 3.94 (s, 3H), 5.30-5.50 (m, 10H), 6.95 (d, 1H), 7.10 (br s, 1H), 7.40 (dd, 1H), 7.88 (d, 1H), 10.62 (s, 1H). MS (ESI): 632 [M+Na]⁺.

Ejemplo 53 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido 2-hidroxi-5-(3-(2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)etil)ureido)benzoico:



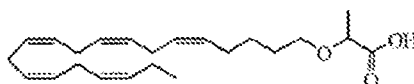
Se añadió gota a gota LiOH 1M (ac., 2.9 mL) a una solución de 2-hidroxi-5-(3-(2-(2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanamido)etil)ureido)benzoato de metilo (220 mg, 0.36 mmol) en MeOH (10 mL) y se calentó la mezcla a 50°C durante la noche. Se enfrió la mezcla a temperatura ambiente y luego se acidificó a pH=2 con HCl (ac.) 6M. La mezcla resultante fue sometida a extracción dos veces con EtOAc y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron bajo presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea utilizando un gradiente de 5-40 % de EtOAc (que contenía 5 % de FA) en heptano (que también contenía 5 % de FA), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 92 mg (rendimiento del 43 %) del compuesto del título. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.91 (t, 3H), 0.98 (t, 3H), 1.40-1.50 (m, 2H), 1.60-1.90 (m, 4H), 2.05-2.20 (m, 4H), 2.80-2.90 (m, 8H), 3.40-3.60 (m, 6H), 3.75-3.80 (m, 1H), 5.30-5.45 (m, 10H), 6.90 (d, 1H), 7.25-7.35 (m, 1H), 7.45-7.55 (m, 1H), 7.80-7.95 (m, 2H), 10.56 (br s, 1H). MS (ESI): 596 [M+H]⁺, 618 [M+Na]⁺.

Ejemplo 54: Preparación de 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaeniloxi)propanoato de terc-butilo:

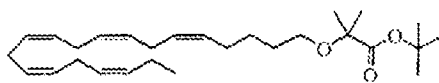


Se disolvió una mezcla de (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-ol, (1.00 g, 3.47 mmol), cloruro de tetrabutilamonio (0.24 g, 0.87 mmol) y 2-bromopropionato de t-butilo (3.62 g, 17.3 mmol) en tolueno (36 mL) y se colocó bajo nitrógeno. Se añadió lentamente una solución acuosa de hidróxido de sodio (50 %, 8 mL) bajo agitación vigorosa y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante veinte horas. Se añadió agua y la mezcla fue sometida a extracción tres veces con éter. El extracto orgánico combinado se lavó con salmuera, se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo al 2 % en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 1.40 g (rendimiento del 90 %) del compuesto del título, como un aceite. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.95 (t, 3H), 1.41 (d, 3H), 1.48 (s, 9H), 1.48-1.66 (m, 4H), 2.05 (m, 4H), 2.83 (m, 8H), 3.35 (m, 1H), 3.55 (m, 1H), 3.79 (q, 1H), 5.32-5.44 (m, 10H).

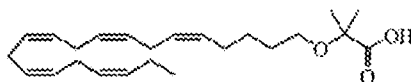
Ejemplo 55: Preparación de ácido 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaeniloxi)propanoico:



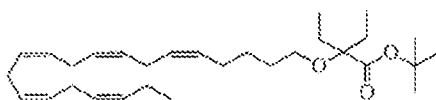
Se añadió ácido trifluoroacético (2 mL) a una solución de 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaeniloxi)propanoato (1.40 g, 3.36 mmol) en diclorometano (10 mL), mantenido bajo nitrógeno y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante tres horas. Se añadió éter dietílico (50 mL) y se lavó la fase orgánica con agua (30 mL), se secó (Na₂SO₄) y se concentró. El residuo fue sometido a cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientemente polares de heptano, acetato de etilo y ácido fórmico (95:5:0.25 -> 80:20:1), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 0.67 g de un producto ligeramente impuro. Este material se disolvió en heptano (15 mL), se lavó tres veces con agua (5 mL), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró para proporcionar 0.50 g (rendimiento del 41 %) del compuesto del título, como un aceite. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.99 (t, 3H), 1.40-1.48 (m, 5H), 1.67 (m, 2H), 2.09 (m, 4H), 2.80-2.60 (m, 8H), 3.53 (m, 2H), 4.01 (q, 1H), 5.31-5.47 (m, 10H); MS (electroatomización): 359.2 [M-H].

Ejemplo 56: Preparación de 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaeniloxi)-2-metilpropanoato de *terc*-butilo:

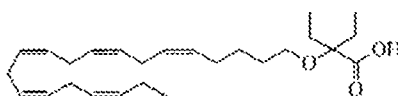
Se disolvió una mezcla de (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-ol, (0.83 g, 3.14 mmol), cloruro de tetrabutilamonio (0.24 g, 0.85 mmol) y 2-bromo isobutirato de *t*-butilo (3.50 g, 15.7 mmol) en tolueno (15 mL) y se colocó bajo nitrógeno. Se añadió lentamente una solución acuosa de hidróxido de sodio (50 %, 5 mL) bajo agitación vigorosa a temperatura ambiente. Se calentó la mezcla resultante a 60°C y se agitó durante seis horas. Se enfrió la mezcla, se añadió agua y fue sometida a extracción tres veces con éter. El extracto orgánico combinado se lavó con salmuera, se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando un gradiente de 5 - 10 % de acetato de etilo en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 0.60 g (rendimiento del 44 %) del compuesto del título, como un aceite. MS (electroatomización): 453.3 [M+Na]⁺.

Ejemplo 57: Preparación de ácido 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaeniloxi)-2-metilpropanoico:

Se añadió ácido trifluoroacético (5 mL) a una solución de 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaeniloxi)-2-metilpropanoato de *terc*-butilo (600 mg, 1.39 mmol) en diclorometano (20 mL) bajo nitrógeno y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante dos horas. Se añadió agua y la fase acuosa fue sometida a extracción dos veces con diclorometano. El extracto orgánico combinado se lavó con salmuera, se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando una mezcla de heptano, acetato de etilo y ácido fórmico (80:20:1), como eluyente. Las fracciones apropiadas se concentraron y el residuo (135 mg) se purificó adicionalmente mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando un gradiente de 5 - 10 % de una mezcla de acetato de etilo y ácido fórmico (95:5) en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 80 mg de un producto ligeramente impuro. Este material se disolvió en heptano (5 mL), se lavó dos veces con agua (5 mL), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró para obtener 40 mg (rendimiento del 8 %) del compuesto del título, como un aceite. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.99 (t, 3H), 1.47 (s, 6H), 1.64 (m, 2H), 2.07 (m, 4H), 2.81-2.88 (m, 8H), 3.46 (t, 2H), 5.29-5.44 (m, 10H); MS (electroatomización): 373.3 [M-H].

Ejemplo 58: Preparación de 2-etil-2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanoato de *terc*-butilo:

Se añadió gota a gota durante 30 minutos 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanoato de *terc*-Butilo (480 mg, 1.11 mmol) a una solución de diisopropilamina de litio (LDA) (2.0 M, 750 µL, 1.50 mmol) en tetrahidrofurano seco (10 mL) mantenido a -70°C bajo nitrógeno. Se agitó la mezcla de reacción durante 30 minutos. Se añadió yoduro de etilo (312 mg, 2.00 mmol) en una sola porción y se calentó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 1 hora. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 17 horas. Se vertió la mezcla en NH₄Cl (ac.) saturado (50 mL) y se le sometió a extracción con heptano (2 x 50 mL). Se lavaron las fases orgánicas combinadas sucesivamente con salmuera (50 mL), HCl 0.25 M (50 mL) y salmuera (50 mL), se secaron (MgSO₄), filtraron y concentraron. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientemente polares de heptano y acetato de etilo (100:0 -> 95:5), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 343 mg (rendimiento del 67 %) del compuesto del título, como un aceite. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.84 (t, 6H), 0.99 (td, 3H), 1.35-1.55 (m, 11 H), 1.54-1.69 (m, 2H), 1.68-1.87 (m, 4H), 1.99-2.24 (m, 4H), 2.74-2.99 (m, 8H), 3.31 (t, 2H), 5.23-5.52 (m, 10H); MS (electroatomización): 401.3 [M-1].

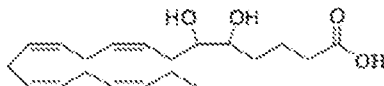
Ejemplo 59: Preparación de ácido 2-etil-2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanoico:

Se agitó vigorosamente una mezcla de ácido fórmico (5 mL) y 2-etil-2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanoato de *terc*-butilo (250 mg, 0.55 mmol) bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante

4.5 horas. Se eliminó al vacío el ácido fórmico. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientemente polares de heptano y acetato de etilo (100:0 -> 80:20), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 163 mg (rendimiento del 74 %) del compuesto del título, como un aceite. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (t, 6H), 0.99 (t, 3H), 1.36-1.57 (m, 2H), 1.68 (dd, 2H), 1.73-1.98 (m, 4H), 2.11 (tt, 4H), 2.70-3.01 (m, 8H), 3.39 (t, 2H), 5.20-5.56 (m, 10H). MS (electroatomización): 481.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Ejemplo 60 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 2-(((3Z,6Z,9Z,12Z)-pentadeca-3,6,9,12-tetraen-1-il)oxi)butanoato de terc-butilo

Paso a) Ácido (8Z,11Z,14Z,17Z)-5,6-dihidroxiicosa-8,11,14,17-tetraenoico



Se agitó una solución de 6-(((3Z,6Z,9Z,12Z)-1-yodopentadeca-3,6,9,12-tetraen-1-il)tetrahydro-2H-piran-2-ona (12.5 g, 29.2 mmol) y KOH (5.73 g, 102 mmol) en una mezcla de MeOH (150 mL) y agua (7.5 mL) a 60 °C bajo nitrógeno durante 4 horas. Se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente, se acidificó con HCl (ac.) 2 M y fue sometida a extracción con EtOAc (300 mL). Se lavó la capa orgánica con agua (300 mL con un poco de salmuera), se secó (Na_2SO_4), filtró y concentró al vacío, proporcionó 9.8 gramos (rendimiento del 100 %) como un aceite.

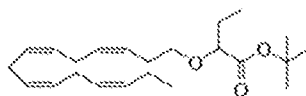
Paso b) (3Z,6Z,9Z,12Z)-pentadeca-3,6,9,12-tetraen-1-ol



Se añadió peryodato de sodio (9.34 g, 43.7 mmol) a una solución de ácido (8Z,11Z,14Z,17Z)-5,6-dihidroxiicosa-8,11,14,17-tetraenoico (9.8 g, 29.1 mmol) en THF : Agua (150 mL) a 0 °C bajo nitrógeno y se agitó durante 1 hora. La mezcla de reacción fue sometida a extracción con EtOAc (300 mL). La capa orgánica se separó y se lavó con salmuera diluida (200 mL), se secó (Na_2SO_4), filtró y concentró al vacío. Se disolvió el residuo en MeOH (100 mL) y se enfrió a 0 °C. Se añadió cuidadosamente NaBH_4 (3.31 g, 87 mmol) en porciones y se agitó la mezcla durante 30 minutos a 0 °C. Se añadió agua (300 mL) con cuidado y la mezcla fue sometida a extracción con EtOAc (2.200 mL). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con agua (200 mL), se secaron (Na_2SO_4), filtraron y concentraron al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo al 20 % en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 4.06 g (rendimiento del 63 %) del compuesto del título, como un aceite.

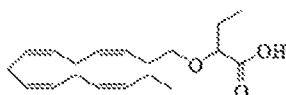
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 0.91 (t, 3H), 1.97 - 2.05 (m, 2H), 2.27 - 2.32 (m, 2H), 2.73 - 2.81 (m, 6H), 3.57 - 3.62 (m, 2H), 5.17 - 5.41 (m, 7H), 5.42 - 5.56 (m, 1H).

Paso c) 2-(((3Z,6Z,9Z,12Z)-pentadeca-3,6,9,12-tetraen-1-il)oxi)butanoato de terc-butilo



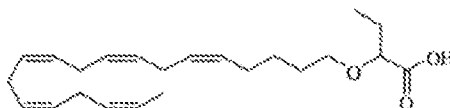
Se añadió cloruro de tetrabutilamonio (0.10 g, 0.33 mmol) a una solución de ((3Z,6Z,9Z,12Z)-pentadeca-3,6,9,12-tetraen-1-ol (0.22 g, 1.00 mmol) en tolueno (10 mL) a temperatura ambiente bajo nitrógeno, seguido de 2-bromobutirato de *t*-butilo (1.11 g, 5.00 mmol). Se añadió una solución acuosa de hidróxido de sodio (50 % (p/p), 4 mL) bajo agitación vigorosa a temperatura ambiente. La mezcla resultante se calentó a 50 °C y se agitó durante dos horas, seguido de agitación a temperatura ambiente durante la noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió agua y la fase acuosa fue sometida a extracción con éter dietílico. Se separaron las fases y la fase acuosa fue sometida a extracción dos veces más con éter dietílico. Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con agua seguida de salmuera, antes de secarse (Na_2SO_4), filtrarse y concentrarse al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo al 5 % en heptano, como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 0.30 g (83 %) del compuesto del título, como un aceite.

Ejemplo 61 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido 2-(((3Z,6Z,9Z,12Z)-pentadeca-3,6,9,12-tetraen-1-il)oxi)butanoico



Se añadió ácido trifluoroacético (2 ml) a una solución 2-(((3Z,6Z,9Z,12Z)-pentadeca-3,6,9,12-tetraen-1-il)oxi)butanoato de *tert*-butilo en diclorometano (10 mL) bajo nitrógeno. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante una hora antes de añadir agua y la fase acuosa fue sometida a extracción dos veces con diclorometano. Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con salmuera, se secaron (Na_2SO_4), filtraron y concentraron al vacío. Se purificó el residuo por cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo al 5 % en heptano (añadido HCOOH al 1 %), como eluyente. La concentración de las fracciones apropiadas proporcionó 0.18 g (rendimiento del 71 %) del compuesto del título, como un aceite. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0.90 - 1.05 (2xt, 6H), 1.75 - 1.90 (m, 2H), 2.05 - 2.15 (m, 2H), 2.30 - 2.50 (m, 2H), 2.85 (m, 6H), 3.60 (m, 2H), 3.85 (t, 1H), 5.25 - 5.60 (m, 8H).

Ejemplo 62 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-nonadeca-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico



Paso 1:

Se añadió una solución de deca-2,5,8-triin-1-ol (0.94 g, 6.43 mmol) en THF (100 ml) enfriada a 0 °C bajo nitrógeno a cloruro de metanosulfonilo (720 μL , 9.24 mmol), seguido de la adición gota a gota de TEA (1.97 mL, 14.13 mmol) durante 15 minutos. Se agitó la mezcla a 0 °C durante 2 horas. Luego, se vertió la mezcla en agua:hielo 1:1 (200 gramos) y fue sometida a extracción con éter dietílico (2x100). La capa orgánica combinada se lavó con NaHCO_3 sat. (ac.) (200 mL), agua (200 mL) y salmuera (200 mL), se secó (Na_2SO_4), filtró y se evaporó al vacío para dar un producto crudo que se purificó adicionalmente mediante secado instantáneo sobre gel de sílice. Las fracciones 1-3 se recogieron utilizando heptano, las fracciones 4-6 utilizando EtOAc:heptano 2.5:100, las fracciones 7 - 10 utilizando EtOAc:heptano 5:100 y la fracción 11 utilizando EtOAc. Se agruparon las fracciones apropiadas y se concentraron para obtener 1.07 g (4.77 mmol, rendimiento del 74.1 %) de metanosulfonato de nona-2,5,7-triin-1-ilo.

Paso 2:

A una solución ambiente de bromuro de etilmagnesio (4.00 mL, 12.00 mmol) diluida con THF seco (25 mL), se añadió en porciones una solución de alcohol propargílico (0.35 mL, 5.99 mmol) durante 20 minutos. Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 90 minutos, antes de enfriarla a 0 °C durante 30 minutos. Se añadió una cantidad catalítica de bromo(dimetilsulfuro) de cobre(I) (330 mg, 1.605 mmol) y se retiró el baño de enfriamiento. Después de 15 minutos de agitación, se añadió gota a gota durante 5 minutos metanosulfonato de nona-2,5,7-triin-1-ilo (1.05 g, 4.68 mmol) disuelto en THF (5 ml) mediante calentamiento. La mezcla de reacción se calentó a reflujo y se agitó a reflujo durante la noche. Se enfrió la reacción a temperatura ambiente y se la extinguió mediante la adición cuidadosa de 50 mL de NH_4Cl ac. sat. Se transfirió la mezcla resultante a un embudo de separación que contenía éter dietílico (100 mL). Se separó la fase orgánica y la fase acuosa fue sometida a extracción dos veces con éter dietílico (2x100 mL). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (50 mL) y se secó (Na_2SO_4). Se concentró el residuo al vacío antes de purificarlo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice. Se agruparon las fracciones apropiadas y se concentraron para obtener 0.49 g (2.65 mmol, rendimiento del 56.6 %) de dodeca-2,5,8,10-tetrain-1-ol.

Paso 3:

A una solución de dodeca-2,5,8,10-tetrain-1-ol (465 mg, 2.52 mmol) en THF (30 ml) enfriada a 0 °C bajo nitrógeno, se le añadió cloruro de metanosulfonilo (0.256 ml, 3.28 mmol), seguido de la adición gota a gota de TEA (0.704 ml, 5.05 mmol) durante 15 minutos. Se agitó la mezcla a 0 °C durante 1 hora. Luego, se vertió la mezcla en agua: hielo 1:1 (100 gramos) y fue sometida a extracción con éter dietílico (2x100 mL). La capa orgánica combinada se lavó con NaHCO_3 sat. (ac.) (200 mL), agua (200 mL) y salmuera (200 mL), se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó al vacío para dar 622 mg de producto crudo que se purificó adicionalmente mediante secado instantáneo. Las fracciones 1 - 3 se recolectaron utilizando heptano, las fracciones 4 - 6 utilizando EtOAc:heptano 2.5:100, las fracciones 7 - 10 utilizando EtOAc:heptano 5:100 y la fracción 11 utilizando EtOAc. Se agruparon las fracciones apropiadas y se concentraron para obtener 466 mg (1.78 mmol, rendimiento del 70.4 %) de metanosulfonato de trideca-2,5,8,11-tetrayn-1-ilo.

Paso 4:

A una solución/suspensión de carbonato de cesio (553 mg, 1.696 mmol), yoduro de sodio (280 mg, 1.866 mmol) y yoduro de cobre (I) (323 mg, 1.696 mmol) en DMF (seco) (15 ml) se añadió hex-5-inoato de etilo (262 mg, 1.866 mmol) en DMF (seco) (5 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno durante 40 minutos. Se añadió metanosulfonato de trideca-2,5,8,11-tetrain-1-ilo (445 mg, 1.696 mmol) en DMF (seco) (5 ml) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió NH_4Cl saturado (200 ml) y la mezcla fue sometida a extracción con EtOAc:Heptano (1:1, 3x150 ml). La fase orgánica combinada se

lavó con salmuera (200 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientemente polares de heptano y acetato de etilo, como eluyente, comenzando con una solución de EtOAc al 2 % en heptano. Se agruparon las fracciones apropiadas y se concentraron para obtener 51 mg (0.166 mmol, rendimiento del 9.8 %) de nonadeca-5,8,11,14,17-pentainoato de etilo.

Paso 5:

A una solución de nonadeca-5,8,11,14,17-pentainoato de etilo (60 mg, 0.196 mmol) en heptano (10 ml) y tolueno (15 mL) se hizo burbujear gas N₂ antes de agregar quinolina (10 µL, 0.084 mmol) y catalizador Lindlar (50 mg, 0.023 mmol) bajo atmósfera de N₂. Se agitó la suspensión bajo atmósfera de H₂ (1 atm) durante 15 hrs. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se evaporó al vacío. El material crudo se purificó mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando una mezcla de 2 % de EtOAc en heptano, como eluyente. Se agruparon las fracciones apropiadas y se concentraron para dar (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-nonadeca-5,8,11,14,17-pentaenoato de etilo (24.6 mg, 0.078 mmol, rendimiento del 39.7 %), como un aceite. ¹H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 1.27 (t, 2H), 1.59 - 1.70 (m, 2H), 1.72 (s, 0H), 2.31 (d, 1H), 2.72 - 2.95 (m, 3H), 4.15 (d, 1H), 5.40 (dq, 4H).

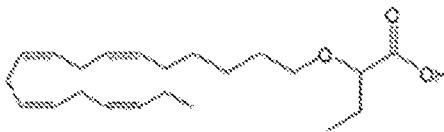
Paso 6:

A una solución de (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-nonadeca-5,8,11,14,17-pentaenoato de etilo (22 mg, 0.070 mmol) en tetrahidrofurano (5 ml), enfriada a 0 °C, se añadió LAH (8 mg, 0.211 mmol) en una porción. Se agitó la mezcla de reacción durante 30 minutos a 0° C, antes de 90 minutos a temperatura ambiente. Mezcla de reacción vertida en NH₄Cl (ac.) sat. (10 mL) e hielo (10 g) y mezcla acidificada usando HCl 10 % (ac.) a pH ~1 - 2. La mezcla fue sometida a extracción con Et₂O (25 ml) dos veces y las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (25 mL) y salmuera (25 mL), antes de secarlas (MgSO₄), filtrarlas y concentrarlas al vacío para proporcionar (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-nonadeca-5,8,11,14,17-pentaen-1-ol (15.5 mg, 0.056 mmol, rendimiento del 81 %), como un aceite.

Paso 7:

Se añadió ácido 2-bromobutírico (100 mg, 0.599 mmol) a una solución de (5Z,8Z,11Z,14 Z,17Z)-nonadeca-5,8,11,14,17-pentaen-1-ol (8 mg, 0.029 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml). Se enfrió la mezcla a 5 °C, antes de agregar gota a gota una solución de *terc*-butóxido de sodio al 17 % (p/p) (500 µl, 0.678 mmol) en *terc*-butil metil éter (30 ml) durante 5 minutos. Después de 3 horas, se añadió *terc*-butóxido de sodio adicional (100 µL 0,136 mmol) y se agitó la mezcla de reacción durante otras 3 horas. La reacción se extinguió mediante la adición de ácido fórmico (0.100 ml, 2.61 mmol) y agua (10 ml) y la mezcla resultante fue sometida a extracción con *terc*-butil metil éter (30 ml). Se lavó la fase orgánica cuatro veces con agua (4x10 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío. Se disolvió el concentrado en Me-THF (50 ml) y se lavó con NH₄Cl ac. sat. (20 ml) cuatro veces. La fase orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para dar ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-nonadeca-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (6 mg, 0.017 mmol, 57.1 %), como un aceite. HRMS (electroatomización), [M-H]⁻: Calculado: 359.2586, encontrado: 359.2578.

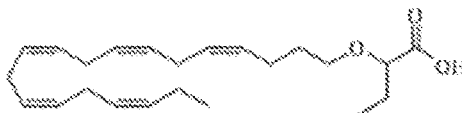
Ejemplo 63 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido 2-(((6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-6,9,12,15-tetraen-1-il)oxi)butanoico



A una solución de (6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-6,9,12,15-tetraen-1-ol (90 mg, 0.343 mmol) en tolueno (3 mL) se le añadió hidróxido de tetrabutilamonio (TBAOH) (2 mg, 0.008 mmol), 2-bromobutanoato de *terc*-butilo (190 mg, 0.819 mmol) y NaOH (50 p/p %, 1 mL) y se agitó la mezcla durante 3 horas a 45 °C. A la mezcla de reacción se le añadió más 2-bromobutanoato de *terc*-butilo (190 mg, 0.819 mmol) y se agitó la mezcla de reacción durante 24 horas a 45 °C. Se enfrió la mezcla a temperatura ambiente y fue sometida a extracción dos veces con Et₂O (2x30 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (3x25 mL) y salmuera (25 mL), se filtraron y se evaporaron al vacío para dar el producto crudo de 2-(((6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-6,9,12,15-tetraen-1-il)oxi)butanoato de *terc*-butilo. El producto crudo de 2-(((6Z,9Z,12Z,15Z)-octadeca-6,9,12,15-tetraen-1-il)oxi)butanoato de *terc*-butilo fue disuelto en ácido fórmico (FA) (5 mL) y la solución resultante se agitó a TA durante 3 h. Se concentró la mezcla al vacío a 25 °C y se disolvió el residuo en EtOAc (30 mL). Se lavó la solución con agua (4x25 mL), se diluyó con EtOAc (20 mL) y se secó (MgSO₄). Se eliminó el solvente al vacío y se purificó el producto crudo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando mezclas crecientemente polares de heptano y acetona (1:0 → 5:1), como eluyente. Las fracciones se agruparon y se evaporaron al vacío. Se disolvió el residuo en FA (5 mL) y se agitó a TA durante 3 h antes de evaporar el solvente al vacío. Al residuo se le añadió EtOAc (30 mL), se lavó con agua (4x25 mL), salmuera (25 mL), se secó (MgSO₄) y se evaporó al vacío. Se purificó el residuo mediante HPLC preparativa utilizando MeCN al 85

% en agua, como eluyente. Se agruparon las fracciones apropiadas y concentraron. Se disolvió el residuo en EtOAc, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El producto se disolvió en Et₂O y se concentró al vacío para dar 10 mg (rendimiento del 8 %) del compuesto del título. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 1.09 - 0.81 (m, 6H), 1.41 (dt, 4H), 1.67 (d, 2H), 1.97 - 1.74 (m, 2H), 2.10 (t, 4H), 2.84 (q, 6H), 3.55 - 3.42 (m, 1H), 3.65 - 3.54 (m, 1H), 3.88 (dd, 4.8 Hz, 1H), 5.53 - 5.25 (m, 8H). HRMS (electroatomización), [M-H]⁻: Calculado: 347.2592, encontrado: 347.2576.

Ejemplo 64 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido 2-(((4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)-nonadeca-4,7,10,13,16-pentaen-1-il)oxi)butanoico



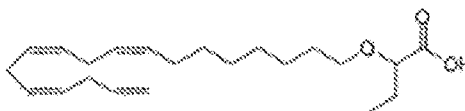
Paso 1:

A una solución de (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)-nonadeca-4,7,10,13,16-pentaen-1-ol (446 mg, 1.625 mmol) y 2-bromobutirato de terc-butilo (501 mg, 2.246 mmol) en tolueno (5 ml) se añadió hidrogenosulfato de tetrabutilamonio (102 mg, 0.300 mmol). Se añadió hidróxido de sodio (2,5 mL, 46.9 mmol) bajo agitación y la reacción se calentó directamente a 50 °C. Después de 1 hora, se añadió más 2-bromobutirato de terc-butilo (533 mg, 2.389 mmol) y se dejó la reacción durante 3 horas más antes de enfriarla bajo agitación durante la noche. Se añadió Et₂O (50 mL) y se formó una emulsión. Se añadió NH₄Cl (ac.) saturado (50 mL) y se agitó la mezcla. Se separaron las fases y la fase acuosa fue sometida a extracción con Et₂O (50 mL). Se lavó la fase orgánica combinada con 5 % p/p de NaOH (ac.). (2 x 50 mL), se secó (MgSO₄), filtró y evaporó. El residuo se secó en una línea de vacío durante 5 días, antes de diluirse con heptano (1 mL) y purificarse mediante secado instantáneo utilizando gel de sílice (5 gramos), eluyendo con: 2x50 mL de heptano seguido de 6x50 mL de mezcla de Heptano:EtOAc (95:5) en un total de 8 fracciones. Se recogió la fracción 3 - 4 para dar 2-(((4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)-nonadeca-4,7,10,13,16-pentaeniloxi)butanoato de terc-butilo (455 mg, 1.092 mmol, rendimiento del 67.2 %) después de la evaporación. ¹H RMN (300 MHz, Cloroformo-d) δ 0.98 (td, 6H), 1.49 (s, 9H), 1.57 - 1.84 (m, 4H), 2.00 - 2.28 (m, 4H), 2.74 - 2.94 (m, 8H), 3.33 (dt, 1H), 3.50 - 3.70 (m, 2H), 5.24 - 5.50 (m, 10H).

Paso 2:

Se agitó una mezcla de 2-(((4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)-nonadeca-4,7,10,13,16-pentaeniloxi)butanoato de terc-butilo (373 mg, 0.895 mmol) en HCOOH (10 mL) vigorosamente durante 2.5 hrs. La mezcla se concentró después de un tiempo de reacción total de 3 horas, se diluyó con Acetato de etilo (50 mL) y se lavó con agua (3 x 50 mL) para dar un pH neutro en la fase acuosa. La fase orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. Purificación mediante secado instantáneo utilizando gel de sílice (8 g) y elución con Heptano:EtOAc 90:10 (3 x 30 mL), seguido de 80:20 (7 x 50 mL). La fracción 4-6 se recogió y se concentró al vacío para proporcionar ácido 2-(((4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)-nonadeca-4,7,10,13,16-pentaeniloxi)butanoico (122 mg, 0.338 mmol, rendimiento del 37.8 %). ¹H RMN (300 MHz, Cloroformo-d) δ 1.00 (td, 2.6 Hz, 6H), 1.62 - 1.79 (m, 2H), 1.79 - 1.92 (m, 2H), 1.99 - 2.13 (m, 2H), 2.19 (dd, 2H), 2.85 (dtd, 8H), 3.47 - 3.67 (m, 2H), 3.88 (dd, 1H), 5.31 - 5.47 (m, 10H). HRMS (electroatomización), [MH]⁻: Calculado: 359.2586, encontrado: 359.2590.

Ejemplo 65 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido 2-(((8Z,11Z,14Z)-octadeca-8,11,14,17-tetraen-1-il)oxi)butanoico



Paso 1:

A una solución de carbonato de Cesio (2.67 g, 8.20 mmol), NaI (1.23 g, 8.20 mmol) y yoduro de cobre (I) (1.56 g, 8.20 mmol) en DMF (20 ml) se añadió non-8-inoato de metilo (1.38 g, 8.20 mmol) en DMF (5 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno durante 40 minutos. Se añadió metanosulfonato de nona-8-en-2,5-diin-1-ilo (1.74 g, 8.20 mmol) en DMF (5 ml) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió NH₄Cl saturado (200 ml) y la mezcla fue sometida a extracción con EtOAc:heptano (1:1, 3x150 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (100 ml), se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. La cromatografía instantánea (heptano/EtOAc 92/8) proporcionó octadeca-17-en-8,11,14-triinoato de metilo (1.43 g, 5.03 mmol, rendimiento del 61.3 %), como un aceite. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.80 - 5.67 (m, 1H), 5.29 - 5.18 (m, 1H), 5.08 - 4.99 (m, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.15 - 3.09 (m, 2H), 3.09 - 3.05 (m, 2H), 2.93 - 2.85 (m, 2H), 2.24 (t, 2H), 2.11 - 2.05 (m, 2H), 1.60 - 1.52 (m, 2H), 1.46 - 1.38 (m, 2H), 1.35 - 1.23 (m, 4H). MS (electroatomización): 307.1 [M+Na]⁺.

Paso 2:

Se añadió una suspensión de Catalizador Lindlar (1.063 g, 0.499 mmol) en heptano (15 ml) bajo atmósfera de N₂ a quinolina (0.177 ml, 1.498 mmol) y una solución de octadeca-17-en-8,11,14-triinoato de metilo (1.42 g, 4.99 mmol) en heptano (5 ml). Se agitó la mezcla bajo atmósfera de H₂ (1 atm) durante la noche. Se filtró la mezcla y se concentró al vacío. La cromatografía instantánea (heptano/EtOAc 98.5/1.5) proporcionó (8Z,11Z,14Z)-octadeca-8,11,14,17-tetraenoato de metilo (0.830 g, 2.86 mmol, rendimiento del 57.2 %), como un aceite. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.84 - 5.65 (m, 1H), 5.43 - 5.19 (m, 6H), 5.05 - 4.85 (m, 2H), 3.60 (s, 3H), 2.81 - 2.68 (m, 6H), 2.23 (t, 2H), 2.02 - 1.92 (m, 2H), 1.59 - 1.52 (m, 2H), 1.34 - 1.18 (m, 6H). MS (electroatomización): 313.2 [M+Na]⁺.

Paso 3:

Se añadió gota a gota una solución de (8Z,11Z,14Z)-octadeca-8,11,14,17-tetraenoato de metilo (830 mg, 2.86 mmol) en THF (2 ml) a una suspensión enfriada (0 °C) de LAH (114 mg, 3.00 mmol) en THF (10 ml) bajo atmósfera de N₂. Se agitó la mezcla durante 40 minutos a 0 °C y se vertió con cuidado en NH₄Cl saturado frío (20 mL). Se acidificó la capa acuosa con HCl (2M) a pH ~2. Se separaron las fases y la fase acuosa fue sometida a extracción con heptano (3x20 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (20 mL), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró al vacío para proporcionar (8Z,11Z,14Z)-octadeca-8,11,14,17-tetraen-1-ol (730 mg, 2.78 mmol, rendimiento del 97 %), como un aceite. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.84 - 5.66 (m, 1H), 5.43 - 5.20 (m, 6H), 5.03 - 4.82 (m, 2H), 3.57 (t, 2H), 2.84 - 2.62 (m, 6H), 2.06 - 1.90 (m, 4H), 1.58 - 1.42 (m, 3H), 1.33 - 1.20 (m, 6H). MS (electroatomización): 285.1 [M+Na]⁺.

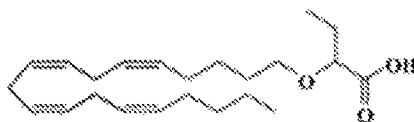
Paso 4:

Se añadió lentamente una solución de NaOH (2 ml, 37.9 mmol) a una solución agitada vigorosamente de (8Z,11Z,14Z)-octadeca-8,11,14,17-tetraen-1-ol (720 mg, 2.74 mmol), 2-bromobutanoato de terc-butilo (918 mg, 4.12 mmol) e hidrogenosulfato de tetrabutilamonio (279 mg, 0.823 mmol) en tolueno (8 ml) bajo atmósfera de N₂. Se calentó la mezcla a 40 °C durante la noche. Se añadió 2-bromobutanoato de terc-butilo adicional (306 mg, 1.372 mmol) dos veces, después de 5 horas y 24 horas. Después de 48 horas, se enfrió la mezcla a 5-10 °C y se añadió NH₄Cl saturado (20 ml). Se separaron las fases y la fase acuosa fue sometida a extracción con EtOAc (50 ml). La fase orgánica combinada se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. La cromatografía instantánea (heptano/EtOAc 99/1) proporcionó 2-(((8Z,11Z,14Z)-octadeca-8,11,14,17-tetraen-1-il)oxi)butanoato de terc-butilo (675 mg, 1.668 mmol, rendimiento del 60.8 %), como un aceite. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.86 - 5.65 (m, 1H), 5.41 - 5.21 (m, 6H), 5.04 - 4.83 (m, 2H), 3.57 - 3.46 (m, 2H), 3.30 - 3.19 (m, 1H), 2.81 - 2.68 (m, 6H), 2.02 - 1.89 (m, 4H), 1.71 - 1.60 (m, 2H), 1.54 - 1.50 (m, 2H), 1.41 (s, 12H), 1.32 - 1.20 (m, 8H), 0.89 (t, 3H).

Paso 5:

Se agitó una solución de 2-(((8Z,11Z,14Z)-octadeca-8,11,14,17-tetraen-1-il)oxi)butanoato de terc-butilo (675 mg, 1.668 mmol) en HCOOH (6.75 ml, 179 mmol) durante 21 hrs a 40 °C bajo atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se evaporó bajo presión reducida y se purificó por HPLC preparativa eluyendo con CH₃CN:H₂O-90:10 con 0.02 % de HCOOH. Las fracciones de la preparativa que contenían el producto puro se evaporaron bajo presión reducida para eliminar el CH₃CN. Al residuo se le añadió metil terc-butil metil éter y salmuera y se separaron las fases. La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó bajo presión reducida para proporcionar ácido 2-(((8Z,11Z,14Z)-octadeca-8,11,14,17-tetraen-1-iloxi)butanoico (163 mg, 0.464 mmol, rendimiento del 27.8 %), como un aceite. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.89 - 5.70 (m, 1H), 5.51 - 5.22 (m, 6H), 5.00 (dd, 2H), 3.84 (t, 1H), 3.62 - 3.38 (m, 2H), 2.79 (m, 6H), 2.12 - 1.95 (m, 2H), 1.88 - 1.75 (m, 2H), 1.64 - 1.58 (m, 2H), 1.31 (s, 8H), 0.96 (t, 3H). HRMS (electroatomización) [M-H]: Calculado: 347.2586, encontrado: 347.2589.

Ejemplo 66 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z)-nonadeca-5,8,11,14-tetraen-1-il)oxi)butanoico



Paso 1:

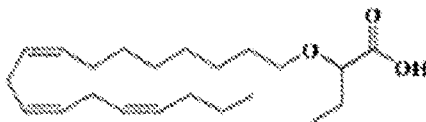
Se añadió gota a gota una solución de (5Z,8Z,11Z,14Z)-nonadeca-5,8,11,14-tetraenoato de etilo (21 g, 65.9 mmol) en THF (50 ml) durante 15 minutos a una suspensión enfriada (0 °C) de LAH (2.503 g, 65.9 mmol) en THF seco (300 ml) bajo atmósfera de nitrógeno. Se agitó la mezcla durante 1 hora a 0 °C y se vertió cuidadosamente en NH₄Cl saturado frío (300 mL). Se acidificó la capa acuosa con HCl (2 M) a pH ~2. Se separaron las fases y la fase acuosa fue sometida a extracción con heptano (2x250 mL). La fase orgánica

combinada se lavó con salmuera (300 mL), se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró al vacío para proporcionar (5Z,8Z,11Z,14Z)-nonadeca-5,8,11,14-tetraen-1-ol (17.9 g, 64.7 mmol, rendimiento del 98 %), como un aceite. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 5.46 - 5.11 (m, 8H), 3.68 - 3.57 (m, 2H), 2.89 - 2.69 (m, 6H), 2.12 - 1.98 (m, 4H), 1.62 - 1.51 (m, 2H), 1.47 - 1.23 (m, 6H), 0.91 - 0.85 (m, 3H).

5 Paso 2:

A una solución de (5Z,8Z,11Z,14Z)-nonadeca-5,8,11,14-tetraen-1-ol (17.9 g, 64.7 mmol) en THF (350 ml) se añadió ácido 2-bromobutanoico (10.35 ml, 97 mmol). Se enfrió la mezcla de reacción a 8 - 10 °C. Se añadió una solución de t-butoxido de sodio (17.42 g, 181 mmol) (17 % en MTBE (120 mL)) durante 25 minutos mientras se mantenía la temperatura entre 8 - 10 °C. Se agitó la reacción durante 30 minutos a 8 - 10 °C. Se añadió más t-butoxido de sodio (2.489 g, 25.9 mmol) (17 % en MTBE (25 mL)) durante 5 minutos. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 8 - 10 °C, seguido de la adición de ácido 2-bromobutírico (6.90 ml, 64.7 mmol) durante 5 minutos. Luego se agitó la mezcla a 8 - 10 °C durante 30 minutos. Se añadió más t-butoxido de sodio (4.98 g, 51.8 mmol) (17 % en MTBE (40 mL)) durante 5 minutos. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 8 - 10 °C. Se añadió más t-butoxido de sodio (2.489 g, 25.9 mmol) (17 % en MTBE (25 mL)) durante 5 minutos. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 8 - 10 °C. Se añadió HCOOH (3 mL) seguido de HCl 2 M (ac.) para dar pH- 2. Se separaron las fases y la fase acuosa fue sometida a extracción con MTBE (2x300 mL). La fase orgánica combinada se lavó con agua (300 mL), NaHCO_3 saturado (4x200 ml) y salmuera (300 ml), se secó (Na_2SO_4), filtró y concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea (heptano/ EtOAc / HCOOH 90/10/0,5) y se agruparon las fracciones apropiadas y se concentraron al vacío. Luego, se purificó el residuo adicionalmente mediante HPLC preparativa utilizando 88 % de MeCN (que contenía 0.02 % de HCOOH) en agua (que contenía 10 % de MeCN y 0.02 % de HCOOH), como eluyente. Se eliminaron los solventes para producir 10.16 g de ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z)-nonadeca-5,8,11,14-tetraen-1-il)oxi)butanoico (26.8 mmol, rendimiento del 41.5 %), como un aceite. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 9.93 (s, 1H), 5.51 - 5.21 (m, 8H), 3.84 - 3.80 (m, 1H), 3.62 - 3.54 (m, 1H), 3.50 - 3.39 (m, 1H), 2.96 - 2.61 (m, 6H), 2.12 - 2.01 (m, 4H), 1.90 - 1.71 (m, 2H), 1.69 - 1.57 (m, 2H), 1.49 - 1.37 (m, 2H), 1.36 - 1.23 (m, 4H), 0.97 (t, 3H), 0.91 - 0.84 (m, 3H). MS (electroatomización): 361.2 [M-H]⁻.

Ejemplo 67 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido 2-(((8Z,11Z,14Z)-octadeca-8,11,14-trien-1-il)oxi)butanoico



30 Paso 1

A una solución agitada de Cs_2CO_3 (106 g, 326 mmol), yoduro de sodio (44.8 g, 299 mmol) y yoduro de cobre (I) (56.9 g, 299 mmol) en DMF (750 ml) bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente se añadió non-8-inoato de etilo (49.5 g, 272 mmol) seguido de 1-bromonona-2,5-diina (54.1 g, 272 mmol). Se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente y se vertió en NH_4Cl saturado (600 mL). La mezcla fue sometida a extracción con MTBE (3x300 mL) y la fase orgánica combinada se lavó con salmuera (400 mL), se secó (Na_2SO_4), filtró y concentró al vacío. La cromatografía instantánea (heptano/ EtOAc 95/5-92/8-90/10) proporcionó octadeca-8,11,14-trienoato de etilo (52.8 g, 176 mmol, rendimiento del 64.7 %), como un aceite. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4.09 (q, 2H), 3.15 - 3.06 (m, 4H), 2.26 (t, 2H), 2.15 - 2.06 (m, 4H), 1.63 - 1.56 (m, 2H), 1.53 - 1.42 (m, 4H), 1.40 - 1.26 (m, 4H), 1.22 (t, 3H), 0.93 (t, 3H). MS (electroatomización): 323.2 [M+Na]⁺.

40 Paso 2:

A una solución en agitación de Acetato níqueloso, 4-hidrato (7.67 mL, 55.4 mmol) en EtOH absoluto (150 ml) a temperatura ambiente se añadió NaBH_4 sólido (2.097 g, 55.4 mmol) bajo una atmósfera de H_2 (1 atm). La suspensión resultante se agitó durante 30 minutos antes de añadir etilendiamina (12.38 ml, 185 mmol). Después de completar la adición, la suspensión se agitó durante otros 15 minutos antes de agregar octadeca-8,11,14-trienoato de etilo (11.1 g, 36.9 mmol) en EtOH absoluto (50 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo H_2 (1 atm) durante 3 noches. Se añadió éter dietílico (500 mL) para diluir la mezcla de reacción y luego la mezcla resultante se pasó a través de una columna corta de gel de sílice. El filtrado se concentró al vacío. Se purificó el residuo por cromatografía instantánea en columna (heptano/ EtOAc 98/2) para proporcionar (8Z,11Z,14Z)-octadeca-8,11,14-trienoato de etilo (10 g, 32.6 mmol, rendimiento del 88 %), como un aceite. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 5.46 - 5.23 (m, 6H), 4.10 (q, 2H), 2.87 - 2.67 (m, 3H), 2.26 (t, 2H), 2.07 - 1.97 (m, 4H), 1.66 - 1.55 (m, 2H), 1.41 - 1.18 (m, 11H), 0.91 - 0.84 (m, 3H).

Paso 3:

Se añadió gota a gota una solución de (8Z,11Z,14Z)-octadeca-8,11,14-trienoato de etilo (24.6 g, 80 mmol) en THF (50 ml) durante 15 minutos a una suspensión enfriada (0 °C) de LAH (3.05 g, 80 mmol) en THF seco (300

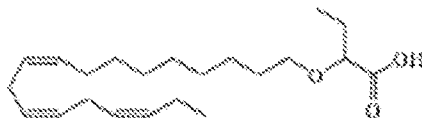
ml) bajo nitrógeno. Se agitó la mezcla durante 1 hora a 0 °C. Se vertió la mezcla cuidadosamente en NH₄Cl saturado frío (300 mL). Se acidificó la capa acuosa con HCl (2 M) a pH ~2. Se separaron las fases y la fase acuosa fue sometida a extracción con heptano (2x250 mL). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (300 mL), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró al vacío para proporcionar (8Z,11Z,14Z)-octadeca-8,11,14-trien-1-ol (20.7 g, 78 mmol, rendimiento del 98 %), como un aceite. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 5.49 - 5.23 (m, 6H), 3.61 (t, 2H), 2.86 - 2.67 (m, 4H), 2.11 - 1.92 (m, 4H), 1.59 - 1.49 (m, 2H), 1.43 - 1.21 (m, 10H), 0.94 - 0.83 (m, 3H).

Paso 4:

A una solución de (8Z,11Z,14Z)-octadeca-8,11,14-trien-1-ol (20.7 g, 78 mmol) en THF (350 ml) se añadió ácido 2-bromobutanoico (12.51 ml, 117 mmol). Se enfrió la mezcla de reacción a 8 - 10 °C. Se añadió una solución de t-butoxido de sodio (21.06 g, 219 mmol) (17 % en MTBE (130 mL)) durante 15 minutos, mientras se mantenía la temperatura entre 8 - 10 °C. Se agitó la reacción durante 30 minutos a 8 - 10 °C. Se añadió más t-butoxido de sodio (3.01 g, 31.3 mmol) (17 % en MTBE (25 mL)) durante 5 minutos. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 8 - 10 °C, seguido de la adición de ácido 2-bromobutírico (8.34 ml, 78 mmol) durante 5 minutos. Luego se agitó la mezcla a 8 - 10 °C durante 30 minutos. Se añadió más terc-butoxido de sodio (6.02 g, 62.6 mmol) (17 % en MTBE (40 mL)) durante 5 minutos. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 8 - 10 °C. Se añadió más t-butoxido de sodio (3.01 g, 31.3 mmol) (17 % en MTBE (25 mL)) durante 5 minutos. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 8 - 10 °C.

Se añadió HCOOH (3 mL) seguido de HCl 2 M (ac.) para dar pH- 2. Se separaron las fases y la fase acuosa fue sometida a extracción con MTBE (2x300 mL). La fase orgánica combinada se lavó con agua (300 mL), NaHCO₃ saturado (4x200 mL) y salmuera (300 mL), se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea (heptano/EtOAc/HCOOH 90/10/0,5) y se agruparon las fracciones apropiadas y se concentraron al vacío. Luego, se purificó el residuo adicionalmente mediante HPLC preparativa utilizando 88 % de MeCN (que contenía 0.02 % de HCOOH) en agua (que contenía 10 % de MeCN y 0.02 % de HCOOH), como eluyente. Se eliminaron los solventes para producir 10.55 g de ácido 2-(((8Z,11Z,14Z)-octadeca-8,11,14-trien-1-il)oxi)butanoico (28.8 mmol, rendimiento del 36.8 %), como un aceite. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 9.70 (s, 1H), 5.47 - 5.25 (m, 6H), 3.85 - 3.81 (m, 1H), 3.60 - 3.52 (m, 1H), 3.49 - 3.42 (m, 1H), 2.87 - 2.68 (m, 4H), 2.10 - 1.94 (m, 4H), 1.89 - 1.69 (m, 2H), 1.66 - 1.54 (m, 2H), 1.43 - 1.24 (m, 10H), 0.96 (t, 3H), 0.89 (t, 3H). MS (electroatomización): 349.2 [M-H]⁻.

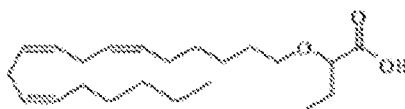
Ejemplo 68 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido 2-(((9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trien-1-il)oxi)butanoico



A una solución de (9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trien-1-ol (29.6 g, 112 mmol) en THF (400 ml) se añadió ácido 2-bromobutanoico (17.89 ml, 168 mmol). Se enfrió la mezcla de reacción a 8 - 10 °C. Se añadió una solución de t-butoxido de sodio (30.1 g, 313 mmol) (17 % en MTBE (180 mL)) durante 5 minutos, mientras se mantenía la temperatura entre 8 - 10 °C. Se agitó la reacción durante 30 minutos a 8 - 10 °C. Se añadió más t-butoxido de sodio (4.30 g, 44.8 mmol) (17 % en MTBE (30 mL)) durante 5 minutos. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 8 - 10 °C, seguido de la adición de ácido 2-bromobutírico (11.93 ml, 112 mmol) durante 5 minutos. Luego se agitó la mezcla a 8 - 10 °C durante 30 minutos. Se añadió más t-butoxido de sodio (8.61 g, 90 mmol) (17 % en MTBE (55 mL)) durante 5 minutos. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 8 - 10 °C. Se añadió más t-butoxido de sodio (4.30 g, 44.8 mmol) (17 % en MTBE (30 mL)) durante 5 minutos. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 8 - 10 °C.

Se añadió HCOOH (3 mL) seguido de HCl 2 M (ac.) para dar pH- 2. Se separaron las fases y la fase acuosa fue sometida a extracción con MTBE (2x300 mL). La fase orgánica combinada se lavó con agua (300 mL), NaHCO₃ saturado (4x200 mL) y salmuera (300 mL), se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea (heptano/EtOAc/HCOOH 90/10/0,5) sobre gel de sílice. Se agruparon las fracciones apropiadas y se concentraron al vacío para producir ácido 2-(((9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trien-1-il)oxi)butanoico (28 g, 78 mmol, rendimiento del 69.9 %), como un aceite. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 10.07 (s, 1H), 5.48 - 5.16 (m, 6H), 3.84 - 3.80 (m, 1H), 3.60 - 3.53 (m, 1H), 3.48 - 3.40 (m, 1H), 2.87 - 2.70 (m, 4H), 2.12 - 1.97 (m, 4H), 1.91 - 1.70 (m, 2H), 1.66 - 1.53 (m, 2H), 1.38 - 1.27 (m, 10H), 0.99 - 0.93 (m, 6H). MS (electroatomización): 373.3 [M+Na]⁺.

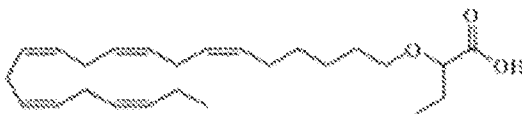
Ejemplo 69 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido 2-(((6Z,9Z,12Z)-octadeca-6,9,12-trien-1-il)oxi)butanoico



A una solución de (6Z,9Z,12Z)-octadeca-6,9,12-trien-1-ol (29.6 g, 112 mmol) en THF (400 ml) se añadió ácido 2-bromobutanoico (17.89 ml, 168 mmol). Se enfrió la mezcla de reacción a 8 - 10 °C. Se añadió una solución de t-butoxido de sodio (30.1 g, 313 mmol) (17 % en MTBE (180 mL)) durante 25 minutos, mientras se mantenía la temperatura entre 8 - 10 °C. Se agitó la reacción durante 30 minutos a 8 - 10 °C. Se añadió más t-butoxido de sodio (4.30 g, 44.8 mmol) (17 % en MTBE (30 mL)) durante 5 minutos. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 8 - 10 °C, seguido de la adición de ácido 2-bromobutírico (11.93 ml, 112 mmol) durante 5 minutos. Luego se agitó la mezcla a 8 - 10 °C durante 30 minutos. Se añadió más t-butoxido de sodio (8.61 g, 90 mmol) (17 % en MTBE (55 mL)) durante 5 minutos. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 8 - 10 °C. Se añadió más t-butoxido de sodio (4.30 g, 44.8 mmol) (17 % en MTBE (30 mL)) durante 5 minutos. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 8 - 10 °C.

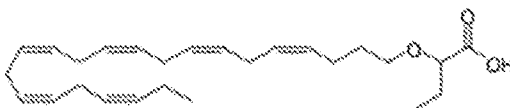
Se añadió HCOOH (3 mL) seguido de HCl 2 M (ac.) para dar pH- 2. Se separaron las fases y la fase acuosa fue sometida a extracción con MTBE (2x300 mL). La fase orgánica combinada se lavó con agua (300 mL), NaHCO₃ saturado (4x200 ml) y salmuera (300 ml), se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea (heptano/EtOAc/HCOOH 90/10/0,5) sobre gel de sílice. Se agruparon las fracciones apropiadas y se concentraron al vacío para producir ácido 2-((6Z,9Z,12Z)-octadeca-6,9,12-trien-1-ilo)butanoico (30.2 g, 83 mmol, rendimiento del 74,1 %), como un aceite. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 9.56 (s, 1H), 5.46 - 5.22 (m, 6H), 3.84 - 3.80 (m, 1H), 3.61 - 3.54 (m, 1H), 3.47 - 3.40 (m, 1H), 2.86 - 2.71 (m, 4H), 2.10 - 1.99 (m, 4H), 1.91 - 1.70 (m, 2H), 1.65 - 1.56 (m, 2H), 1.45 - 1.18 (m, 10H), 0.97 (t, 3H), 0.87 (t, 3H). MS (electroatomización): 373.2 [M+Na]⁺.

Ejemplo 70 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido 2-(((6Z,9Z,12Z,15Z,18Z)-henciosa-6,9,12,15,18-pentaen-1-il)oxi)butanoico



A una solución de (6Z,9Z,12Z,15Z,18Z)-henciosa-6,9,12,15,18-pentaen-1-ol (23 g, 76 mmol) en THF (350 ml) se añadió ácido 2-bromobutanoico (12.15 ml, 114 mmol). Se enfrió la mezcla de reacción a 8 - 10 °C. Se añadió una solución de t-butoxido de sodio (20.46 g, 213 mmol) (17 % en MTBE (140 mL)) durante 25 minutos, mientras se mantenía la temperatura entre 8 - 10 °C. Se agitó la reacción durante 30 minutos a 8 - 10 °C. Se añadió más t-butoxido de sodio (2.92 g, 30.4 mmol) (17 % en MTBE (25 mL)) durante 5 minutos. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 8 - 10 °C, seguido de la adición de ácido 2-bromobutírico (8.10 ml, 76 mmol) durante 5 minutos. Luego se agitó la mezcla a 8 - 10 °C durante 30 minutos. Se añadió más t-butoxido de sodio (5.85 g, 60.8 mmol) (17 % en MTBE (45 mL)) durante 5 minutos. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 8 - 10 °C. Se añadió más t-butoxido de sodio (2.92 g, 30.4 mmol) (17 % en MTBE (25 mL)) durante 5 minutos. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 8 - 10 °C. Se añadió HCOOH (3 mL) seguido de HCl 2 M (ac.) para obtener un pH de ~ 2. Se separaron las fases y la fase acuosa fue sometida a extracción con MTBE (2x300 mL). La fase orgánica combinada se lavó con agua (300 mL), NaHCO₃ saturado (4x200 ml) y salmuera (300 ml), se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea (heptano/EtOAc/HCOOH 90/10/0,5) sobre gel de sílice. Se agruparon las fracciones apropiadas y se concentraron al vacío para producir ácido 2-(((6Z,9Z,12Z,15Z,18Z)-henciosa-6,9,12,15,18-pentaen-1-il)oxi)butanoico (18.9 g, 47.3 mmol, rendimiento del 62.2 %), como un aceite. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 9.85 (s, 1H), 5.48 - 5.21 (m, 10H), 3.84 - 3.81 (m, 1H), 3.61 - 3.53 (m, 1H), 3.48 - 3.41 (m, 1H), 2.93 - 2.71 (m, 8H), 2.18 - 1.96 (m, 4H), 1.91 - 1.70 (m, 2H), 1.66 - 1.57 (m, 2H), 1.45 - 1.30 (m, 4H), 0.99 - 0.93 (m, 6H). MS (electroatomización): 411.4 [M+Na]⁺.

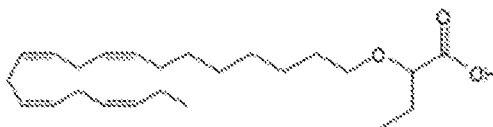
Ejemplo 71 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido 2-(((4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaen-1-il)oxi)butanoico



A una solución de (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaen-1-ol (30 g, 95 mmol) en tolueno (11 ml) y THF (400 ml) se añadió ácido 2-bromobutírico (17.28 ml, 162 mmol) seguido de la adición de una solución de t-butoxido de sodio (25,7 g, 267 mmol) en THF (160 ml) durante 35 minutos, mientras se mantenía la temperatura entre 8 - 10 °C. Se agitó la reacción durante 40 minutos a 8 - 10 °C. Se añadió t-butoxido de sodio (4.17 g, 43.4 mmol) en THF (60 ml) durante 10 minutos. Se agitó la mezcla resultante a 8 - 10 °C durante

40 minutos, antes de agregar más ácido 2-bromobutírico (10,17 ml, 95 mmol) en una sola porción. Se agitó la mezcla a 8 - 10 °C durante 1 hora, antes de añadir más t-butoxido de sodio (7.33 g, 76 mmol) en THF (100 ml) durante 10 minutos, manteniendo la temperatura por debajo de 12 °C. Se agitó la reacción a 10 °C durante 60 minutos. Se añadió t-butoxido de sodio (4.17 g, 43.4 mmol) en una sola porción y luego se agitó durante 1 hora adicional. Se añadieron más ácido 2-bromobutírico (8.5 ml, 50 mmol) y t-butoxido de sodio (4.8 g, 50 mmol) y se agitó la mezcla durante 1 hora a 8 - 10 °C. Se añadieron más ácido 2-bromobutírico (8.5 ml, 50 mmol) y t-butoxido de sodio (4.8 g, 50 mmol) y se agitó la mezcla durante 1 hora a 8 - 10 °C. Se añadió más THF (200 ml) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se añadieron más ácido 2-bromobutírico (17 ml, 100 mmol) y t-butoxido de sodio (9.6 g, 100 mmol) y se agitó la mezcla de reacción durante 1 hora a 8 - 10 °C. A continuación, se añadió a la reacción (1 ml) de ácido fórmico y se agitó la mezcla resultante a 8 - 10 °C durante 10 minutos, antes de añadir HCl 6 M para dar pH- 2. Se añadió agua (100 mL) y se separaron la fase acuosa y la fase orgánica. La fase acuosa fue sometida a extracción dos veces con éter dietílico (2x 500 mL). La fase orgánica combinada se lavó con agua (3x 1000 ml), NaHCO₃ sat. (3x 500 ml) y salmuera (1x100 ml), se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío. Se purificó el residuo por cromatografía instantánea (EtOAc/Heptano/5 % HCOOH) (90/10) sobre gel de sílice para proporcionar ácido 2-(((4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaen-1-il)oxi)butanoico (10.3 g, 25.07 mmol, rendimiento del 26.3 %), como un aceite. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 5.49 - 5.20 (m, 12H), 3.90 - 3.75 (m, 1H), 3.65 - 3.52 (m, 1H), 3.51 - 3.35 (m, 1H), 2.91 - 2.69 (m, 10H), 2.21 - 1.98 (m, 4H), 1.91 - 1.59 (m, 4H), 1.05 - 0.88 (m, 6H). MS (electroatomización): 423.3 [M+Na]⁺.

Ejemplo 72 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido 2-(((8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-8,11,14,17-tetraen-1-il)oxi)butanoico



Paso 1:

A una suspensión calentada de magnesio (0.217 g, 8.93 mmol) en THF (3 ml) se añadió 1,2-dibromoetano (2 gotas), seguido de la adición gota a gota de una solución de 2-(((5-bromopentil)oxi)tetrahydro-2H-pirano (2.07 g, 8.24 mmol) en THF (15 ml) bajo atmósfera de nitrógeno. Se calentó la mezcla a reflujo durante 1 hora y se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió gota a gota una solución de (3Z,6Z,9Z,12Z)-pentadeca-3,6,9,12-tetraenal (1.5 g, 6.87 mmol) en THF (10 ml) y se agitó la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió HCl 1M y la mezcla fue sometida a extracción con EtOAc (2x50 mL). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (50 mL), se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. La cromatografía instantánea sobre gel de sílice (heptano/EtOAc 80/20-75/25) proporcionó (8Z,11Z,14Z,17Z)-1-(((tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)icosa-8,11,14,17-tetraen-6-ol (0.74 g, 1.895 mmol, rendimiento del 27.6 %), como un aceite. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.59 - 5.49 (m, 1H), 5.49 - 5.25 (m, 7H), 4.56 - 4.53 (m, 1H), 3.88 - 3.82 (m, 1H), 3.77 - 3.67 (m, 1H), 3.65 - 3.59 (m, 1H), 3.52 - 3.43 (m, 1H), 3.40 - 3.34 (m, 1H), 2.85 - 2.77 (m, 6H), 2.23 (t, 2H), 2.13 - 1.97 (m, 2H), 1.84 - 1.77 (m, 1H), 1.73 - 1.67 (m, 1H), 1.63 - 1.34 (m, 12H), 0.96 (t, 3H). MS (electroatomización): 413.3 [M+Na]⁺.

Paso 2:

A una solución de (8Z,11Z,14Z,17Z)-1-(((tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)icosa-8,11,14,17-tetraen-6-ol (0.74 g, 1.895 mmol) en THF (20 ml) se añadió TEA (0.528 ml, 3.79 mmol) seguido de cloruro de metanosulfonilo (0.192 ml, 2.463 mmol). Se agitó la mezcla bajo atmósfera de nitrógeno durante 3 horas a temperatura ambiente. Se añadió ácido cítrico (5 %, ac., 50 mL) y la mezcla fue sometida a extracción con EtOAc (2x50 mL). La fase orgánica combinada se lavó con NaHCO₃ saturado (50 mL) y salmuera (50 mL), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró al vacío para obtener 0.82 g del mesilato intermedio. El mesilato intermedio se disolvió en Et₂O (10 ml) y se añadió gota a gota a una suspensión agitada de LAH (0.288 g, 7.58 mmol) en Et₂O (25 ml). Se agitó la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió con cuidado HCl 1 M (50 mL). La mezcla fue sometida a extracción con MTBE (2x50 mL). La fase orgánica combinada se lavó con NaHCO₃ saturado (50 mL) y salmuera (50 mL), se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. La cromatografía instantánea sobre gel de sílice (heptano/EtOAc 97/3) proporcionó 2-(((8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-8,11,14,17-tetraen-1-il)oxi)tetrahydro-2 H-pirano (0.46 g, 1.228 mmol, rendimiento del 64.8 %), como un aceite. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.46 - 5.20 (m, 8H), 4.57 - 4.54 (m, 1H), 3.88 - 3.82 (m, 1H), 3.74 - 3.68 (m, 1H), 3.51 - 3.44 (m, 1H), 3.39 - 3.33 (m, 1H), 2.84 - 2.77 (m, 6H), 2.14 - 1.96 (m, 4H), 1.85 - 1.77 (m, 1H), 1.73 - 1.65 (m, 1H), 1.62 - 1.46 (m, 6H), 1.37 - 1.24 (m, 8H), 0.96 (t, 3H). MS (electroatomización): 397.3 [M+Na]⁺.

Paso 3:

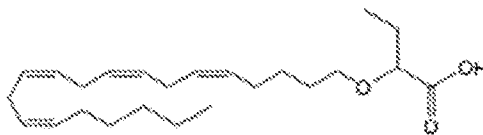
A una solución de 2-(((8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-8,11,14,17-tetraen-1-il)oxi)tetrahydro-2H-pirano (0.46 g, 1.228 mmol) en EtOH (5 ml) se añadió p-toluenosulfonato de piridinio (PPTS, 0.309 g, 1.228 mmol) y se calentó la mezcla a 50 °C durante 2 horas. Se enfrió la mezcla a temperatura ambiente. Se añadió NaHCO₃ saturado (50

mL) y la mezcla fue sometida a extracción con EtOAc (2x50 mL). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (50 mL), se secó (Na_2SO_4), filtró y concentró al vacío. La cromatografía instantánea sobre gel de sílice (heptano/EtOAc 80/20) proporcionó (8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-8,11,14,17-tetraen-1-ol (0.26 g, 0.895 mmol, rendimiento del 72.9 %), como un aceite. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5.41 – 5.17 (m, 8H), 3.57 (t, 2H), 2.84 – 2.68 (m, 6H), 2.06 – 1.94 (m, 4H), 1.54 – 1.46 (m, 2H), 1.34 – 1.21 (m, 8H), 1.20 – 1.13 (m, 1H), 0.91 (t, 3H).

Paso 4:

A una solución de (8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-8,11,14,17-tetraen-1-ol (93 mg, 0.32 mmol) en tolueno (3 mL) se añadió 2-bromobutanoato de terc-butilo (143 mg, 0.64 mmol), hidróxido de tetrabutilamonio (TBAOH) (5 mg, 0.02 mmol) y NaOH (50 p/p %, 1 mL) y se calentó la mezcla a 45 °C. Se añadieron 71.4 mg (0.32 mmol) de 2-bromobutanoato de terc-butilo a la mezcla de reacción después de 1.5 horas de agitación, se añadió 71.4 mg (0.32 mmol) de 2-bromobutanoato de terc-butilo a la mezcla de reacción después de 3 horas y a la mezcla de reacción se añadieron 143 mg (0.64 mmol) de 2-bromobutanoato de terc-butilo después de 8 horas a 45 °C. Se enfrió la mezcla a temperatura ambiente después de 24 horas y se añadió agua (40 mL). La mezcla resultante fue sometida a extracción dos veces con Et₂O (25 + 40 mL) y el extracto orgánico combinado se lavó con agua (4x25 mL) y salmuera (25 mL), se secó (MgSO_4), se filtró y se evaporó al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice (heptano → heptano:acetona-5:1). Se agruparon las fracciones apropiadas y se concentraron para dar 15 mg de 2-(((8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-8,11,14,17-tetraen-1-il)oxi)butanoato de terc-butilo. Este intermedio se disolvió en ácido fórmico (5 mL) y se agitó la mezcla resultante a TA durante 1 hora y 45 min. Se eliminó el solvente al vacío y al residuo se le añadió EtOAc (30 mL). Se lavó la solución con agua (4x25 mL) y salmuera (25 mL), se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante HPLC preparativa utilizando MeCN al 85 % en agua, como eluyente. Se agruparon las fracciones apropiadas y se concentraron para dar 15 mg (0.04 mmol, rendimiento del 12 %) de ácido 2-(((8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-8,11,14,17-tetraen-1-il)oxi)butanoico. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 1.00 (td, 6H), 1.49 – 1.20 (m, 8H), 1.64 (t, 2H), 1.96 – 1.73 (m, 2H), 2.08 (dt, 4H), 2.84 (q, 6H), 3.55 – 3.43 (m, 1H), 3.65 – 3.54 (m, 1H), 3.87 (dd, 1H), 5.49 – 5.24 (m, 8H). HRMS (electroatomización), $[\text{M}-\text{H}]^-$: Calculado: 375.2899, encontrado: 375.2892.

Ejemplo 73 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14-tetraen-1-il)oxi)butanoico

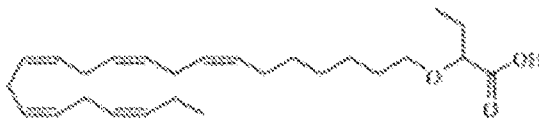


Paso 1:

Se añadió gota a gota una solución de (5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14-tetraenoato de etilo (501.9 mg, 1.509 mmol) en THF seco (1 mL) a una suspensión enfriada (0 °C) de LiAlH_4 (64.8 mg, 1.707 mmol) en THF seco (3 mL) bajo atmósfera de N_2 . Se agitó la mezcla durante 55 minutos a 0 °C. Se añadió agua (5 mL) gota a gota y luego se añadió HCl 1 M (10 mL). Se retiró el baño de enfriamiento y se agitó la mezcla de reacción durante 5 minutos. La mezcla de reacción fue sometida a extracción con metil tert-butil metil éter (2x50 mL), se lavó la fase orgánica con HCl 1 M (20 mL), se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó bajo presión reducida para proporcionar (5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14-tetraen-1-ol (397.7 mg, 1.369 mmol, rendimiento del 91 %) como un líquido. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5.41 – 5.29 (m, 8H), 3.63 (t, 2H), 2.83 – 2.77 (m, 6H), 2.20 – 1.91 (m, 4H), 1.61 – 1.54 (m, 2H), 1.46 – 1.41 (m, 2H), 1.35 – 1.28 (m, 8H), 0.87 (t, 3H).

Paso 2:

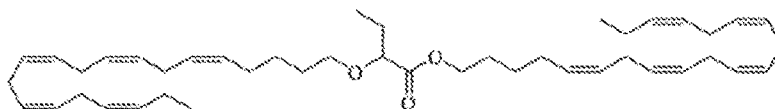
A una solución de (5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14-tetraen-1-ol (349 mg, 1.20 mmol) en tolueno (5 mL) se le añadió 2-bromobutanoato de terc-butilo (535 mg, 2.40 mmol), hidróxido de tetrabutilamonio (TBAOH) (156 mg, 0.24 mmol, 40 % p/p) y NaOH (50 p/p %, 2 mL) y se calentó la mezcla a 45 °C. Se enfrió la mezcla a temperatura ambiente después de 12 horas y se le añadió agua helada (25 mL) y Et₂O (20 mL). Se separaron las fases y la fase acuosa fue sometida a extracción con Et₂O (20 mL). El extracto orgánico combinado se lavó con agua (25 mL) y salmuera (25 mL), se secó (MgSO_4), se filtró y se evaporó al vacío. Se disolvió el residuo en EtOH (20 mL) y se evaporó al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice (heptano:acetona-1:20 → heptano:acetona-1:10). Se agruparon las fracciones apropiadas y se concentraron para dar 360 mg (0.83 mmol, rendimiento del 69 %) del intermedio 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14-tetraen-1-il)oxi)butanoato de terc-butilo. Se disolvieron 342 mg (0.79 mmol) de este intermedio en ácido fórmico (7 mL) y se agitó la mezcla resultante a TA durante 3 horas. Se eliminó el solvente al vacío y el residuo se añadió a EtOAc (75 mL). Se lavó la solución con agua (3x50 mL), se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice (acetona:heptano:HOAc-10:10:1 → acetona:heptano:HOAc-30:70:1). Se agruparon las fracciones apropiadas y se concentraron para obtener 181 mg (0.48 mmol, rendimiento del 58 %) de ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14-tetraen-1-il)oxi)butanoico.

Ejemplo 74 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido 2-(((7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-7,10,13,16,19-pentaen-1-il)oxi)butanoico**Paso 1:**

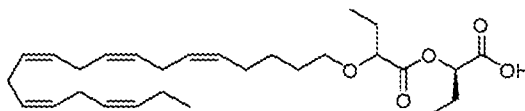
- 5 Se añadió gota a gota una solución de (7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-7,10,13,16,19-pentaenoato de etilo (1.5 g, 4.18 mmol) en THF (4 ml) a una suspensión enfriada (0 °C) de LAH (0.159 g, 4.18 mmol) en THF seco (20 ml) bajo nitrógeno. Se agitó la mezcla durante 1 hora a 0 °C. Se vertió la mezcla cuidadosamente en HCl 1M (100 mL). Se separaron las fases y la fase acuosa fue sometida a extracción con heptano (100 mL). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (30 mL), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró al vacío para proporcionar (7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-do-cosa-7,10,13,16,19-pentaen-1-ol (1.16 g, 3.66 mmol, rendimiento del 88 %), como un aceite. 1H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.44 - 5.23 (m, 10H), 3.62 (t, 2H), 2.87 - 2.73 (m, 8H), 2.10 - 1.99 (m, 4H), 1.60 - 1.51 (m, 2H), 1.40 - 1.29 (m, 6H), 0.95 (t, 3H).

Paso 2:

- 15 A una solución de (7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-7,10,13,16,19-pentaen-1-ol (1.16 g, 3.66 mmol) en THF (50 ml) se añadió ácido 2-bromobutanoico (0.918 g, 5.50 mmol). Se enfrió la mezcla de reacción a 8 - 10 °C. Se añadió una solución de terc-butóxido de sodio (0.986 g, 10.26 mmol) en MTBE (15 mL) durante 5 minutos. Se agitó la reacción durante 30 minutos a 8 - 10 °C. Se añadió más terc-butóxido de sodio (0.141 g, 1.466 mmol) en MTBE (4 mL). Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 8 - 10 °C seguido de la adición de ácido 2-bromobutanoico (0.612 g, 3.66 mmol) durante 5 minutos. Luego se agitó la mezcla a 8 - 10 °C durante 30 minutos. Se añadió terc-butóxido de sodio adicional (0.282 g, 2.93 mmol) en MTBE (8 mL). Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 8 - 10 °C. Se añadió más terc-butóxido de sodio (0.141 g, 1.466 mmol) en MTBE (4 mL). Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 8 - 10 °C. Se añadió HCOOH (0.5 mL) seguido de HCl (ac.) 1 M para obtener un pH ~ 2. Se separaron las fases y la fase acuosa fue sometida a extracción con MTBE (2x50 mL). La fase orgánica combinada se lavó con agua (50 mL), NaHCO₃ saturado (4x30 mL) y salmuera (30 mL), se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. La HPLC preparativa usando 90 % de MeCN (que contenía 0.02 % de HCOOH) en agua (que contenía 10 % de MeCN y 0.02 % de HCOOH), como eluyente, proporcionó ácido 2-(((7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-7,10,13,16,19-pentaen-1-il)oxi)butanoico (1 g, 2.439 mmol, rendimiento del 66.6 %), como un aceite. 1H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.44 - 5.24 (m, 10H), 3.84 - 3.81 (m, 1H), 3.59 - 3.64 (m, 1H), 3.47 - 3.41 (m, 1H), 2.90 - 2.73 (m, 8H), 2.11 - 1.98 (m, 4H), 1.90 - 1.71 (m, 2H), 1.64 - 1.57 (m, 2H), 1.41 - 1.26 (m, 6H), 0.98 - 0.93 (m, 6H). HRMS (electroatomización), [M]⁺: Calculado: 402.3134, encontrado: 402.3141.

Ejemplo 75 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato de (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-ilo

- 35 Se añadió ácido 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-ilo)butanoico (14.28 g, 38.1 mmol) y (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-ol (10.00 g, 34.7 mmol) a una mezcla de ácido D(+)-10-alcanforsulfónico (0.530 g, 2.282 mmol) en ciclohexano (50 mL) y se calentó a reflujo, eliminando el agua mediante un aparato Dean-Stark. Se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se purificó por cromatografía instantánea seca usando gel de sílice (100 g) y eluyendo con ciclohexano (50 mL), seguido de heptano (50 mL), 2 % de EtOAc en heptano (2x200 mL) y 4 % de EtOAc en heptano (2x200 mL). Se agruparon las fracciones apropiadas y se concentraron al vacío para proporcionar 2-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-ilo)butanoato de (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-ilo (20.3 g, 30.5 mmol, rendimiento del 88 %), como un aceite. 1H RMN (300 MHz, Cloroformo-d) δ 0.99 (t, 9H), 1.45 (ddd, 4H), 1.56 - 1.93 (m, 6H), 2.09 (p, 8H), 2.85 (dt, 16H), 3.34 (dt, 1H), 3.60 (dt, 1H), 3.76 (dd, 1H), 4.16 (td, 2H), 5.05 - 5.76 (m, 20H). MS (electroatomización): 645.5 [M+H]⁺.

Ejemplo 76 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido (2R)-2-((2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoil)oxi)butanoico

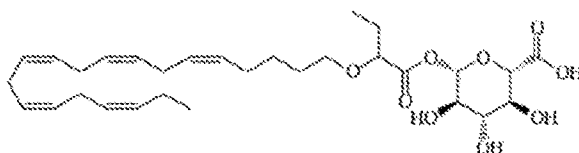
Paso 1:

A una solución de ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-iloxi)butanoico (400 mg, 1.07 mmol) en CDM (10 mL) se añadió N-metilmorfolina (235 µL, 2.15 mmol) y TBTU (tetrafluoroborato de 2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio) (344 mg, 1.07 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante 30 minutos antes de añadir (R)-2-hidroxibutanoato de terc-butilo (250 mg, 2.14 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 22 horas y luego se lavó con agua (10 mL), HCl 1M (10 mL), NaHCO₃ saturado (10 mL) y salmuera (10 mL). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. Se aislaron 161 mg (0.312 mmol, rendimiento del 29.2 %) del intermedio (R)-1-(terc-butoxi)-1-oxobutan-2-il 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato, como un aceite. MS (electroatomización): 539.4 [M+Na]⁺.

Paso 2:

Se disolvió 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato de (R)-1-(terc-butoxi)-1-oxobutan-2-ilo (161 mg, 0.312 mmol) en ácido fórmico (4 mL) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 17 horas. A la mezcla se añadió EtOAc (10 mL) y la mezcla resultante se lavó con agua (10 mL) y salmuera (10 mL). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. Se aislaron 60 mg (0.130 mmol, rendimiento del 41.8 %) de ácido (2R)-2-((2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoil)oxi)butanoico, como un aceite. MS (electroatomización): 459.3 [M-H]⁻.

Ejemplo 77 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-((2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoil)oxi)tetrahydro-2H-piran-2-carboxílico

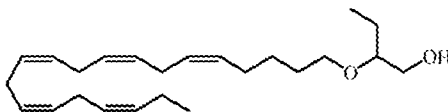


Paso 1:

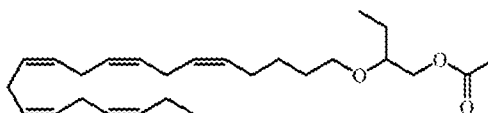
A una mezcla de (2S,3S,4S,5R,6R)-3,4,5,6-tetrahidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxilato de 4-metoxibencilo (2.47 g, 7.86 mmol), ácido 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (2.94 g, 7.85 mmol) y HATU (1-[Bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4.5-b]piridinio 3-óxido hexafluorofosfato) (3.00 g, 7.90 mmol) en acetonitrilo (85 mL) se añadió 4-metilmorfolina (1.75 mL, 15.92 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante 23.5 hrs bajo atmósfera de N₂ a temperatura ambiente. Se añadió Amberlyst-15 (4.7 mEq / g) (3.35 g) y se agitó la mezcla durante aproximadamente 5 minutos. La mezcla de reacción se filtró y se concentró bajo presión reducida y se purificó el residuo por cromatografía instantánea sobre gel de sílice eluyendo con CH₂Cl₂:CH₂Cl₂:EtOH (95:5). Se agruparon las fracciones apropiadas y se concentraron al vacío para dar 2.64 g de una mezcla impura. Se purificó el residuo por cromatografía instantánea sobre gel de sílice eluyendo con CH₂Cl₂:CH₂Cl₂:EtOH (95:5) y luego CH₂Cl₂:CH₂Cl₂:EtOH (97:3). Se agruparon las fracciones apropiadas y se concentraron al vacío para dar el intermedio (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-((2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoil)oxi)tetrahydro-2H-piran-2-carboxilato de (4-metoxiciclohexil)metilo (1.27 g, 1.78 mmol, rendimiento del 22.4 %), como un aceite. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.26-7.22 (m, 2H), 6.83-6.81 (m, 2H), 5.60-5.57 (m, 1H), 5.40-5.26 (m, 10H), 5.12-5.10 (m, 2H), 4.60-4.56 (m, 1H), 4.14-4.13 (m, 1H), 3.98 (t, 1H), 3.93-3.67 (m, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.61-3.56 (m, 3H), 3.31-3.25 (m, 1H), 2.82-2.77 (m, 8H), 2.07-2.02 (m, 4H), 1.80-1.67 (m, 2H), 1.57-1.54 (s, 2H), 1.43-1.36 (m, 2H), 1.05-0.77 (m, 6H). MS (electroatomización): 693.4 [M+Na]⁺.

Paso 2:

Se trató (4-Metoxiciclohexil)metil(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-((2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoil)oxi)tetrahydro-2H-piran-2-carboxilato (1.20 g, 1.79 mmol) con una solución de TFA al 10 % en DCM (8 mL) a 0 °C bajo atmósfera de nitrógeno. Después de agitar durante 3 h a temperatura ambiente, se eliminó el solvente al vacío. La cromatografía instantánea (DCM/MeOH/HCOOH - 95/5/0.2) proporcionó 500 mg de un producto impuro. El producto se purificó adicionalmente mediante HPLC preparativa utilizando 85 % de MeCN (que contenía 0.02 % de HCOOH) en agua (que contenía 10 % de MeCN y 0.02 % de HCOOH), como eluyente. Se agruparon las fracciones apropiadas y se concentraron para dar ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-((2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoil)oxi)tetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (80 mg, 0.139 mmol, rendimiento del 7.8 %) como un sólido. ¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 5.60-5.56 (m, 1H), 5.51-5.27 (m, 10H), 3.99-3.88 (m, 2H), 3.71-3.63 (m, 1H), 3.62-3.54 (m, 1H), 3.53-3.38 (m, 3H), 2.93-2.83 (m, 8H), 2.19-2.07 (m, 4H), 1.93-1.83 (m, 1H), 1.81-1.72 (m, 1H), 1.69-1.60 (m, 2H), 1.53-1.45 (m, 2H), 1.04-0.98 (m, 6H). MS (electroatomización): 549.3 [M-H]⁻.

Ejemplo 78 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butan-1-ol

Se añadió gota a gota una solución de 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoato de butilo (1.008 g, 2.34 mmol) en THF seco (3 ml) a una suspensión de LiAlH₄ (94.9 mg, 2.50 mmol) en THF seco (10 ml) a 0 °C bajo atmósfera de N₂. Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C durante 1.5 hrs antes de retirar el baño de enfriamiento y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 20 hrs. Se enfrió la mezcla de reacción en un baño de agua helada antes de agregar gota a gota agua (2.5 ml) y HCl 1 M (10 ml). Se retiró el baño de enfriamiento y se agitó la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla resultante fue sometida a extracción con heptano (2x50 ml), se lavó con HCl 1 M (10 ml), se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró bajo presión reducida. La cromatografía instantánea sobre gel de sílice eluyendo con heptano-EtOAc (90:10) proporcionó 0.705 g (rendimiento del 83 %) del compuesto del título, como un aceite. 1H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.71 - 4.93 (m, 10H), 3.63 (dd, 1H), 3.58 - 3.34 (m, 3H), 3.29-3.23 (m, 1H), 2.95 - 2.65 (m, 8H), 2.18 - 1.98 (m, 4H), 1.88 (bs, 1H), 1.66 - 1.51 (m, 3H), 1.45 (dt, 3H), 0.95 (t, 3H), 0.89 (t, 3H). MS (ESI, pos) 383 [M+Na]⁺.

Ejemplo 79 de referencia (no de acuerdo con la invención): Preparación de acetato de 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butilo

Se añadió una mezcla de 2-(((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butan-1-ol (300.9 mg, 0.834 mmol), trietil amina (140 ml, 1.00 mmol) y DMAP (4.7 mg, 0.038 mmol) en CH₂Cl₂ seco (5 ml) a anhídrido acético (95 ml, 1.00 mmol). Se agitó la mezcla de reacción bajo atmósfera de N₂ a temperatura ambiente durante 80 minutos. Se añadió agua (10 ml) y la mezcla fue sometida a extracción con heptano (2x50 ml), se lavó con salmuera (20 ml), se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró bajo presión reducida. La cromatografía instantánea sobre gel de sílice eluyendo con heptano-EtOAc (100:1) proporcionó 0.319 g (95 %) del compuesto del título, como un aceite. 1H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.59 - 5.14 (m, 10H), 4.10 (dd, 1H), 4.02 (dd, 1H), 3.54 (dt, 1H), 3.43 (dt, 1H), 3.38 - 3.29 (m, 1H), 2.92 - 2.65 (m, 8H), 2.14 - 1.95 (m, 4H), 2.05 (s, 3H), 1.63 - 1.47 (m, 4H), 1.45-1.38 (m, 2H), 0.96 (t, 3H), 0.92 (t, 3H). MS (ESI, pos) 425 [M+Na]⁺.

Ejemplos biológicos

Evaluación del Compuesto A en un modelo de ratón con NASH inducida por dieta (CDAA/dieta alta en grasa)

Los modelos de ratón que son deficientes en metionina y/o colina (MCD y CDAA respectivamente) están bien establecidos para estudiar el desarrollo y el tratamiento de la NASH en el desarrollo de fármacos preclínicos. Como precursores de la síntesis de fosfatidilcolina, una deficiencia dietética de metionina/colina conduce a una incapacidad para sintetizar lipoproteínas hepáticas para la exportación de triglicéridos, lo que resulta en esteatosis hepática, inflamación y fibrosis graves.

Aunque la dieta deficiente en metionina-colina (MCD), ampliamente utilizada, reproduce de manera consistente una inflamación hepática y fibrosis graves similares a las de la NASH en ratones, también se asocia con una pérdida de peso grave (pérdida de masa muscular esquelética y grasa). Esto se asocia a un mayor riesgo de muerte, lo que presenta importantes problemas para los experimentos de fibrogénesis a largo plazo. Al agregar una dosis subóptima de metionina (0.17 %), el modelo dietético CDAA supera estos problemas y se ha demostrado que imita la NASH humana tanto en ratones como en ratas, al producir secuencialmente esteatohepatitis, fibrosis hepática y cáncer de hígado con una pérdida menos grave de peso corporal.

En los Ejemplos Biológicos 1 - 7, se realizaron estudios en ratones macho C56BL/6J (de 9 semanas de edad). Los ratones fueron alimentados con dietas alta en grasa, ya sea con suficiente colina (CS) o con deficiente en colina (31 % de calorías totales; "CDAA/alta en grasa"). La dieta inductora de NASH se inició 6 semanas antes del comienzo del tratamiento, con el fin de diseñar el estudio como un arreglo de tratamiento/reversión en lugar de profilaxis.

En los Ejemplos 1 - 5 Biológicos, los ratones se dividieron en 6 grupos experimentales (n=9 por grupo) y se alimentaron con dietas CS o CDAA/alta en grasa. Después de 6 semanas de dieta CS o CDAA, a los ratones se les administró por vía oral el Compuesto A o el Compuesto N de comparación, ambos en 2 dosis, 0.15 mmol/kg de peso corporal/día (dosis baja, LD) y 0.3 mmol/kg de peso corporal por día (dosis alta, HD). Las sustancias de prueba se administraron por vía oral como mezcla con la dieta alta en grasa. La fibrosis hepática

se evaluó mediante la medición del contenido de hidroxiprolina (HYP) y la morfometría del Rojo Sirio (SR). Los niveles de transcripciones relacionadas con la fibrosis, la inflamación y el metabolismo se midieron mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR).

5 En los Ejemplos 6 y 7 Biológicos, los ratones fueron alimentados con dietas CS o CDAA/alta en grasa como se describió anteriormente. En el Ejemplo 6, después de 6 semanas de dieta CS o CDAA/alta en grasa, a los ratones se les administraron 56 mg/kg de peso corporal por día de Compuesto A administrado por vía oral, o el agonista de GLP-1R de acción prolongada Bydureon® (exenatida), que está aprobado para el tratamiento de la diabetes tipo 2, inyectados por vía subcutánea a 0.4 mg/kg por semana durante seis semanas. El efecto sobre el número, el espesor y la longitud de las fibras de colágeno hepáticas se determinó mediante un sistema de imágenes ópticas multifotón no lineal en muestras de hígado aisladas de los grupos alimentados con el control del vehículo (n=8), Compuesto A (n=9) y GLP-1R (n=8).

10 En el Ejemplo 7 Biológico, después de 6 semanas de dieta CS o CDAA/alta en grasa, a los ratones se les administraron 112 mg/kg de peso corporal por día del Compuesto A, o una dosis equimolar de ácido eicosapentaenoico (EPA), administrada por vía oral. Se realizó un análisis lipídico hepático en muestras de hígado aisladas de los grupos CS (n=9), Compuesto A (n=9) y EPA (n=8).

15 En los Ejemplos 21 - 24 Biológicos, se estudiaron los efectos del Compuesto A solo y en combinación con el agonista de GLP-1 exenatida. Los estudios se realizaron en ratones macho C56BL/6J (de 9 semanas de edad). Los ratones se dividieron en 6 grupos experimentales (n=9 por grupo) que contenían dietas CS o CDAA/alta en grasa, como se describió anteriormente. La dieta CDAA/alta en grasa inductora de NASH se inició 6 semanas antes del comienzo del tratamiento, con el fin de evaluar el tratamiento/reversión, más que la profilaxis. Así, después de 6 semanas de dieta CS o CDAA/alta en grasa, los ratones fueron tratados con (A) Compuesto A oral a 0.3 mmol/kg de peso corporal/día solo, (B) un agonista de GLP-1 solo, administrado i.p. a 0.4 mg/kg una vez por semana, o (C) una combinación de Compuesto A a 0.3 mmol/kg de peso corporal/día y un agonista de GLP-1, administrados i.p. a 0.4 mg/kg una vez por semana (reducido a 0.1 mg/kg durante las últimas 3 semanas debido a una pérdida de peso excesiva). El Compuesto A se administró por vía oral como mezcla con la dieta alta en grasa, mientras el agonista de GLP-1 se administró mediante inyección intraperitoneal (i.p.). Se midieron los niveles de transcripciones relacionadas con la fibrosis, la inflamación y el metabolismo mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) en tejido hepático aislado.

20 Evaluación del Compuesto A en un modelo de NASH inducido por inyección de estreptozotocina/dieta alta en grasa (modelo STAM)

25 En el Ejemplo 8 Biológico, se obtuvieron ratones C57BL/6 con 15 días de preñez libres de patógenos, de Charles River Laboratories en Japón Inc. (Kanagawa, Japón). La NASH se estableció en ratones macho mediante una única inyección subcutánea de estreptozotocina (STZ) (Sigma, EE. UU.) después del nacimiento y alimentación con una dieta alta en grasa (HFD; CLEA, Japón, Japón) ad libitum, después de las 4 semanas de edad (día 28 ± 2). Los ratones fueron aleatorizados en 3 grupos de 8 ratones a las 6 semanas de edad el día antes del inicio del tratamiento: vehículo (solución salina), Compuesto A y telmisartán (control positivo). Se administró un tratamiento con el Compuesto A en una dosis de 37 mg/kg de peso corporal por día mediante sonda oral junto con una dieta alta en grasa durante 6 semanas antes del sacrificio. La calificación de actividad (NAS) de NAFLD se calculó de acuerdo con criterios estandarizados y el área de fibrosis se evaluó mediante tinción con Rojo Sirio.

Evaluación de los efectos del Compuesto A en un modelo de ratón con NASH inducido por la dieta (ratones doblemente transgénicos APOE*3Leiden.CETP)

35 El ratón doblemente transgénico APOE*3Leiden.CETP expresa una variante de la apolipoproteína E3 humana (APOE3), la APOE*3Leiden, además de la apolipoproteína C1 humana (APOC1) y CETP. Los ratones doblemente transgénicos APOE*3Leiden.CETP presentan niveles elevados de colesterol y triglicéridos en plasma, confinados principalmente a la fracción de lipoproteínas de tamaño VLDL/LDL. Al aumentar el contenido de colesterol de la dieta en este modelo, se desarrollan todas las características de la NASH humana.

40 En el Ejemplo 9 Biológico, se realizaron estudios en ratones APOE*3Leiden.CETP sometidos a una dieta alta en grasa (24 % de grasa p/p) con un contenido de colesterol variable (0.25 - 1 % de colesterol p/p). En un estudio (usando colesterol al 1 % p/p), después de un período de prueba de 3 semanas, los ratones con baja respuesta (20 % del total) fueron retirados del estudio y los ratones restantes se subdividieron en 4 grupos de 12 ratones cada uno (+5 en el grupo de control), emparejados por colesterol, triglicéridos plasmáticos, glucosa en sangre, peso corporal y edad (t=0) y se comenzó el tratamiento. Los ratones recibieron una alimentación diaria por sonda entre las 07:00 y las 10:00 con el Compuesto A a 0.3 mmol/kg de peso corporal por día, el Compuesto N de comparación (0.3 mmol/kg de peso corporal por día), rosiglitazona (13 mg/kg de peso corporal por día) o control (aceite de maíz). Después de 20 semanas de tratamiento los ratones fueron sacrificados por asfixia con CO₂, se recogió el hígado y se calificó el nivel de hipertrofia hepatocelular.

En el Ejemplo 25 Biológico, se estudiaron los efectos del Compuesto A solo y en combinación con ácido graso omega-3. A los ratones APOE*3Leiden.CETP se les administró una dieta semisintética alta en grasa (24 % de grasa p/p) con 0.25 de colesterol p/p. Después de un período de prueba de 4 semanas, los ratones con baja respuesta fueron retirados del estudio y los ratones restantes se subdividieron en grupos de 8 ratones cada uno, emparejados por colesterol, triglicéridos plasmáticos, glucosa en sangre, peso corporal y edad ($t = 0$) y se inició el tratamiento. Para facilitar la mezcla de los compuestos, se añadió aceite de girasol a un volumen total de aceite de 10 mL/kg de dieta. El Compuesto A se administró a 0.3 mmol/kg de peso corporal/día, mientras los ésteres etílicos de ácidos grasos omega-3 (85 % p/p de ésteres etílicos de EPA/DHA) se administraron a 3.0 mmol/kg de peso corporal/día. Tanto el Compuesto A como los ésteres etílicos de omega-3 se administraron por vía oral como mezcla con la dieta alta en grasa. Después de 4 semanas de tratamiento, los ratones fueron sacrificados por asfixia con CO₂. Se recogió el hígado y se midió el contenido hepático de colesterol libre, ésteres de colesterol y triglicéridos después de la extracción y separación mediante cromatografía de capa fina de alto rendimiento.

Evaluación de los efectos del Compuesto A en un modelo de ratón con NASH inducido por una dieta de obesidad (modelo AMLN ob/ob)

Los ratones B6.V-Lepob/Jrj inducidos por una dieta de obesidad (ob/ob) son consistentemente propensos a la fibrosis (hígado) cuando se agregan colesterol (2 %), 40 % de grasa (que contiene 18 % de ácidos grasos trans) y 20 % de fructosa a una dieta alta en calorías (es decir, dieta alta en grasa AMLN). Los ratones ob/ob con dieta AMLN (denominados "ratones AMLN ob/ob") desarrollan esteatohepatitis y fibrosis en un período de tiempo más corto (≤ 12 semanas) en comparación con los ratones C57BL/6 de tipo salvaje (ratones AMLN) alimentados con la misma dieta. Los ratones AMLN ob/ob proporcionan un modelo de NASH inducido por una dieta de obesidad que también permite el estudio de los efectos sobre el control glucémico. El desarrollo de NASH en el modelo AMLN ob/ob se confirma mediante biopsia.

En los ejemplos 10 - 12, 15, y 19 Biológicos, se realizaron estudios en ratones macho ob/ob (de 5 semanas de edad) alimentados con una dieta alta en grasa AMLN durante 15 semanas, luego aleatorizados en 3 grupos ($n=10$ por grupo) para recibir 112 mg/kg de peso corporal por día de Compuesto A a través de la dieta, 30 mg/kg de peso corporal por día de pioglitazona a través de la dieta o ningún tratamiento (vehículo) durante 4 semanas más. Se realizó una prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) en la semana 3. La fibrosis hepática se evaluó mediante mediciones de la expresión del gen fibrogénico/fibrolítico hepático mediante determinación de secuencia de ARN a las 4 semanas.

En los ejemplos 10, 13 - 14 y 16 - 18 Biológicos, se realizaron estudios en ratones macho ob/ob (de 5 semanas de edad) alimentados con una dieta alta en grasa AMLN durante 18 semanas, luego aleatorizados en 6 grupos ($n=10$ por grupo) para recibir el Compuesto A (en 3 dosis diarias diferentes, 45 mg/kg, 90 mg/kg o 135 mg/kg) a través de la dieta, 30 mg/kg de peso corporal por día de ácido obeticoólico (OCA) a través de la dieta o ningún tratamiento (vehículo) durante otras 8 semanas. La evaluación de los parámetros relacionados con la NASH y la fibrosis se realizó al final del estudio mediante mediciones de inmunohistoquímica (IHC) cuantitativa.

Respecto a la traslación clínica, las dosis del Compuesto A utilizadas aquí (45 mg/kg, 90 mg/kg y 135 mg/kg en el estudio de 8 semanas y 112 mg/kg en el estudio de 4 semanas) corresponden a dosis humanas de aproximadamente 250 mg/día, 500 mg/día y 750 mg/día (y 600 mg/día en el estudio de 4 semanas) para un humano de 70 kg, cuando se corrigen para las diferencias entre especies. Ver Nair, AB, y Jacob, S., J Basic Clin Pharm, 2016; 7(2): 27-31, para obtener una guía para la conversión de dosis entre especies.

Evaluación de los efectos del Compuesto A sobre las células hepáticas en forma de estrella humanas *in vitro*

Las células en forma de estrella son células residentes del hígado y el principal tipo de célula implicado en el inicio y la progresión de la fibrosis hepática. En el Ejemplo 20 Biológico se realizaron estudios *in vitro* en células en forma de estrella humanas cultivadas (células LX-2) para evaluar los efectos directos del Compuesto A sobre estas células. Las células se trataron durante 24 horas con el Compuesto A (10 μ M, 25 μ M, 50 μ M o 75 μ M) o ácido oleico (OA; 75 μ M) y se evaluó la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) para determinar los efectos sobre la proliferación. Se utilizó un ensayo MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) para determinar la viabilidad celular.

Ejemplo 1 Biológico. Efectos del Compuesto A y del Compuesto N sobre el contenido de fibrosis hepática medido por el contenido total de hidroxiprolina (HYP) por hígado

El Compuesto A en dosis bajas (LD) y altas (HD) administrado a ratones alimentados con CDAA/alta en grasa indujo una disminución significativa de la fibrosis hepática (contenido de HYP por hígado) frente al control ($p < 0.01^*$ y 0.001^{**} respectivamente). No se observaron efectos significativos para el Compuesto N de comparación. Los efectos del Compuesto A sobre el contenido de HYP hepática se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Hidroxiprolina (μ g HYP/por hígado)

Compuesto	Contenido de hidroxiprolina (µg) por hígado
CSAA (control suficiente de colina con alta grasa)	310
CDAA (deficiente en colina)	1250
CDAA + Compuesto A LD	800*
CDAA + Compuesto A HD	750**
CDAA + Compuesto N LD	1100
CDAA + Compuesto N HD	950

Ejemplo 2 Biológico. Efectos del Compuesto A y del Compuesto N sobre el contenido de fibrosis hepática medido por el contenido relativo de hidroxiprolina (HYP) (ug de HYP por 100 mg de hígado)

- 5 El Compuesto A en dosis bajas (LD) y altas (HD) administrado a ratones alimentados con CDAA/alta en grasa disminuyó la fibrosis hepática (contenido de HYP por hígado), mientras no se observaron efectos para el Compuesto N. Los efectos del Compuesto A sobre el contenido relativo de HYP se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2 Hidroxiprolina (µg HYP/por 100 mg de hígado)

Compuesto	Contenido de hidroxiprolina (µg) por 100 mg de hígado
CSAA (control suficiente de colina alto en grasa)	26
CDAA (deficiente en colina)	52
CDAA + Compuesto A LD	38
CDAA + Compuesto A HD	37
CDAA + Compuesto N LD	48
CDAA + Compuesto N HD	54

10 **Ejemplo 3 Biológico. Efectos del Compuesto A y del Compuesto N sobre la expresión de genes inflamatorios hepáticos (expresión del ARNm de TNF-a)**

El Compuesto A en dosis bajas (LD) y altas (HD) administrado a ratones alimentados con CDAA/alta en grasa indujo una disminución significativa de la inflamación hepática (ARNm de TNF-a) frente al control (ambos $p < 0.001^{***}$). También se observó una reducción significativa ($p < 0.001$) para el Compuesto N, pero no para la dosis alta (HD). Los efectos del Compuesto A sobre el TNF-a hepático se muestran en la Tabla 3.

15 Tabla 3 Expresión del gen inflamatorio hepático (ARNm del TNF-a)

Compuesto	TNF-a (expresión relativa de ARNm)
CSAA (control suficiente de colina alto en grasa)	1
CDAA (deficiente en colina)	1.7
CDAA + Compuesto A LD	0.75***

CDAA + Compuesto A HD	0.65***
CDAA + Compuesto N LD	1 ***
CDAA + Compuesto N HD	1.2

Ejemplo 4 Biológico. Efectos del Compuesto A y del Compuesto N sobre la expresión de genes relacionados con la fibrosis (expresión del ARNm de Col1a1)

5 El Compuesto A en dosis bajas (LD) y altas (HD) administrado a ratones alimentados con CDAA/alta en grasa indujo una disminución significativa en la expresión del gen relacionado con la fibrosis hepática (ARNm de Col1a1) frente al control (ambos $p < 0.001^{***}$ respectivamente). No se observaron efectos significativos para el Compuesto N. Los efectos del Compuesto A sobre Col1a1 hepático se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4 Expresión de gen relacionada con fibrosis hepática (ARNm de Col1a1)

Compuesto	Col1a1 (expresión relativa de ARNm)
CSAA (control suficiente de colina alto en grasa)	1
CDAA (deficiente en colina)	19
CDAA + Compuesto A LD	10***
CDAA + Compuesto A HD	6***
CDAA + Compuesto N LD	15
CDAA + Compuesto N HD	16

10 **Ejemplo 5 Biológico. Efectos del Compuesto A sobre el contenido de fibrosis hepática medido mediante morfometría Sirius Red**

15 Con el fin de cuantificar con mayor precisión la cantidad, localización y relevancia funcional de la fibrosis hepática, se realizó la morfometría Sirius Red (SR). A diferencia de los ejemplos 1 y 2, donde se utilizó la evaluación bioquímica del contenido de hidroxiprolina (HYP) midiendo el colágeno en los vasos grandes, la morfometría SR cuantifica los depósitos de colágeno sinusoidal funcionalmente más relevantes. Se midieron 10 áreas por diapositiva utilizando una magnificación de 100x. El Compuesto A en dosis bajas (LD) y altas (HD) administrado a ratones alimentados con CDAA/alta en grasa indujo una disminución significativa en el porcentaje de área de superficie de fibrosis hepática frente al control ($p < 0.001^{***}$ y 0.05^* respectivamente). Los efectos del Compuesto A sobre la fibrosis hepática medida mediante morfometría SR se muestran en la

20 Tabla 5.

Tabla 5: Fibrosis hepática por morfometría SR

Compuesto	Área de fibrosis (% medio)
CSAA (control suficiente de colina alto en grasa)	0.9
CDAA (deficiente en colina)	2.46
CDAA + Compuesto A LD	0.76***
CDAA + Compuesto A HD	1.56*

Ejemplo 6 Biológico. Efectos del Compuesto A y Bydureon® sobre fibras de colágeno

Cuando se administró en dosis bajas (56 mg/kg) a ratones alimentados con CDAA/alta en grasa, el Compuesto A redujo significativamente la cantidad de fibras de colágeno. (Fig. 1A) en 51 % ($p=0.01$). Este efecto se reflejó en la desaparición casi completa de fibras de colágeno cortas ($< 8.5 \mu\text{m}$) y delgadas ($< 3.5 \mu\text{m}$), como se reflejó en los ligeros aumentos del grosor y la longitud de la fibra por el Compuesto A en las Fig. 1B y Fig. 1C, respectivamente. El Bydureon® (0.4 mg/kg semanales inyectados por vía subcutánea) no tuvo un efecto significativo.

Ejemplo 7 Biológico. Efectos del Compuesto A y EPA sobre el metabolismo lipídico hepático

Para comprender mejor los efectos del Compuesto A sobre el metabolismo lipídico hepático, se realizó un análisis lipídico de ratones ("CD") alimentados con CS y con CDAA/alta en grasa en tejido hepático aislado. Cuando se administró en dosis altas (112 mg/kg) a ratones alimentados con CDAA/alta en grasa, el Compuesto A redujo significativamente los efectos de deficiencia en colina, medida por los triglicéridos (TG) hepáticos (Fig. 2A), diglicéridos (DG) hepáticos (Fig. 2B), ácidos grasos libres (FFA) hepáticos (Fig. 2C) o éster de colesterol (Fig. 2D). Por el contrario, el tratamiento con una cantidad equimolar de EPA no redujo el aumento de TG, DG, FFA hepáticos o éster de colesterol asociado con una dieta deficiente en colina.

Ejemplo 8 Biológico. Efectos del Compuesto A sobre el abombamiento hepatocelular, la inflamación lobular, la esteatosis, la calificación NAS compuesta y el área de fibrosis

El Compuesto A administrado a ratones (modelo) STAM disminuyó el abombamiento hepatocelular además de la esteatosis y la inflamación lobular. Tanto la calificación NAS compuesta ($p < 0.001^*$) como el área de fibrosis (área positiva de Sirius Red) disminuyeron con el Compuesto A.

Tabla 6 Abombamiento hepatocelular, calificación NAS total y área de fibrosis

Compuesto	Esteatosis	Inflamación lobular	Abombamiento hepatocelular	Calificación NAS (media $\pm$ DE)	Área de fibrosis (%)
Vehículo n=6 (solución salina)	1	1.9	2	5.3 ± 0.8	1.01
Compuesto A n=8 (37 mg/kg/día)	0.12	0.88	1	$2.3 \pm 1.5^*$	0.79
Telmisartán n=6	0.7	0.45	0.8	1.8 ± 0.8	0.44

Ejemplo 9 Biológico 9. Efectos del Compuesto A y del Compuesto N sobre la hipertrofia hepatocelular

El Compuesto A administrado a ratones ApoE*3L-CETP (dieta con 0.25 % de colesterol p/p) indujo una disminución significativa de la hipertrofia hepatocelular ($p < 0.01^*$), lo que constituye una disminución del 83 % frente al control ($p < 0.01$). No se observó ningún efecto con el Compuesto N.

Tabla 7 Hipertrofia hepatocelular

Compuesto	Abombamiento hepatocelular	Disminución de la hipertrofia vs. control (%)
Control	46 ± 23.9	-
Compuesto A	$8.9 \pm 5.9^*$	83*
Compuesto N	42.9 ± 29.7	7

Ejemplo 10 Biológico 10. Efectos del Compuesto A, pioglitazona y OCA sobre el peso del hígado y el peso corporal

Como se muestra en la Fig. 3A, a las 4 semanas, el Compuesto A (112 mg/kg) no tuvo efecto sobre el peso corporal en ratones AMLN *ob/ob*, mientras la pioglitazona indujo un aumento significativo del 15 % en el peso corporal ($p < 0.01$). El peso del hígado no varió en todos los grupos en la semana 4, como se muestra en la Fig. 3B. A las 8 semanas, ni el Compuesto A (45 mg/kg, 90 mg/kg y 135 mg/kg) ni el OCA afectaron

significativamente el peso corporal, como se muestra en la Fig. 3C, y la ingesta de alimentos no se afectó en ninguno de los grupos. El OCA redujo significativamente ($p < 0.05$) el peso del hígado a las 8 semanas, mientras el Compuesto A no tuvo efectos significativos en ninguna dosis en comparación con el vehículo, como se muestra en la Fig. 3D.

5 **Ejemplo 11 Biológico. Efectos del Compuesto A y la pioglitazona sobre la expresión de genes fibrogénicos y fibrolíticos hepáticos**

Los efectos del tratamiento de 4 semanas con el Compuesto A (112 mg/kg) o pioglitazona (30 mg/kg) sobre la expresión de genes fibrogénicos y fibrolíticos en muestras de hígado aisladas de ratones AMLN *ob/ob* se muestran en las Figs. 4A - 4F. El Compuesto A redujo significativamente la expresión de genes canónicos que regulan la fibrogenesis hepática, incluyendo el factor (PDGF- β) beta de crecimiento derivado de plaquetas (Fig. 4A), receptor - β (PDGFR- β) del factor de crecimiento derivado de plaquetas (Fig. 4B), colágeno-1 $\alpha 1$ (col1A1) (Fig. 4C), col3A1 (Fig. 4D), col4A1 (Fig. 4E), y la proteína 47 (HSP47) de choque térmico (Fig. 4F). La pioglitazona redujo significativamente la expresión de las isoformas de colágeno examinadas (col1A1, col3A1, col4A1) y HSP47, pero no tuvo efecto sobre la expresión de PDGF- β o PDGFR- β .

15 **Ejemplo 12 Biológico. Efectos del Compuesto A y la pioglitazona sobre la estabilidad de la matriz extracelular hepática y la expresión del gen de la fibrólisis**

Como se muestra en las Figs. 5A - 5D, respecto a los genes que regulan la estabilidad de la matriz (ECM) extracelular o la fibrólisis, 4 semanas de tratamiento con el Compuesto A redujeron significativamente la expresión hepática de lisil-oxidasa (LOX). (Fig. 5A), similar a LOX 2 (LOXL2) (Fig. 5B), y LOXL1 (Fig. 5C), así como el inhibidor tisular de la metaloproteínasa (TIMP1) (Fig. 5D) en ratones AMLN *ob/ob*. La pioglitazona también redujo significativamente los niveles de transcripción de estas transcripciones, aunque el efecto fue más leve que el efecto obtenido con el Compuesto A.

Ejemplo 13 Biológico. Efectos del Compuesto A y OCA en el progreso de la fibrosis hepática

Para evaluar los efectos de 8 semanas de administración del Compuesto A (45 mg/kg, 90 mg/kg o 135 mg/kg) u OCA (30 mg/kg) sobre el progreso de la fibrosis hepática en ratones AMLN *ob/ob* se realizó inmunohistoquímica cuantitativa (IHC) midiendo el contenido de col1A1 y α -actina del músculo liso (SMA). Como se muestra en las Fig. 6A y Fig. 6B, En las dosis de 90 mg/kg y 135 mg/kg, el Compuesto A redujo notablemente el marcador α -SMA de miofibroblastos (expresado tanto como contenido de área total como % de fracción del área), mientras el OCA no mostró ningún efecto significativo.

De manera similar, el Compuesto A administrado a 90 y 135 mg/kg redujo el contenido total de col1A1 (Fig. 6C), mientras el OCA no tuvo un efecto significativo. Cuando se expresó como porcentaje de la superficie total (Fig. 6D), la dosis de 90 mg/kg indujo una reducción significativa en los niveles de col1A1, mientras las reducciones en las dosis de 45 y 135 mg/kg no fueron estadísticamente significativas. Para corroborar los efectos antifibróticos observados con la IHC cuantitativa, se midieron las concentraciones hepáticas de hidroxiprolina (HYP), como se muestra en las Fig. 6E y Fig. 6F. Sólo el Compuesto A redujo el contenido de HYP, expresado como contenido total ($p < 0.01$ para las dosis de 90 y 135 mg/kg) o relativo ($p < 0.05$ para las dosis de 90 y 135 mg/kg).

Ejemplo 14 Biológico. Efectos del Compuesto A y OCA en la regresión de la fibrosis hepática

Como biopsias de línea base (previas al tratamiento) se realizaron análisis de sangre en ratones AMLN *ob/ob* que incorporaban la medición de IHC de col1A1 hepático y α -SMA, y se compararon los valores terminales de col1A1 y α -SMA con los valores de línea base (biopsia previa al tratamiento) en todos los grupos, para establecer si las reducciones significativas que observamos después del tratamiento con el Compuesto A frente al vehículo al final del estudio estaban asociadas con la regresión de la fibrosis. Como se muestra en la Fig. 7A, el tratamiento con 135 mg/kg del Compuesto A disminuyó el porcentaje del área del contenido de α -SMA evaluado mediante tinción inmunohistoquímica en comparación con el contenido de α -SMA en la biopsia previa al tratamiento. Las dosis de 45 mg/kg y 90 mg/kg del Compuesto A dieron como resultado una tendencia no significativa. El OCA no tuvo ningún efecto significativo. De manera similar, todas las dosis del Compuesto A mostraron una tendencia hacia una disminución del contenido de col1A1 en comparación con el contenido previo a la biopsia, aunque solo la dosis de 90 mg/kg fue estadísticamente significativa ($p < 0.005$) (Fig. 7B). Tanto el tratamiento con vehículo como con OCA mostraron aumentos leves en el contenido hepático de col1A1 después del período de administración de 8 semanas, aunque el aumento solo fue significativo para OCA ($p < 0.05$).

Ejemplo 15 Biológico. Efectos del Compuesto A y la pioglitazona sobre la expresión de genes inflamatorios

De relevancia específica para el progreso de la fibrosis en ratones AMLN *ob/ob*, 4 semanas de tratamiento con 112 mg/kg del Compuesto A redujeron significativamente la expresión de genes inflamatorios en comparación con los ratones de control a los que se les administró el vehículo. Específicamente, el Compuesto A redujo los

niveles de transcripción tanto del factor beta 1 (TGF- β 1) de crecimiento que transforma ($p < 0.05$) como del receptor de TGF- β 1 (TGFR β) ($p < 0.01$), como se muestra en las Fig. 8A y Fig. 8B, respectivamente. La pioglitazona redujo la expresión de TGFR β ($p < 0.05$), pero no de TGF- β 1. Se encontraron reducciones significativas en CCR2, MAC-2 (datos no mostrados), CD68 y CD14 (todos $p < 0.001$) después del tratamiento con el Compuesto A frente al control, como se muestra en las Figs. 8C, 8D, y 8F. El tratamiento con el Compuesto A también redujo significativamente los niveles de galectina-3 (Gal-3) en comparación con los controles a los que se les administró el vehículo (Fig. 8E). La pioglitazona redujo significativamente el CCR2 ($p < 0.01$) (Fig. 8C), CD68 ($p < 0.01$) (Fig. 8D), y CD14 ($p < 0.001$) (Fig. 8F). Ningún compuesto redujo significativamente los niveles de transcripción de interleuquina (IL)-1 β o MCP-1 (datos no mostrados).

Ejemplo 16 Biológico. Efectos del Compuesto A y OCA sobre la inflamación hepática medida por Gal-3 hepática

Para evaluar los efectos de un tratamiento de 8 semanas con Compuesto A (45 mg/kg, 90 mg/kg o 135 mg/kg) u OCA (30 mg/kg) sobre la inflamación hepática en ratones AMLN *ob/ob*, se realizó IHC para evaluar los niveles de galectina-3 (Gal-3). Como se muestra en las Fig. 9A y Fig. 9B, el tratamiento con el Compuesto A resultó en una reducción dependiente de la dosis en el nivel de expresión de Gal-3, cuando se midió como contenido total o como porcentaje de área, mientras OCA solo redujo los niveles de expresión de Gal-3 cuando se midió como contenido total.

Ejemplo 17 Biológico. Efectos del Compuesto A y OCA sobre el daño hepatocelular

Para evaluar los efectos del Compuesto A y la pioglitazona sobre la lesión o daño hepatocelular en ratones AMLN *ob/ob*, se midieron la alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato transaminasa (AST) plasmáticas después de 8 semanas de administración. Como se muestra en la Fig. 10A, se logró una reducción marcada y significativa de ALT con las dosis de 90 mg/kg y 135 mg/kg del Compuesto A ($p < 0.01$ y $p < 0.001$ respectivamente) mientras OCA no tuvo efecto. En las dosis de 90 mg/kg y 135 mg/kg, el Compuesto A también redujo significativamente la AST ($p < 0.05$ y $p < 0.01$ respectivamente), mientras el OCA no mostró ningún efecto sobre los niveles de AST. (Fig. 10B).

Ejemplo 18 Biológico. Efectos del Compuesto A y OCA sobre la esteatosis hepática, los niveles de lípidos hepáticos y los niveles de lípidos plasmáticos

Como se muestra en las Fig. 11A y Fig. 11B, Tanto el Compuesto A como el OCA redujeron significativamente la esteatosis en ratones AMLN *ob/ob* después de 8 semanas de administración (expresada como porcentaje de área o contenido lipídico total), demostrando OCA una eficacia comparable con la dosis más alta (135 mg/kg) del Compuesto A (ambos $p < 0.001$). De manera similar, tanto el OCA como el Compuesto A (en las dosis de 90 mg/kg y 135 mg/kg) demostraron reducciones comparables en los niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol total, como se muestra en la Fig. 11D y Fig. 11E. El tratamiento con OCA, pero no el Compuesto A, mostró un contenido de colesterol hepático total reducido ($p < 0.01$) (Fig. 11C).

Ejemplo 19 Biológico. Efectos del Compuesto A y la pioglitazona sobre el control glucémico

Después de 3 semanas de administración del Compuesto A (112 mg/kg), pioglitazona o vehículo de control, se realizó una prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) en ratones AMLN *ob/ob*. Como se muestra en la Fig. 12A, tanto el Compuesto A como la pioglitazona redujeron significativamente la excursión de glucosa durante los primeros 240 minutos después de la carga de glucosa (AUC 0 - 240 minutos), aunque el efecto fue más pronunciado con pioglitazona. De manera similar, se lograron reducciones significativas en los niveles de glucosa plasmática en ayunas con ambos compuestos, aunque el efecto fue más pronunciado con pioglitazona en comparación con el Compuesto A (Fig. 12B). La pioglitazona, pero no el Compuesto A, redujo la insulina en ayunas ($p < 0.001$) (Fig. 12C).

Ejemplo 20 Biológico. Efectos del Compuesto A y del ácido oleico sobre la proliferación y viabilidad *in vitro* de las células en forma de estrella

Se evaluó la proliferación celular de células hepáticas en forma de estrella humanas LX-2 tratadas durante 24 horas con 10 - 75 μ M de Compuesto A o ácido oleico (OA) (75 μ M), mediante la incorporación de BrdU. Los resultados son valores medios normalizados $\pm$ S.E.M. de 5 experimentos independientes para icosabutato y 2 experimentos independientes para OA. Como se muestra en la Fig. 13A, las células LX-2 tratadas con 25 μ M ($p < 0.005$), 50 μ M ($p < 0.0001$) y 75 μ M ($p < 0.005$) del Compuesto A fueron menos proliferativas en comparación con OA o el vehículo. La reducción de la proliferación causada por el Compuesto A fue del 25 - 34 % a las 24 horas, mientras el OA no tuvo efecto. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA unidireccional con corrección de Dunnett para comparaciones múltiples. Como se muestra en la Fig. 13B, ni el Compuesto A ni el OA mostraron un efecto significativo sobre la viabilidad celular medida mediante un ensayo MTS en 2 experimentos independientes.

Ejemplo 21 Biológico. Efectos del Compuesto A y un agonista de GLP-1 (GLP-1a, exenatida), solos y en combinación, sobre la expresión de genes relacionados con la fibrosis hepática (expresión del ARNm de Col1a1)

5 El Compuesto A, GLP-1a y el Compuesto A + GLP-1a en combinación administrados a ratones alimentados con CDAA/alta en grasa indujeron una disminución significativa en la expresión del ARNm de Col1a1 frente a los ratones alimentados con CDAA (todos $p < 0.001^{***}$). Los efectos del Compuesto A solo y en combinación con GLP-1a sobre el ARNm de Col1a1 hepático se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8 Expresión de genes relacionados con la fibrosis hepática (ARNm de Col1a1)

Compuesto	Col1a1 (expresión relativa de ARNm)
CSAA (control suficiente de colina alto en grasa)	1
CDAA (deficiente en colina)	19
CDAA + Compuesto A	6.2 ^{***}
CDAA + GLP-1a	10.3 ^{***}
CDAA + Compuesto A + GLP-1a	4.9 ^{***}

10 **Ejemplo 22 Biológico. Efectos del Compuesto A y un agonista de GLP-1 (GLP-1a, exenatida), solos y en combinación, sobre la expresión de genes relacionados con la fibrosis hepática (expresión del ARNm de TIMP (inhibidor tisular de la metaloproteinasa de matriz)-1a)**

15 El Compuesto A, GLP-1a y el Compuesto A + GLP-1a en combinación administrados a ratones alimentados con CDAA/alta en grasa indujeron una disminución significativa en la expresión del ARNm de TIMP-1a hepático, frente a los ratones alimentados con CDAA (todos $p < 0.001^{***}$). Los efectos del Compuesto A solo y en combinación con GLP-1a sobre el ARNm de TIMP-1a hepático se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9 Expresión de genes relacionados con la fibrosis hepática (ARNm de TIMP-1a)

Compuesto	TIMP-1a (expresión relativa de ARNm)
CSAA (control suficiente de colina alto en grasa)	1
CDAA (deficiente en colina)	6.7
CDAA + Compuesto A	2 ^{***}
CDAA + GLP-1a	2.4 ^{***}
CDAA + Compuesto A + GLP-1a	0.76 ^{***}

20 **Ejemplo 23 Biológico. Efectos del Compuesto A y del agonista de GLP-1 (GLP-1a, exenatida), solos y en combinación, sobre la expresión de genes relacionados con la fibrosis hepática (expresión del ARNm de la MMP (metaloproteinasa de matriz)-13)**

25 El Compuesto A, GLP-1a y el Compuesto A + GLP-1a en combinación administrados a ratones alimentados con CDAA/alta en grasa indujeron una disminución significativa en la expresión del ARNm de MMP-13 hepático frente a los ratones alimentados con CDAA (todos $p < 0.001^{***}$). Los efectos del Compuesto A solo y en combinación con GLP-1a sobre el ARNm de MMP-13 hepático se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10 Expresión de genes relacionados con la fibrosis hepática (ARNm de MMP-13)

Compuesto	MMP-13 (expresión relativa de ARNm)
CSAA (control suficiente de colina alto en grasa)	1
CDAA (deficiente en colina)	3.2
CDAA + Compuesto A	1.6***
CDAA + GLP-1a	2.1***
CDAA + Compuesto A + GLP-1a	1.3***

Ejemplo 24 Biológico. Efectos del Compuesto A y el agonista de GLP-1 (GLP-1a, exenatida), solos y en combinación, sobre la expresión de genes relacionados con la inflamación hepática (expresión del ARNm del TNF- α)

- 5 El Compuesto A, GLP-1a y el Compuesto A + GLP-1a en combinación administrados a ratones alimentados con CDAA/alta en grasa indujeron una disminución significativa en la expresión de ARNm de TNF- α hepático frente a los ratones alimentados con CDAA ($p < 0.001$ para el Compuesto A solo o en combinación con GLP-1a, $p < 0.05$ para GLP-1a solo). Los efectos del Compuesto A solo y en combinación con GLP-1a sobre el ARNm del TNF- α hepático se muestran en la Tabla 11.

10 Tabla 11 Expresión de genes relacionados con la fibrosis hepática (ARNm del TNF- α)

Compuesto	TNF- α (expresión relativa de ARNm)
CSAA (control suficiente de colina alto en grasa)	1
CDAA (deficiente en colina)	1.7
CDAA + Compuesto A	0.65***
CDAA + GLP-1a	1.05*
CDAA + Compuesto A + GLP-1a	0.66***

Ejemplo 25 Biológico. Efectos del Compuesto A y de los ésteres etílicos omega-3 concentrados, solos y en combinación, sobre los lípidos hepáticos (ésteres de colesterol-CE, colesterol libre-CF, triglicéridos-TG)

- 15 Una dosis baja (0.3mmol/kg de peso corporal/día) del Compuesto A (LD) administrada a ratones transgénicos ApoE*3L-CETP alimentados con una dieta Occidental con 0.25 % de colesterol en combinación con una dosis alta (3 mmol/kg de peso corporal/día) de éster etílico de omega-3 EPA/DHA 85 % (HD) indujo una disminución significativa en FC ($p < 0.01$), CE ($p < 0.001$) y TG ($p < 0.01$). Ningún compuesto redujo significativamente los TG hepáticos como monoterapia en este modelo.

20 Tabla 12 Lípidos hepáticos

Compuesto	FC hepático	CE hepático	TG hepático
Control	12.3	22.7*	95.4
Compuesto A LD	9.5	17*	58.8
EPA/DHA HD	8.9*	12**	65.4

Compuesto A LD + EPA/DHA HD	8.1	8***	39.1**
-----------------------------	-----	------	--------

Ejemplo 26 Biológico: Estudio Multicéntrico, Aleatorizado, Doble Ciego, Controlado con Placebo y de Grupos Paralelos del Compuesto A en Pacientes con Esteatohepatitis (NASH) No alcohólica

Los objetivos de este ensayo clínico son evaluar la eficacia de diferentes dosis del Compuesto A para resolver la NASH en pacientes sin empeorar la fibrosis y determinar la seguridad y tolerabilidad del Compuesto A en pacientes que padecen NASH.

Número de pacientes

Se examinan 600 pacientes que padecen NASH en aproximadamente 30 sitios, para determinar su idoneidad; se prevé que aproximadamente 264 sean compatibles con los criterios de selección que se describen a continuación y se espera que aproximadamente 198 completen la totalidad del ensayo (lo que da 66 sujetos por grupo de tratamiento, asumiendo que el 25 % de los pacientes abandonan).

Asignación de tratamiento

Los pacientes encontrados elegibles para el estudio se dividen aleatoriamente en tres grupos paralelos, cada uno de los cuales consiste en 88 pacientes. Al grupo 1 se le administra placebo del Compuesto A, al grupo 2 se le administran 300 mg del Compuesto A y al grupo 3 se le administran 600 mg del Compuesto A. El Compuesto A o placebo se administra una vez al día en una (300 mg) o dos (600 mg) cápsulas durante 52 semanas. Estratificación para F1 vs F2/F3.

La eficacia del tratamiento con el Compuesto A se evalúa, por ejemplo, mediante la calificación NAS de las biopsias de hígado, la evaluación PDFF de MRI LiverMultiScan y cT1, pruebas de función hepática, HOMA-IR y biomarcadores de inflamación y fibrosis (incluyendo hsCRP, Pro-C3, panel ELF y otros biomarcadores adecuados).

La seguridad y la tolerabilidad se evalúan mediante informes de eventos adversos, monitoreo de signos vitales, examen físico, hematología y bioquímica (renal, hepática), análisis de orina y ECGs de 12 derivaciones en reposo.

La presión arterial se controla mediante tres lecturas de presión arterial en posición sentado que se toman en cada visita.

Diseño del estudio

El estudio se realiza durante 58 semanas y 10 visitas clínicas por paciente, incluyendo una discriminación, un período de tratamiento doble ciego y un seguimiento posterior al tratamiento. Los procedimientos realizados en cada visita se describen a continuación y se resumen en la Tabla 13.

- Visita 1 (1 a 42 días antes del inicio de la administración del tratamiento): se discriminan los pacientes respecto a su compatibilidad de acuerdo con los criterios que se delinean a continuación y se obtiene el consentimiento del paciente. La evaluación puede realizarse en más de una visita.
- Visita 2: Los pacientes son aleatorizados a uno de los 3 grupos de tratamiento. A cada uno de los grupos de tratamiento se le administran 300 o 600 mg del Compuesto A, o un placebo, diariamente durante 52 semanas. Se realizan evaluaciones de línea base, que incluyen imágenes hepáticas (MRI - PDFF y cT1), signos vitales, laboratorios de seguridad (hematología basal, bioquímica y análisis de orina), ECGs de 12 derivaciones en reposo y biomarcadores (HOMA-IR, hsCRP, Pro-C3 y panel ELF).
- Visita 3 (después de 4 semanas de tratamiento): se evalúa a los pacientes para detectar eventos adversos, signos vitales, laboratorios de seguridad (hematología, bioquímica y análisis de orina), ECGs de 12 derivaciones en reposo y muestra de farmacocinética mínima.
- Visita 4 (después de 10 semanas de tratamiento): se evalúa a los pacientes para detectar eventos adversos, signos vitales, laboratorios de seguridad (hematología, bioquímica y análisis de orina), ECGs de 12 derivaciones en reposo y muestra de farmacocinética mínima.
- Visita 5 (después de 16 semanas de tratamiento): se evalúa a los pacientes para detectar eventos adversos, imágenes hepáticas (MRI - PDFF y cT1), signos vitales, laboratorios de seguridad (hematología, bioquímica y análisis de orina), ECGs de 12 derivaciones en reposo, biomarcadores (HOMA-IR, hsCRP, Pro-C3 y panel ELF) y muestra de farmacocinética mínima.

- Visitas 6, 7 y 8 (después de 24, 32 y 40 semanas de tratamiento): se evalúa a los pacientes para detectar eventos adversos, signos vitales, laboratorios de seguridad (hematología, bioquímica y análisis de orina), ECG en reposo de 12 derivaciones, biomarcadores (hsCRP) y muestra de farmacocinética mínima.
- 5 • Visita 9 (después de 52 semanas de tratamiento): se evalúa a los pacientes mediante biopsia de hígado, imágenes hepáticas (MRI - PDFF y cT1), signos vitales, laboratorios de seguridad (hematología, bioquímica y análisis de orina), ECGs de 12 derivaciones en reposo, biomarcadores (HOMA-IR, hsCRP, Pro-C3 y panel ELF) y muestra de farmacocinética mínima.
- 10 • Visita 10 (14-21 días después de suspender la medicación del ensayo): los pacientes se someten a un seguimiento de seguridad y se evalúan respecto a eventos adversos, los signos vitales, laboratorios de seguridad (hematología, bioquímica y análisis de orina), los ECG en reposo de 12 derivaciones y muestra de farmacocinética mínima.

15 A los pacientes que abandonan el estudio antes de completarlo se les evalúa respecto a eventos adversos, signos vitales, laboratorios de seguridad (hematología, bioquímica y análisis de orina), ECGs de 12 derivaciones en reposo, muestra de farmacocinética mínima y biomarcadores (HOMA-IR, hsCRP, Pro-C3 y panel ELF).

Criterios de inclusión de pacientes:

Los pacientes cumplen los siguientes criterios para ser incluyendo en el ensayo.

- Entre 18 y 75 años de edad.
- Las mujeres no están en edad fértil o utilizan medios anticonceptivos aceptables.
- 20 • Si las parejas femeninas de los pacientes masculinos están en edad fértil, los pacientes masculinos están dispuestos a utilizar procedimientos anticonceptivos (por ejemplo, condones). Además, su pareja femenina utiliza procedimientos anticonceptivos (por ejemplo, hormonas, dispositivo intrauterino, etc.). Se utiliza doble anticoncepción desde la primera dosis del fármaco compuesto hasta 90 días después de la última dosis del fármaco en estudio.
- 25 • Consentimiento informado escrito.
- Criterios opcionales de fibroscan previos a la biopsia.
- Un diagnóstico histológico de NASH en la discriminación o dentro de los 6 meses posteriores a la discriminación.
- Calificación NAS ≥ 4 .
- 30 • Calificación de fibrosis 1 - 3 inclusive (F1 limitada al 30 %).
- PDFF opcional $> 10\%$ en MRI
- Preparado para someterse a una biopsia de hígado después de 52 semanas de tratamiento.
- Enfermedad hepática compensada con los siguientes criterios hematológicos y bioquímicos al ingresar al protocolo:
- 35 • ALT $< 5 \times \text{ULN}$
- AST > 30
- Hemoglobina $> 11 \text{ g/dL}$ para mujeres y $> 12 \text{ g/dL}$ para hombres
- Glóbulos blancos (WBC) $> 2.5 \text{ K}/\mu\text{L}$
- Recuento de neutrófilos $> 1.5 \text{ K}/\mu\text{L}$
- 40 • Plaquetas $> 100 \text{ K}/\mu\text{L}$
- Bilirrubina total $< 35 \mu\text{mol/L}$. Los pacientes con bilirrubina $> 35 \mu\text{mol/L}$ pueden incluirse si presentan bilirrubina no conjugada en el contexto de un síndrome de Gilbert.
- Albúmina $> 36 \text{ g/L}$
- Relación Internacional Normalizada (INR) < 1.4

- Creatinina sérica <1.3 mg/dL (hombres) o <1.1 (mujeres) o tasa de filtración glomerular estimada ≥ 60 mL/min/1.73 m²
- Ninguna otra causa de enfermedad hepática crónica (autoinmune, colangitis biliar primaria, HBV, HCV, enfermedad de Wilson, deficiencia de α -1-antitripsina, hemocromatosis, etc...)
- 5 • Si es aplicable, diabetes tipo 2 estable (definida como HgbA1c < 9.5 % y glucemia en ayunas < 10 mmol/L, sin cambios en la medicación en los 6 meses anteriores y sin síntomas nuevos asociados con diabetes descompensada en los 3 meses anteriores).
- Tener un peso estable desde que se realizó la biopsia hepática, definiéndose como estable no más de un 5 % de pérdida del peso corporal inicial.
- 10 Criterios de exclusión de pacientes
- Los pacientes no cumplen alguno de los siguientes criterios de exclusión:
- Antecedentes de ingesta excesiva sostenida de alcohol, evaluada mediante un cuestionario de ingesta de alcohol.
- 15 • Una condición metabólica inestable definida por: una ganancia o pérdida de peso de más de 5 kg en los últimos tres meses, diabetes con mal control glucémico (HgbA1c > 9.5 %), o introducción de un antidiabético o de un fármaco antiobesidad/cirugía bariátrica (para perder peso) de absorción deficiente o restrictiva en los últimos 6 meses antes de la discriminación.
- Antecedentes de cirugía bariátrica con absorción gastrointestinal deficiente en menos de 5 años o ingestión de fármacos de los que se sabe que producen esteatosis hepática, incluyendo corticosteroides, estrógenos en dosis altas, metotrexato, tetraciclina o amiodarona en los 6 meses anteriores.
- 20 • Enfermedad sistémica o mayor significativa distinta de la enfermedad hepática, incluyendo insuficiencia cardíaca congestiva (clase C y D de la AHA), enfermedad coronaria inestable, enfermedad cerebrovascular, enfermedad pulmonar, insuficiencia renal, trasplante de órganos, enfermedad psiquiátrica grave o neoplasia maligna que, en opinión del investigador, impedirían el tratamiento con el Compuesto A.
- 25 • Antígeno HB > 0, PCR del HCV > 0 (los pacientes con antecedentes de infección por HCV pueden incluirse si la PCR del HCV es negativa durante más de 3 años) o infección por HIV.
- Cualquier otra afección que, en opinión del investigador, impediría la competencia o el cumplimiento o posiblemente dificultaría la finalización del estudio.
- Índice de masa corporal (BMI) > 45 kg/m².
- 30 • Diabetes tipo 1 o diabetes tipo 2 tratada con insulina.
- Cetoacidosis diabética.
- Triglicéridos en ayunas > 300 mg/dL.
- Trastornos de la hemostasia o tratamiento actual con anticoagulantes.
- Una contraindicación para la biopsia hepática.
- 35 • Antecedentes o arritmias cardíacas actuales y/o antecedentes de enfermedad cardiovascular, incluyendo infarto de miocardio, excepto en pacientes con hipertensión bien controlada, y cualquier anomalía clínicamente significativa del ECG.
- Participación en cualquier otro estudio de fármacos en investigación dentro de los 3 meses anteriores o 5 semividas de dicho fármaco.
- 40 • Hipersensibilidad conocida a cualquiera de los ingredientes o excipientes del IMP.
- Tomar antidiabéticos de los que se sabe que tienen actividad contra la NASH, por ejemplo, pioglitazona y agonistas del receptor GLP-1.

Criterios de punto final

- 45 El criterio primario de valoración final de la eficacia del Compuesto A es el porcentaje de pacientes con resolución de la NASH, definida por la desaparición del abombamiento (calificación =0) con una calificación de inflamación lobular de 0 o 1, y sin empeoramiento de la fibrosis.

Los criterios secundarios de valoración final para la eficacia del Compuesto A son el cambio desde la línea base en la calificación NAS, los cambios en las calificaciones histológicas individuales para esteatosis, abombamiento, inflamación y fibrosis, los cambios en las enzimas hepáticas, los cambios en los parámetros de imágenes y los cambios en los biomarcadores (incluyendo hsCRP, Pro-C3, panel ELF y citocinas).

- 5 Los criterios secundarios de valoración final de seguridad/tolerabilidad incluyen eventos adversos reportados, valores de laboratorio (hematología, bioquímica y análisis de orina), signos vitales (presión arterial, frecuencia del pulso y temperatura) y hsCRP.

- 10 Los criterios secundarios de valoración final de la farmacocinética incluyen la comparación de las concentraciones plasmáticas mínimas medias en estado estacionario para las 3 dosis del Compuesto A tomadas en las visitas 4, 5, 6, 7 y 8.

Procedimientos estadísticos

- 15 Un tamaño de muestra de 88 pacientes por grupo proporciona un poder del 80 % para detectar una tasa de respuesta del 40 % para activo frente al placebo, asumiendo una tasa de respuesta al placebo del 18 % y una tasa de abandono del 25 %. Después de un análisis provisional de 16 semanas, se puede realizar una nueva estimación del tamaño de la muestra. El análisis de eficacia se realiza en una población con intención de tratar modificada que consiste en aquellos con una medición de eficacia de línea base y al menos una posterior a la línea base. Se realizan comparaciones entre cada dosis individual y placebo.

Tabla 13: Calendario de evaluaciones

Evaluaciones	Visita 1	Visita 2	Visita 3	Visita 4	Visita 5	Visita 6	Visita 7	Visita 8	Visita 9	Visita 10	ET
	Discriminación* Día -42--1	Aleatorización y línea base Día 0	Después de 4 semanas de Rx Día 28	Después de 10 semanas de Rx Día 70	Después de 16 semanas de Rx Día 112	Después de 24 semanas de Rx Día 168	Después de 32 semanas de Rx Día 224	Después de 40 semanas de Rx Día 280	Después de 52 semanas de Rx Día 364	Seguimiento de seguridad Día 378	Terminación anticipada
Consentimiento informado	X										
Demografía + PMH	X										
Con fármacos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Examen físico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
ECGs de 12 derivaciones	X			X	X	X	X	X	X	X	X
Laboratorios de seguridad ²	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Biopsia de hígado	X								X		
Confirmar elegibilidad		X									
MRI-PDFF y cT1		X			X				X		
Biomarcadores ³		X			X	X	X	X	X		X
Muestra de PK			X	X	X	X	X	X	X	X	X
Monitoreo de AE		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Dispensación de fármacos y rendición de		X	X	X	X	X	X	X	X		X

¹Examen completo en las visitas 1, 2, 9 y 10, examen abreviado en todas las demás visitas

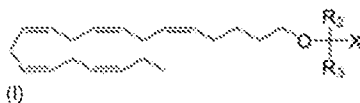
²Hematología, Bioquímica, coagulación, análisis de orina, lípidos

³hsCRP, Pro-C3, panel ELF, HOMA-IR, citoquinas

* El período de discriminación de hasta 6 semanas puede incluir más de una visita real si se procede a la biopsia

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la Fórmula (I)



en donde R_2 y R_3 son iguales o diferentes y se seleccionan entre un átomo de hidrógeno y un grupo alquilo C_1-C_6 ; y

X es un ácido carboxílico o un éster de alquilo C_1-C_6 ;

o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o solvato de dicha sal del mismo,

para uso en el tratamiento terapéutico de la esteatohepatitis no alcohólica caracterizada por fibrosis.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R_2 y R_3 se eligen independientemente entre un átomo de hidrógeno, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo y un grupo isopropilo.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R_2 y R_3 son ambos independientemente grupos alquilo C_1-C_6 .

4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde uno de R_2 y R_3 es un átomo de hidrógeno y el otro es un grupo etilo.

5. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde X es un ácido carboxílico.

6. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde X es un éster de alquilo C_1-C_6 .

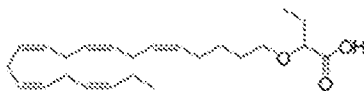
7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde X se elige entre un éster metílico, un éster etílico, un éster isopropílico, un éster n-butílico y un éster terc-butílico.

8. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 6 o 7 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde X se selecciona del grupo de un éster metílico y un éster etílico.

9. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto está presente en forma de un enantiómero, diastereoisómero o mezcla de los mismos.

10. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto está presente en su forma R, en su forma S o en forma racémica.

11. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto es ácido 2-(((5Z,8Z, 11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaen-1-il)oxi)butanoico (Compuesto A), o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo, y la fórmula es



(Compuesto A)

12. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho compuesto se administra en una dosis de 5 mg a 4 g por dosis.

13. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho compuesto se administra una vez al día.

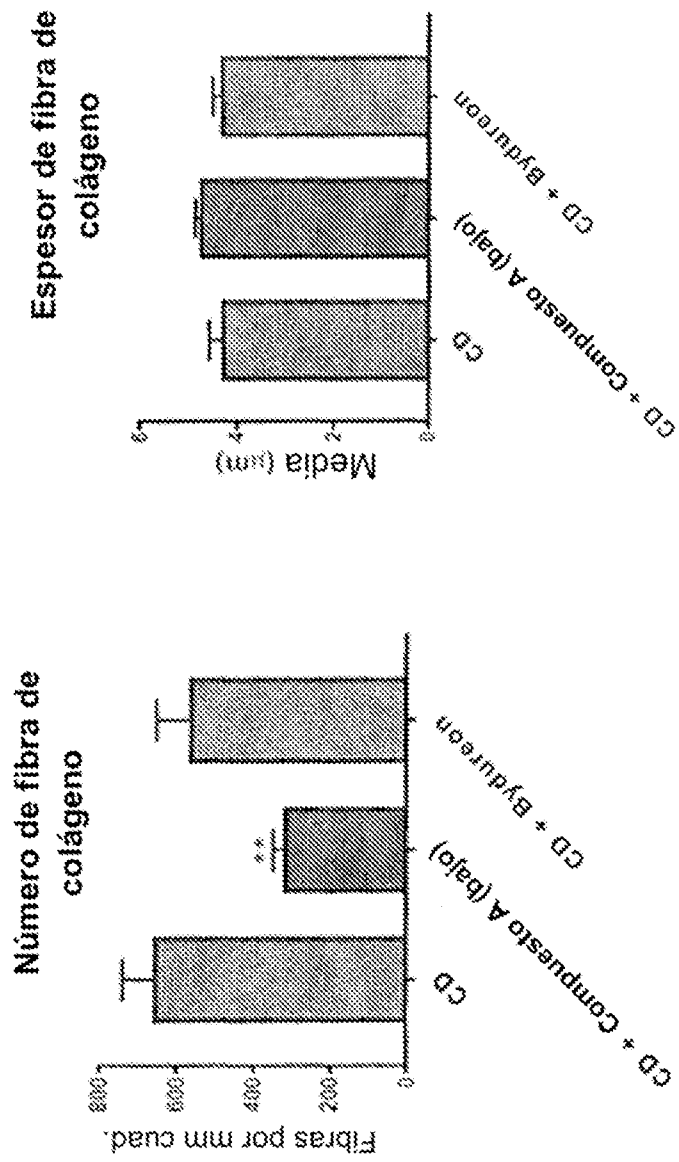
14. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, formulada para administración oral para su uso en el tratamiento de la esteatohepatitis no alcohólica caracterizada por fibrosis.

15. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14 para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la composición farmacéutica comprende además al menos un aglutinante, excipiente, diluyente o antioxidante, o cualquier combinación de los mismos.

16. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto se administra en una dosificación de 600 mg diarios.

17. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto se administra como una monoterapia.

- 5 18. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto se coadministra con al menos un agente activo adicional seleccionado del grupo de un agonista del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1); un inhibidor de dipeptidil peptidasa (DPP IV) y ácidos grasos omega-3 (PUFA n-3).



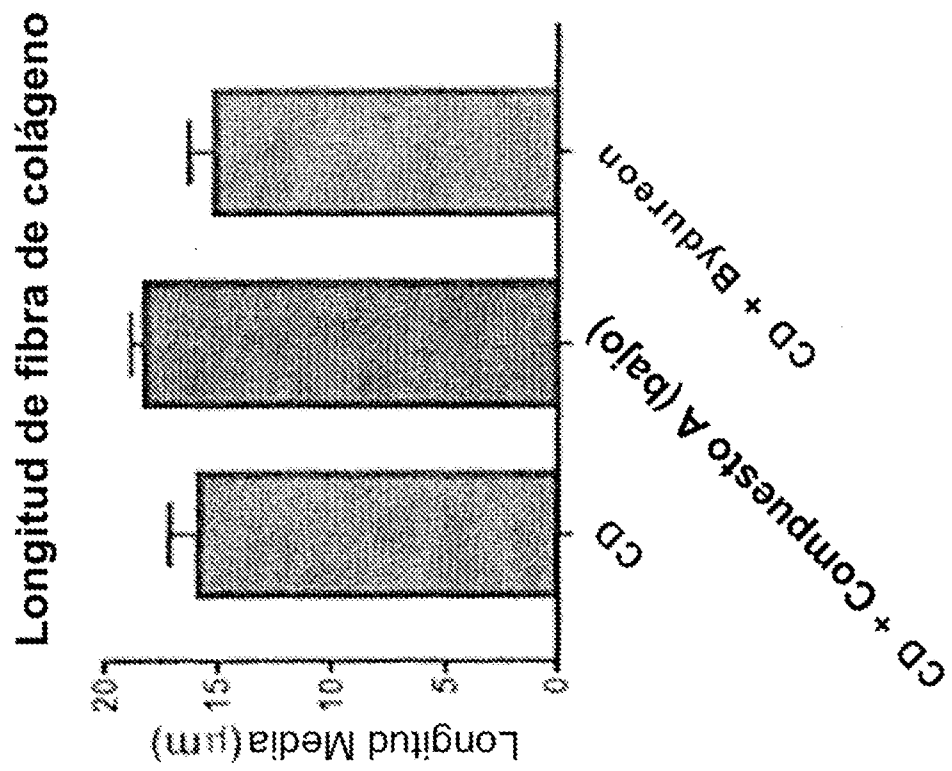


FIG. 1C

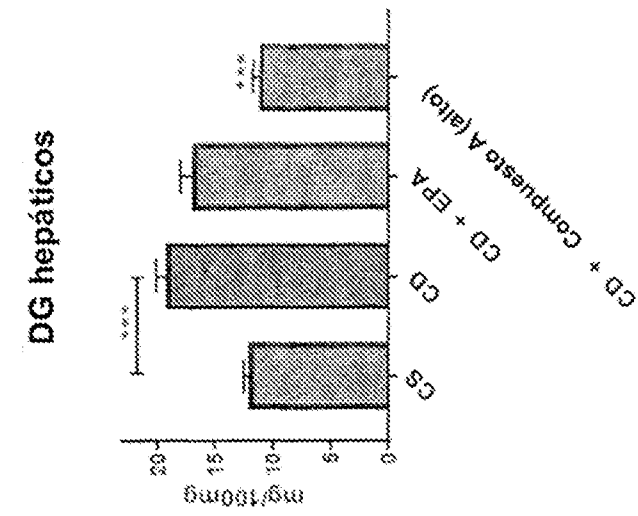


FIG. 2B

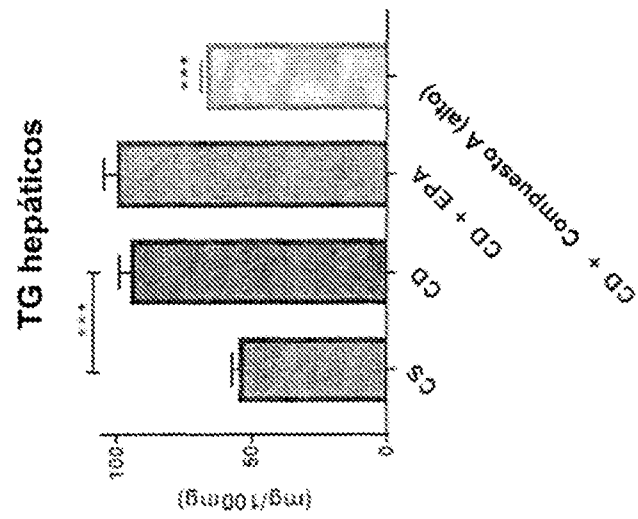


FIG. 2A

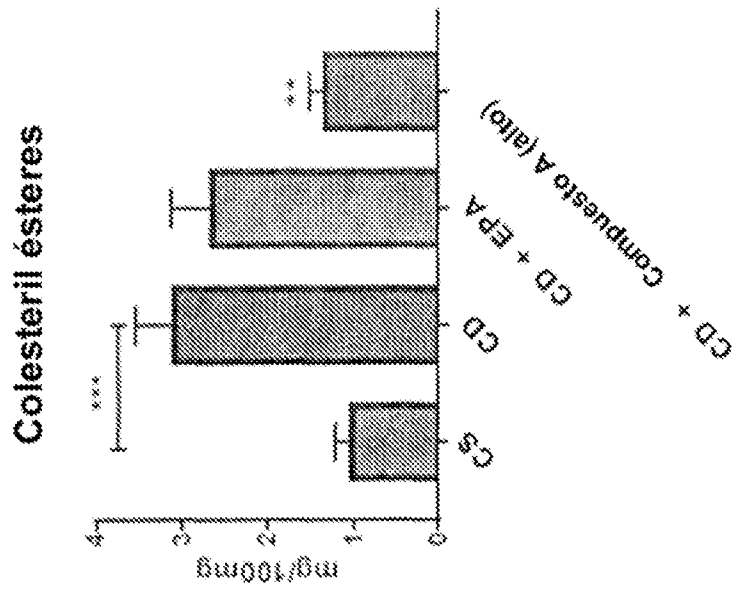


FIG. 2D

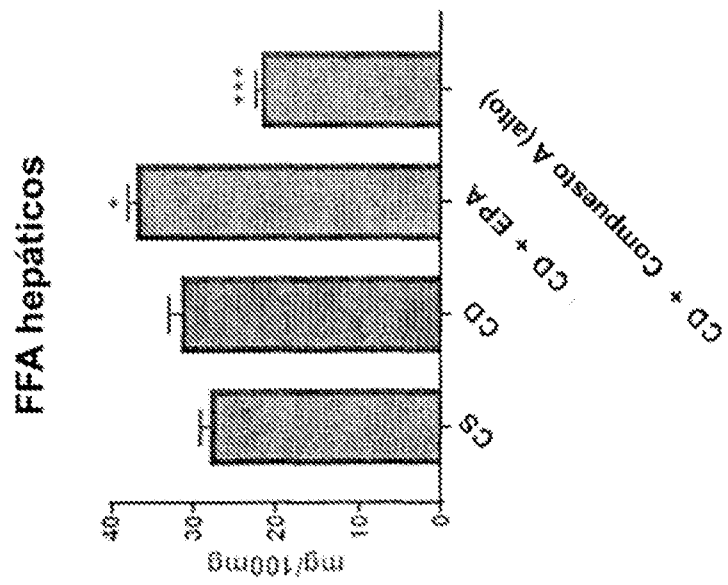
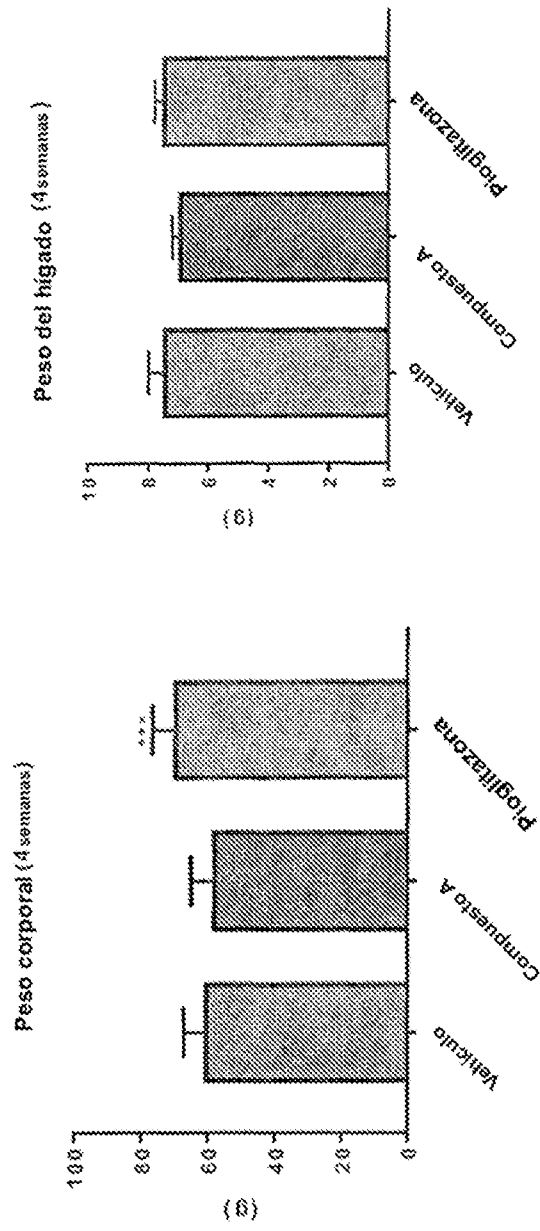


FIG. 2C



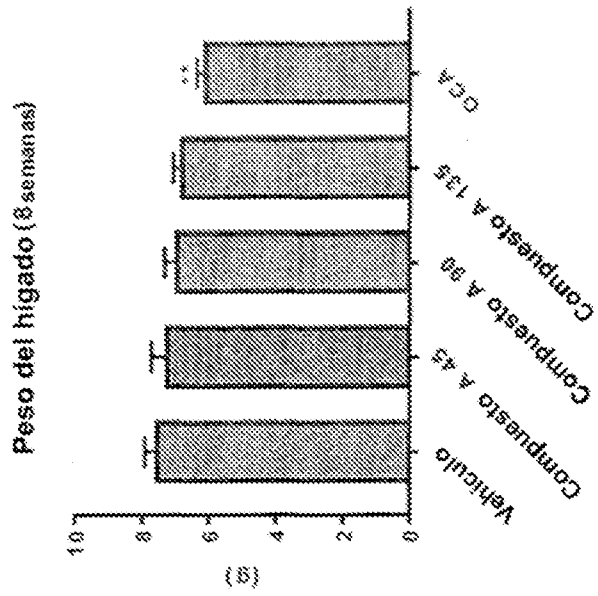


FIG. 3D

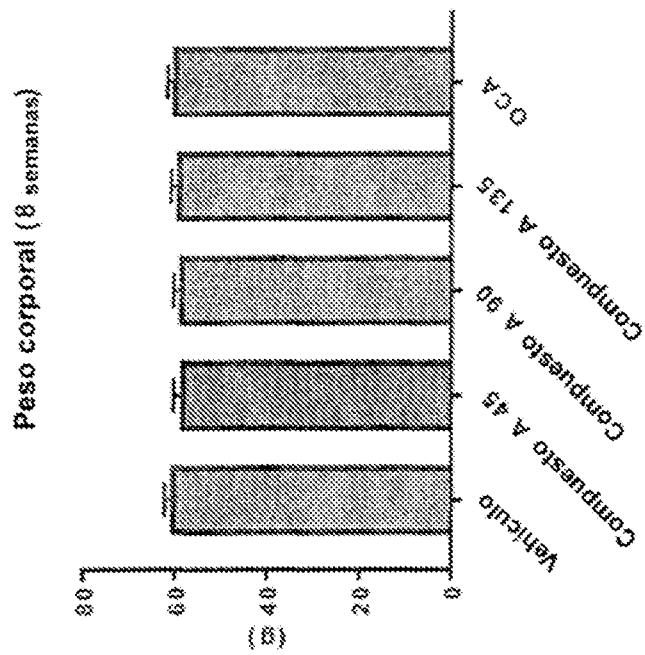


FIG. 3C

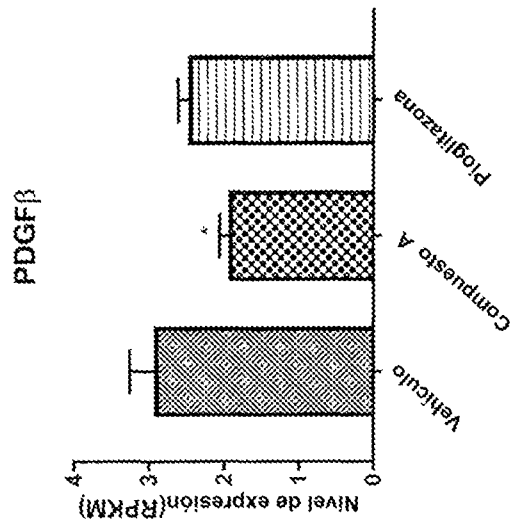


FIG. 4A

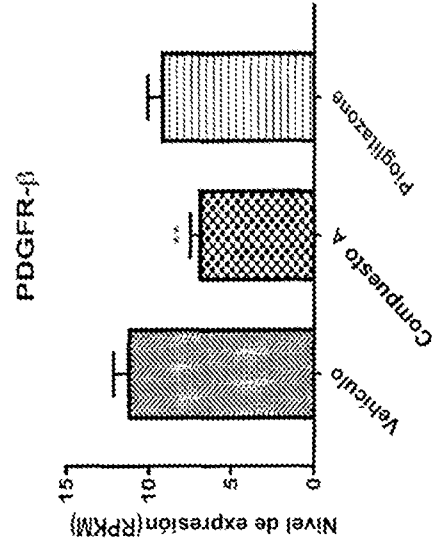


FIG. 4B

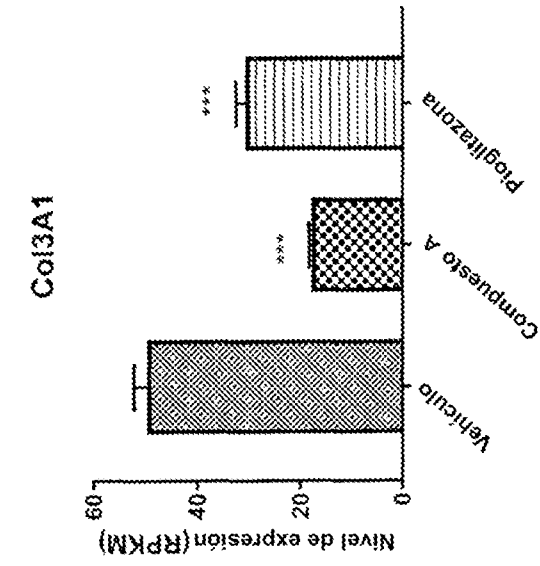


FIG. 4D

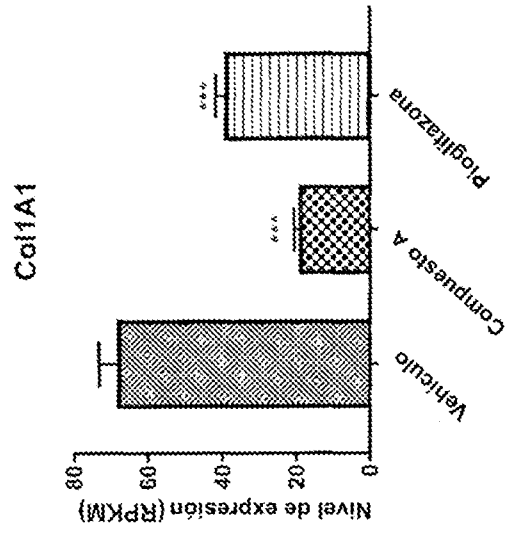


FIG. 4C

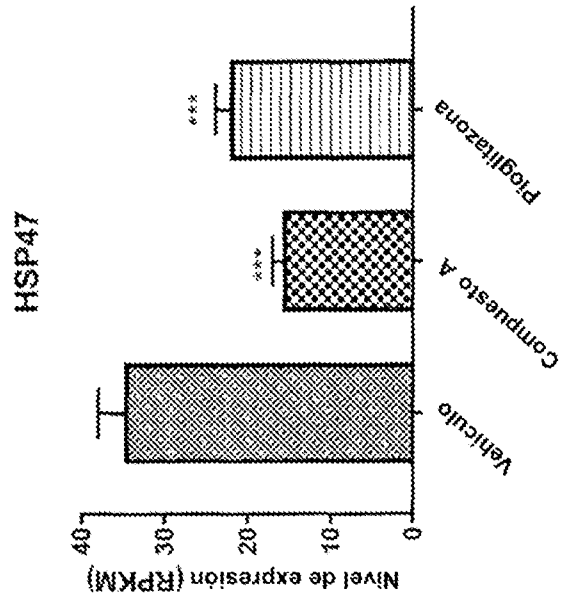


FIG. 4F

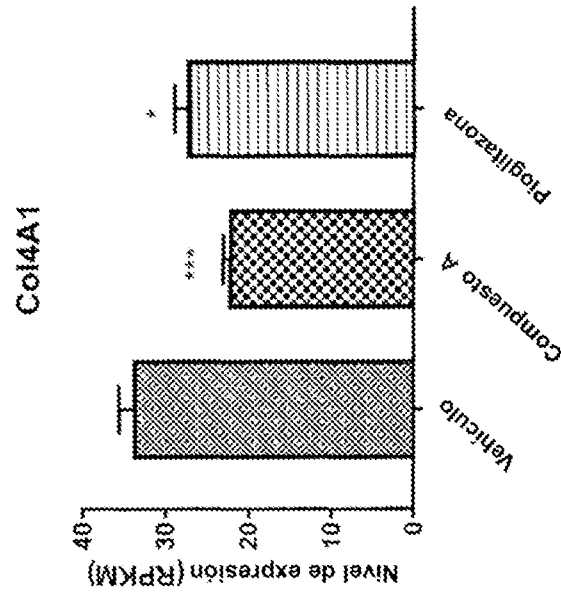


FIG. 4E

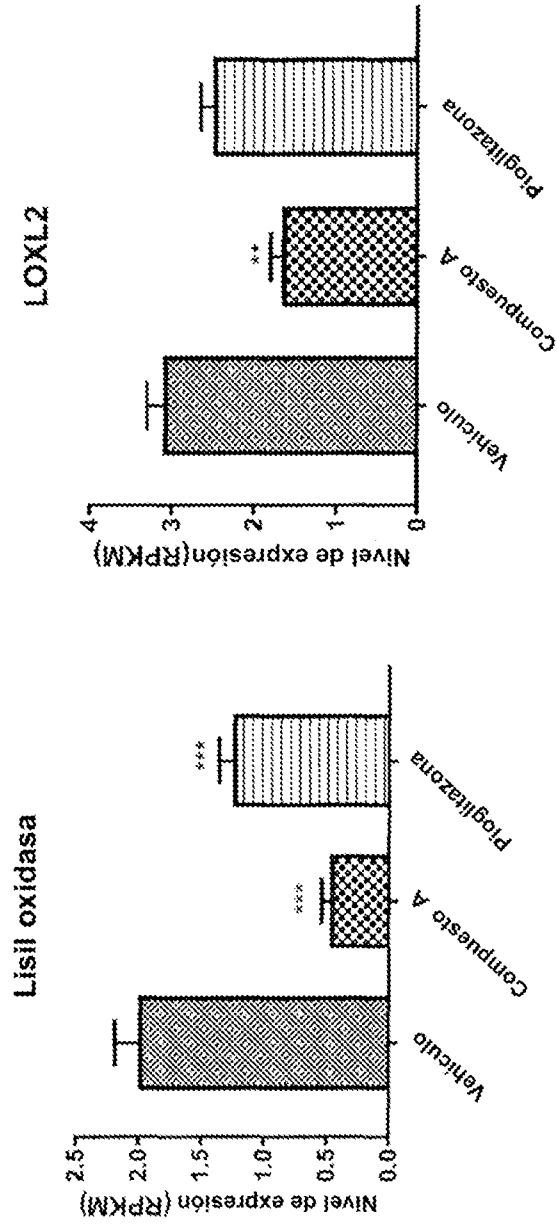


FIG. 5A

FIG. 5B

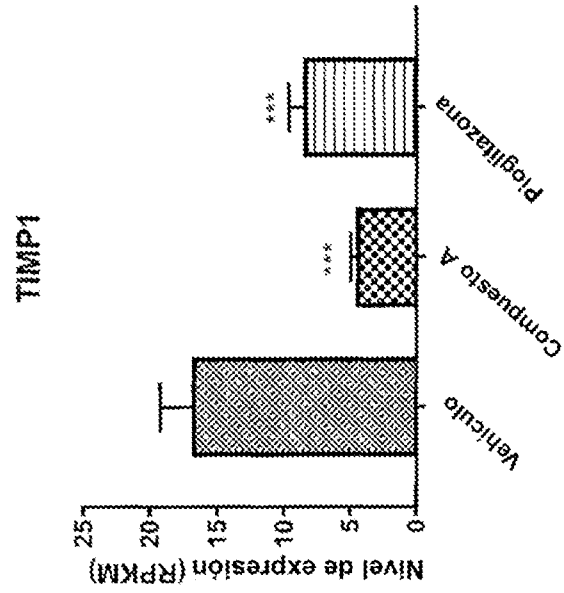


FIG. 5D

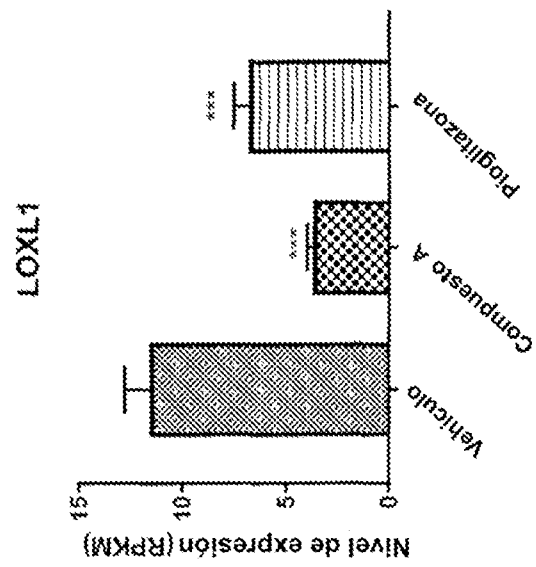


FIG. 5C

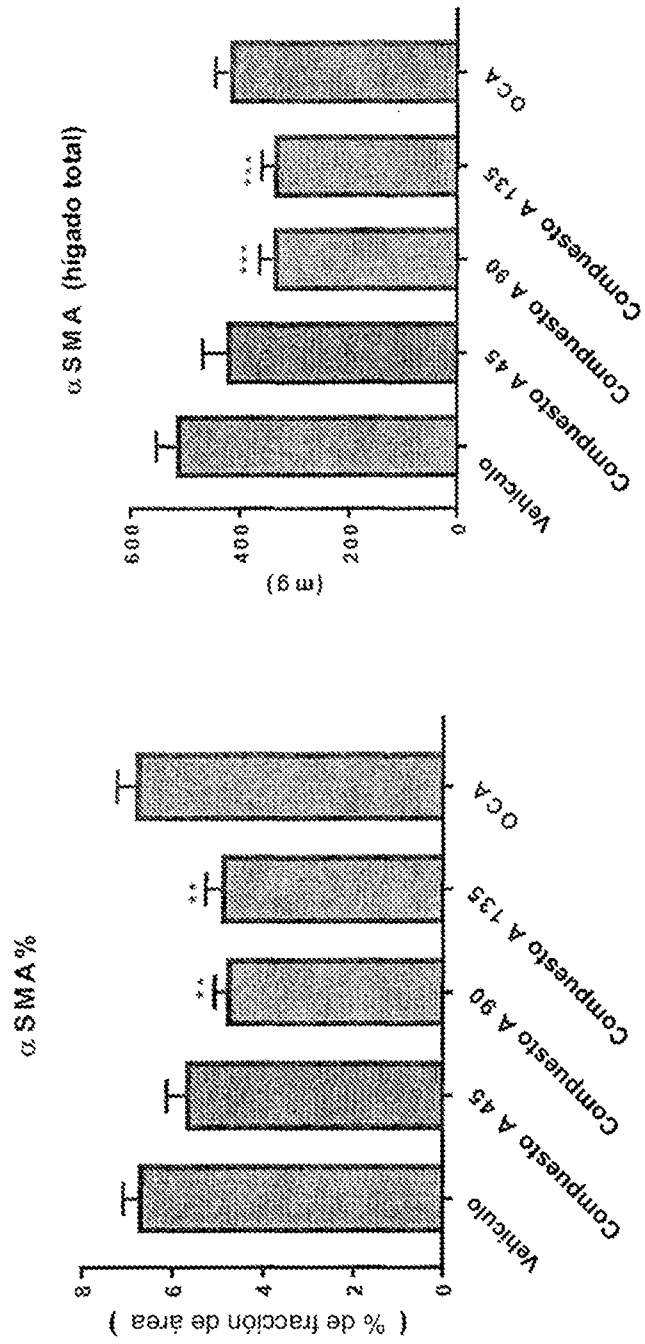


FIG. 6A

FIG. 6B

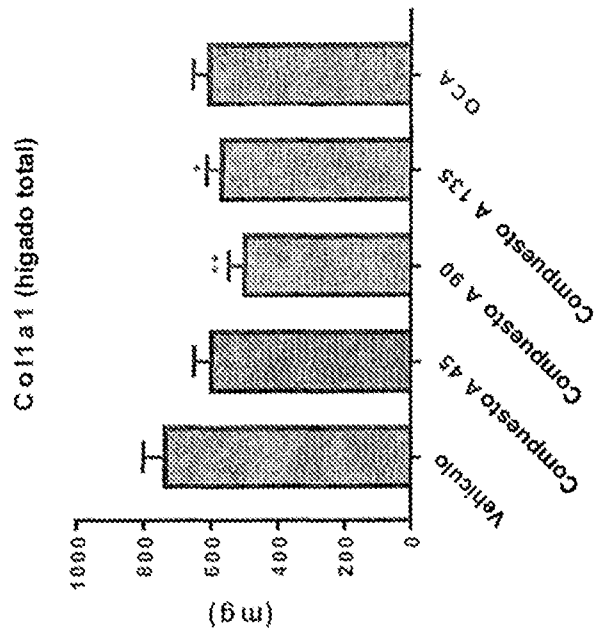


FIG. 6C

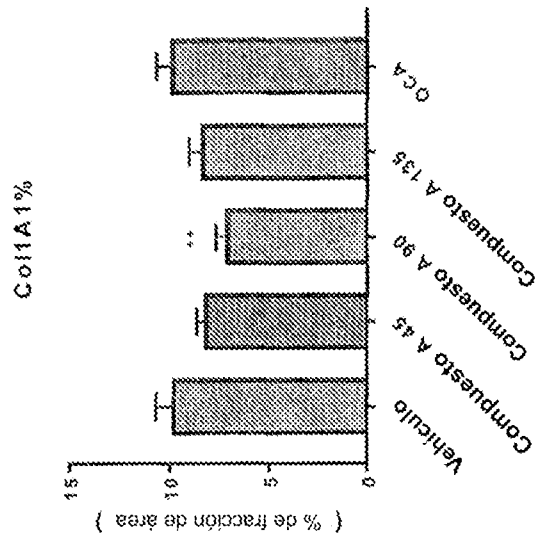


FIG. 6D

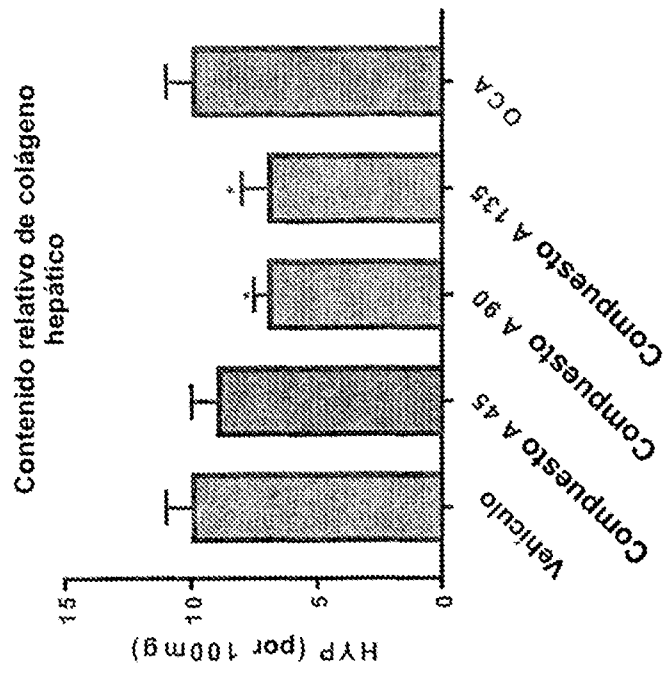


FIG. 6F

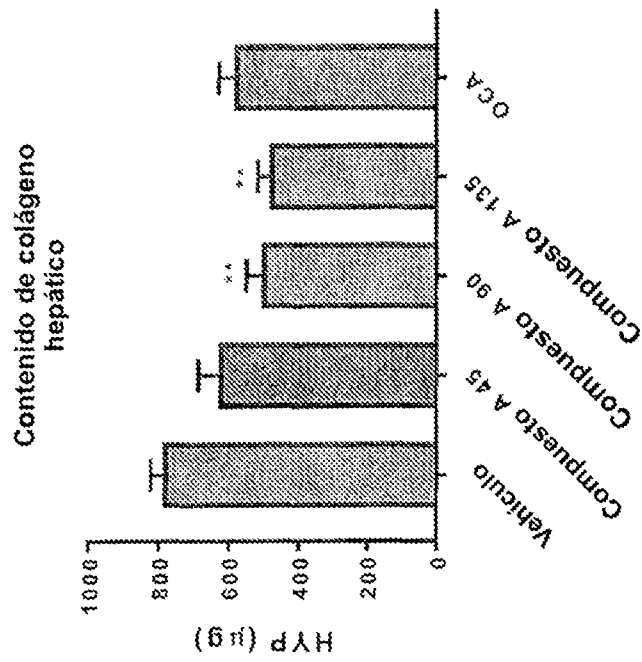
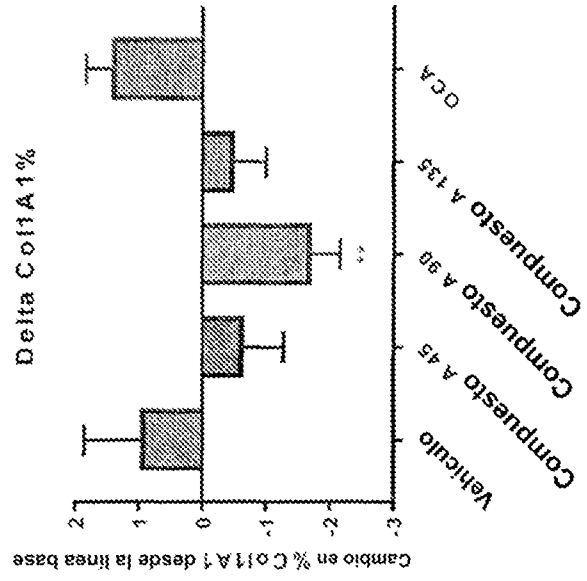
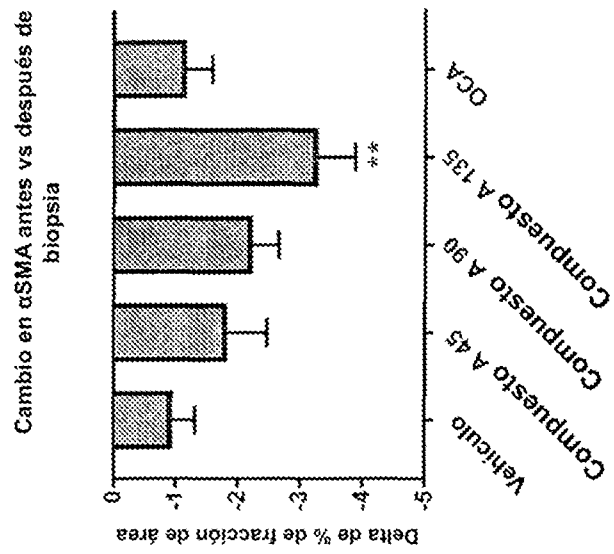


FIG. 6E



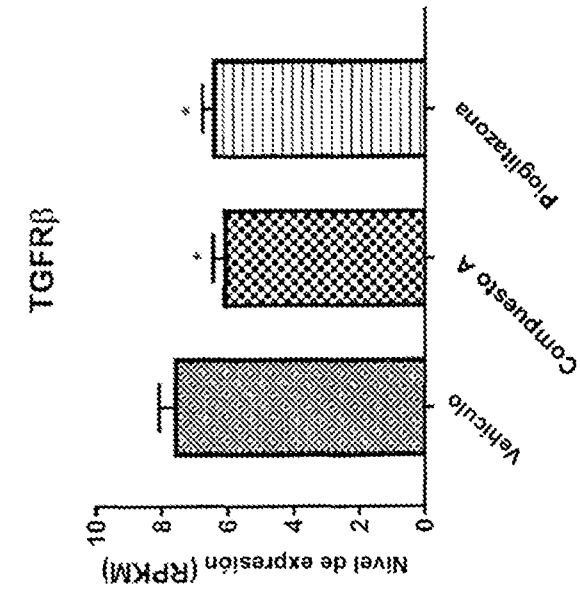


FIG. 8B

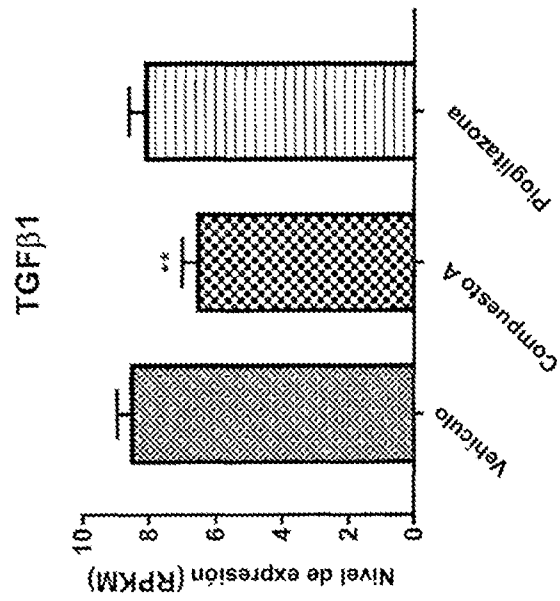


FIG. 8A

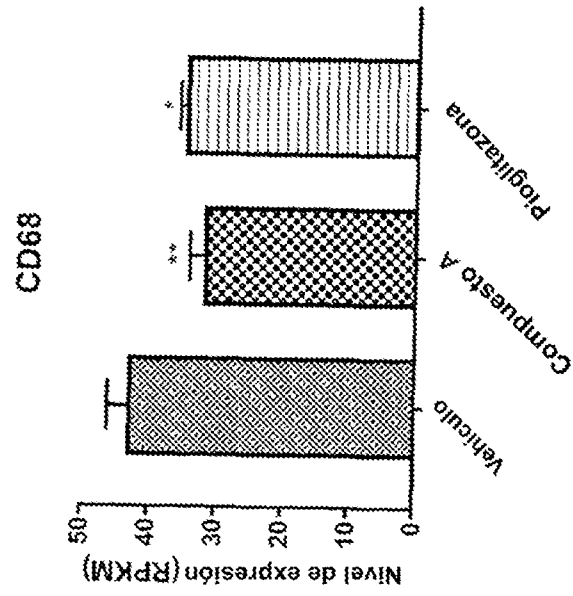


FIG. 8D

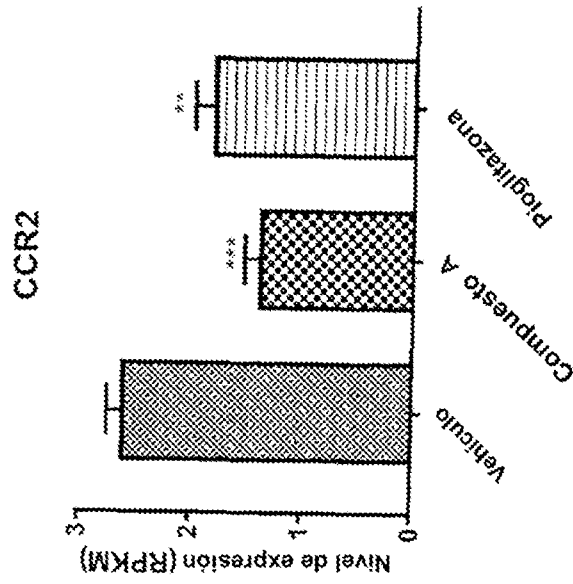


FIG. 8C

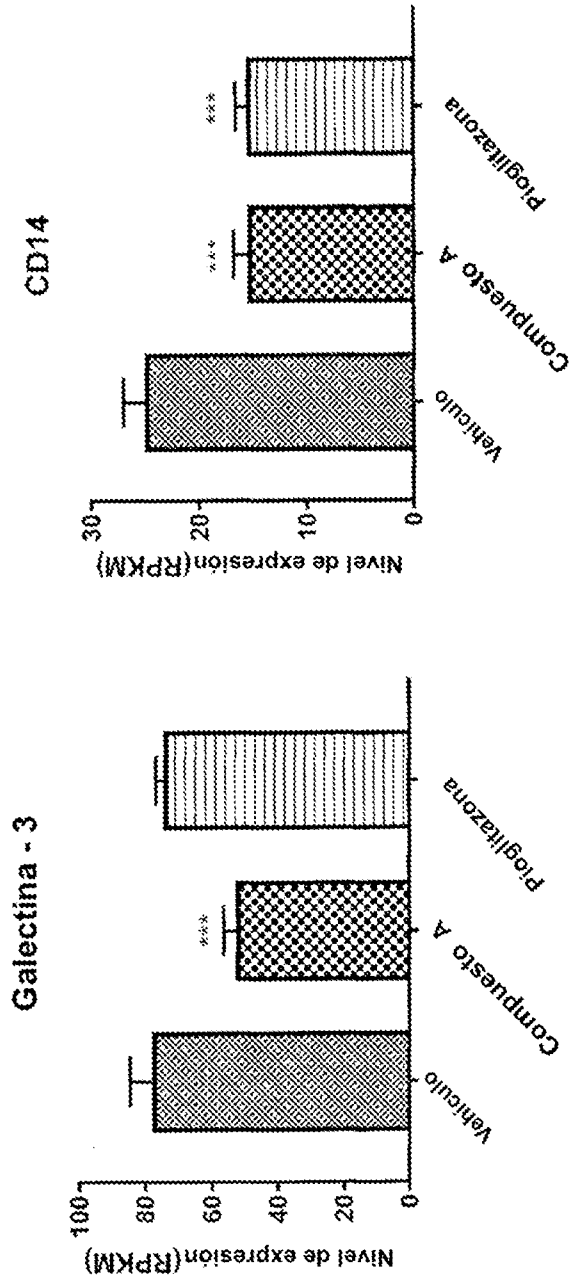


FIG. 8E

FIG. 8F

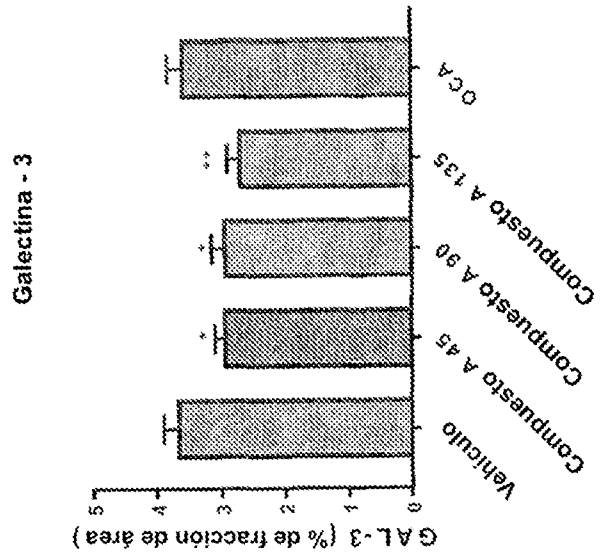


FIG. 9B

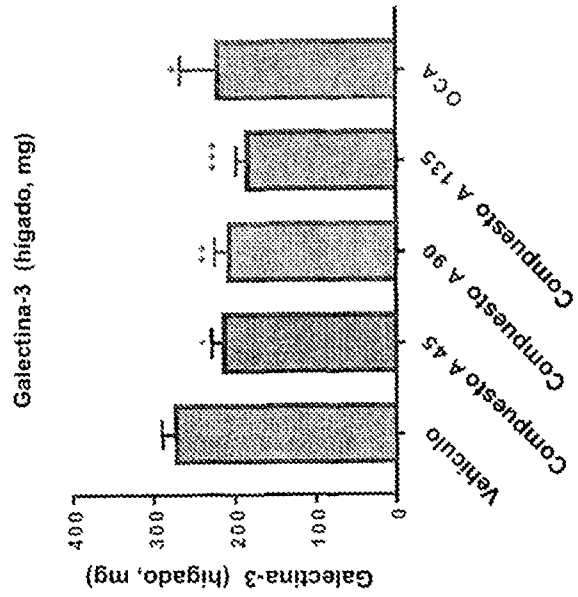


FIG. 9A

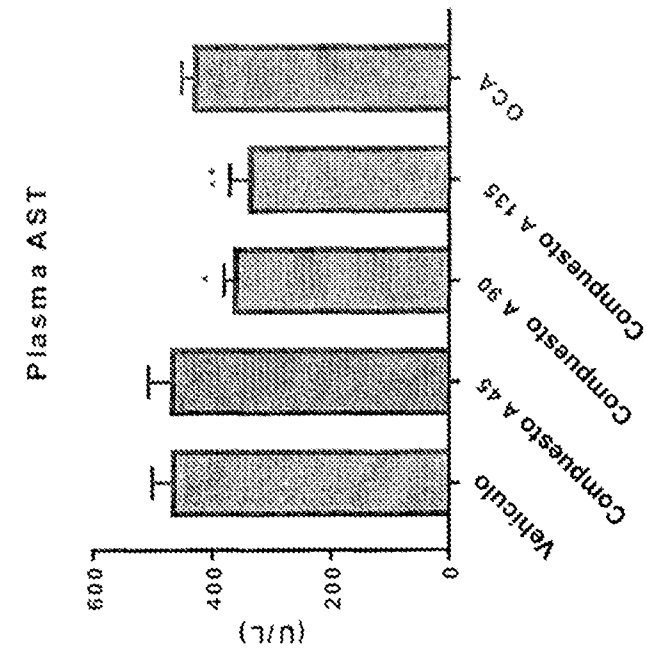


FIG. 10B

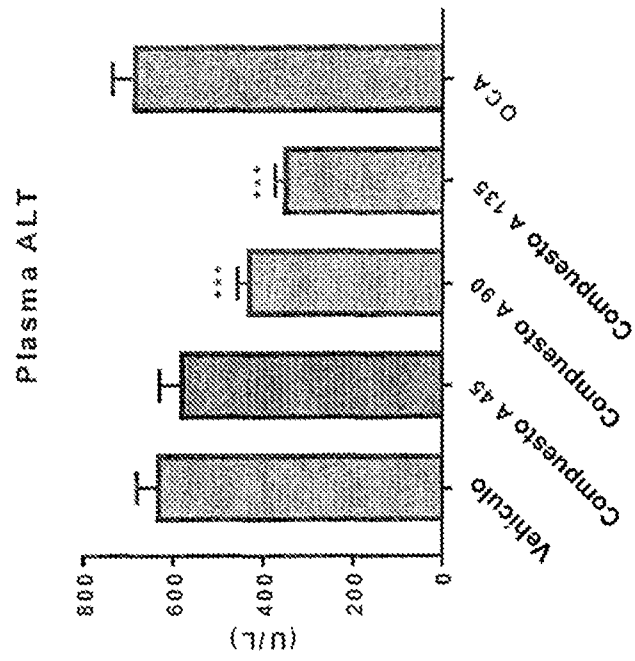


FIG. 10A

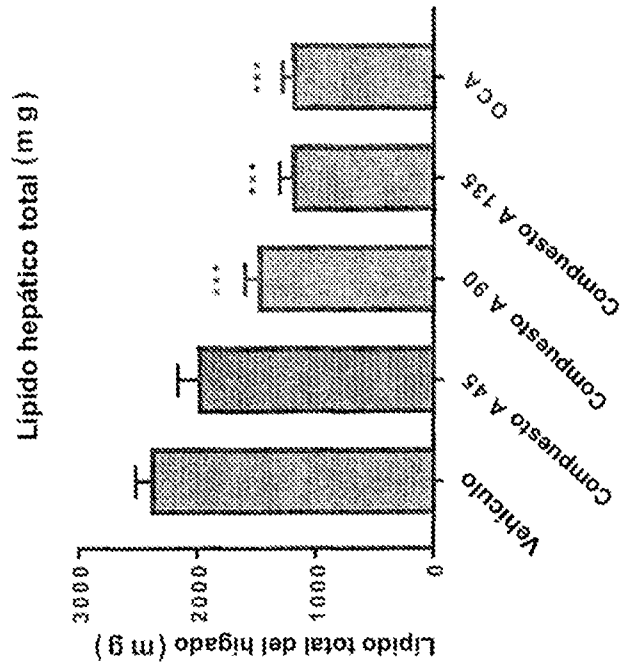


FIG. 11B

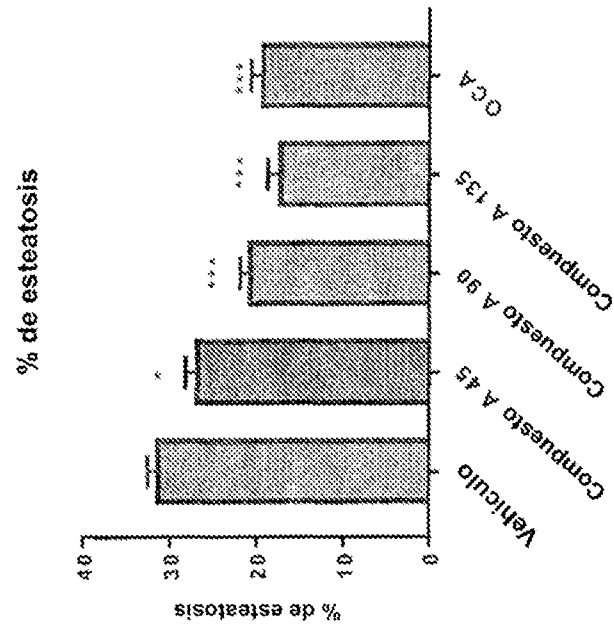


FIG. 11A

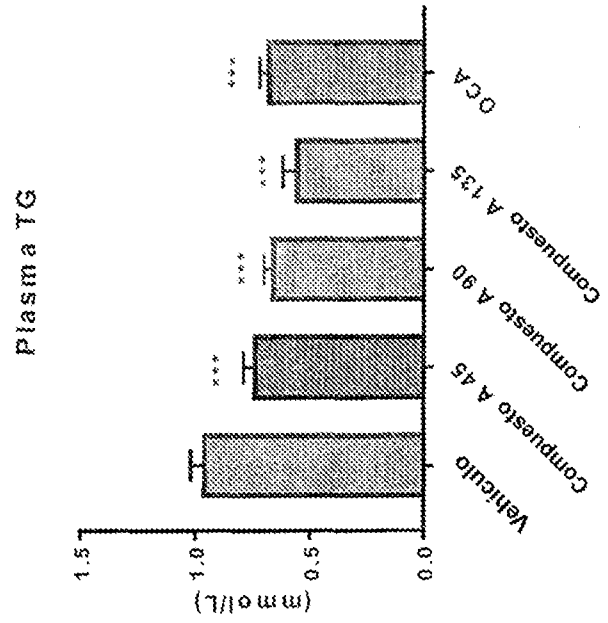


FIG. 11D

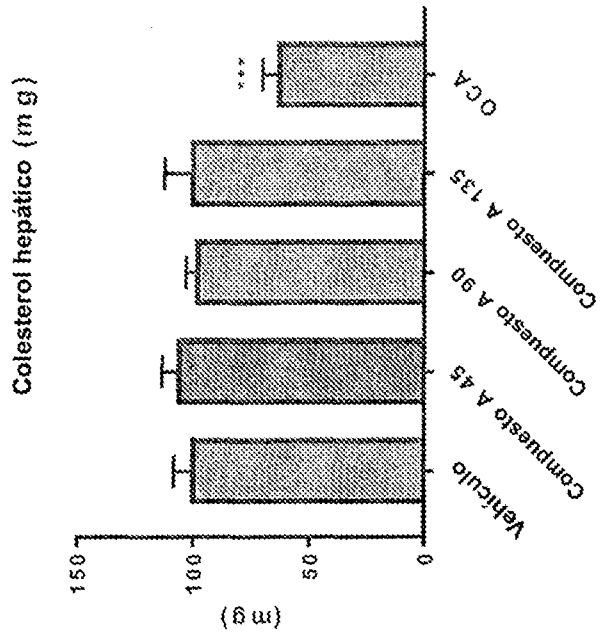


FIG. 11C

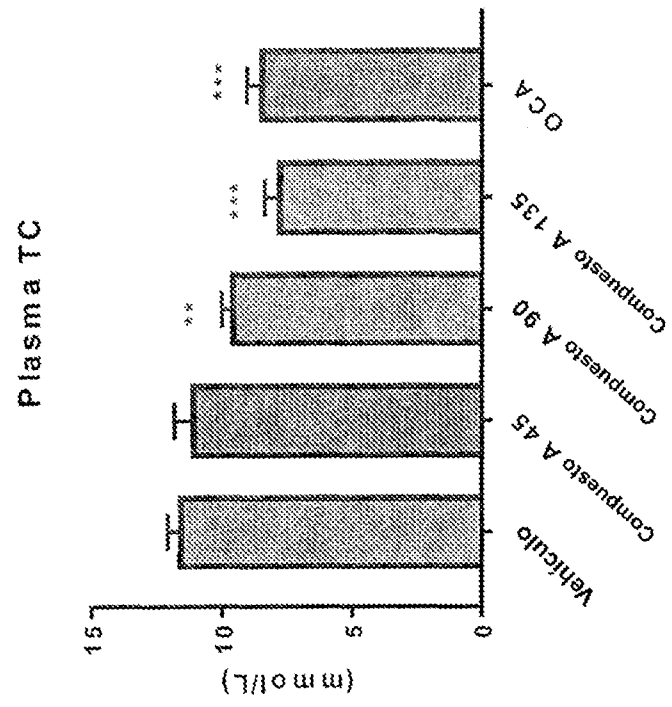


FIG. 11E

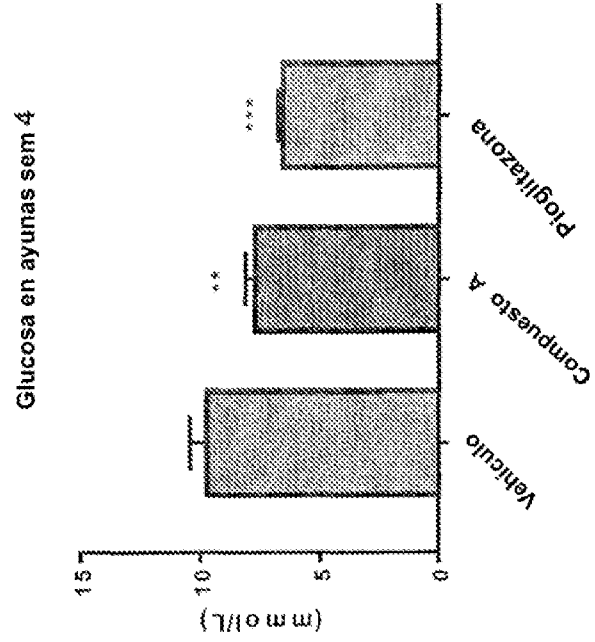


FIG. 12B

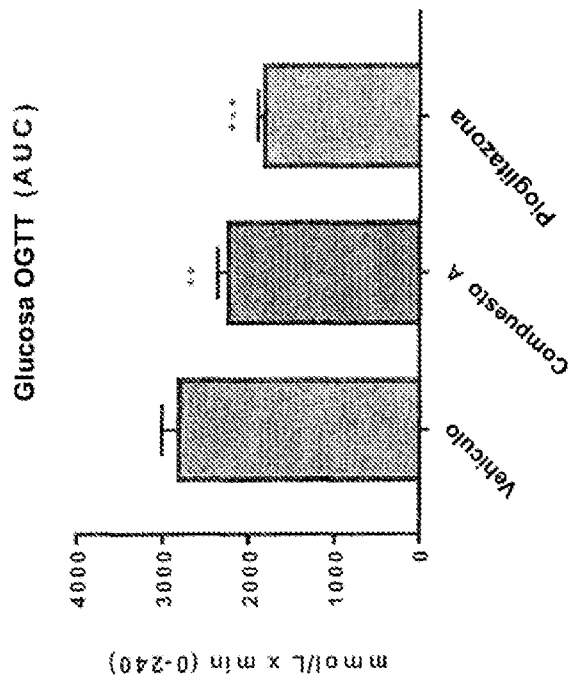


FIG. 12A

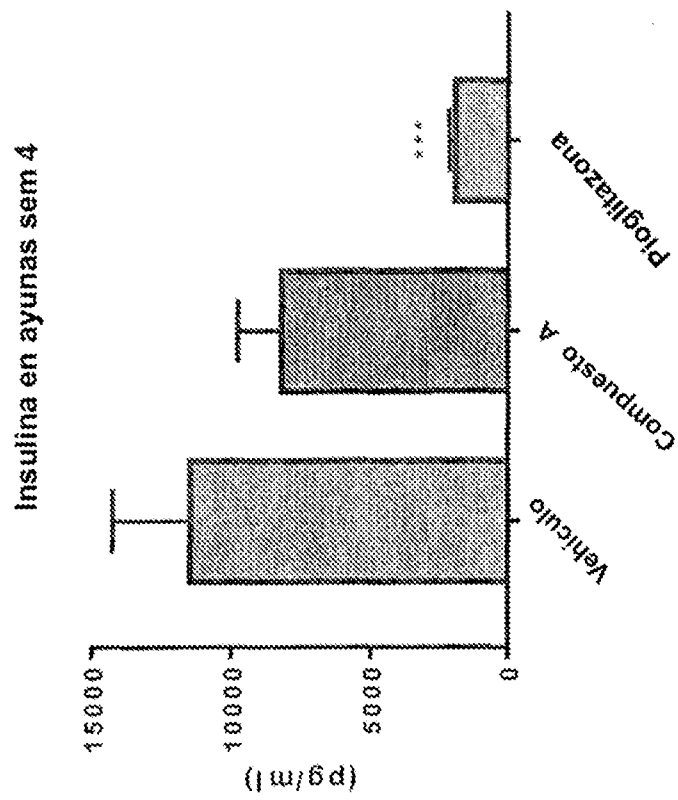


FIG. 12C

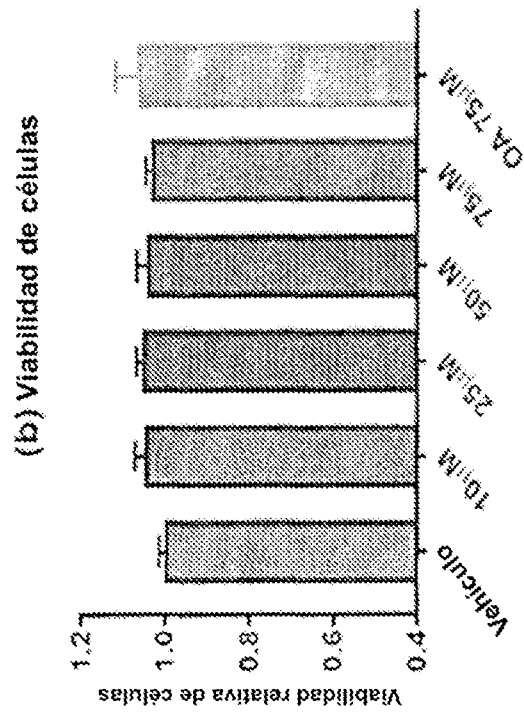


FIG. 13B

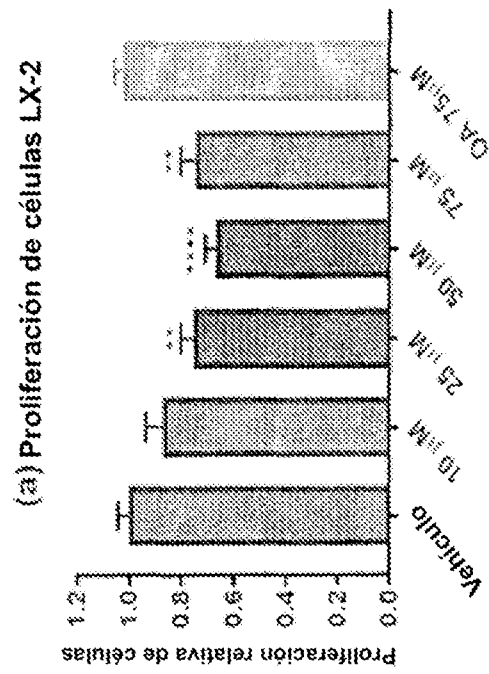


FIG. 13A