

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 371**

51 Int. Cl.:

C07C 59/42 (2006.01)
A61K 31/191 (2006.01)
C07D 303/12 (2006.01)
A61K 31/336 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/202 (2006.01)
A61K 31/232 (2006.01)
C11C 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2009 E 09815065 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 2344441**

54 Título: **Compuestos del ácido 7,14-dihidroxidocosahexaenoico**

30 Prioridad:

18.12.2008 US 138652 P
16.09.2008 US 97328 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.05.2016

73 Titular/es:

THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL INC.
(100.0%)
Corporate Sponsored Research and Licensing
101 Huntington Avenue, 4th Floor
Boston, MA 02199-8001, US

72 Inventor/es:

SERHAN, CHARLES, N. y
YANG, RONG

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 569 371 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

Compuestos del ácido 7,14-dihidroxicosaheptaenoico

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente provisional nº de serie 61/138.652, titulada "Compuestos del ácido 14-hidroxicosaheptaenoico", presentada el 18 de diciembre de 2008 y la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº de serie 61/097.328, titulada "Compuestos del ácido 14-hidroxicosaheptaenoico", presentada el 16 de septiembre de 2008.

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere en general a análogos dihidroxílicos del ácido docosaheptaenoico (DHA) novedosos que tienen todos un grupo hidroxilo en C-14 de la cadena de carbono y un segundo grupo hidroxilo en la posición C-7 de la cadena de carbono.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Dada la contribución de la inflamación incontrolada a muchas enfermedades humanas, la identificación de los mecanismos de control endógenos en la respuesta inflamatoria aguda es de amplio interés (1). Los mediadores lipídicos clásicos tales como prostaglandinas y leucotrienos son bien apreciados por sus importantes papeles proinflamatorios en la inflamación (2). En los últimos años, la resolución de la inflamación ha surgido como un área de un considerable potencial de contener mediadores locales que pueden ser útiles para nuevos enfoques terapéuticos (para revisiones, véanse 3, 4). Usando un enfoque de sistemas no sesgados que emplea la lipidómica, proteómica y el tráfico celular para estudiar exudados inflamatorios autorresolutivos, se reveló que la terminación de la inflamación aguda implica procesos biosintéticos activos produciendo mediadores lipídicos endógenos novedosos que son tanto antiinflamatorios como prorresolutivos (5-8). Resulta ahora evidente que la resolución de la inflamación aguda es un proceso activo en lugar de pasivo como se entendía anteriormente (9), generando mediadores contrarreguladores potentes y novedosos denominados resolvinas y protectinas (para una revisión reciente, véase la Ref. 4).

Las resolvinas y protectinas se biosintetizan por exudados a partir de ácidos grasos omega-3 esenciales (p.ej. EPA y DHA), y las estructuras están establecidas para los miembros clave de estas familias (4). Las acciones inmunorreguladoras de los ácidos grasos omega-3 y sus papeles en la salud y enfermedades humanas tales como cáncer y neuroinflamación son ampliamente apreciadas (10-12). Aunque los ácidos grasos omega-3 son de amplio uso como suplementos dietéticos y productos terapéuticos potenciales en muchas enfermedades, incluyendo enfermedades inflamatorias, su mecanismo o mecanismos y su relación con la inflamación continúan siendo de interés. Las resolvinas y protectinas exhiben potentes acciones antiinflamatorias y prorresolutivas multinivel (13) y son miembros de un nuevo género de mediadores endógenos de la resolución (4). Por ejemplo, la resolvina E1 se biosintetiza a partir de EPA e interacciona con receptores específicos que controlan las células inflamatorias (14, 15). También los ratones transgénicos *fat-1*, productores de altos niveles endógenos de omega-3, muestran un estado inflamatorio reducido y niveles elevados de resolvinas y protectinas que, cuando se administran reducen la inflamación y estimulan la resolución (16-18). La principal vía biosintética a partir de DHA para resolvinas y protectinas procede durante la resolución a través de un intermedio 17S-hidroxicosaheptaenoico producido por un mecanismo de lipooxigenasa. Con la terapia de aspirina, la ciclooxigenasa-2 acetilada produce 17R-epímeros de resolvinas y protectinas originados por aspirina, así como potencia su formación (6). La deficiencia genética o sobreexpresión de 12/15-LOX de murino regula la producción de resolvinas y protectinas y altera sus respuestas tanto ante lesión térmica como ante la extensión de la aterosclerosis (17, 18).

Las oxilipinas son conocidas por ser útiles como compuestos antiinflamatorios o antineurodegenerativos (33).

Por lo tanto, existe la necesidad de una comprensión adicional, de una exploración y/o identificación de nuevos materiales útiles anteriormente no apreciados como mediadores biológicos potentes de interés.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

Se proporcionan evidencias de una nueva ruta de mediadores operativos en la resolución de la inflamación aguda que poseen acciones potentes con PMN y MΦs. La identificación de estos nuevos mediadores, conocidos como

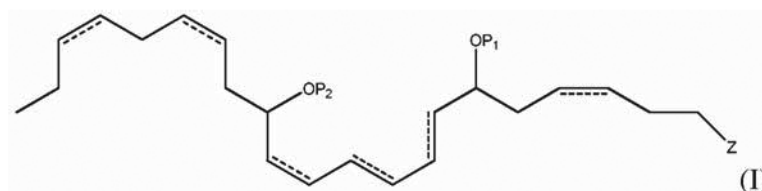
maresinas (mediadores de macrófago para resolver la inflamación), proporciona evidencias para autacoides producidos a partir de ácidos grasos omega-3 esenciales mediante una nueva ruta que puede estar ligada a la homeostasis, resolución de la inflamación, curación de heridas y cáncer.

- 5 Por tanto, la presente divulgación proporciona evidencias para nuevos mediadores y una ruta operativa durante la resolución de inflamación aguda que convierte el DHA en una serie 14S de análogos de DHA novedosos que poseen potentes acciones antiinflamatorias y preresolutivas duales tanto con neutrófilos como macrófagos. La identificación de estas nuevas series 14S de análogos de DHA proporciona evidencias adicionales para mediadores locales producidos por ácidos grasos omega-3 esenciales que pueden ligar las acciones beneficiosas conocidas del
- 10 DHA en los sistemas orgánicos con acciones reductoras de enfermedad inflamatoria y cáncer en seres humanos.

La presente invención proporciona sorprendentemente compuestos, composiciones y usos novedosos que se refieren a análogos dihidroxílicos del ácido docosahexaenoico (DHA), que tienen todos un grupo hidroxilo en C-14 de la cadena de carbono y un segundo grupo hidroxilo en la posición C-7 de la cadena de carbono. Estos materiales

15 se biogénicamente derivados y se aislados del medio.

En una realización, la invención hace referencia a un análogo de DHA nuevo y útil tal como un compuesto que comprende la fórmula (I):



20

donde cada uno de P₁ y P₂ es individualmente un grupo protector o un átomo de hidrógeno;

donde --- es un doble enlace;

donde los dobles enlaces en las posiciones 4, 16 y 19 son cada uno de configuración Z y el doble enlace en la

25 posición 10 es de configuración E;

donde Z es -C(O)OR^d, -C(O)NR^cR^c, -C(O)H, -C(NH)NR^cR^c, -C(S)H, -C(S)OR^d, -C(S)NR^cR^c o -CN;

cada R^a se selecciona independientemente de entre hidrógeno, alquilo (C1-C6), cicloalquilo (C3-C8), cicloalquilalquilo (C4-C11), arilo (C5-C10), fenilo, arilalquilo (C6-C16), bencilo, heteroalquilo de 2-6 miembros, cicloheteroalquilo de 3-8 miembros, morfolinilo, piperazinilo, homopiperazinilo, piperidinilo, cicloheteroalquilalquilo de

30 4-11 miembros, heteroarilo de 5-10 miembros y heteroarilalquilo de 6-16 miembros;

cada R^c es independientemente un grupo protector o R^a o, como alternativa, cada R^c se toma junto con el átomo de nitrógeno al que está unido formando un cicloheteroalquilo o heteroarilo de 5 a 8 miembros que puede incluir opcionalmente uno o más de los mismos o diferentes heteroátomos adicionales, y que puede estar opcionalmente

sustituido con uno o más de los mismos o diferentes grupos R^a o R^b adecuados;

35 cada R^b se selecciona independientemente de entre =O, -OR^d, haloalquilo C1-C3, -OCF₃, =S, -SR^d, =NR^d, =NOR^d, -NR^cR^c, halógeno, -CF₃, -CN, -NC, -OCN, -SCN, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -S(O)R^d, S(O)₂R^d, -S(O)₂OR^d, -S(O)NR^cR^c, -S(O)₂NR^cR^c, -OS(O)R^d, -OS(O)₂R^d, -OS(O)₂OR^d, -OS(O)₂NR^cR^c, -C(O)R^d, -C(O)OR^d, -C(O)NR^cR^c, -C(NH)NR^cR^c, -C(NR^a)NR^cR^c, -C(NOH)R^a, -C(NOH)NR^cR^c, -OC(O)R^d, -OC(O)OR^d, -OC(O)NR^cR^c, -OC(NH)NR^cR^c, -OC(NR^a)NR^cR^c, -[NHC(O)]_nR^d, -[NR^aC(O)]_nR^d, -[NHC(O)]_nOR^d, -[NR^aC(O)]_nOR^d, -[NHC(O)]_nNR^cR^c, -[NR^aC(O)]_nNR^cR^c,

40 [NHC(NH)]_nNR^cR^c o -[NR^aC(NR^a)]_nNR^cR^c;

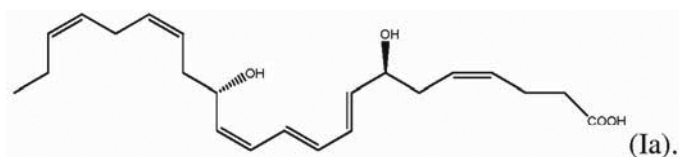
cada n es, independientemente, un entero de entre 0 a 3; y

cada R^d es, independientemente, un grupo protector o R^a;

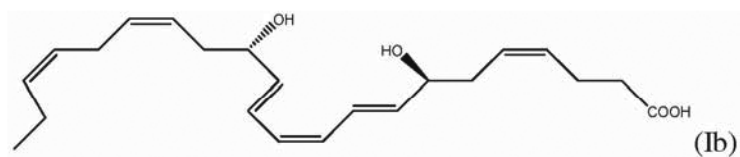
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a condición de que cuando Z es -C(O)OR^d, entonces R^d para Z no es un hidrógeno. En ciertos aspectos, P₁ y P₂ son ambos átomos de hidrógeno.

45

Un isómero de particular de interés del análogo de DHA (I) es (Ia), que comprende la fórmula:



Otro isómero de interés del análogo de DHA (I) es (Ib), que comprende la fórmula:



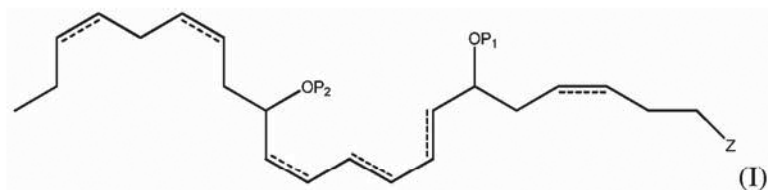
5

al que se hace referencia como el producto de “doble dioxigenación”.

Debería entenderse que los compuestos (Ia) y (Ib) incluyen todas las sales farmacéuticamente aceptables, ésteres de los mismos, las formas purificadas/aisladas, así como compuestos donde uno o ambos de los hidroxilos se convierten en un grupo protector como se describe en la presente memoria.

En otro aspecto, la presente invención proporciona análogos de DHA nuevos y útiles tales como un compuesto purificado que comprende la fórmula (I):

15



donde P_1 , P_2 , --- , Z , R^a , R^b , R^c , R^d y n son como se han definidos anteriormente, y donde los dobles enlaces en las posiciones 4, 16 y 19 están cada uno en configuración Z y el doble enlace en la posición 10 está en configuración E.

20 En un aspecto, P_1 y P_2 son ambos átomos de hidrógeno. En otro aspecto, Z es $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^d$ y R^d de Z es un átomo de hidrógeno. En aún otra realización, el 7-hidroxilo tiene una configuración S. En aún otra realización más, el 14-hidroxilo tiene una configuración S.

En otro aspecto, el alcohol C-14 tiene una configuración S para los compuestos indicados a lo largo de la solicitud.

25

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos de la invención, con o sin otros ingredientes farmacéuticos activos, en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicha preparación puede administrarse según los procedimientos descritos en la presente memoria.

30

En aún otro aspecto, la presente invención está dirigida a compuestos de la invención para uso en el tratamiento o la prevención de inflamación o enfermedad inflamatoria en un mamífero. El tratamiento o la prevención implican administrar una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de al menos un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica del mismo. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden usarse para tratar o

35 prevenir inflamación, cáncer, neurodegeneración, pérdida de memoria, arrugas, psoriasis, caspa o dermatitis administrando a un individuo que lo necesite una cantidad efectiva de cualquiera de los compuestos descritos en la presente memoria.

Adicionalmente, los compuestos de la invención pueden usarse para tratar el desarrollo neuronal, desarrollo fetal,

40 homeostasis, remodelación de tejidos o curación de heridas administrando a un individuo que lo necesite una

cantidad efectiva de cualquiera de los compuestos descritos en la presente memoria.

Los rasgos y ventajas adicionales de la invención resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

5

Aunque se dan a conocer múltiples realizaciones, resultarán evidentes aún otras realizaciones de la presente invención para los especialistas en la materia a partir de la siguiente descripción detallada. Como resultará evidente, la invención puede sufrir modificaciones en diversos aspectos obvios, todas sin apartarse del alcance de la presente invención como se define en las reivindicaciones. Por consiguiente, las descripciones detalladas han de

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Autorresolución de exudados inflamatorios agudos. Figura 1A. Curso temporal de la acumulación de PMN (línea de puntos), resolución y formación de HDHA durante peritonitis iniciada por zimosano. Se extrajeron los exudados para lipidómica orientada, usando CL/EM/EM. Los ácidos hidroxidocosahexaenoicos 17-HDHA (línea de trazos) y 14S-HDHA (línea recta) identificados usando los resultados de MRM son representativos (n= 3) y de PMN (n= 4). Figuras 1B y 1C. Espectros de masas representativos de 17-HDHA (Panel B) y 14S-HDHA (Panel C), n=3.

Figura 2. Los macrófagos generan productos novedosos. Figura 2A. MΦ residentes de murino (5×10^6 células/ml) incubados con DHA o 14S-HpDHA: lipidómica de mediador basada en CL/EM/EM orientada. Cromatograma iónico seleccionado (m/z 359/250) del ácido 7,14-dihidroxidocosahexaenoico (II) y su isómero conjugado trans (I). El cromatograma iónico seleccionado (dibujo superpuesto de trazos; m/z 359/250) muestra el producto de doble dioxigenación 7S,14S-diHDHA. Recuadro: FACS de MΦ residentes aislados.

25

Figura 2 Panel B. Lipidómica de mediador lipídico. Espectros de masas para el ácido 7,14-dihidroxidocosahexaenoico (m/z 359) y (Panel C) el isómero correspondiente. Véanse el recuadro y el texto para iones de diagnóstico, n= 3.

Figura 3. Productos de macrófagos antiinflamatorios novedosos. Figura 3A. Reducción de PMN en peritonitis de murino. Actividad en las fracciones de formiato de metilo de la extracción con C18 de MΦ aislados (negro), producto de MΦ (20 ng/ratón) aislado con HPLC-FI, PD1 (20 ng/ratón) o RvE1 (20 ng/ratón). Los resultados se expresan como exudado de PMN media \pm EEM (n= 3, *, p< 0,05, en comparación con zimosano más vehículo). Figura 3B Acciones diferenciales en PMN frente a monocitos. Se inyectó a los ratones el producto de doble dioxigenación (0,1 ng/ratón), aislamiento de MΦ (0,1 ng/ratón) o vehículo solo (como en el Panel A), seguido de inyección i.p. de zimosano (1 mg) para provocar peritonitis. Después de 2 h, se enumeraron los leucocitos. *Barra negra*, PMN; *barra rayada*, células mononucleares. Los resultados son media \pm EEM (n=3, *, p<0,05, en comparación con zimosano más vehículo; †, p< 0,05, doble dioxigenación frente a aislamiento de MΦ). Figura 3C. Reducción de peritonitis: Respuesta a la dosis. Se inyectó i.v. el producto de MΦ aislado después de aislamiento por HPLC ~2 min antes del zimosano i.p. Los resultados son medias \pm EEM (n= 3, *, p< 0,05, en comparación con zimosano más vehículo).

40

Figura 3D. MaR1 potencia la fagocitosis. Se expusieron MΦ (placa de 24 pocillos, 10^5 células/pocillo) a las concentraciones indicadas durante 15 min seguido de zimosano marcado con FITC (30 min, 37 °C). Los resultados son medias \pm EEM expresados como % de aumento por encima del vehículo (n= 3, *, p< 0,05 en comparación con vehículo; †, p< 0,05, doble dioxigenación frente a MaR1). *Rombo negro*, MaR1. *Cuadrado negro*, producto de doble dioxigenación 7S,14S-diHDHA. *Recuadro*, Comparación de MaR1 con otros mediadores [1 nM].

45

Figura 4. Identificación del producto de atrapamiento de metoxilo de MΦ. Espectro de EM/EM del producto de m/z 373 a 10,2 min. *Recuadro*: Cromatograma de ion extraído de m/z 373-263 y estructura deducida.

50

Figura 5. Esquema biosintético propuesto para maresina 1 y productos relacionados. Las estereoquímicas y geometrías de doble enlace de los nuevos mediadores que contienen dihidroxilo son asignaciones provisionales y representadas en las configuraciones probables basadas en la síntesis biogénica, atrapamiento y marcaje.

La Figura 6 muestra el espectro de EM-EM del producto novedoso obtenido con incubaciones con $H_2^{18}O$ y MΦ.

55

La Figura 7 es el espectro de CG-EM obtenido para el diol vecinal de 13,14-dihidroxilo a partir de DHA y MΦ. Este derivado de producto se obtuvo después de tratamiento con diazometano y BSTFA, dando el éter metílico derivado de OTMS.

La Figura 8 es un esquema de síntesis general para preparar un tipo de análogo que es aplicable a análogos di- y trihidroxílicos.

5 La Figure 9 es un esquema sintético general para preparar un análogo fluorado terminal.

La Figura 10 representa las estructuras, fragmentación por CL-EM y CG-EM para compuestos de serie 14 novedosos identificados usando lipidómica basada en mediador. ^aSe efectuó el análisis de CL-EM/EM con un HPLC Agilent 1100 series acoplado con un espectrómetro de masas cuadrupolar de atrapamiento de ion lineal ABI Sciex
 10 Instruments 3200 Qtrap equipado con una columna Agilent Eclipse Plus C18 (4,6 mm x 50 mm x 1,8 µm). La fase móvil consistía en metanol/agua/ácido acético (60/40/0,01; v/v/v) y se escalonó a 80/20/0,1 (v/v/v) durante 7,5 minutos y a 95/5/0,01 (v/v/v) durante los siguientes 4,5 minutos a un caudal de 400 µl/min. Se redujo el caudal a 200 µl/min durante 3 minutos, se devolvió entonces a 400 µl/min y se escalonó la fase móvil durante los siguientes 6 minutos hasta 100/0/0,01 (v/v/v) antes de volver a 60/40/0,01 (v/v/v). ^bSe efectuó el análisis de CG-EM con un
 15 Agilent HP6890 equipado con un detector de masas HP5973N. Se empleó una columna HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) con un programa de temperatura; la temperatura inicial era de 150 °C, seguido de 230 °C (8 min) y 280 °C (10 min) con un caudal de helio de 1,0 ml/min. Se prepararon derivados de trimetilsililo después del tratamiento con diazometano. ^cSe registraron los espectros en metanol usando un espectrofotómetro Agilent 4682 UV-Vis o un DAD Agilent 1100 series *Las estereoquímicas mostradas son asignaciones provisionales. Las geometrías de doble
 20 enlace se muestran en las configuraciones probables basadas en las rutas biosintéticas propuestas.

DESCRIPCION DETALLADA

Los mecanismos celulares y moleculares endógenos que controlan la inflamación aguda y su resolución son de
 25 amplio interés. Usando exudados inflamatorios autorresolutivos y lipidómica, se identificó una nueva ruta que implica la biosíntesis de potentes mediadores antiinflamatorios y prorresolutivos a partir del ácido graso esencial ácido docosahexaenoico (DHA) por macrófagos. Durante la resolución de la peritonitis de murino, los exudados acumulaban tanto 17-HDHA, un conocido marcador de la serie 17S-D de biosíntesis de resolvina y protectina, como
 30 14S-HDHA de DHA endógeno. La adición de DHA o ácido 14S-hidroperoxidocosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico (14S-HpDHA) a macrófagos activados convertía estos sustratos en productos que contienen dihidroxilo novedosos que poseen una potente actividad antiinflamatoria y prorresolutiva con una potencia similar a la resolvina E1 y la protectina D1. La incorporación de isótopos estables, atrapamiento de intermedios y caracterización de las propiedades físicas y biológicas de los productos demostraron una ruta novedosa de 14-lipooxigenasa que genera
 35 ácido 7,14-dihidroxicocosa-4Z,8,10,12,16Z,19Z-hexaenoico bioactivo, denominado maresina (mediador de macrófago en la resolución de la inflamación: MaR), que potencia la resolución. Estos hallazgos proporcionan que las maresinas y este nuevo metaboloma están implicados en algunas de las acciones beneficiosas de DHA y macrófagos en la homeostasis de tejido, resolución de inflamación, curación de heridas y defensa del hospedador.

Abreviaturas usadas a lo largo de la memoria descriptiva:

40 7S,14S-diHDHA (doble dioxigenación), ácido 7S,14S-dihidroxicocosa-4Z,8E,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico
 14S-HDHA, ácido 14S-hidroxicocosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico
 14S-HpDHA, ácido 14S-hidroperoxidocosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico
 17S-HDHA, ácido 17S-hidroxicocosa-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-hexaenoico
 45 DHA, ácido docosahexaenoico
 CG-EM, cromatografía de gases-espectrometría de masas
 CL/EM/EM, cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem
 LOX, lipooxigenasa
 MaR, maresina, mediador de macrófago en la resolución de inflamación
 50 MΦ, macrófago
 PD1, protectina D1, ácido 10R,17S-dihidroxicocosa-4Z,7Z,11E,13E,15Z,19Z-hexaenoico
 PGE², prostaglandina E₂
 PMN, neutrófilos polimorfonucleares
 Rv, resolvina
 55 RvD1, resolvina D1, ácido 7S,8R,17S-trihidroxicocosa-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-hexaenoico
 RvE1, resolvina E1, ácido 5S,12R,18R-trihidroxicocosa-6Z,8E,10E,14Z,16E-pentaenoico

En la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, los términos “incluye” y “comprende” son términos de extremos abiertos y debería interpretarse que significan “incluye pero sin limitación”. Estos términos engloban los términos

más restrictivos “consiste esencialmente en” y “consiste en”.

Debe indicarse que, como se usan en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las forma singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen la referencia plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. También los términos “un” (o “una”), “uno o más” y “al menos uno” pueden usarse intercambiabilmente en la presente memoria. También ha de indicarse que los términos “comprende”, “incluye” caracterizado por” y “tiene” pueden usarse intercambiabilmente.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que se entienden comúnmente por un especialista en la materia a la que pertenece esta invención. Todas las referencias citadas en esta memoria descriptiva han de tomarse como indicativas del nivel de conocimiento en la materia. Nada en la presente memoria ha de considerarse como administración de que la invención no está facultada a anteponer dicha divulgación en virtud de la invención anterior.

“Compuestos de la invención” hace referencia a los análogos de dihidroxi-DHA y compuestos englobados por las fórmulas genéricas dadas a conocer en la presente memoria, e incluyen cualquier compuesto específico de estas fórmulas cuya estructura se dé a conocer en la presente memoria. Los compuestos de la invención pueden identificarse por su estructura química y/o nombre químico. Cuando discrepan la estructura química y el nombre químico, la estructura química es determinante de la identidad del compuesto. Los compuestos de la invención pueden contener uno o más centros quirales y/o dobles enlaces y, por lo tanto, pueden existir como estereoisómeros, tales como isómeros de doble enlace (concretamente isómeros geométricos), enantiómeros o diastereómeros). Por consiguiente, las estructuras químicas representadas en la presente memoria engloban todos los posibles enantiómeros y estereoisómeros de los compuestos ilustrados, incluyendo la forma estereoisoméricamente pura (p.ej., geométricamente pura, enantioméricamente pura o diastereoisoméricamente pura) y mezclas enantioméricas y estereoisoméricas. Las mezclas enantioméricas y estereoisoméricas pueden resolverse en sus componentes enantiómeros o estereoisómeros componentes usando técnicas de separación o técnicas de síntesis quiral bien conocidas por el especialista en la materia. Los compuestos de la invención incluyen también compuestos marcados isotópicamente en que uno o más átomos tienen una masa atómica diferente a la masa atómica encontrada convencionalmente en la naturaleza.

Los compuestos representados a lo largo de la memoria descriptiva contienen sitios etilénicamente insaturados. Cuando existen dobles enlace de carbono-carbono, la química configuracional puede ser cis (E) o trans (Z) y las representaciones a lo largo de la memoria descriptiva no pretenden ser limitantes. Las representaciones se presentan, en general, basadas en la química configuracional de compuestos de DHA o EPA relacionados, y aunque no están limitadas en teoría, se cree que poseen una química de configuración similar. El uso de --- refleja esto a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, de modo que se contemplan ambos isómeros cis y trans. En ciertas realizaciones, la configuración del enlace etilénico es conocida y se describe particularmente.

En un aspecto de la invención, el compuesto o compuestos de la invención se purifican y/o aíslan sustancialmente mediante técnicas conocidas en la materia. La pureza de los compuestos purificados es generalmente de al menos aproximadamente un 90 %, preferiblemente al menos aproximadamente un 95 % y lo más preferiblemente al menos aproximadamente un 99 % en peso.

Así, el término “purificado” como se usa en la presente memoria no requiere la pureza absoluta; en cambio, se pretende como un término relativo. Por ejemplo, un análogo de DHA purificado puede ser aquel en que el análogo de DHA objeto está a una concentración mayor de lo que estaría el análogo en su entorno natural en un organismo. Por ejemplo, un análogo de DHA de la invención puede considerarse purificado si el contenido de análogo en la preparación representa al menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95 %, 98 % o 99 % del contenido de análogo total de la preparación.

“Actividad biológica” y sus equivalentes contextuales “actividad” y “bioactividad” significa que un compuesto desencadena un efecto estadísticamente válido en cualquier ensayo de prueba biológica. Preferiblemente, el umbral para definir un compuesto “activo” será efectos reproducibles y estadísticamente válidos de al menos un 25 % de desviación del control no tratado a concentraciones de 1 μM o menores.

“Ensayo de prueba biológica” significa un procedimiento experimental específico. Los ejemplos no limitantes de ensayos de prueba biológica incluyen: 1) unión de ligando, directa o indirecta, a una diana purificada, fracción subcelular, célula intacta o extracto de célula o tejido; 2) protección metabólica con semivida potenciada cuando se expone a una diana purificada, fracción subcelular, célula intacta, extracto de célula o tejido, o se administra al

organismo intacto por cualquier vía; 3) prevención, reversión o mejora de respuestas funcionales basadas en células y tejidos reconocidas por los especialistas en la materia por representar sustitutos de la acción antiinflamatoria (p.ej., producción y liberación de citocina alteradas) y 4) prevención, reversión o mejora de síntomas y/o procesos patológicos en modelos animales de inflamación y enfermedad inflamatoria.

5 "Etiqueta detectable" significa cualquier modalidad química o biológica que pueda usarse para rastrear, seguir la pista, localizar, cuantificar, inmovilizar, purificar o identificar compuestos mediante medios de detección apropiados conocidos en la materia. Los ejemplos no limitantes de etiquetas detectables incluyen marcajes de fluorescencia, fosforescencia, luminiscencia, radiactivos o biospecíficos de captura por afinidad.

10 "Grupo electronegativo" es un grupo químico que tiende a adquirir, en lugar de perder, electrones en sus interacciones químicas. Los ejemplos de grupos electronegativos incluyen, pero sin limitación, $-\text{NO}_2$, sales de amonio, grupos sulfonilo, grupos carbonilo, halógenos, ésteres, ácidos carboxílicos, nitrilos, etc.

15 "*in situ*" hace referencia a e incluye los términos "*in vivo*", "*ex vivo*" e "*in vitro*" como se reconocen y se entienden comúnmente estos términos por un especialista en la materia. Además, la frase "*in situ*" se emplea en la presente memoria en el contexto connotativo y denotativo más amplio para identificar una entidad, célula o tejido como se encuentra o en su lugar, independientemente de su fuente u origen, su condición o estado o su duración o longevidad en esa localización o posición.

20 "Farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerada en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

25 "Sal farmacéuticamente aceptable" hace referencia a una sal de un compuesto de la invención que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto original. Dichas sales incluyen: (1) sales formadas cuando está presente un protón básico en el compuesto original tales como sales de adición de ácido, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; o aquellas formadas con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido benzenosulfónico, ácido 4-clorobenzenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido canforsulfónico, ácido 4-metilbencilo[2.2.2]-oct-2-en-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido *tert*-butilacético, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico y similares; o (2) sales formadas cuando está presente un protón ácido en el compuesto original y se reemplaza por un ion metálico, p.ej. un ion metálico alcalino, un ion alcalinotérreo o un ion aluminio; o se coordina con una base orgánica tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, *N*-metilglucamina, trietilamina, propilamino, diazabenciloundecano y similares.

"Vehículo farmacéuticamente aceptable" hace referencia a un diluyente, coadyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra un compuesto de la invención.

45 La frase "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente memoria significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación implicado en el porte o transporte de un compuesto o compuestos de la presente invención en o hacia el sujeto de tal modo que puede efectuar su función pretendida. Típicamente, dichos compuestos son portados o transportados desde un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano o porción del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y celulosa acetato; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles tales como propilenglicol; polioles tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes de tamponación tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido alginico; agua exenta de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones tampón de fosfato y otras

sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

“Profármaco” hace referencia a un derivado de una molécula farmacológica que requiere una transformación en el cuerpo para liberar el fármaco activo. Los profármacos son frecuentemente (aunque no necesariamente) 5 farmacológicamente inactivos hasta que se convierten en el fármaco original. Un fármaco que contiene hidroxilo puede convertirse, por ejemplo, en un profármaco de sulfonato, éster o carbonato, que puede hidrolizarse *in vivo* proporcionando el compuesto de hidroxilo. Un fármaco que contiene amino puede convertirse, por ejemplo, en un profármaco de carbamato, amida, imina, fosfonilo, fosforilo o sulfenilo, que puede hidrolizarse *in vivo* proporcionando el compuesto amino. Un fármaco de ácido carboxílico puede convertirse en un profármaco de éster (incluyen ésteres 10 de sililo y tioésteres), amida o hidrazida, que puede hidrolizarse *in vivo* proporcionando el compuesto de ácido carboxílico. Los profármacos para fármacos que contienen diferentes grupos funcionales distintos de los enumerados anteriormente son bien conocidos por el especialista en la materia.

“Prorrresto” hace referencia a una forma de grupo protector que, cuando se usa para enmascarar un grupo funcional 15 en una molécula farmacológica, convierte el fármaco en un profármaco. Típicamente, el prorrresto se unirá al fármaco a través de un enlace o enlaces que se escinden por medios enzimáticos o no enzimáticos *in vivo*.

“Grupo protector” hace referencia a un agrupamiento de átomos que, cuando se une con un grupo funcional reactivo en una molécula, enmascara, reduce o previene la reactividad del grupo funcional. Pueden encontrarse ejemplos de 20 grupos protectores en Green *et al.*, "Protective Groups in Organic Chemistry", (Wiley, 2ª ed. 1991) y Harrison *et al.*, "Compendium of Synthetic Organic Methods," Vol. 1-8 (John Wiley and Sons, 1971-1996). Los grupos protectores de amino representativos incluyen, pero sin limitación, formilo, acetilo, trifluoroacetilo, bencilo, benciloxicarbonilo ("CBZ"), *tert*-butoxicarbonilo ("Boc"), trimetilsililo ("TMS"), 2-trimetilsililetanosulfonilo ("SES"), tritilo y grupos tritilo sustituidos, aliloxicarbonilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo ("Fmoc"), nitroveratrilocarbonilo ("Nvoc") y similares. Los 25 grupos protectores de hidroxilo representativos incluyen, pero sin limitación, aquellos en que el grupo hidroxilo está acilado (p.ej., ésteres metílicos y etílicos, grupos acetato o propionato o glicolésteres) o alquilados tales como tritiléteres así como alquiléteres, tetrahidropiraniéteres, trialkilsililéteres (p.ej., grupos TMS o TIPPS) y aliléteres.

“Sujeto” significa organismos vivos susceptibles de afecciones o enfermedades causadas o contribuidas por 30 inflamación, respuestas inflamatorias, vasoconstricción y supresión mieloide. Los ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, perros, gatos, vacas, cabras y ratones. El término sujeto se pretende que incluya adicionalmente especies transgénicas tales como, por ejemplo, ratones transgénicos.

“Alquilo”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, hace referencia a un radical hidrocarburo monovalente, 35 ramificado, lineal o cíclico, saturado o insaturado, que tiene el número expresado de átomos de carbono (es decir, C1-C6 significa de 1 a 6 átomos de carbono) y que deriva de la retirada de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un alcano, alqueno o alquino original. Los grupos alquilo típicos incluyen, pero sin limitación, metilo; etilos tales como etanilo, etenilo, etinilo; propilos tales como propan-1-ilo, propan-2-ilo, ciclopropan-1-ilo, prop-1-en-1-ilo, prop-1-en-2-ilo, prop-2-en-1-ilo, cicloprop-1-en-1-ilo; cicloprop-2-en-1-ilo, prop-1-in-1-ilo, prop-2-in-1-ilo, etc.; 40 butilos tales como butan-1-ilo, butan-2-ilo, 2-metilpropan-1-ilo, 2-metilpropan-2-ilo, ciclobutan-1-ilo, but-1-en-1-ilo, but-1-en-2-ilo, 2-metilprop-1-en-1-ilo, but-2-en-1-ilo, but-2-en-2-ilo, buta-1,3-dien-1-ilo, buta-1,3-dien-2-ilo, ciclobut-1-en-1-ilo, ciclobut-1-en-3-ilo, ciclobuta-1,3-dien-1-ilo, but-1-in-1-ilo, but-1-in-3-ilo, but-3-in-1-ilo, etc. y similares. Cuando se pretenden niveles específicos de saturación, se usa la nomenclatura “alcanilo”, “alquenilo” y/o “alquinilo”, como se define a continuación. En realizaciones preferidas, los grupos alquilo son alquilo (C1-C6).

45 “Alcanilo”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, hace referencia a un alquilo ramificado, lineal o cíclico saturado derivado de la retirada de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un alcano original. Los grupos alcanilo típicos incluyen, pero sin limitación, metanilo; etanilo; propanilos tales como propan-1-ilo, propan-2-ilo (isopropilo), ciclopropan-1-ilo, etc.; butanilos tales como butan-1-ilo, butan-2-ilo (*sec*-butilo), 2-metilpropan-1-ilo 50 (isobutilo), 2-metilpropan-2-ilo (*tert*-butilo), ciclobutan-1-ilo, etc. y similares. En realizaciones preferidas, los grupos alcanilo son alcanilo (C1-C6).

“Alquenilo”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, hace referencia a un alquilo ramificado, lineal o cíclico 55 insaturado que tiene al menos un doble enlace de carbono-carbono derivado de la retirada de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un alqueno original. El grupo puede estar en conformación *cis* o *trans* alrededor del doble o dobles enlaces. Los grupos alquenilo típicos incluyen, pero sin limitación, etenilo; propenilos tales como prop-1-en-1-ilo, prop-1-en-2-ilo, prop-2-en-1-ilo, prop-2-en-2-ilo, cicloprop-1-en-1-ilo; cicloprop-2-en-1-ilo; butenilos tales como but-1-en-1-ilo, but-1-en-2-ilo, 2-metilprop-1-en-1-ilo, but-2-en-1-ilo, but-2-en-2-ilo, buta-1,3-dien-1-ilo, buta-1,3-dien-2-ilo, ciclobut-1-en-1-ilo, ciclobut-1-en-3-ilo, ciclobuta-1,3-dien-1-ilo, etc. y similares. En

realizaciones preferidas, el grupo alqueno es alqueno (C2-C6).

“Alquino”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, hace referencia a un alquilo ramificado, lineal o cíclico insaturado que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono derivado de la retirada de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un alquino original. Los grupos alquino típicos incluyen, pero sin limitación, etinilo; propinilos tales como prop-1-in-1-ilo, prop-2-in-1-ilo, etc.; butinilos tales como but-1-in-1-ilo, but-1-in-3-ilo, but-3-in-1-ilo, etc. y similares. En realizaciones preferidas, el grupo alquino es alquino (C2-C6).

“Alquildiilo”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, hace referencia a un grupo hidrocarburo divalente ramificado, lineal o cíclico saturado o insaturado que tiene el número expresado de átomos de carbono (concretamente, C1-C6 significa de 1 a 6 átomos de carbono) derivado de la retirada de un átomo de hidrógeno de cada uno de dos átomos de carbono diferentes de un alcano, alqueno o alquino original, o de la retirada de dos átomos de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un alcano, alqueno o alquino original. Los dos centros radicales monovalentes de cada valencia del centro radical divalente pueden formar enlaces con el mismo o diferentes átomos. Los grupos alquildiilo típicos incluyen, pero sin limitación, metanodiilo; etildiilos tales como etano-1,1-diilo, etano-1,2-diilo, eteno-1,1-diilo, eteno-1,2-diilo; propildiilos tales como propano-1,1-diilo, propano-1,2-diilo, propano-2,2-diilo, propano-1,3-diilo, ciclopropano-1,1-diilo, ciclopropano-1,2-diilo, prop-1-eno-1,1-diilo, prop-1-eno-1,2-diilo, prop-2-eno-1,2-diilo, prop-1-eno-1,3-diilo, cicloprop-1-eno-1,2-diilo, cicloprop-2-eno-1,2-diilo, cicloprop-2-eno-1,1-diilo, prop-1-ino-1,3-diilo, etc.; butildiilos tales como butano-1,1-diilo, butano-1,2-diilo, butano-1,3-diilo, butano-1,4-diilo, butano-2,2-diilo, 2-metilpropano-1,1-diilo, 2-metilpropano-1,2-diilo, ciclobutano-1,1-diilo; ciclobutano-1,2-diilo, ciclobutano-1,3-diilo, but-1-eno-1,1-diilo, but-1-eno-1,2-diilo, but-1-eno-1,3-diilo, but-1-eno-1,4-diilo, 2-metilprop-1-eno-1,1-diilo, 2-metanilidenpropano-1,1-diilo, buta-1,3-dieno-1,1-diilo, buta-1,3-dieno-1,2-diilo, buta-1,3-dieno-1,3-diilo, buta-1,3-dieno-1,4-diilo, ciclobut-1-eno-1,2-diilo, ciclobut-1-eno-1,3-diilo, ciclobut-2-eno-1,2-diilo, ciclobuta-1,3-dieno-1,2-diilo, ciclobuta-1,3-dieno-1,3-diilo, but-1-ino-1,3-diilo, but-1-ino-1,4-diilo, buta-1,3-diino-1,4-diilo, etc. y similares. Cuando se pretenden niveles específicos de saturación, se usa la nomenclatura alcanildiilo, alqueniildiilo y/o alquiniildiilo. Cuando se pretende específicamente que las dos valencias estén en el mismo átomo de carbono, se usa la nomenclatura “alquilideno”. En realizaciones preferidas, el grupo alquildiilo es alquil C1-C6-diilo. Se prefieren también grupos alcanodiilo acíclicos saturados en que los centros radicales estén en los carbonos terminales, p.ej. metanodiilo (metano); etano-1,2-diilo (etano); propano-1,3-diilo (propano); butano-1,4-diilo (butano) y similares (a los que se hace referencia también como alquilenos, definidos *intra*).

“Alquildiilo”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, hace referencia a un grupo hidrocarburo saturado o insaturado, ramificado, lineal o cíclico divalente que tiene el número expresado de átomos de carbono (es decir, C1-C6 significa de 1 a 6 átomos de carbono) derivado de la retirada de un átomo de hidrógeno de cada uno de dos átomos de carbono diferentes de un alcano, alqueno o alquino original, o de la retirada de dos átomos de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un alcano, alqueno o alquino original. Los dos centros radicales monovalentes o cada valencia del centro radical divalente pueden formar enlaces con los mismos o diferentes átomos. Los grupos alquildiilo típicos incluyen, pero sin limitación, metanodiilo; etildiilos tales como etano-1,1-diilo, etano-1,2-diilo, eteno-1,1-diilo, eteno-1,2-diilo; propildiilos tales como propano-1,1-diilo, propano-1,2-diilo, propano-2,2-diilo, propano-1,3-diilo, ciclopropano-1,1-diilo, ciclopropano-1,2-diilo, prop-1-eno-1,1-diilo, prop-1-eno-1,2-diilo, prop-2-eno-1,2-diilo, prop-1-eno-1,3-diilo, cicloprop-1-eno-1,2-diilo, cicloprop-2-eno-1,1-diilo, cicloprop-2-eno-1,1-diilo, prop-1-ino-1,3-diilo, etc.; butildiilos tales como butano-1,1-diilo, butano-1,2-diilo, butano-1,3-diilo, butano-1,4-diilo, butano-2,2-diilo, 2-metilpropano-1,1-diilo, 2-metilpropano-1,2-diilo, ciclobutano-1,1-diilo; ciclobutano-1,2-diilo, ciclobutano-1,3-diilo, but-1-eno-1,1-diilo, but-1-eno-1,2-diilo, but-1-eno-1,3-diilo, but-1-eno-1,4-diilo, 2-metilprop-1-eno-1,1-diilo, 2-metanilidenpropano-1,1-diilo, buta-1,3-dieno-1,1-diilo, buta-1,3-dieno-1,2-diilo, buta-1,3-dieno-1,3-diilo, buta-1,3-dieno-1,4-diilo, ciclobut-1-eno-1,2-diilo, ciclobut-1-eno-1,3-diilo, ciclobut-2-eno-1,2-diilo, ciclobuta-1,3-dieno-1,2-diilo, ciclobuta-1,3-dieno-1,3-diilo, but-1-ino-1,3-diilo, but-1-ino-1,4-diilo, buta-1,3-diino-1,4-diilo, etc. y similares. Cuando se desean niveles específicos de saturación, se usa la nomenclatura de alcanodiilo, alqueniildiilo y/o alquiniildiilo. En una realización preferida, el grupo alcanodiilo es alcano C1-C6-diilo. Se prefieren también grupos alcanodiilo acíclicos saturados en que los centros radicales están en los carbonos terminales, p.ej., metanodiilo (metano), etano-1,2-diilo (etano), propano-1,3-diilo (propano), butano-1,4-diilo (butano) y similares (a los que se hace referencia también como alquilenos, definidos a continuación).

“Alquileno”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, hace referencia a un grupo alquildiilo saturado o insaturado de cadena lineal que tiene dos centros radicales monovalentes terminales derivados de la retirada de un átomo de hidrógeno de cada uno de dos átomos de carbono terminales del alcano, alqueno o alquino original de cadena lineal. La localización del doble o triple enlace, si está presente, en un alquileno particular se indica entre corchetes. Los grupos alquileno típicos incluyen, pero sin limitación metano; etilenos tales como etano, eteno, etino; propilenos tales como propano, prop[1]eno, propa[1,2]dieno, prop[1]ino, etc.; butilenos tales como butano, but[1]eno,

but[2]eno, buta[1,3]diene, but[1]ino, but[2]ino, buta[1,3]diino, etc. y similares. Cuando se pretenden niveles de saturación específicos, se usa la nomenclatura alcano, alqueno y/o alquino. En realizaciones preferidas, el grupo alquileo es alquileo C1-C6 o C1-C3. Se prefieren también grupos alcano saturados de cadena lineal, p.ej., metano, etano, propano, butano y similares.

5

"Heteroalquilo", "heteroalcanilo", "heteroalquenilo", "heteroalquinilo", "heteroalquildiilo" y "heteroalquileo", por sí mismos o como parte de otro sustituyente, hacen referencia a grupos alquilo, alcanilo, alquenilo, alquinilo, alquildiilo o alquileo, respectivamente, en que uno o más de los átomos de carbono se reemplazan cada uno independientemente por el mismo o diferente heteroátomo o grupo heteroatómico. Los heteroátomos y/o grupos heteroatómicos típicos que pueden reemplazar a los átomos de carbono incluyen, pero sin limitación, -O-, -S-, -S-O-, -NR'-, -PH-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O) NR'-, -S(O)₂NR'- y similares, incluyendo combinaciones de los mismos en que cada R' es independientemente hidrógeno o alquilo (C1-C6).

"Cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", por sí mismos o como parte de otro sustituyente, hacen referencia a versiones cíclicas de grupos "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Para los grupos heteroalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición que está unida con el resto de la molécula. Los grupos cicloalquilo típicos incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo; ciclobutilos tales como ciclobutanilo y ciclobutenilo; ciclopentilos tales como ciclopentanilo y ciclopentenilo; ciclohexilos tales como ciclohexanilo y ciclohexenilo y similares. Los grupos heterocicloalquilo típicos incluyen, pero sin limitación, tetrahidrofuranilo (p.ej., tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, etc.), piperidinilo (p.ej., piperidin-1-ilo, piperidin-2-ilo, etc.), morfolinilo (p.ej., morfolin-3-ilo, morfolin-4-ilo, etc.), piperazinilo (p.ej., piperazin-1-ilo, piperazin-2-ilo, etc.) y similares.

"Puente heteroaromático acíclico" hace referencia a un puente divalente en que los átomos del esqueleto son exclusivamente heteroátomos y/o grupos heteroaromáticos. Los puentes heteroaromáticos acíclicos típicos incluyen, pero sin limitación, -O-, -S-, -S-O-, -NR'-, -PH-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O) NR'-, -S(O)₂NR'- y similares, incluyendo combinaciones de los mismos en que cada R' es independientemente hidrógeno o alquilo (C1-C6).

"Sistema de anillo aromático original" hace referencia a un sistema de anillo cíclico o policíclico insaturado que tiene un sistema de electrones π conjugado. Se incluyen específicamente en la definición de "sistema de anillo aromático original" los sistemas de anillo fusionados en que uno o más de los anillos son aromáticos y uno o más de los anillos están saturados o insaturados tales como, por ejemplo, fluoreno, indano, indeno, fenaleno, tetrahidronaftaleno, etc. Los sistemas de anillo aromático original típicos incluyen, pero sin limitación, aceantrileno, acenaftileno, acefenaftileno, antraceno, azuleno, benceno, criseno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, hexaceno, hexafeno, hexaleno, indaceno, s-indaceno, indano, indeno, naftaleno, octaceno, octafeno, octaleno, ovaleno, penta-2,4-dieno, pentaceno, pentaleno, pentafeno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiadeno, pireno, pirantreno, rubiceno, tetrahidronaftaleno, trifenileno, trinaftaleno y similares, así como los diversos isómeros hidratados de los mismos.

"Ariilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, hace referencia a un grupo hidrocarburo aromático monovalente que tiene el número expresado de átomos de carbono (concretamente, (C5-C15) significa de 5 a 15 átomos de carbono) derivado de la retirada de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un sistema de anillo aromático original. Los grupos ariilo típicos incluyen, pero sin limitación, grupos derivados de aceantrileno, acenaftileno, acefenaftileno, antraceno, azuleno, benceno, criseno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, hexaceno, hexafeno, hexaleno, as-indaceno, s-indaceno, indano, indeno, naftaleno, octaceno, octafeno, octaleno, ovaleno, penta-2,4-dieno, pentaceno, pentaleno, pentafeno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiadeno, pireno, pirantreno, rubiceno, trifenileno, trinaftaleno y similares, así como los diversos isómeros hidratados de los mismos. En realizaciones preferidas, el grupo ariilo es ariilo (C5-C15), siendo (C5-C10) aún más preferido. Son ariilos particularmente preferidos ciclopentadienilo, fenilo y naftilo.

"Ariilarilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, hace referencia a un grupo hidrocarburo monovalente derivado de la retirada de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un sistema de anillo en que se unen directamente dos o más sistemas de anillo aromático originales idénticos o no idénticos entre sí por un enlace sencillo, en que el número de dichas conexiones de anillo directas es uno menor que el número de sistemas de anillo aromático originales implicados. Los grupos ariilarilo típicos incluyen, pero sin limitación, bifenilo, trifenilo, fenilnaftilo, binaftilo, bifenilnaftilo y similares. Cuando se especifica el número de átomos de carbono en un grupo ariilarilo, los números hacen referencia a los átomos de carbono que comprenden cada anillo aromático original. Por ejemplo, ariilarilo (C5-C15) es un grupo ariilarilo en que cada anillo aromático comprende de 5 a 15 átomos de carbono, p.ej. bifenilo, trifenilo, binaftilo, fenilnaftilo, etc. Preferiblemente, cada sistema de anillo aromático original de un grupo ariilarilo es independientemente un aromático (C5-C15), más preferiblemente un aromático (C5-C10). Se prefieren también los grupos ariilarilo en que todos los sistemas de anillo aromático originales son idénticos, p.ej.,

bifenilo, trifenilo, binaftilo, trinaftilo, etc.

“Biarilo”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, hace referencia a un grupo arilarilo que tiene dos sistemas aromáticos originales idénticos unidos directamente entre sí por un enlace sencillo. Los grupos biarilo típicos incluyen, pero sin limitación, bifenilo, binaftilo, biantracilo y similares. Preferiblemente, los sistemas de anillo aromático son anillos aromáticos (C5-C15), más preferiblemente anillos aromáticos (C5-C10). Es un grupo biarilo particularmente preferido el bifenilo.

“Aralalquilo”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, hace referencia a un grupo alquilo acíclico en que se reemplaza uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, típicamente un átomo de carbono terminal o sp^3 , por un grupo arilo. Los grupos arilalquilo típicos incluyen, pero sin limitación, bencilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-feniletan-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-ilo, 2-naftiletan-1-ilo, naftobencilo, 2-naftofeniletan-1-ilo y similares. Cuando se pretenden restos alquilo específicos, se usa la nomenclatura arilalcanilo, arilalquenilo y/o arilalquinilo. En realizaciones preferidas, el grupo arilalquilo es arilalquilo (C6-C21), p.ej., el resto alcanilo, alquenilo o alquinilo del grupo arilalquilo es C1-C6 y el resto arilo es C5-C15. En realizaciones particularmente preferidas, el grupo arilalquilo es (C6-C13), p.ej., el resto alcanilo, alquenilo o alquinilo del grupo arilalquilo es (C1-C3) y el resto arilo es (C5-C10).

“Sistema de anillo heteroaromático original” hace referencia a un sistema de anillo aromático original en que uno o más átomos de carbono están cada uno independientemente reemplazados por el mismo o diferentes heteroátomos o grupos heteroatómicos. Los heteroátomos o grupos heteroatómicos típicos para reemplazar a los átomos de carbono incluyen, pero sin limitación, N, NH, P, O, S, S(O), S(O)₂, Si, etc. Se incluyen específicamente en la definición de “sistemas de anillo heteroaromático originales” los sistemas de anillo fusionados en que uno o más de los anillos son aromáticos y uno más de los anillos son saturados o insaturados tales como, por ejemplo, benzodioxano, benzofurano, cromano, cromeno, indol, indolina, xanteno, etc. Se incluyen también en la definición de “sistema de anillo heteroaromático original” aquellos anillos reconocidos que incluyen sustituyentes comunes tales como, por ejemplo, benzopirona y 1-metil-1,2,3,4-tetrazol. Los sistemas de anillo heteroaromático originales típicos incluyen, pero sin limitación, acridina, bencimidazol, benzoisoxazol, benzodioxano, benzodioxol, benzofurano, benzopirona, benzotiadiazol, benzotiazol, benzotriazol, benzoxazina, benzoxazol, benzoxazolina, carbazol, β-carbolina, cromano, cromeno, cinolina, furano, imidazol, indazol, indol, indolina, indolizina, isobenzofurano, isocromeno, isoindol, isoindolina, isoquinolina, isotiazol, isoxazol, naftiridina, oxadiazol, oxazol, perimidina, fenantridina, fenantrolina, fenazina, ftalazina, pteridina, purina, pirano, pirazina, pirazol, piridazina, piridina, pirimidina, pirrol, pirrolizina, quinazolina, quinolina, quinolizina, quinoxalina, tetrazol, tiadiazol, tiazol, tiofeno, triazol, xanteno y similares.

“Heteroarilo”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, hace referencia a un grupo heteroaromático monovalente que tiene el número expresado de átomos de anillo (p.ej., “5-14 miembros” significa de 5 a 14 átomos de anillo) derivado de la retirada de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de un sistema de anillo heteroaromático original. Los grupos heteroarilo típicos incluyen, pero sin limitación, grupos derivados de acridina, bencimidazol, benzoisoxazol, benzodioxano, benzodioxol, benzofurano, benzopirona, benzotiadiazol, benzotiazol, benzotriazol, benzoxazina, benzoxazol, benzoxazolina, carbazol, β-carbolina, cromano, cromeno, cinolina, furano, imidazol, indazol, indol, indolina, indolizina, isobenzofurano, isocromeno, isoindol, isoindolina, isoquinolina, isotiazol, isoxazol, naftiridina, oxadiazol, oxazol, perimidina, fenantridina, fenantrolina, fenazina, ftalazina, pteridina, purina, pirano, pirazina, pirazol, piridazina, piridina, pirimidina, pirrol, pirrolizina, quinazolina, quinolina, quinolizina, quinoxalina, tetrazol, tiadiazol, tiazol, tiofeno, triazol, xanteno y similares, así como los diversos isómeros hidratados de los mismos. En realizaciones preferidas, el grupo heteroarilo es un heteroarilo de 5-14 miembros, siendo particularmente preferido heteroarilo de 5-10 miembros.

“Heteroaril-heterarilo”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, hace referencia a un grupo heteroaromático monovalente derivado de la retirada de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de un sistema de anillo en que se unen directamente dos o más sistemas de anillo heteroaromáticos originales idénticos o no idénticos entre sí por un enlace sencillo, en que el número de dichas conexiones de anillo directas es uno menor que el número de sistemas de anillo heteroaromático originales implicados. Los grupos heteroarilheteroarilo típicos incluyen, pero sin limitación, bipiridilo, tripiridilo, piridilpurinilo, bipurinilo, etc. Cuando se especifica el número de átomos, los números hacen referencia al número de átomos que comprende cada sistema de anillo heteroaromático original. Por ejemplo, heteroarilheteroarilo de 5-15 miembros es un grupo heteroarilheteroarilo en que cada sistema de anillo heteroaromático original comprende de 5 a 15 átomos, p.ej., bipiridilo, tripiridilo, etc. Preferiblemente, cada sistema de anillo heteroaromático original es independientemente un heteroaromático de 5-15 miembros, más preferiblemente un heteroaromático de 5-10 miembros. Se prefieren también grupos heteroarilheteroarilo en que todos los sistemas de anillo heteroaromáticos originales son idénticos.

"Biheteroarilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, hace referencia a un grupo heteroarilheteroarilo que tiene dos sistemas de anillo heteroaromáticos originales idénticos unidos directamente entre sí por un enlace sencillo. Los grupos biheteroarilo típicos incluyen, pero sin limitación, biperidilo, bipurinilo, biquinolínico y similares.

5 Preferiblemente, los sistemas de anillo heteroaromático son anillos heteroaromáticos de 5-15 miembros, más preferiblemente anillos heteroaromáticos de 5-10 miembros.

"Heteroarilalquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, hace referencia a un grupo alquilo acíclico en que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, típicamente un átomo de carbono terminal o sp^3 , se reemplaza por un grupo heteroarilo. Cuando se pretenden restos alquilo específicos, se usa la nomenclatura heteroarilalquilo, heteroarilalquenilo y/o heteroarilalquinilo. En realizaciones preferidas, el grupo heteroarilalquilo es un heteroarilalquilo de 6-21 miembros, p.ej. el resto alcanilo, alquenilo o alquinilo del heteroarilalquilo es alquilo (C1-C6) y el resto heteroarilo es un heteroarilo de 5-15 miembros. En realizaciones particularmente preferidas, el heteroarilalquilo es un heteroarilalquilo de 6-13 miembros, p.ej., el resto alcanilo, alquenilo o alquinilo es alquilo (C1-15 C3) y el resto heteroarilo es un heteroarilo de 5-10 miembros.

"Halógeno" o "halogeno", por sí mismos o como parte de otro sustituyente, a menos que se afirme otra cosa, hacen referencia a fluoro, cloro, bromo y yodo.

20 "Halogenoalquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, hace referencia a un grupo alquilo en que uno o más de los átomos de hidrógeno se reemplaza por un halógeno. Por tanto, el término "halogenoalquilo" pretende incluir monohalogenoalquilos, dihalogenoalquilos, trihalogenoalquilos, etc. hasta perhalogenoalquilos. Por ejemplo, la expresión "halogenoalquilo (C1-C2)" incluye fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, 1-fluoroetilo, 1,1-difluoroetilo, 1,2-difluoroetilo, 1,1,1-trifluoroetilo, perfluoroetilo, etc.

25 Los grupos anteriormente definidos pueden incluir prefijos y/o sufijos que se usan comúnmente en la materia para crear grupos sustituyentes bien reconocidos adicionales. Como ejemplos, "alquiloxilo" o "alcoxilo" hace referencia a un grupo de fórmula -OR", "alquilamina" hace referencia a un grupo de fórmula -NHR" y "dialquilamina" hace referencia a un grupo de fórmula -NR"R", en que cada R" es independientemente un alquilo. Como otro ejemplo, 30 "halogenoalcoxilo" o "halogenoalquiloxilo" hace referencia a un grupo de fórmula -OR'", en que R'" es un halogenoalquilo.

La presente divulgación está también dirigida a procedimientos para tratar inflamación arterial, artritis, psoriasis, urticaria, vasculitis, asma, inflamación ocular, inflamación pulmonar, fibrosis pulmonar, dermatitis seborreica, 35 dermatosis pustulosa o enfermedades cardiovasculares en un sujeto mediante la administración de uno o más de los análogos de DHA descritos en la presente memoria. Los estados patológicos o afecciones que están asociados a la inflamación, tales como agrupamiento de neutrófilos, leucocitos y/o citocinas, están incluidos dentro del alcance general de inflamación e incluyen, por ejemplo, adicción, SIDA, trastornos relacionados con el alcohol, alergia, enfermedad de Alzheimer, anestesiología, antiinfecciosos, agentes antiinflamatorios, artritis, asma, aterosclerosis, 40 enfermedades óseas, cáncer de mama, cáncer, enfermedades cardiovasculares, salud infantil, cáncer de colon, defectos congénitos, análisis de decisión, trastornos neurológicos degenerativos, demencia, dermatología, diabetes, sacarina, diagnóstico, suministro de fármaco, descubrimiento/cribado de fármacos, trastornos endocrinos, ORL, epidemiología, enfermedades oculares, medicina fetal y materna, trastornos gastrointestinales, terapia génica, diagnóstico genético, genética, trastornos genitourinarios, medicina geriátrica, crecimiento y desarrollo, audición, 45 trastornos hematológicos, trastornos hepato biliares, hipertensión, imagenología, inmunología, enfermedades infecciosas, leucemia/linfoma, cáncer de pulmón, trastornos metabólicos, neonatología, trastornos neurológicos, trastornos neuromusculares, medicina nuclear, obesidad/trastornos alimentarios, ortopedia, otros, enfermedades parasitarias, trastornos perinatales, embarazo, medicina preventiva, cáncer de próstata, trastornos psiquiátricos, trastornos pulmonares, radiología, trastornos renales, reproducción, enfermedades reumáticas, apoplejía, cirugía, 50 trasplantes, vacunas, medicina vascular, curación de heridas, infecciones orales, enfermedad periodontal, lesión cerebral, traumatismo e inflamación neuronal y salud femenina.

Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" de uno o más de los análogos de DHA de la invención. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" hace referencia a una cantidad efectiva, a las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, 55 para conseguir el resultado terapéutico deseado, p.ej., una disminución o prevención de los efectos asociados a diversos estados patológicos o afecciones. La cantidad terapéuticamente efectiva de un análogo de DHA puede variar según factores tales como el estado patológico, edad, sexo y peso del individuo y la capacidad del compuesto terapéutico de desencadenar la respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es

también aquella en que cualquier efecto tóxico o perjudicial del agente terapéutico se compensa por los efectos beneficiosos terapéuticos.

Una "cantidad profilácticamente efectiva" hace referencia a una cantidad efectiva, a las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Típicamente, puesto que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada óptima (p.ej., una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse una sola inyección en bolus, pueden administrarse varias dosis divididas con el tiempo o puede reducirse o aumentarse proporcionalmente la dosis como se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación por la facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en la presente memoria hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos para tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Las especificaciones de las formas de unidad de dosificación de la invención están dictadas por y son directamente dependientes de (a) las características únicas del análogo de DHA y el efecto terapéutico o profiláctico particular para conseguir y (b) las limitaciones inherentes en la materia de combinar dicho compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Un intervalo ejemplar no limitante para una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un análogo de DHA de la invención es de 0,1-20 mg/kg, más preferiblemente de 1-10 mg/kg. Ha de indicarse que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y gravedad de la afección para aliviar. Ha de entenderse adicionalmente que, para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deberían ajustarse con el tiempo según las necesidades individuales y el criterio profesional de la persona que administre o supervise la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación expuestos en la presente memoria son ejemplares solo y no se pretende que limiten el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

Cuando los compuestos de la presente invención se administran como productos farmacéuticos a seres humanos y mamíferos, pueden procurarse *per se* o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, de 0,1 a 99,5% (más preferiblemente de 0,5 a 90 %) del ingrediente activo, es decir al menos un análogo de DHA, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En ciertas realizaciones, los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más grupos funcionales ácidos y, por tanto, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. El término "sales, ésteres, amidas y profármacos farmacéuticamente aceptables" como se usa en la presente memoria hace referencia a aquellas sales carboxilato, sales de adición de aminoácido, ésteres, amidas y profármacos de los compuestos de la presente invención que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuadas para uso en contacto con tejidos de pacientes sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, en proporción con una relación de beneficio/riesgo razonable y efectiva para su uso pretendido de los compuestos de la invención. El término "sales" se refiere a las sales de adición de ácido inorgánico y orgánico relativamente no tóxicas de los compuestos de la presente invención. Estas sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos o haciendo reaccionar separadamente el compuesto purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y aislando la sal así formada. Estos pueden incluir cationes basados en metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares, así como cationes amonio, amonio cuaternario y amina no tóxicos incluyendo, pero sin limitación, amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina y similares (véase, por ejemplo, Berge S. M., *et al.*, "Pharmaceutical Salts," *J. Pharm. Sci.*, 1977; 66: 119).

El término "ésteres farmacéuticamente aceptables" hace referencia a los productos esterificados relativamente no tóxicos de los compuestos de la presente invención. Estos ésteres pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos, o haciendo reaccionar separadamente el compuesto purificado en su forma de ácido libre o hidroxilo con un agente esterificante adecuado. Los ácidos carboxílicos pueden convertirse en ésteres mediante tratamiento con un alcohol en presencia de un catalizador. El término se pretende que incluya adicionalmente grupos hidrocarburos inferiores capaces de solvatare en condiciones fisiológicas, p.ej., ésteres alquílicos, ésteres metílicos, etílicos y propílicos.

Pueden estar presentes también en las composiciones agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes tales

como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes.

Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes hidrosolubles, tales como
5 ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes solubles en aceite tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, α -tocoferol y similares y agentes quelantes de metal tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

10 Las formulaciones de la presente invención incluyen aquellas adecuadas para administración intravenosa, oral, nasal, tópica, transdérmica, bucal, sublingual, rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquier procedimiento bien conocido en las técnicas farmacéuticas. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material
15 vehículo para producir una forma de dosificación única será generalmente aquella cantidad del compuesto que produzca el efecto terapéutico. Generalmente, en porcentaje, esta cantidad oscilará de aproximadamente 1 % a aproximadamente 99 % de ingrediente activo, preferiblemente de aproximadamente 5 % a aproximadamente 70 %, lo más preferiblemente de aproximadamente 10 % a aproximadamente 30 %.

Los procedimientos de preparación de estas formulaciones o composiciones incluyen la etapa de poner en
20 asociación un compuesto de la presente invención con el vehículo y, opcionalmente uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntima un compuesto de la presente invención con vehículos líquidos, o vehículos sólidos finamente divididos o ambos y, entonces, si es necesario, conformar el producto.

25 Las formulaciones de la invención adecuadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (usando una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos o como solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como emulsión de aceite en agua o de agua en aceite, o como elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o como colutorios y similares, conteniendo cada una una
30 cantidad predeterminada de un compuesto de la presente invención como ingrediente activo. Un compuesto de la presente invención puede administrarse también como una inyección en bolus, electuario o pasta.

En las formas de dosificación sólidas de la invención para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), se mezcla el ingrediente activo con uno o más vehículos farmacéuticamente
35 aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio y/o cualquiera de los siguientes; cargas o extensores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; humectantes tales como glicerol; agentes disgregantes tales como agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; agentes retardantes de la solución tales como parafina; acelerantes de la
40 absorción tales como compuestos de amonio cuaternario; agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita; lubricantes tales como talco, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos y agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas pueden comprender también agentes de tamponación. Pueden emplearse también composiciones sólidas de tipo similar como cargas en
45 cápsulas de gelatina rellena blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Puede elaborarse un comprimido mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos por compresión pueden prepararse usando aglutinante (por ejemplo, gelatina o
50 hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo almidón glicolato de sodio o carboximetilcelulosa de sodio reticulada), agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos por moldeo pueden elaborarse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

55 Los comprimidos y otras formas de dosificación sólida de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden ranurarse opcionalmente o prepararse con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Pueden formularse también para proporcionar una liberación lenta o controlada del ingrediente activo en el mismo usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para

- proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril o algún otro medio inyectable estéril, inmediatamente antes del uso. Estas composiciones pueden contener también opcionalmente
- 5 agentes opacificantes y pueden ser de una composición que libere el ingrediente o ingredientes activos solo, o preferencialmente, en una cierta porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de imbibición que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. El ingrediente activo puede estar también en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes anteriormente descritos.
- 10 Las formas de dosificación líquida para administración oral de los compuestos de la invención incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquida pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la materia tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como
- 15 alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfúrico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitán y mezclas de los mismos.
- 20 Aparte de diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir también coadyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.
- Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo,
- 25 alcoholes de isoestearilo etoxilados, ésteres de polioxietilensorbitol y sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar y tragacanto y mezclas de los mismos.
- Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas de la invención para administración rectal o vaginal pueden presentarse como supositorio, que puede prepararse mezclando uno o más compuestos de la invención con uno o
- 30 más excipientes o vehículos no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera de supositorios o un salicilato, y que sean sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura corporal y, por lo tanto, se fundirán en el recto o la cavidad vaginal y liberarán el compuesto activo.
- Las formulaciones de la presente invención que son adecuadas para administración vaginal incluyen también
- 35 pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen aquellos vehículos que son conocidos en la técnica por ser apropiados.
- Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de un compuesto de esta invención incluyen polvos, pulverizadores, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhaladores. El compuesto
- 40 activo puede mezclarse en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y con cualquiera conservante, tampón o propelente que pueda requerirse.
- Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto activo de esta invención, excipientes tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de
- 45 celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos.
- Los polvos y pulverizadores pueden contener, además de un compuesto de esta invención, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida o mezclas de estas sustancias. Los pulverizadores pueden contener adicionalmente propelentes acostumbrados tales como
- 50 clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano.
- Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar un suministro controlado de un compuesto de la presente invención al cuerpo. Dichas formas de dosificación pueden elaborarse disolviendo o dispersando el compuesto en el medio apropiado. Pueden usarse también potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del
- 55 compuesto a través de la piel. La velocidad de dicho flujo puede controlarse proporcionando una membrana controladora de la velocidad o dispersando el compuesto activo en una matriz polimérica o gel.
- Se contemplan también como dentro del alcance de esta invención formulaciones oftálmicas, pomadas, polvos, soluciones oculares y similares. Dichas soluciones son útiles para el tratamiento de conjuntivitis.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención adecuadas para administración parenteral comprenden uno o más compuestos de la invención en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes del uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos, solutos que vuelven la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido o agentes de suspensión o espesantes.

Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones pueden contener también coadyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede asegurarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. Puede ser también deseable incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, puede ocasionarse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retarden la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

En algunos casos, para prolongar el efecto de un fármaco, es deseable retardar la absorción del fármaco de una inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tiene una mala hidrosolubilidad. La velocidad de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño de cristal y la forma cristalina. Como alternativa, se logra la absorción retardada de una forma de fármaco administrada por vía parenteral disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleoso.

Se elaboran formas inyectables de liberación prolongada formando matrices de microencapsulación de los compuestos en cuestión en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la relación de fármaco a polímero, y de la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la velocidad de liberación de fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen polo(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de liberación prolongada se preparan también atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que sean compatibles con el tejido corporal.

Las preparaciones de la presente invención pueden procurarse por vía oral, parenteral, tópica o rectal. Se procuran por supuesto en formas adecuadas para cada vía de administración. Por ejemplo, se administran en forma de comprimidos o cápsula, por inyección, inhalación, loción ocular, pomada, supositorio, etc., administración por inyección, infusión o inhalación; tópica por loción o pomada y rectal por supositorios. Se prefiere la administración de inyección intravenosa.

Las frases "administración parenteral" y "administrado parenteralmente", como se usan en la presente memoria, significan modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal e infusión.

Las frases "administración sistémica", "administrado sistémicamente", "administración periférica" y "administrado periféricamente", como se usan en la presente memoria, significan la administración de un compuesto, fármaco u otro material de forma distinta que directamente en el sistema nervioso central, de tal modo que entre en el sistema del paciente y, por tanto, se someta al metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

Estos compuestos pueden administrarse a seres humanos y otros animales para terapia mediante cualquier vía de administración adecuada, incluyendo oral y nasal, como, por ejemplo, por pulverizador, rectal, intravaginal, parenteral, intracisternal y tópica, como en polvos, pomadas o gotas, incluyendo por vía bucal y sublingual.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención que pueden usarse en una forma hidratada adecuada y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante procedimientos convencionales conocidos por los especialistas en la materia. Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea efectiva para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular, sin ser tóxico para el paciente.

El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto particular de la presente invención empleado, o el éster, sal o amida del mismo, la vía de administración, el momento de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con el compuesto particular empleado, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico previo del paciente que se esté tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Un médico o veterinario especialista en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad efectiva de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría empezar por dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles menores que los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado, y aumentar gradualmente la dosificación hasta conseguir el efecto deseado.

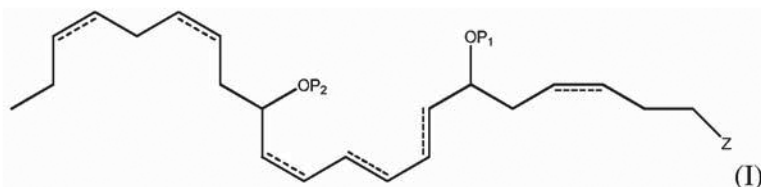
En general, una dosis diaria adecuada de un compuesto de la invención será aquella cantidad de compuesto que es la menor dosis efectiva para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis efectiva dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. Generalmente, las dosis intravenosas y subcutáneas de los compuestos de esta invención para un paciente, cuando se usan para los efectos analgésicos indicados, oscilarán de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal al día, más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg por kg al día, y aún más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 40 mg por kg al día. Por ejemplo, se administran entre aproximadamente 0,01 y 20 µg, entre aproximadamente 20 y 100 µg y entre aproximadamente 10 y 200 µg de los compuestos de la invención por 20 g de peso del sujeto.

Si se desea, la dosis diaria efectiva del compuesto activo puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas separadamente a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente en formas de dosificación unitarias.

La invención presenta un artículo de fabricación que contiene material de envasado y formulación de análogo de DHA de la invención contenida en el material de envasado. Esta formulación contiene al menos un análogo de DHA y el material de envasado contiene una etiqueta o prospecto de envase que indica que la formulación puede administrarse al sujeto para tratar una o más afecciones como se describen en la presente memoria, en una cantidad, a una frecuencia y durante una duración efectiva para tratar o prevenir dicha o dichas afecciones. Dichas afecciones se mencionan a lo largo de la memoria descriptiva. Se describen en la presente memoria análogos de DHA adecuados.

La presente invención proporciona sorprendentemente compuestos, composiciones y usos novedosos referentes a análogos de dihidroxilo del ácido docosahexaenoico (DHA) que tienen todos un grupo hidroxilo en C-14 de la cadena de carbono y un segundo grupo hidroxilo en la posición C-7 de la cadena de carbono. Estos materiales derivan biogénicamente y se aíslan de medios.

En una realización, la invención se refiere a un nuevo y útil análogo de DHA tal como un compuesto que comprende la fórmula (I):



donde cada uno de P₁ y P₂ es individualmente un grupo protector o un átomo de hidrógeno;

donde --- es un doble enlace;

- 5 donde los dobles enlaces en las posiciones 4, 16 y 19 son cada uno de configuración Z y el doble enlace en la posición 10 es de configuración E;

donde Z es -C(O)OR^d, -C(O)NR^cR^c, -C(O)H, -C(NH)NR^cR^c, -C(S)H, -C(S)OR^d, -C(S)NR^cR^c o -CN;

cada R^a se selecciona independientemente hidrógeno, alquilo (C1-C6), cicloalquilo (C3-C8), ciclohexilo, cicloalquilalquilo (C4-C11), arilo (C5-C10), fenilo, arilalquilo (C6-C16), bencilo, heteroalquilo de 2-6 miembros,

- 10 cicloheteroalquilo de 3-8 miembros, morfolinilo, piperazinilo, homopiperazinilo, piperidinilo, cicloheteroalquilalquilo de 4-11 miembros, heteroarilo de 5-10 miembros o heteroarilalquilo de 6-16 miembros;

cada R^c es independientemente un grupo protector o R^a o, como alternativa, cada R^c se toma junto con el átomo de nitrógeno al que está unido formando un cicloheteroalquilo o heteroarilo de 5 a 8 miembros que puede incluir opcionalmente uno o más de los mismos o diferentes heteroátomos adicionales, y que puede estar opcionalmente

- 15 sustituido con uno o más de los mismos o diferentes grupos R^a o R^b adecuados;

cada R^b se selecciona independientemente de =O, -OR^d, halogenoalquilo (C1-C3), -OCF₃, =S, -SR^d, =NR^d, =NOR^d, -NR^cR^c, halógeno, -CF₃, -CN, -NC, -OCN, -SCN, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -S(O)R^d, S(O)₂R^d, -S(O)₂OR^d, -S(O)NR^cR^c, -S(O)₂NR^cR^c, -OS(O)R^d, -OS(O)₂R^d, -OS(O)₂OR^d, -OS(O)₂NR^cR^c, -C(O)R^d, -C(O)OR^d, -C(O)NR^cR^c, -C(NH)NR^cR^c, -C(NR^a)NR^cR^c, -C(NOH)R^a, -C(NOH)NR^cR^c, -OC(O)R^d, -OC(O)OR^d, -OC(O)NR^cR^c, -OC(NH)NR^cR^c, -OC(NR^a)NR^cR^c, -

- 20 -[NHC(O)]_nR^d, -[NR^aC(O)]_nR^d, -[NHC(O)]_nOR^d, -[NR^aC(O)]_nOR^d, -[NHC(O)]_nNR^cR^c, -[NR^aC(O)]_nNR^cR^c, -

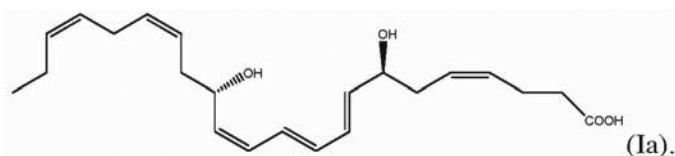
cada n es, independientemente, un entero de 0 a 3; y

cada R^d es, independientemente, un grupo protector o R^a;

una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con la condición de que cuando Z es -C(O)OR^d, entonces R^d de Z

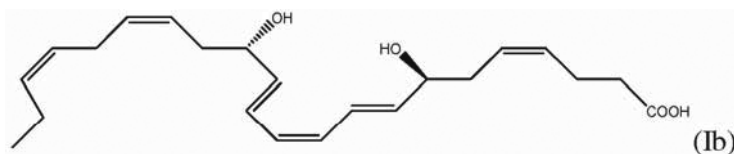
- 25 no sea un hidrógeno. En ciertos aspectos, P₁ y P₂ son ambos átomos de hidrógeno.

Es un isómero particular de interés del análogo de DHA (I) (Ia) que comprende la fórmula:



30

Es otro isómero de interés del análogo de DHA (I) (Ib) que comprende la fórmula:



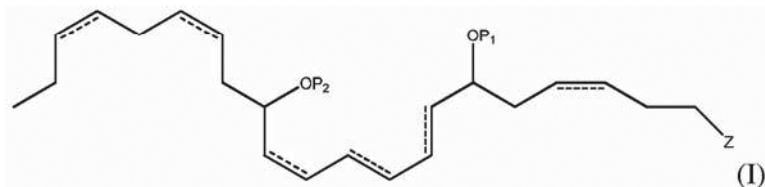
- 35 al que se hace referencia como el producto de "doble dioxigenación".

Debería entenderse que los compuestos (Ia) y (Ib) incluyen todas las sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos, las formas purificadas/aisladas, así como compuestos donde uno o ambos de los hidroxilos se

convierten en un grupo protector como se describe en la presente memoria.

En otro aspecto, la presente invención proporciona nuevos y útiles análogos de DHA tales como un compuesto purificado que comprende la fórmula (I):

5



donde P_1 , P_2 , Z , R^a , R^b , R^c , R^d y n son como se definen anteriormente, y donde los dobles enlaces en las posiciones 4, 16 y 19 están cada uno en configuración Z y el doble enlace en la posición 10 está en configuración E.

10 En un aspecto, P_1 y P_2 son ambos átomos de hidrógeno. En otro aspecto, Z es $-C(O)OR^d$ y R^d de Z es un átomo de hidrógeno. En aún otra realización, el 7-hidroxilo tiene la configuración S. En aún otra realización, el 14-hidroxilo tiene la configuración S.

En otro aspecto, el alcohol C-14 tiene la configuración S para los compuestos indicados a lo largo de la solicitud.

15

Debería entenderse que los intermedios descritos en la presente memoria están también incluidos como parte de la invención y pueden considerarse agentes activos también. Por ejemplo, los intermedios que contienen cetona están dentro del alcance de los agentes activos, así como los intermedios de alquino descritos en la presente memoria.

20 Resultados y discusión

Lipidómica orientada de exudados inflamatorios resolutivos. A la vista de las acciones de los mediadores químicos especializados en la resolución (6, 7), se monitorizó 17-HDHA como biomarcador de la activación y conversión de DHA endógeno, así como se empleó la lipidómica orientada para indagar si estaban operativas otras rutas (véase la Figura 1). Durante este desarrollo de peritonitis, entraron rápidamente los PMN, alcanzando el máximo a las 12 h. En este sistema autorresolutivo (19), los PMN descendían y se perdían de los exudados, definiendo por tanto la resolución (Figura 1). Se llevaron a cabo lipidómicas de mediador orientado no sesgadas que emplean análisis basados en CL/EM/EM con estos tres exudados. Además de 17S-HDHA, se convirtió un marcador de la biosíntesis de resolvina y protectina (6), el DHA endógeno, en ácido 14S-hidroxicosahexaenoico (14S-HDHA). No se identificó ningún producto en exudados obtenidos con el inhibidor de lipooxigenasa (LOX) esculetina ($n=3$), y se redujeron sustancialmente ambos en lavados de peritonitis de ratones deficientes en 12/15-LOX ($n=2$, $d=4$). La aparición de 14S-HDHA en este sistema acompañó a 17-HDHA a lo largo del desarrollo de 72 h, indicando que se acumulaba 14S-HDHA en la fase de resolución.

35 Se identificaron estos dos productos de LOX mediante iones de diagnóstico característicos en sus espectros de masas respectivos. La Figura 1B muestra un espectro representativo de 17-HDHA formado en el curso temporal y 1C el espectro de 14S-HDHA, así como iones de diagnóstico para identificación. Estos incluían m/z 205, 138 y 233 específicos de 14S-HDHA. Los iones de m/z 343 [M-H], m/z 325, 299 y 281 se comparten entre el ácido 14-hidroxi- y 17-hidroxicosahexaenoico (véanse los recuadros en la Figura 1B y C). Se generaron ambos de 14S-HDHA y 17-HDHA a partir de DHA endógeno con MΦ activados con el ionóforo de Ca^{2+} A_{23187} (5,0 μ M, pH 7,45, $n=4$; valores representativos: 14S-HDHA, 325 $pg/10^6$ células; 17-HDHA, 439 $pg/10^6$ células). Estos resultados demuestran que, durante el curso temporal de la inflamación aguda y su resolución, estaba presente una producción prolongada de productos de LOX endógeno en la fase aguda inicial a las 2-4 h que se acumulaban durante la resolución con niveles máximos de 14S-HDHA > 17-HDHA a las 72 h.

45

Se determinó que el 14S-HDHA podría ser un marcador que refleja la activación de una ruta de lipooxigenación del carbono 14 de DHA (C22:6) novedosa. Esto podría conducir a la producción de mediadores bioactivos mediante DHA, puesto que los productos monohidroxilados de los ácidos grasos poliinsaturados son biomarcadores de rutas que conducen a moléculas bioactivas potentes, como en el caso de 17-HDHA y 17-HpDHA, precursores de resolvinas y protectinas (6, 20, 21). También 5-HETE es un marcador bien apreciado de la conversión de ácido araquidónico en leucotrienos (2). Con este fin, se aislaron MΦ peritoneales residentes (véase la Figura 2A, recuadro de FACS) que contenían ~5-90 % de MΦ y 10-15 % de linfocitos, se preparó 14S-HpDHA mediante síntesis

50

biogénica y se incubaron con estas células para determinar si era un precursor de nuevos productos bioactivos. Se aisló 14S-HpDHA de 12-LOX incubada con DHA purificado por HPLC (n= 7) y se determinó que la configuración era >98 % S por CL/EM/EM quiral. Se convirtieron tanto 14S-HpDHA (10 µM) como DHA (10 µM) por los MΦ residentes en nuevos productos identificados mediante lipidómica de mediador basada en CL/EM/EM (Figura 2A) y marcados I y II. Cada uno tenía cromóforos de UV que contienen trieno conjugado, comportamiento cromatográfico y espectros de masas consistentes con productos que contienen 7,14-dihidroxiilo con un esqueleto de C22 originario de DHA. Ambos daban esencialmente el mismo espectro de masas, aunque a tiempos de retención diferentes, indicando que eran isómeros muy similares (Figuras 2B y 2C). Se aislaron estos y se sometieron a cromatografía de gases-espectrometría de masas, para identificar adicionalmente y confirmar las asignaciones de fragmentos y sitios posicionales de oxigenación, p.ej., las posiciones de carbono de los grupos alcohol. Los análisis de CG-EM confirmaron los iones asignados por CL/EM/EM y eran consistentes con los productos que contienen 7,14-dihidroxiilo biosintetizados a partir de DHA (Figura 10). Los MΦ humanos aislados incubados con 14S-HpDHA daban también el producto que contiene 7,14-hidroxiilo novedoso y coincidía con el compuesto de MΦ de murino (n= 3).

15 *Mediadores antiinflamatorios y prorrresolutivos novedosos.* En paralelo con estas determinaciones, se valoró en los materiales obtenidos a partir de MΦ de murino la bioactividad potencial después de extracción y cromatografía en fase sólida C18. El material derivado de MΦ mostraba propiedades antiinflamatorias notables (Figura 3A), regulando la entrada de PMN en peritonitis inducida por zimosano cuando se compara directamente con otros mediadores de neuroprotectina/protectina D1 (20) y RvE1 (5, 6, 14) derivados de ácido graso ω-3. Por tanto, estos hallazgos sugerían que, en los aislamientos de MΦ obtenidos a partir de células incubadas con ácido 14S-hidroperoxidocosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico, se biosintetizaban materiales bioactivos potentes a partir de este precursor que regulaba los PMN, previniendo su infiltración. Estas sustancias es probable que sean muy potentes, porque solo cantidades de nanogramos procuradas por ratón desencadenaban acciones antiinflamatorias.

25 Dada la capacidad del DHA de servir como sustrato para que LOX forme tanto productos de doble dioxigenación relacionados con la protectina D1 como el precursor que contiene hidroperóxido del carbono 17 del epóxido (20), se determinó que el 14S-HpDHA podría ser también un sustrato para doble dioxigenación. Las acciones secuenciales de 12-LOX y 5-LOX con DHA generaban ácido 7S,14S-dihidroxiidocosa-4Z,8E,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico (n= 5; Figura 2, perfil en puntos y Figura 10). Probablemente, este sea un isómero del material aislado en MΦ (Figuras 2 y 3), porque este compuesto de referencia (curva de puntos de la Figura 2A) no coeluía con productos derivados de MΦ por debajo de las etiquetas I y II. Este producto de doble dioxigenación a 0,1 ng de dosis por ratón reducía la infiltración de PMN en peritonitis inducida por zimosano, pero parecía ser menos potente que el material aislado de MΦ (Figura 3B). Por tanto, los resultados de la Figura 3 demuestran claramente las potentes bioacciones del producto que contiene 7,14-dihidroxiilo novedoso purificado por HPLC a partir de incubaciones de MΦ residentes con zimosano y ácido 14S-hidroperoxidocosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico.

Se llevaron a cabo experimentos adicionales para aislar el material bajo los picos I y II (Figura 2A) y determinar si el compuesto I es un isómero de II. Sometiendo los compuestos aislados a condiciones de isomerización (22) se demostró que el compuesto II probablemente contenía una estructura de trieno que contiene un doble enlace cis sensible a la conversión en un isómero I de trieno conjugado que contiene todo trans (concretamente, 8E,10E,12E) en condiciones de trabajo y procesamiento. En vista de la incorporación de ¹⁸O y el atrapamiento de epóxido (véase a continuación), es probable que el pico del isómero I contenga también racematos R/S en el carbono 7. Se llevó a cabo una purificación por HPLC-FI adicional del producto que contiene 7,14-dihidroxiilo de MΦ para valorar sus acciones. Los resultados de la Figura 3C demuestran que, a dosis tan bajas como 0,2 ng/ratón, el nuevo compuesto reducía potentemente la infiltración de PMN en los sitios de inflamación.

50 *Fagocitosis potenciada por macrófagos.* Es un rasgo clave de un mediador prorrresolutivo, además de limitar la entrada de PMN, la acción dual de estimular la captación por MΦ de PMN apoptóticos y/o zimosano para estimular la resolución y la eliminación microbiana (4, 13, 23). A continuación, se determinó si el nuevo compuesto derivado de MΦ potenciaba la fagocitosis y se comparó con RvE1, PD1 y un eicosanoide, PGE₂ (Figura 3D, recuadro). RvE1 y PD1 son potentes potenciadores de la fagocitosis de MΦ a concentraciones tan bajas como 1 mM (13). Para comparación directa, el producto de doble dioxigenación (7S,14S-di-HDHA) era activo, pero menos potente que el nuevo producto aislado de MΦ. Por tanto, dadas sus potentes acciones y estructura novedosa, se designó el producto de MΦ como maresina 1 (MaR1).

Ruta biosintética de maresina. La Figura 5 ilustra un esquema hipotético de la ruta de maresina. Se convierte DHA en ácido 14-hidroperoxidocosa-hexaenoico, probablemente a través de 12-LOX en seres humanos, como se muestra en incubaciones de DHA y 12-LOX, seguido de reducción a 14S-HDHA y/o, mediante doble dioxigenación, por

ejemplo 12-LOX/5-LOX secuencial, generando 7S,14S-diHDHA. En ratones deficientes en 12/15-LOX, se redujo la generación de 14S-HDHA en peritonitis >95 %. El intermedio clave 14S-hidroperóxido se convierte enzimáticamente en un intermedio que contiene 13(14)-epóxido, que se hidroliza enzimáticamente entonces a través de un catión carbonio hasta ácido 7,14S-dihidroxidocosahexaenoico, creando un trieno conjugado con 3 de los 6 dobles enlaces.

5 Los resultados de la incorporación del isótopo oxígeno-18 usando $H_2^{18}O$ demostraron que > 75 % del oxígeno en la posición de carbono 7 derivaba de H_2O (véase la Figura 6) y no de oxígeno molecular, como habría sido el caso si este grupo alcohol en posición 7 se generase por un mecanismo de doble dioxigenación (véase 20). En paralelo, se llevó a cabo un atrapamiento de alcohol con metanol ácido en exceso con los MΦ aislados que procuró el producto ácido 7-metoxi-14-hidroxidocosa-4Z,8,10,12,16Z,19Z-hexaenoico atrapador de metoxilo, identificado usando análisis

10 orientado por CL/EM/EM. Su espectro de MS^2 mostró iones consistentes con el ataque auxiliado por ácido en la posición de carbono 7 y la adición de metoxilo, dando el espectro de MS^2 de m/z 373 a los 10,2 min (recuadro de la Figura 4 para asignaciones de ion y Figura 5). También es posible que pudiera haber ocurrido una adición de metoxilo en la posición de carbono 13 que pudiera dar esencialmente los mismos iones en MS^2 . Es más probable que la adición de metoxilo fuera en el carbono 7, porque está en el extremo menos estéricamente impedido del

15 catión de carbonio conjugado.

Para proporcionar una confirmación adicional de la ruta de maresina y el esquema biosintético, se incubaron MΦ de murino aislados ($15,5 \times 10^6$ células/3 ml, 37 °C, 30 min) con zimosano y DHA- d_5 marcado con deuterio (10 μM) que contiene 5 átomos de deuterio en las posiciones de carbono 21, 22, 22 y 22. Los MΦ convertían el DHA- d_5 en

20 14S-HDHA- d_5 , con los iones de diagnóstico en su espectro de masas a m/z 348, 330, 304, 286 y 205, así como evidencias adicionales de producto que contiene 7,14S-dihidroxilo. La estructura de dihidroxilo portaba d_5 del precursor, se confirmó con los iones a m/z 364, 346, 320 y 302 y los grupos hidroxilo en posiciones 7 y 14 apoyados por m/z 251, 223 y 250, 221 respectivamente (no mostrado). En conjunto, estos resultados proporcionan apoyo a la biosíntesis de un intermedio de 13(14)-epóxido por MΦ a partir del ácido 14S-hidroperoxidocosa-

25 4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico (14S-HpDHA), que se convierte enzimáticamente en el ácido 7,14-dihidroxidocosa-4Z,8,10,12,16Z,19Z-hexaenoico, potente y bioactivo MaR1 en la Figura 5.

El DHA (C22:6) es un ácido graso esencial y miembro de la familia n-3 de ácidos grasos, que están a altos niveles en aceites marinos. Es esencial para sistemas de mamíferos en que no se biosintetiza *de novo* y por lo tanto es un

30 requisito nutricional (10, 11, 21). Se proporciona en la presente memoria una ruta novedosa tal que, durante la resolución, el DHA se convierte en nuevos y potentes productos bioactivos. Esta nueva ruta se identificó usando lipidómica de mediador orientada de exudados de peritonitis de murino, y se demostró tanto con MΦ de murino como humanos. La biofunción paralela y análisis espectrales confirmaron las nuevas estructuras como productos que contienen 7,14-dihidroxilo biosintetizados a partir de DHA. Uno de los productos novedosos caracterizados, la

35 maresina 1, probó ser un mediador potente, deteniendo la infiltración de PMN y estimulando la fagocitosis de MΦ. Un isómero de la maresina 1, 7S,14S-diHDHA, era menos potente, indicando acciones estereoselectivas *in vitro* e *in vivo*. Estas acciones antiinflamatorias y prorresolutivas eran evidentes en el intervalo de nanogramos tanto *in vitro* como *in vivo*, sugiriendo que esta nueva ruta mediadora podría desempeñar un papel clave en la regulación de la catábasis o retorno de tejidos del estado inflamatorio a la homeostasis (8, 13).

40

Los nuevos compuestos aislados de MΦ mostraban acciones distintas y separadas sobre PMN en comparación con células mononucleares, como aquellas identificadas últimamente para mediadores multifuncionales. Específicamente, para acelerar la resolución, los miembros de este nuevo género de mediadores endógenos portan acciones multinivel que limitan la acumulación de PMN adicional en sitios de tejido y estimulan la eliminación,

45 potenciando la fagocitosis de MΦ no flogística (4, 23). Este tipo de selectividad pone una separación espacial y temporal, así como funcional, entre estos nuevos mediadores y, por ejemplo, leucotrienos que estimulan respuestas proinflamatorias.

Cuando se comparó con RvE1 derivado de EPA y PD1/NPD1 de DHA que porta grupos alcohol en el carbono 10 y

50 17 (6, 7, 20, 21), la MaR1 probó ser de potencia comparable (Figura 3). En contraposición, la PGE_2 no potenciaba la fagocitosis, un hallazgo consistente con que PGE_2 y PGD_2 reducen específicamente la fagocitosis por MΦ de células apoptóticas (24). Aunque las resolvinas de serie D y serie E, así como PD1, comparten acciones prorresolutivas y antiinflamatorias con el género, cada miembro actúa en receptores específicos (4, 14) y, por tanto, dadas las acciones estereoespecíficas de los nuevos mediadores de ruta, es probable que actúen sobre sus propios

55 receptores separadamente de aquellos de Rv. Estos hallazgos con los mediadores químicos novedosos sugieren que potenciar la capacidad de MΦ de retirar las células apoptóticas y necróticas de los sitios de inflamación y potenciar la contención de partículas microbianas junto con la regulación negativa de la entrada de nuevos PMN en el sitio puede no solo acortar el intervalo de resolución (8, 13), sino que también puede proteger los tejidos del daño por lesión de tejido indeseada y estrés oxidativo que pueden acompañar a inflamación e infección.

Se determinó también que el intermedio epóxido puede experimentar hidrólisis no enzimática, dando productos que contienen 7*R/S*,14*S*-dihidroxiol (que parecen coeluir en este sistema de CL) y el correspondiente diol vecinal, a saber ácido 13,14-dihidroxicosahexaenoico (que se aisló e identificó, véanse la Figura 5, la Figura 10 y la Figura 7). La secuencia biosintética propuesta está también apoyada por los resultados de la incorporación de ¹⁸O y rastreo marcado con deuterio (d₅) de d₅-DHA a productos de la ruta de maresina marcados con d₅. En conjunto, estos resultados proporcionan evidencias de una ruta altamente efectiva en MΦ residentes aislados para la biosíntesis de nuevos y potentes mediadores químicos mediante la 14-lipoxigenación de DHA y posteriores etapas enzimáticas (Figura 5). Se identificó también a 4,14-di-HDHA (Figura 10) como un producto probable de las interacciones de 5-LOX y 12-LOX, así como a otros dos nuevos productos de DHA generados por MΦ, un docosanoide que contiene 13(14)-epoxialcohol y ácido 4*S*,13,14*S*-trihidroxicosahexaenoico-5,7,9,11,16*Z*,19*Z*-hexaenoico.

Se identificó por primera vez el 14*S*-HDHA a través de araquinodato 12-LOX en las branquias de peces (25) y en plaquetas humanas (26), sistemas neuronales (27) y muchos otros organismos mamíferos e invertebrados marinos (28). Por tanto, aunque se identificó a 14*S*-HDHA en muchos sistemas, seguía sin determinarse que puede servir como marcador de la conversión de DHA en mediadores bioactivos novedosos. Debería indicarse que, además de la producción de 14*S*-HDHA por células con 12-LOX, la 15-LOX humana puede contribuir también a esta ruta de 14-LOX, porque los MΦ y otras células humanas poseen unas destacadas 12-LOX y 15-LOX (2, 10, 18), y el 14*S*-HDHA estaba esencialmente ausente en ratones deficientes de 12/15-LOX. Dada la importancia de 12-LOX de plaquetas en la biosíntesis transcelular de mediadores lipídicos (4), es probable que las interacciones célula-célula puedan contribuir también a la biosíntesis de maresinas y productos relacionados.

Aunque los suplementos de ácidos grasos n-3 marinos son de amplio uso en animales y seres humanos porque se cree que poseen acciones terapéuticas, las evidencias convincentes de ensayos clínicos que apoyen sus acciones en el tratamiento de trastornos inflamatorios y la reducción del riesgo de cáncer no carecen de críticas (29-31). Son posibles fuentes de variación en sus acciones en los estudios clínicos a) las dosis muy altas usadas (dosis de miligramos a gramos), b) la ausencia de biomarcadores apropiados de utilización de ácidos grasos ω-3 y c) funciones mediadoras específicas provocadas en el intervalo de pico- a nanogramos. Por tanto, las nuevas rutas y maresinas bioactivas documentadas aquí, junto con las resolvinas, protectinas y metabolomas funcionales relacionados, podrían proporcionar un nuevo medio para calificar el impacto de los ácidos grasos ω-3 esenciales en la salud y la enfermedad, así como dar nuevos enfoques terapéuticos.

Materiales y procedimientos

Se adquirieron DHA, 12-LOX (porcina), 5-LOX (humana), 17-HDHA-d₅ y PGE₂-d₄ en Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI). El zimosano A era de Sigma (St. Louis, MO). Se obtuvieron los materiales de extracción de fase sólida, disolventes y reactivos de CL/EM/EM y CG-EM (32). Se prepararon RvE1 y PD1 sintéticos mediante síntesis orgánica total según los criterios de concordancia publicados (32) por el NIH Specialized Research Center P50-DE016191 (en el C.N.S.; Nicos A. Petasis, USC).

Se preparó 14*S*-HpDHA a partir de DHA (~150 μM) y se incubó con 12-LOX (porcina) aislada 5,4 U/ml (tampón fosfato 0,05 M, 0,02 % de Tween 20, pH 7,4). Se aisló 14*S*-HpDHA mediante HPLC-FI (Agilent 1100 Series) usando una columna C18 (Beckman 250 mm x 10 mm x 5 μm) y una fase móvil consistente en metanol/agua (80/20; v/v) a 4 ml/min durante 20 min, y era >98 % de configuración (*S*). La reducción con NaBH₄ produjo 14*S*-HDHA, usado como patrón de espectrometría de masas. Se efectuó la síntesis biogénica del producto de doble dioxigenación (7*S*,14*S*-diHDHA) con enzima 5-LOX incubada con 14*S*-HDHA. Se subió de escala el 7*S*,14*S*-diHDHA para comparación directa de las propiedades biológicas y físicas con las de los otros compuestos novedosos aislados de MΦ.

Incubaciones de macrófagos.

Se recogieron MΦ peritoneales residentes por lavado de ratones no infectados (ratones FVB de 20-25 g, 6-8 semanas de edad; Charles River Labs, Wilmington, MA) con acceso ilimitado a la dieta de roedor 5001 (Lab Diet, St. Louis, MO) que contiene EPA al 1,5 % y DHA al 1,9 % de los ácidos grasos totales (19). Todos los estudios animales se aprobaron y efectuaron de acuerdo con las directrices proporcionadas por el Harvard Medical Standing Committee on Animals (número de protocolo 02570).

Después de la centrifugación (2000 rpm) y adición de DPBS^{+/+}, se incubaron los MΦ (15,5 x 10⁶ células/3 ml) con zimosano A y DHA o 14*S*-HpDHA 10 μM (pH 7,45, 37 °C durante 30 min). Para valorar la incorporación de ¹⁸O, se añadieron 0,45 ml de H₂¹⁸O (Cambridge Isotopes, Andover, MA) a 50 μl de 10X DPBS^{+/+}, se mezcló y se ajustó a

~pH 7,3 con HCl 1 N. Se suspendieron los MΦ peritoneales aislados (5×10^6 células) en tampón que contiene $H_2^{18}O$. Después de una rápida congelación-descongelación en nitrógeno líquido, se añadió 14S-HpDHA (5 μ M) purificado con A_{23187} (2,5 μ M) durante 30 min a 37 °C. Para el atrapamiento de alcohol, se incubaron MΦ aislados ($5,0 \times 10^6$ células/100 μ l) (37 °C, 5 min) con 14S-HpDHA (100 μ M) y A_{23187} (5 μ M) y se detuvieron las incubaciones con 10X vol. de metanol frío, pH aparente ajustado a ~pH 3 (20). Se detuvieron todas las demás incubaciones con 2 vol. de metanol frío y se mantuvieron a -80 °C antes de la extracción.

Lipidómica de mediador: Aislamiento de producto y extracciones

10 Se añadió patrón interno deuterado (17-HDHA- d_5 , PGE $_2$ - d_4 ; ~3 ng) a cada incubación después de la precipitación de proteína de >30 min. Se extrajeron muestras (32) y se tomaron fracciones de formiato de metilo para lipidómica de mediador basada en CL/EM/EM. Se registraron los espectros UV en metanol usando un Agilent 4682 para la cuantificación y valoración de la integridad estructural de mediadores conocidos usando coeficientes de extinción apropiados (32).

15

Se efectuó el análisis basado en CL-EM/EM con un HPLC Agilent 1100 series acoplado con un espectrómetro de masas cuadrupolar de atrapamiento de ion lineal ABI Sciex Instruments 3200 Qtrap equipado con una columna Agilent Eclipse Plus C18 (4,6 mm x 50 mm x 1,8 μ m). Se ejecutó el instrumento en modo de ionización negativa y, para el modo de ion producto potenciado (EPI), la fase móvil consistía en metanol/agua/ácido acético (60/40/0,01; v/v/v) y se escalonó a 80/20/0,1 (v/v/v) durante 7,5 min y a 95/5/0,01 (v/v/v) en los siguientes 4,5 min a un caudal de 400 μ l/min. Se disminuyó el caudal a 200 μ l/min durante 3 min, se devolvió entonces a 400 μ l/min y se escalonó la fase móvil durante los siguientes 6 min a 100/0/0,01 (v/v/v). Para la adquisición de datos de monitorización de reacciones múltiples (MRM), la fase móvil era metanol/agua/ácido acético (60/40/0,01; v/v/v) escalonada a 80/20/0,01 (v/v/v) después de 5 min, 95/5/0,01 (v/v/v) después de 8 min y 100/0/0,01 después de 14 min para lavar la columna.

25

Los productos que contienen dihidroxilo novedosos de DHA se monitorizaron en modo de ion de producto potenciado (EPI, 359,2). Se usaron los pares iónicos de los procedimientos de MRM reseñados para análisis y cuantificación de 17-HDHA, 14S-HDHA y patrones internos. Se usó el par iónico 359,2/250,2 para identificar los productos que contienen 7,14-dihidroxilo. Se usaron para identificación los criterios de concordancia del tiempo de retención y ≥ 6 iones de diagnóstico de los de las referencias sintéticas (32). Se llevó a cabo la cuantificación usando curvas de calibración construidas para cada compuesto y se monitorizaron las recuperaciones usando patrones internos deuterados añadidos.

30

35 *Peritonitis y fagocitosis de murino*

Se aislaron los productos que contienen 7,14-dihidroxilo de las fracciones de formiato de metilo obtenidas a partir de MΦ de murino mediante HPLC-FI (Agilent 1100 series) usando una columna Beckman C18 (250 mm x 10 mm x 5 μ m) y metanol/agua (65/35; v/v) escalonado a 85/15 (v/v) durante 30 min. Se valoraron sus acciones en peritonitis inducida por zimosano A de murino (19). Se inició la peritonitis mediante la administración intraperitoneal (*i.p.*) de 1 mg de zimosano A en 1 ml de solución salina estéril, y se administró cada compuesto *i.v.* 5 min antes del zimosano. A las 2 h, se sacrificaron los ratones y se recolectaron los exudados peritoneales (5 ml de DPBS $^{-}$ sin calcio ni magnesio), se identificaron y se enumeraron por microscopia óptica y FACS. Se identificaron los MΦ residentes por FACS (8). Para valorar las acciones prorresolutivas, se incubaron los MΦ peritoneales (placa de 24 pocillos, 10^5 células/pocillo) de ratones no infectados con cada compuesto (15 min, pH 7,45), seguido de la adición de zimosano A marcado con FITC (30 min, 37 °C). Se usó azul de tripano para inactivar las partículas extracelulares de zimosano (1 min, 37 °C), seguido de DPBS $^{+/+}$ (pH 7,45) y se cuantificó la fagocitosis usando un Perkin-Elmer Victor 3 .

40

45

Incubaciones de macrófagos humanos. Se aislaron monocitos de sangre periférica humana de donantes sanos mediante selección positiva usando microperlas CD14 y una columna MACS (Miltenyi Biotec). Después del aislamiento, se sembraron las células en RPMI con 10 % de FBS en presencia de GM-CSF (10 ng/ml) durante 7 días para permitir la diferenciación en macrófagos maduros. Se incubaron entonces los macrófagos con 14-HpDHA (5 μ g) o DHA (5 μ g) en presencia de zimosano (100 μ g) durante 30 min a 37 °C en DPBS $^{+/+}$. Se terminaron las incubaciones mediante la adición de 2 vol. de metanol frío y se tomaron muestras para extracción en fase sólida.

50

Análisis de CG-EM. Se efectuaron los análisis de CG-EM con un Agilent HP 6890 equipado con un detector selectivo de masas HP5973. Se prepararon los derivados de trimetilsililo individuales después de tratar los compuestos aislados con diazometano. El voltaje de ionización era de 70 eV y la temperatura de la fuente iónica era de 230 °C. Se empleó una columna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, Agilent Technologies, Wilmington, DE) con un

55

programa de temperatura; la temperatura inicial era de 150 °C durante 2 min, se escalonó a 230 °C (8 min) y a 280 °C (10 min) y se mantuvo a 280 °C durante 10 min con un caudal de helio de 1,0 ml/min.

Análisis de HPLC-EM/EM quiral. Se conectó un Chiralpak AD-RH (150 x 2 x 5 µm, Chiral Technologies, Inc., West Chester, PA) con un Qtrap 3200 (Applied Biosystems), bombeado con un sistema HPLC Agilent 1100. Se eluyó una fase móvil de acetonitrilo:agua:ácido acético (70:30:0,01 v/v/v) a un caudal de 200 µl/min durante 7 minutos, seguido de gradiente hasta 100:0:0,01 (v/v/v), que se aplicó durante los siguientes 5 minutos.

Análisis estadístico.

10 Se expresan todos los resultados como media ± EEM. Se determinó la significancia estadística usando una prueba de T de Student de dos colas.

Preparación sintética de análogos

15 Sin pretender ser limitante, las Figuras 8 y 9 proporcionan procedimientos sintéticos para preparar diversos análogos descritos en la presente memoria. Los intermedios y productos pueden purificarse, o aislarse, mediante procedimientos conocidos en la materia tales como por recristalización, destilación, cromatografía en columna, etc.

20 Con referencia a la Figura 8, puede someterse un análogo di- o trihidroxílico a condiciones oxidativas y esterificarse, proporcionando una funcionalidad cetona en la cadena de alquilo. La funcionalización con un agente alquilante adecuado, tal como un reactivo de Grignard, proporciona un producto o productos alquilados, dependiendo del número de cetonas presentes y de la cantidad relativa de agente alquilante proporcionada. El éster puede desesterificarse proporcionando un ácido carboxílico.

25 La Figura 9 proporciona un esquema sintético para preparar análogos de maresina terminados en trifluorometilo. Acoplar el alquino protegido con trifluorometilhidroxilo con un trieno yodado proporciona un pentadieno terminado en trifluorometilo/alquino después de la desprotección de los grupos hidroxilo. El intermedio puede oxidarse en esta etapa, como se describe anteriormente, proporcionando intermedios mono- o dicetónicos que pueden alquilarse, 30 proporcionando una funcionalidad o funcionalidades hidroxílicas terciarias. Como alternativa, el pentadieno terminado en trifluorometilo/alquino puede desprotegerse y someterse a condiciones reductivas, proporcionando 22-trifluoromaresina 1, que puede oxidarse adicionalmente y tratarse en condiciones de alquilación como se describe anteriormente, proporcionando los compuestos VIa a VIc, por ejemplo.

35 Referencias

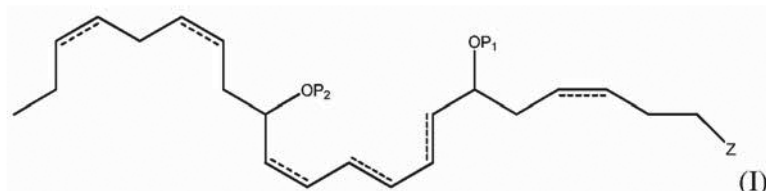
1. Nathan, C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature* 420:846-852.
2. Samuelsson, B. 1983. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 220:568-575.
- 40 3. Gilroy, D.W., T. Lawrence, M. Perretti, and A.G. Rossi. 2004. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3:401-416.
4. Serhan, C.N., N. Chiang, and T.E. Van Dyke. 2008. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* 8:249-261.
5. Serhan, C.N., C.B. Clish, J. Brannon, S.P. Colgan, N. Chiang, and K. Gronert. 2000. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2- 45 nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J. Exp. Med.* 192:1197-1204.
6. Serhan, C.N., S. Hong, K. Gronert, S.P. Colgan, P.R. Devchand, G. Mirick, and R.-L. Moussignac. 2002. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter pro-inflammation signals. *J. Exp. Med.* 196:1025-1037.
- 50 7. Hong, S., K. Gronert, P. Devchand, R.-L. Moussignac, and C.N. Serhan. 2003. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood and glial cells: autacoids in anti-inflammation. *J. Biol. Chem.* 278:14677-14687.
8. Bannenberg, G.L., N. Chiang, A. Ariel, M. Arita, E. Tjonahen, K.H. Gotlinger, S. Hong, and C.N. Serhan. 2005. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J. Immunol.* 174:4345-4355.
- 55 9. Cotran, R.S., V. Kumar, and T. Collins, editors. 1999. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. W.B. Saunders Co., Philadelphia. 1425 pp.
10. Calder, P.C. 2007. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 77:327-335.
11. Simopoulos, A.P. 2002. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J. Am. Coll. Nutr.*

- 21:495-505.
12. Orr, S.K., and R.P. Bazinet. 2008. The emerging role of docosahexaenoic acid in neuroinflammation. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 9:735-743.
13. Schwab, J.M., N. Chiang, M. Arita, and C.N. Serhan. 2007. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 447:869-874.
14. Arita, M., F. Bianchini, J. Aliberti, A. Sher, N. Chiang, S. Hong, R. Yang, N.A. Petasis, and C.N. Serhan. 2005. Stereochemical assignment, anti-inflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J. Exp. Med.* 201:713-722.
15. Cash, J.L., R. Hart, A. Russ, J.P.C. Dixon, W.H. Colledge, J. Doran, A.G. Hendrick, M.B.L. Carlton, and D.R. Greaves. 2008. Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23. *J. Exp. Med.* 205:767-775.
16. Hudert, C.A., K.H. Weylandt, J. Wang, Y. Lu, S. Hong, A. Dignass, C.N. Serhan, and J.X. Kang. 2006. Transgenic mice rich in endogenous n-3 fatty acids are protected from colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:11276-11281.
17. Gronert, K., N. Maheshwari, N. Khan, I.R. Hassan, M. Dunn, and M.L. Schwartzman. 2005. A role for the mouse 12/15-lipoxygenase pathway in promoting epithelial wound healing and host defense. *J. Biol. Chem.* 280:15267-15278.
18. Merched, A., K. Ko, K.H. Gotlinger, C.N. Serhan, and L. Chan. 2008. Atherosclerosis: Evidence for impairment of resolution of vascular inflammation governed by specific lipid mediators. *FASEB J.* 22:3595-3606.
19. Winyard, P.G., and D.A. Willoughby, editors. 2003. *Inflammation Protocols*. Humana, Totowa, NJ. 378 pp.
20. Serhan, C.N., K. Gotlinger, S. Hong, Y. Lu, J. Siegelman, T. Baer, R. Yang, S.P. Colgan, and N.A. Petasis. 2006. Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes. *J. Immunol.* 176:1848-1859.
21. Mukherjee, P.K., V.L. Marcheselli, C.N. Serhan, and N.G. Bazan. 2004. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:8491-8496.
22. Fox, M.A., and J.K. Whitesell. 1997. *Organic Chemistry*. Jones & Bartlett, Boston. 1248 pp.
23. Godson, C., S. Mitchell, K. Harvey, N.A. Petasis, N. Hogg, and H.R. Brady. 2000. Cutting edge: Lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J. Immunol.* 164:1663-1667.
24. Rossi, A.G., J.C. McCutcheon, N. Roy, E.R. Chilvers, C. Haslett, and I. Dransfield. 1998. Regulation of macrophage phagocytosis of apoptotic cells by cAMP. *J. Immunol.* 160:3562-3568.
25. German, J.B., G.G. Bruckner, and J.E. Kinsella. 1986. Lipoxygenase in trout gill tissue acting on arachidonic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 875:12-20.
26. Lagarde, M., M. Croset, M. Guichardant, and M. Dechavanne. 1985. Role of lipoxygenase products in platelet function: relation to fatty acid modified phospholipids. *Adv. Exp. Med. Biol.* 192:327-335.
27. Kim, H.Y., J.W. Karanian, T. Shingu, and N. Salem, Jr. 1990. Stereochemical analysis of hydroxylated docosahexaenoates produced by human platelets and rat brain homogenate. *Prostaglandins* 40:473.
28. Rowley, A.F., H. Kuhn, and T. Schewe, editors. 1998. *Eicosanoids and Related Compounds in Plants and Animals*. Portland Press, London.
29. MacLean, C.H., S.J. Newberry, W.A. Mojica, P. Khanna, A.M. Issa, M.J. Suttrop, Y.W. Lim, S.B. Traina, L. Hilton, R. Garland, and S.C. Morton. 2006. Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk: a systematic review. *JAMA.* 295:403-415.
30. Dwyer, J.H., H. Allayee, K.M. Dwyer, J. Fan, H. Wu, R. Mar, A.J. Lusis, and M. Mehrabian. 2004. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 350:29-37.
31. Colomer, R., J.M. Moreno-Nogueira, P.P. Garcia-Luna, P. Garcia-Peris, A. Garcia-de-Lorenzo, A. Zarazaga, L. Quecedo, J. del Llano, L. Usan, and C. Casimiro. 2007. N-3 fatty acids, cancer and cachexia: a systematic review of the literature. *Br. J. Nutr.* 97:823-831.
32. Serhan, C.N., Y. Lu, S. Hong, and R. Yang. 2007. Mediator lipidomics: search algorithms for eicosanoids, resolvins and protectins. *Meth. Enzymol.* 432:275-317.
33. WO 2006/055965 A2

Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a realizaciones preferidas, los especialistas en la materia reconocerán que pueden hacerse cambios en la forma y el detalle sin apartarse del alcance de la invención como se define en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende la fórmula (I):



5

donde cada uno de P₁ y P₂ es individualmente un grupo protector o un átomo de hidrógeno;

donde --- es un doble enlace;

donde los dobles enlaces en las posiciones 4, 16 y 19 son cada uno de configuración Z y el doble enlace en la

10 posición 10 es de configuración E;

donde Z es -C(O)OR^d, -C(O)NR^cR^c, -C(O)H, -C(NH)NR^cR^c, -C(S)H, -C(S)OR^d, -C(S)NR^cR^c o -CN;

cada R^a se selecciona independientemente hidrógeno, alquilo (C1-C6), cicloalquilo (C3-C8), ciclohexilo, cicloalquilalquilo (C4-C11), arilo (C5-C10), fenilo, arilalquilo (C6-C16), bencilo, heteroalquilo de 2-6 miembros, cicloheteroalquilo de 3-8 miembros, morfolinilo, piperazinilo, homopiperazinilo, piperidinilo, cicloheteroalquilalquilo de

15 4-11 miembros, heteroarilo de 5-10 miembros o heteroarilalquilo de 6-16 miembros;

cada R^c es independientemente un grupo protector o R^a o, como alternativa, cada R^c se toma junto con el átomo de nitrógeno al que está unido formando un cicloheteroalquilo o heteroarilo de 5 a 8 miembros que puede incluir opcionalmente uno o más de los mismos o diferentes heteroátomos adicionales, y que puede estar opcionalmente sustituido con uno o más de los mismos o diferentes grupos R^a o R^b adecuados;

20 cada R^b se selecciona independientemente de =O, -OR^d, halogenoalquilo (C1-C3), -OCF₃, =S, -SR^d, =NR^d, =NOR^d, -NR^cR^c, halógeno, -CF₃, -CN, -NC, -OCN, -SCN, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -S(O)R^d, S(O)₂R^d, -S(O)₂OR^d, -S(O)NR^cR^c, -S(O)₂NR^cR^c, -OS(O)R^d, -OS(O)₂R^d, -OS(O)₂OR^d, -OS(O)₂NR^cR^c, -C(O)R^d, -C(O)OR^d, -C(O)NR^cR^c, -C(NH)NR^cR^c, -C(NR^a)NR^cR^c, -C(NOH)R^a, -C(NOH)NR^cR^c, -OC(O)R^d, -OC(O)OR^d, -OC(O)NR^cR^c, -OC(NH)NR^cR^c, -OC(NR^a)NR^cR^c, -[NHC(O)]_nR^d, -[NR^aC(O)]_nR^d, -LNHC(O)]_nOR^d, -LNR^aC(O)]_nOR^d, -[NHC(O)]_nNR^cR^c, -[NR^aC(O)]_nNR^cR^c,

25 [NHC(NH)]_nNR^cR^c o -[NR^aC(NR^a)]_nNR^cR^c;

cada n es, independientemente, un entero de 0 a 3; y

cada R^d es, independientemente, un grupo protector o R^a;

donde "alquilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente hace referencia a un radical hidrocarburo monovalente ramificado, de cadena lineal o cíclica saturado o insaturado que tiene el número expresado de átomos de carbono, que deriva de la retirada de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un alcano, alqueno o alquino original;

30 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a condición de que:

- (i) el compuesto se purifique; y/o
(ii) cuando Z es -C(O)OR^d, entonces R^d de Z no sea hidrógeno.

35

2. El compuesto de la reivindicación 1, donde:

- (i) el compuesto se purifica, Z es -C(O)OR^d y R^d de Z es un átomo de hidrógeno; y/o
(ii) el hidroxilo de C-7 tiene la configuración S; y/o

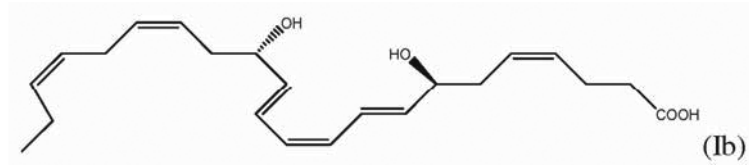
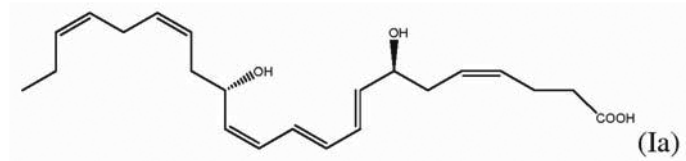
40

- (iii) el alcohol de C-14 tiene la configuración S.

3. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde P₁ y P₂ son ambos átomos de hidrógeno.

45

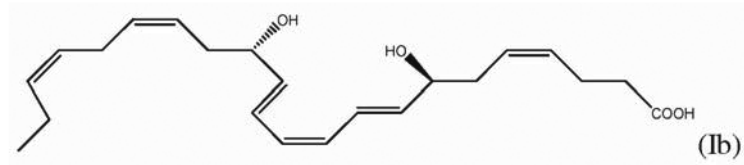
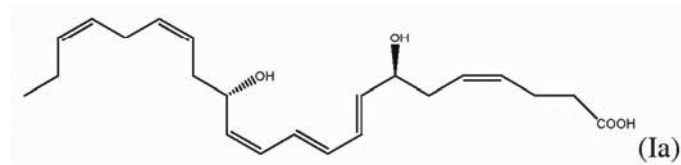
4. Un compuesto que comprende la fórmula (Ia) o (Ib):



o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente donde uno o ambos de los hidroxilos se convierte en un grupo protector.

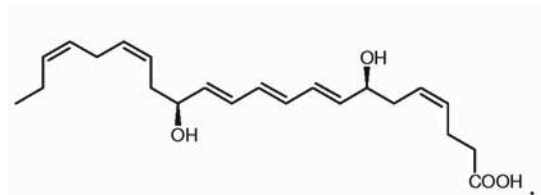
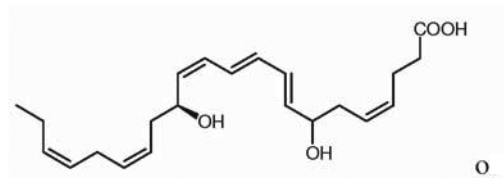
5

5. El compuesto de la reivindicación 4, que comprende la fórmula (Ia) o (Ib):



10 o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Un compuesto que comprende una fórmula seleccionada de entre:



15

7. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 o 6, para uso en:
- (i) medicina; o
 - (ii) el tratamiento o la prevención de inflamación, cáncer neurodegeneración, pérdida de memoria, arrugas, psoriasis, caspa o dermatitis; o
 - (iii) el tratamiento de desarrollo neuronal, desarrollo fetal, homeostasis, remodelación de tejidos o reparación de heridas.
8. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 3 o 5 a 7, y que comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. Uso de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 o 6, para la fabricación de un medicamento para:
- 15 (i) el tratamiento o prevención de inflamación, cáncer, neurodegeneración, pérdida de memoria, arrugas, psoriasis, caspa o dermatitis; o
- (ii) el tratamiento de desarrollo neuronal, desarrollo fetal, homeostasis, remodelación de tejidos o reparación de heridas.

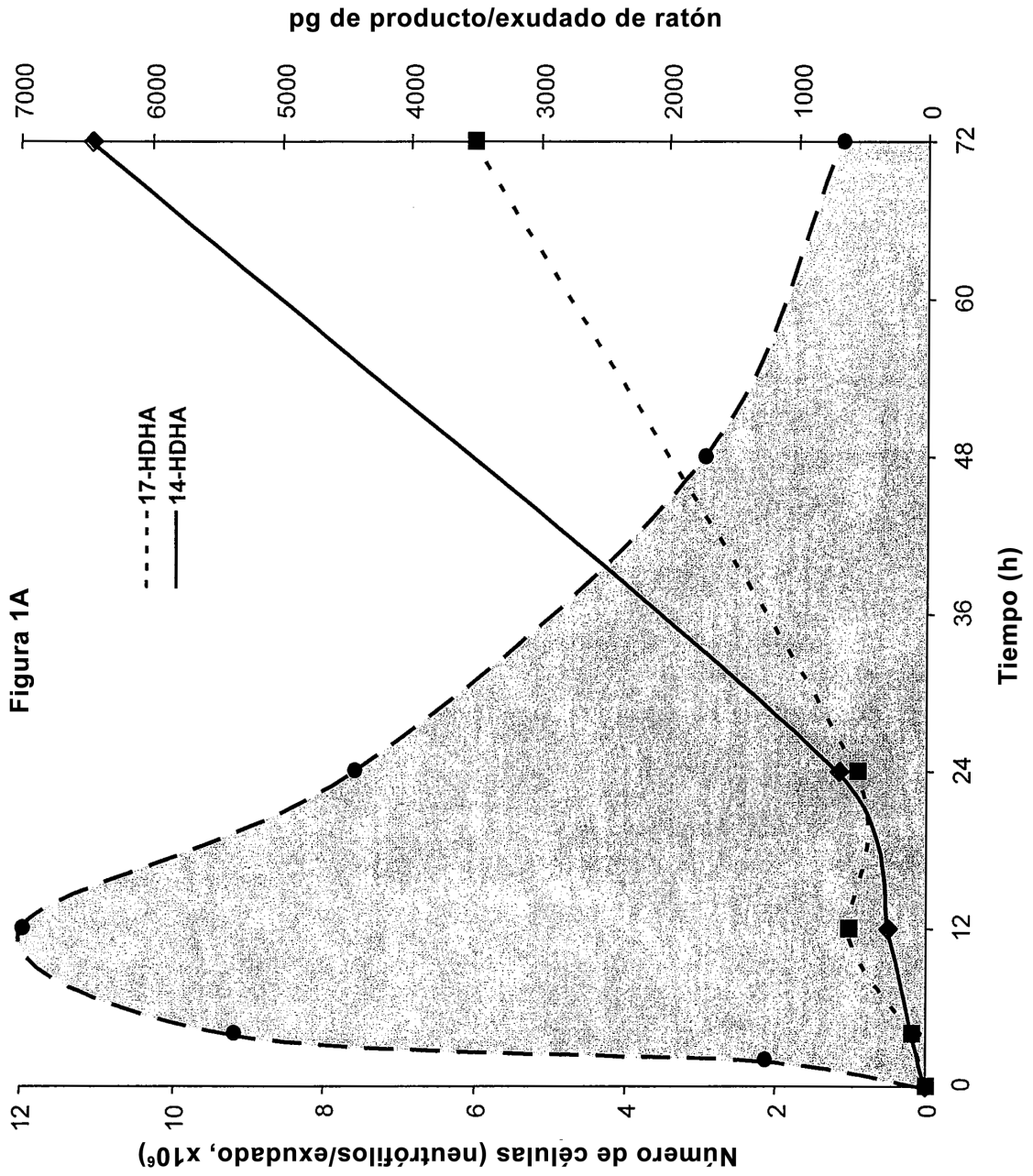
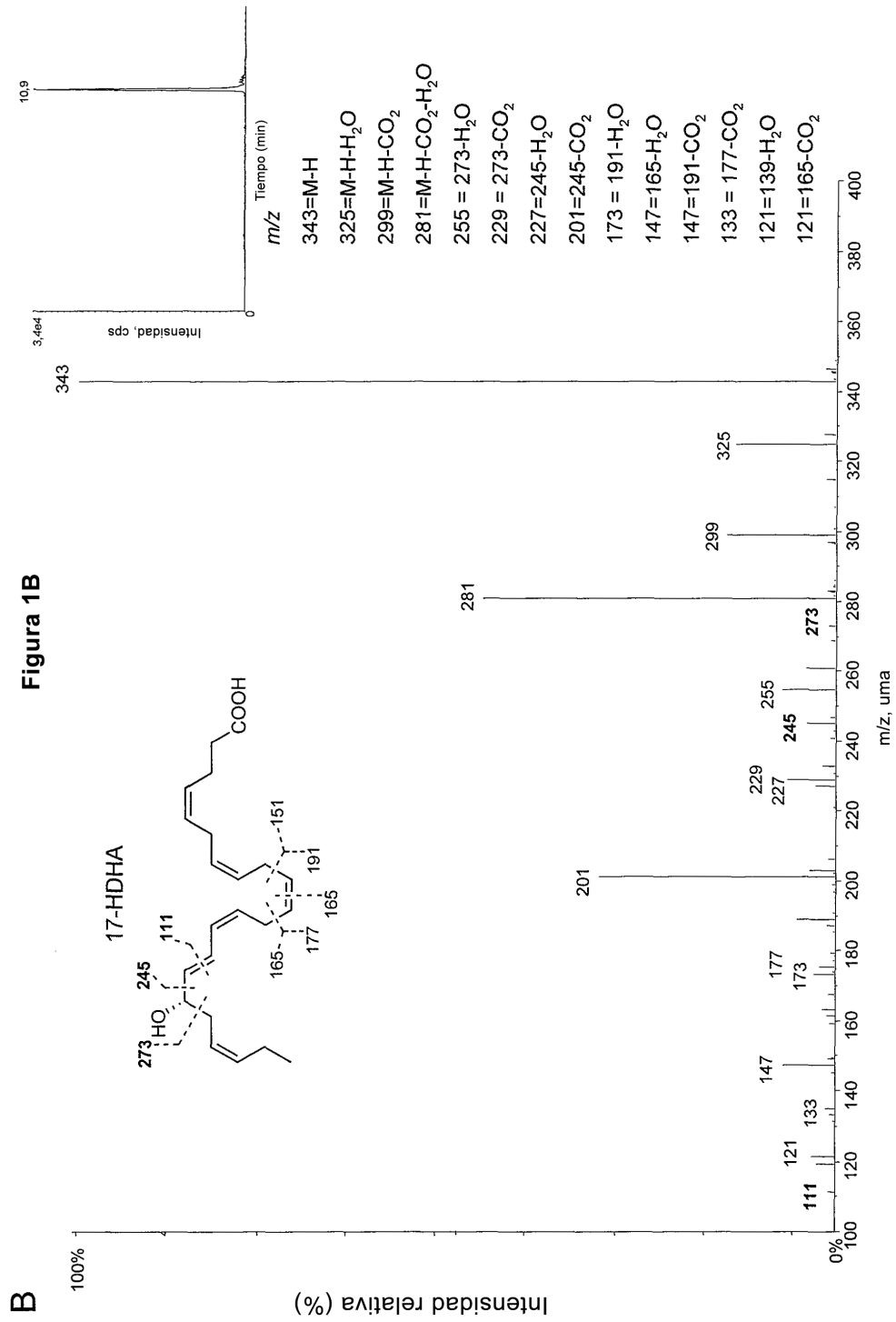
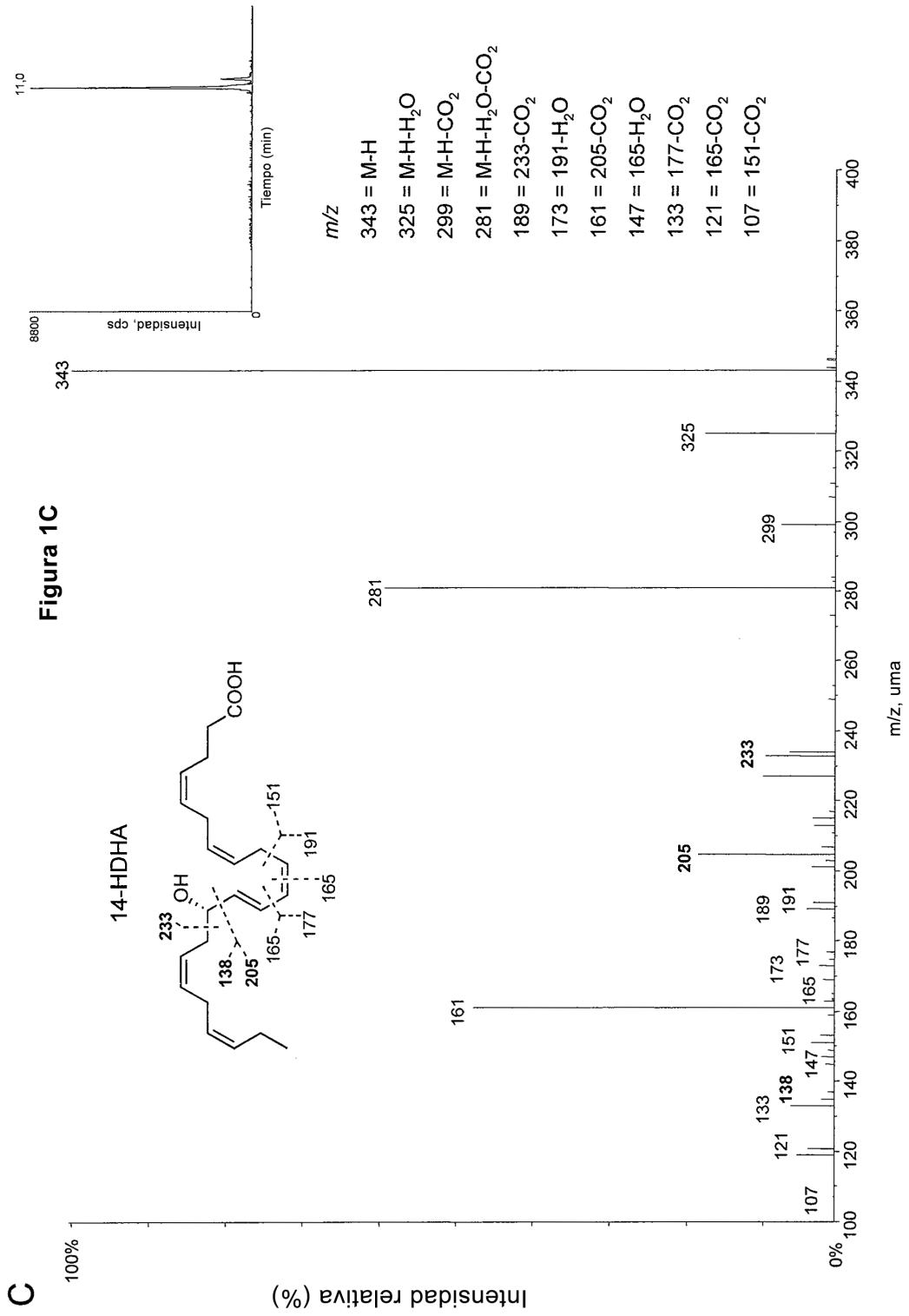


Figura 1A

A





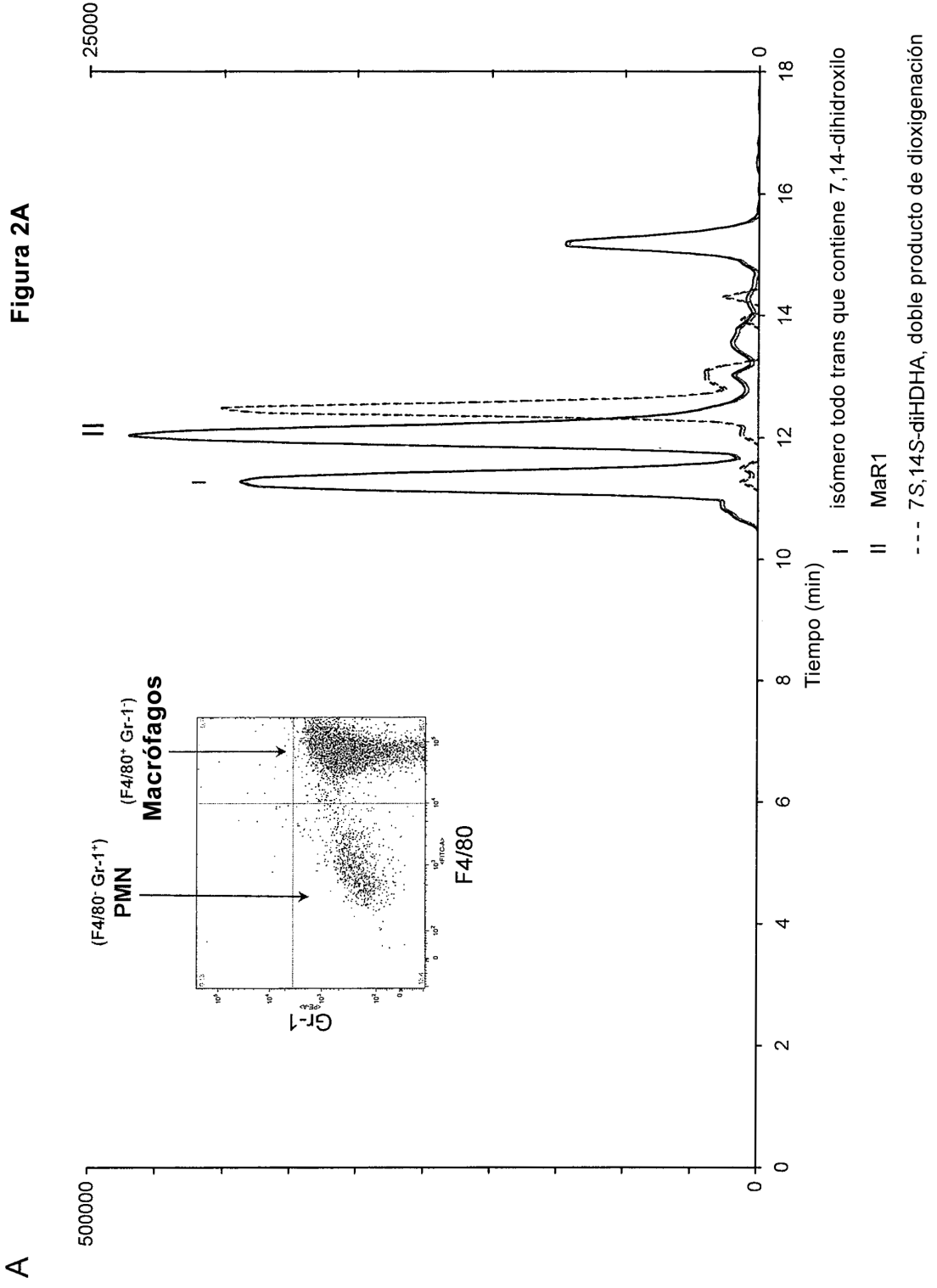
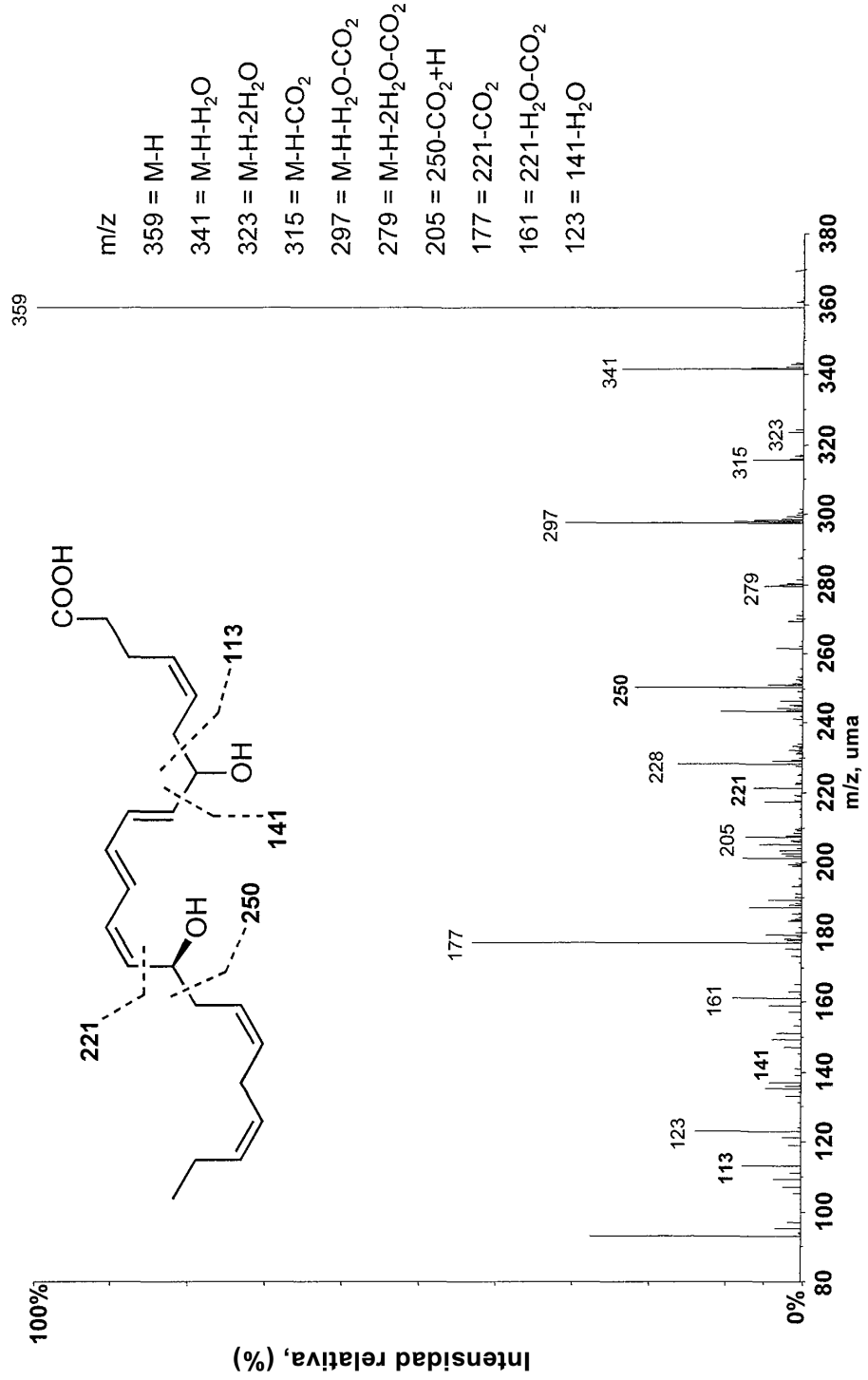
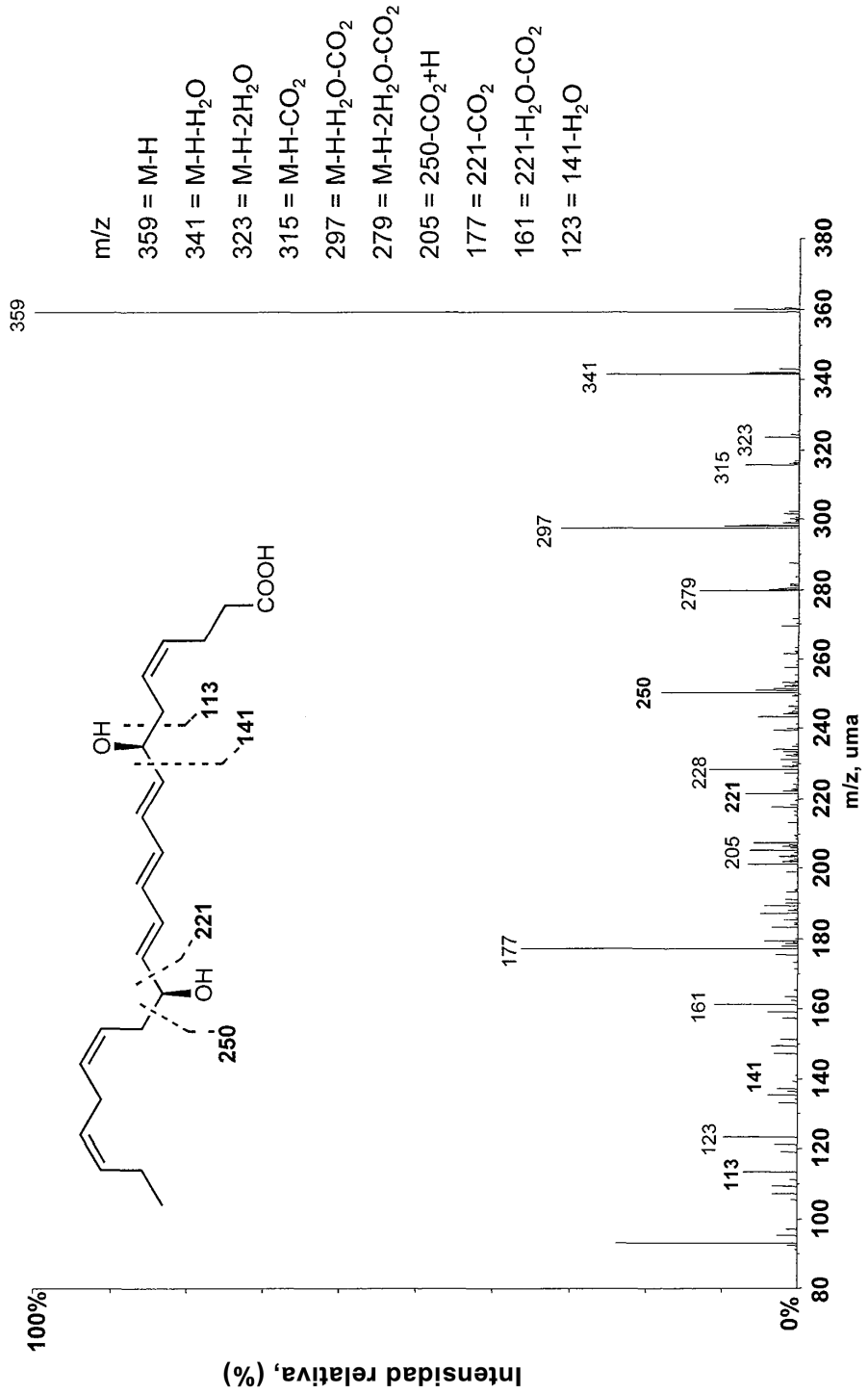


Figura 2B



B

Figura 2C



C

Figura 3A

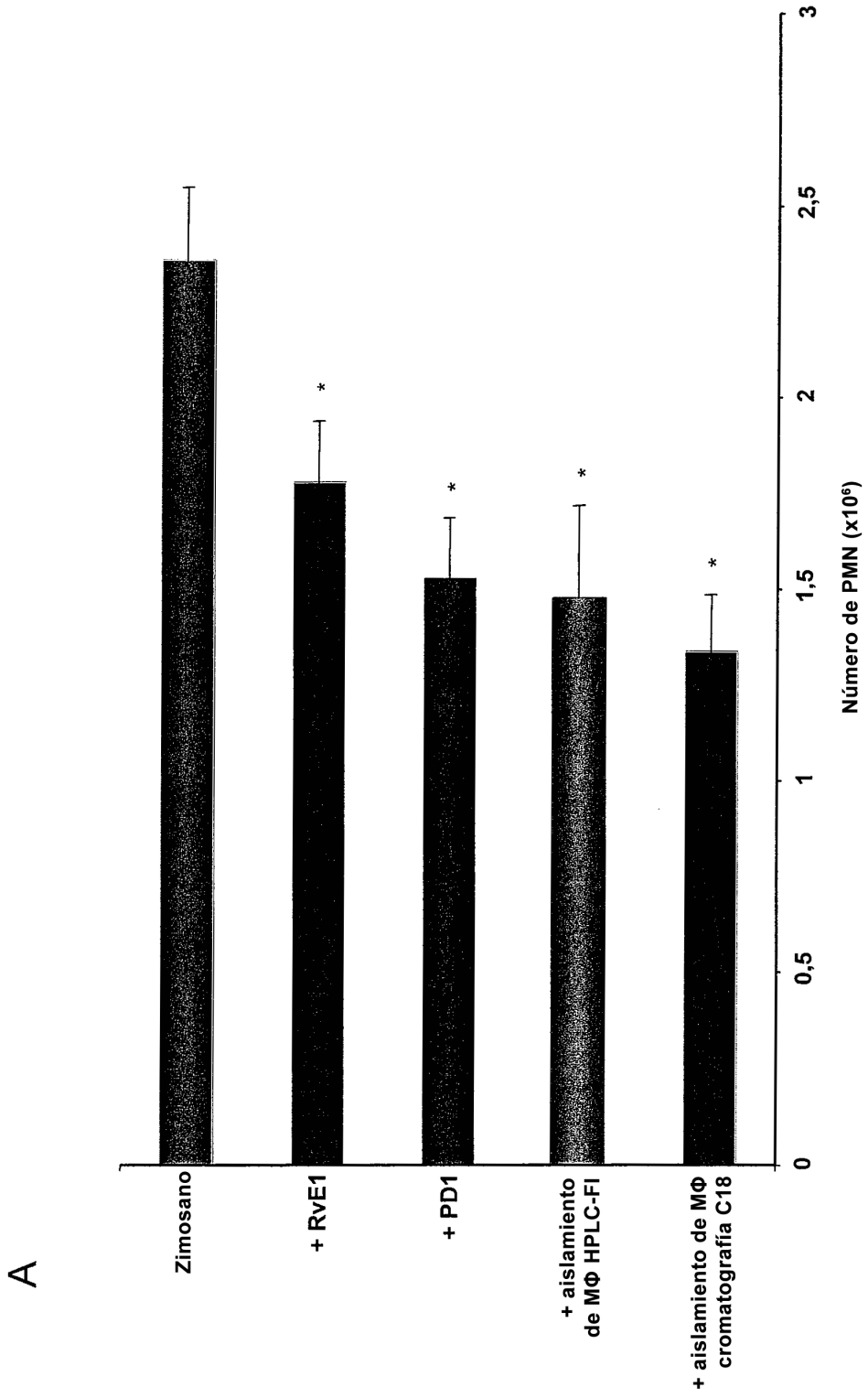
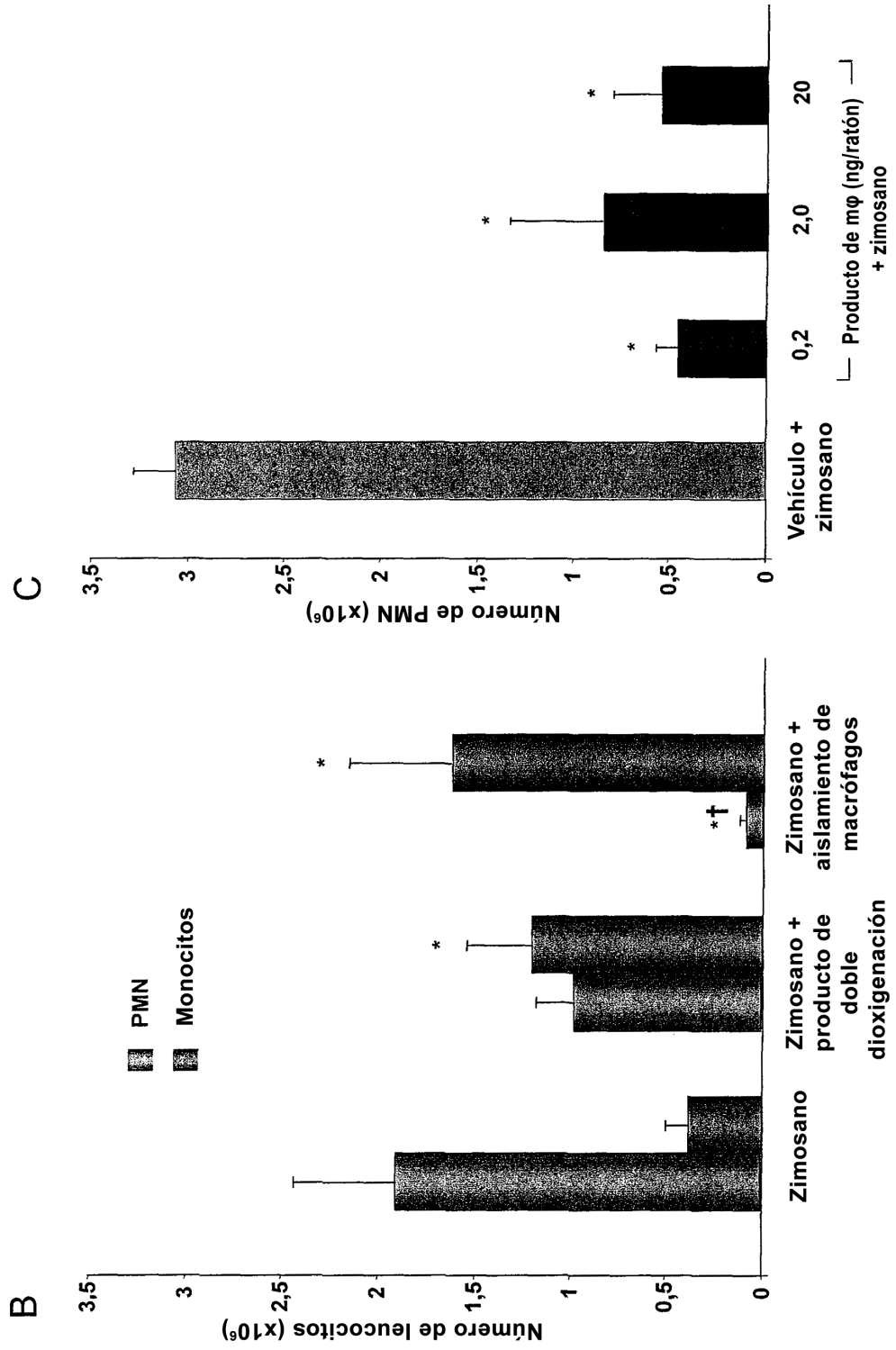
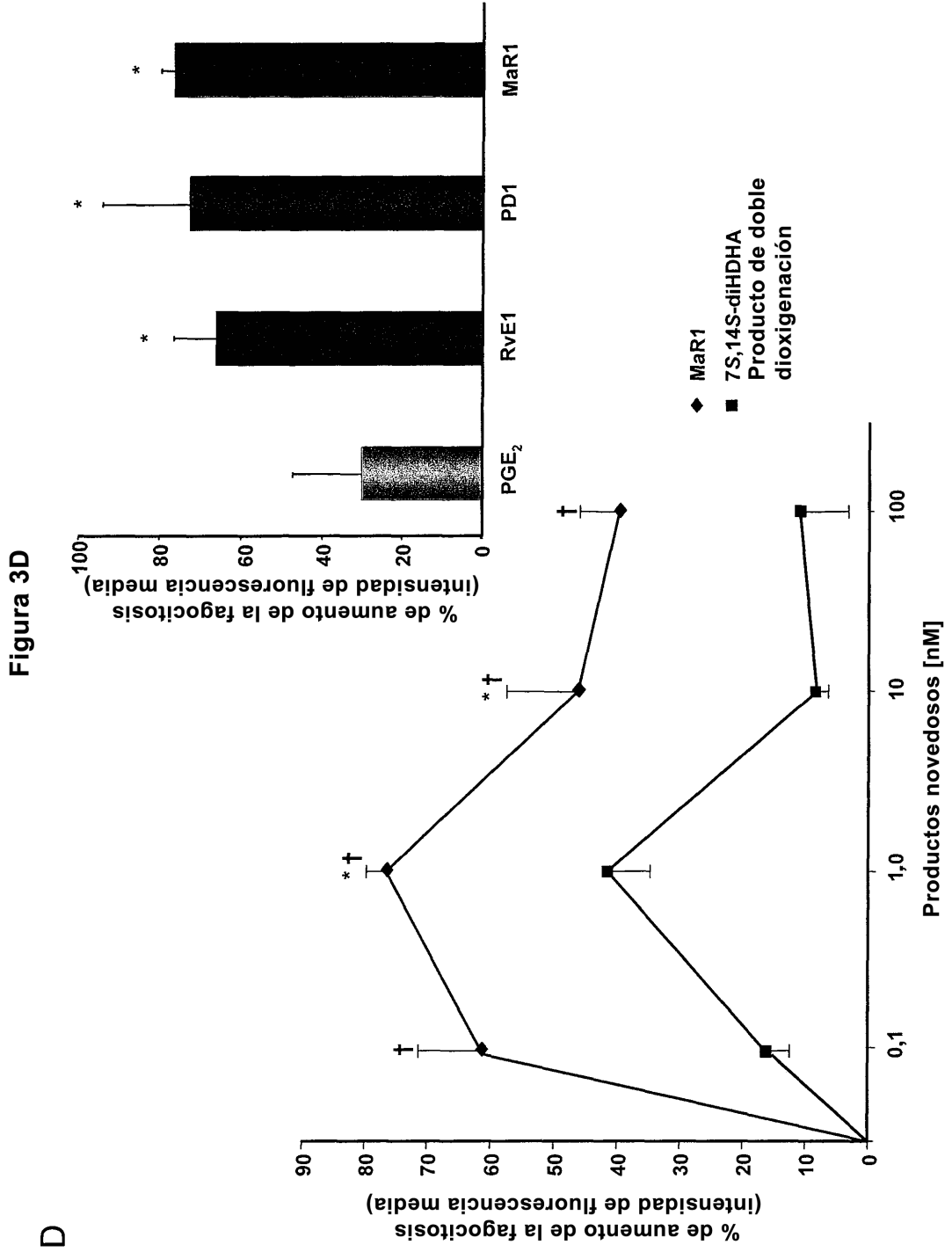


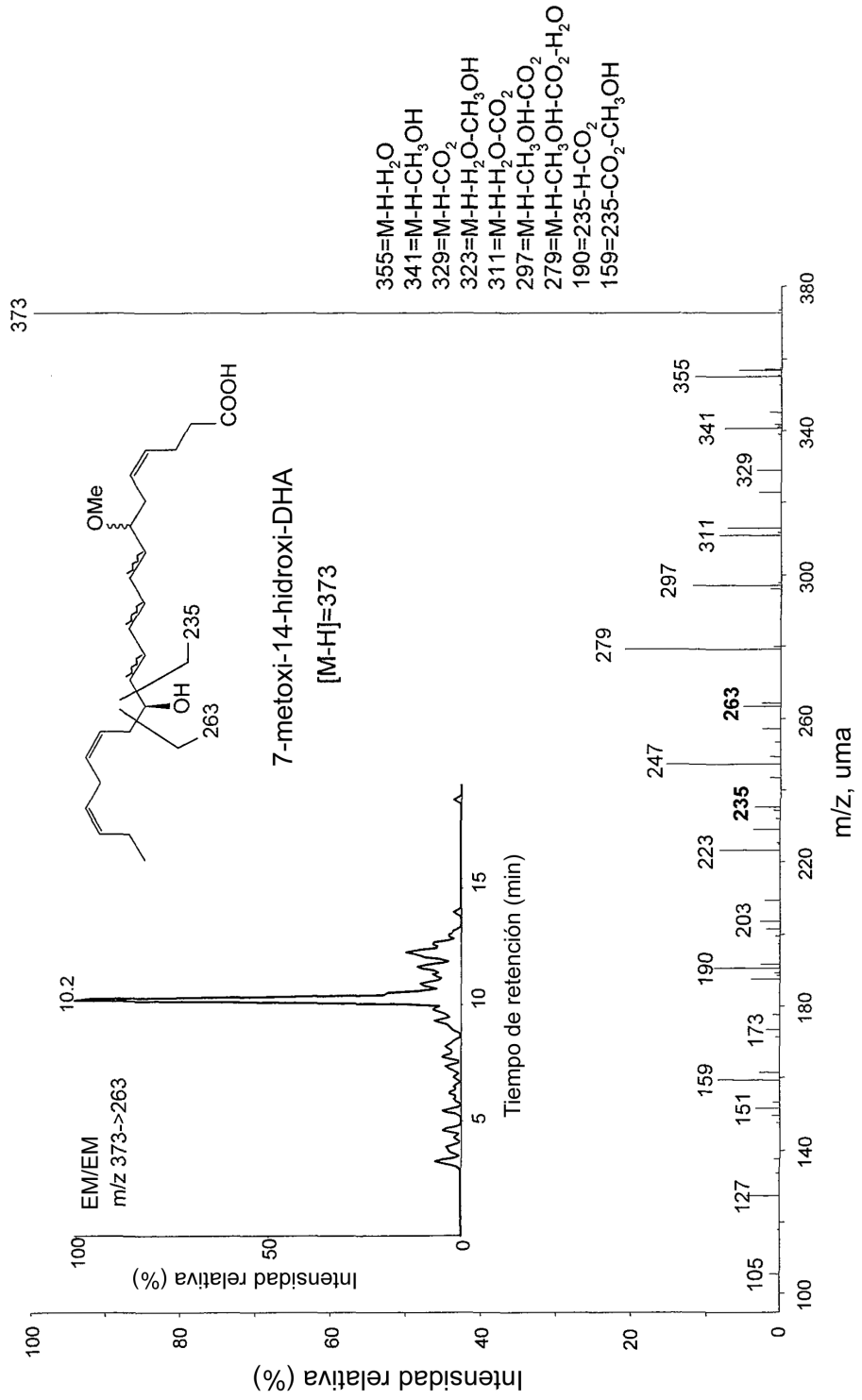
Figura 3B y 3C





D

Figura 4



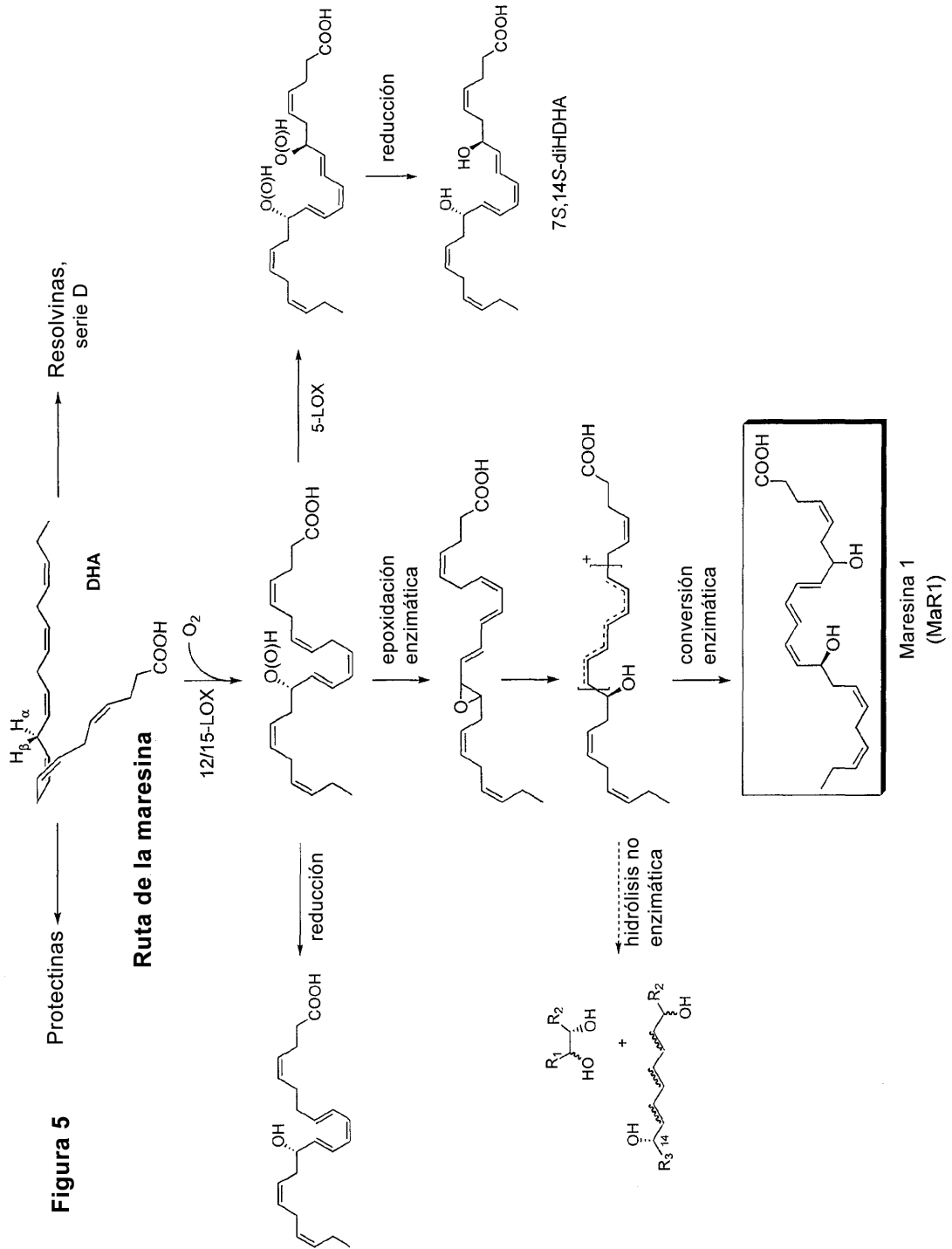


Figura 6

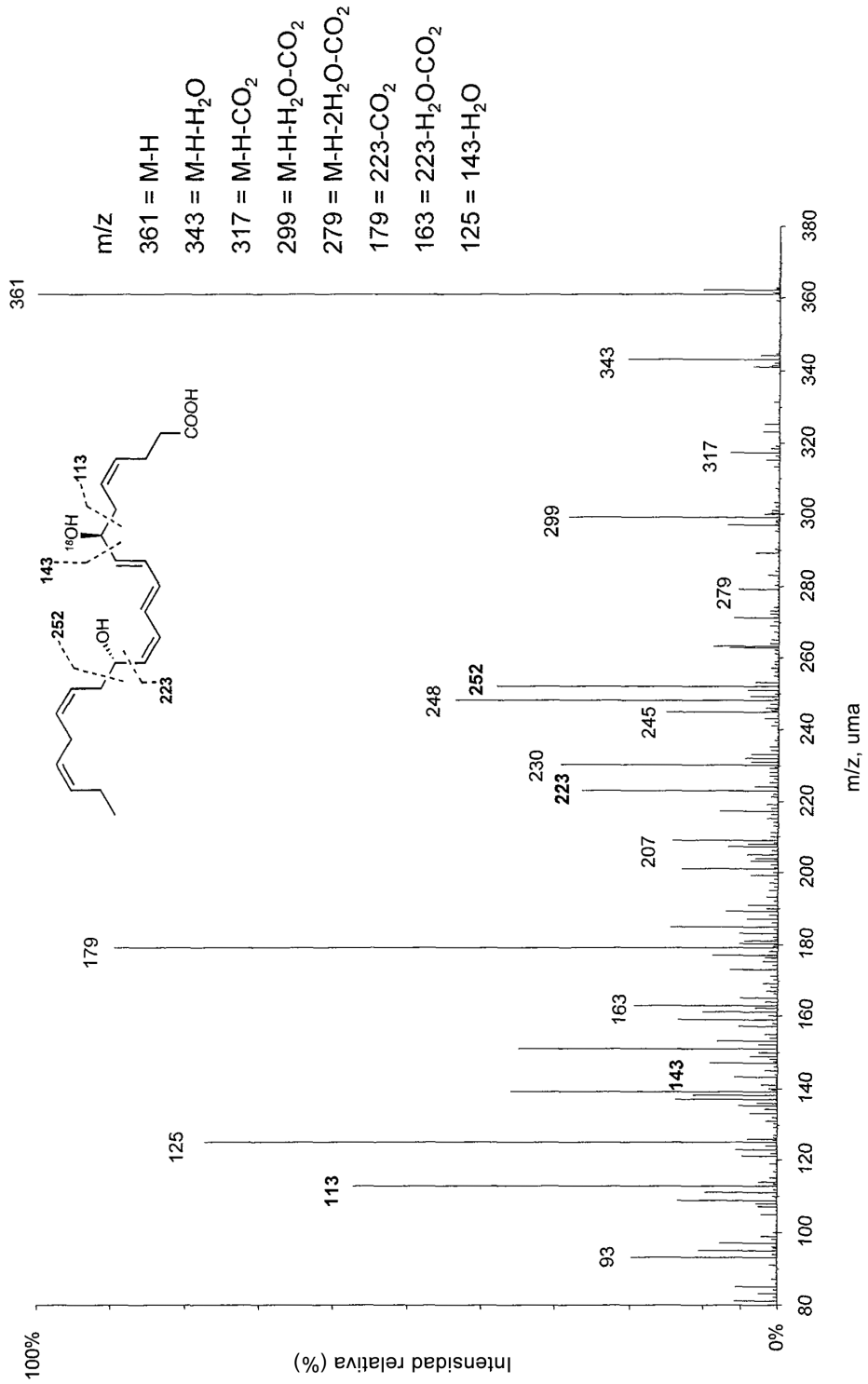
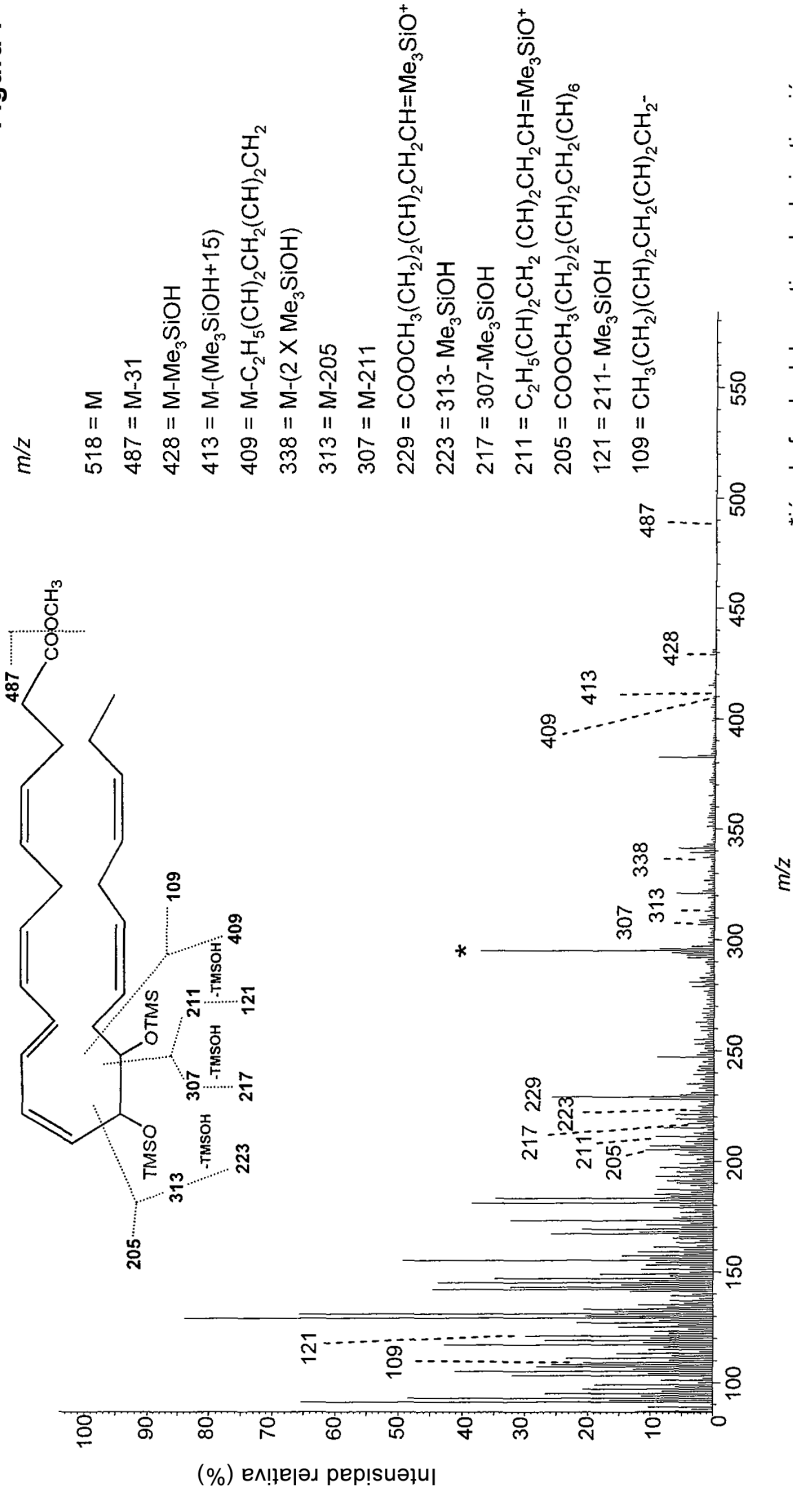


Figura 7



Preparación del análogo metilmaresina 1 Figura 8

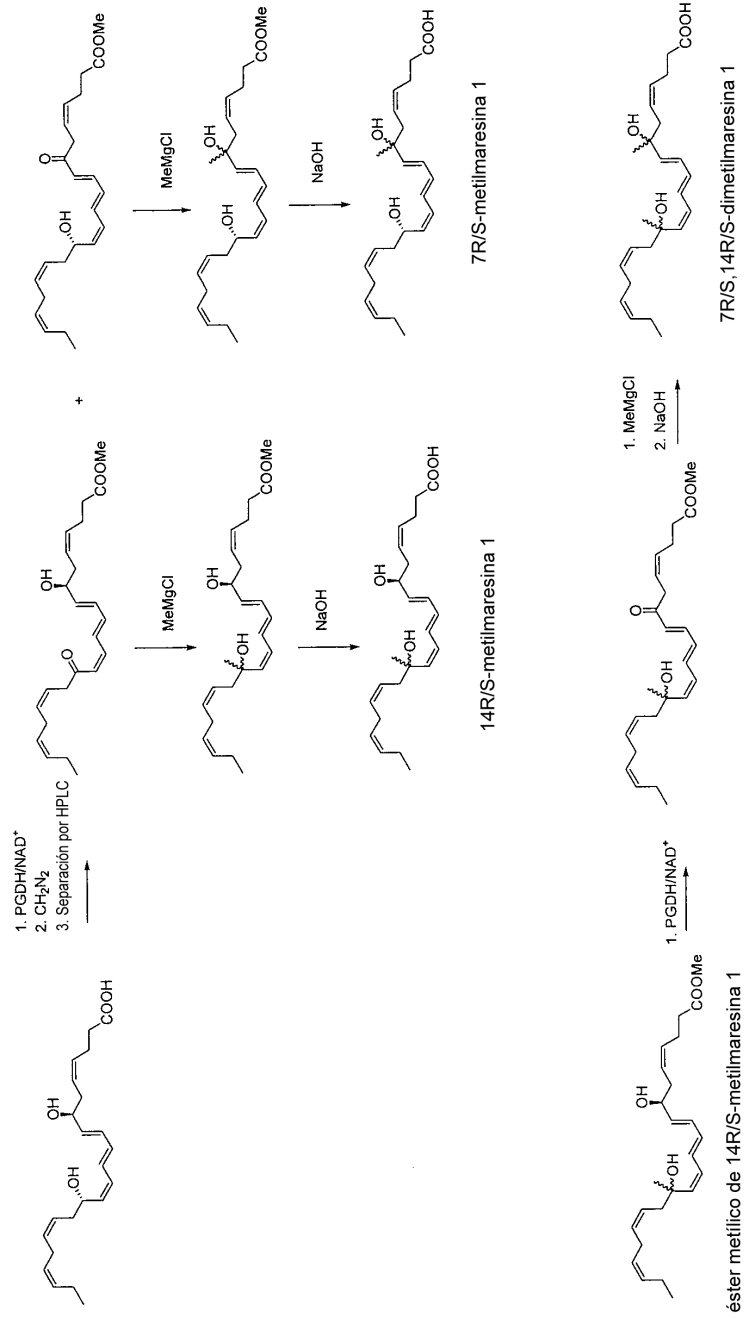


Figura 9
Preparación del análogo 22-trifluoromaresina

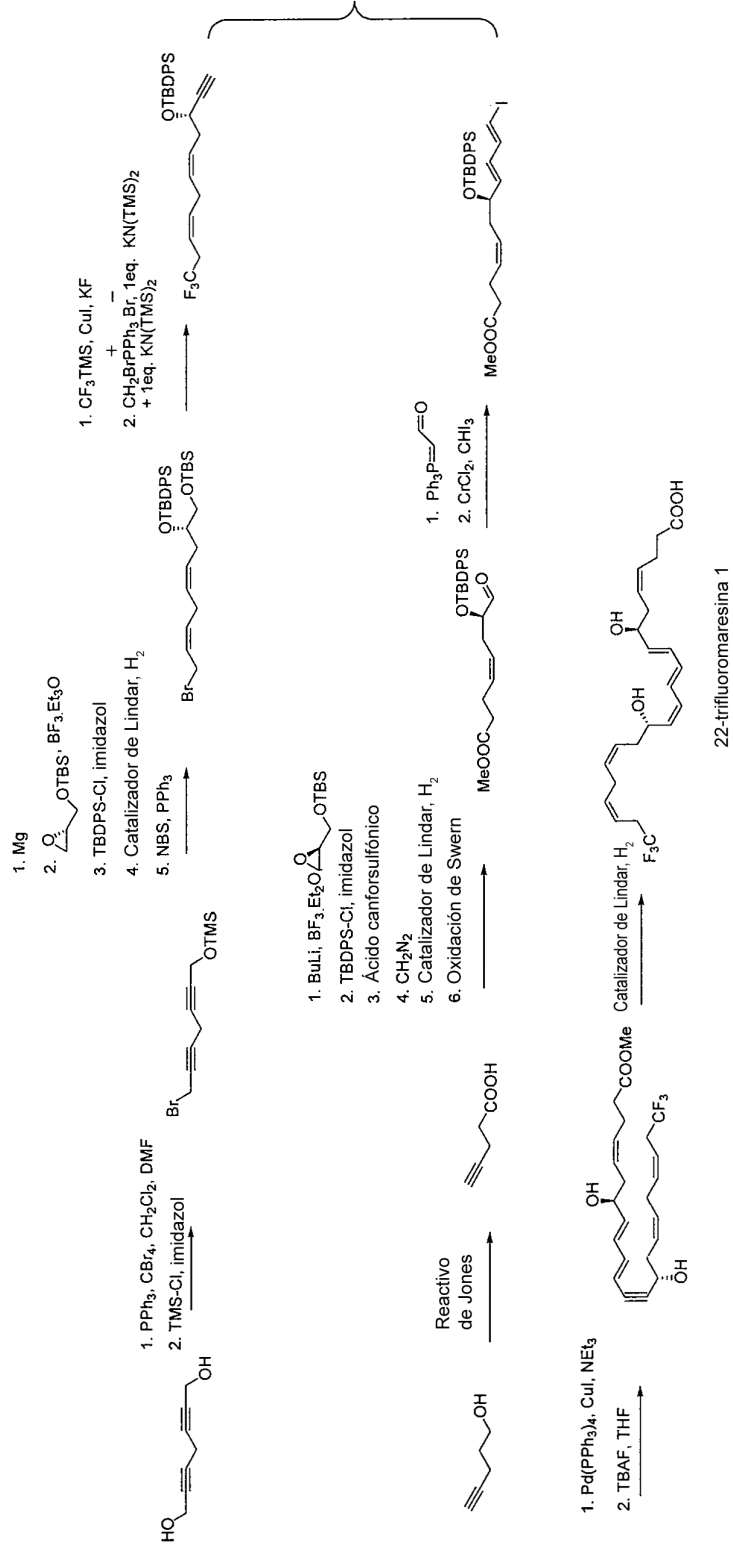
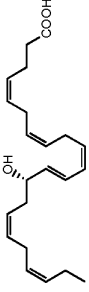
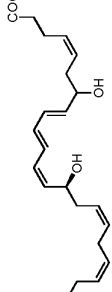
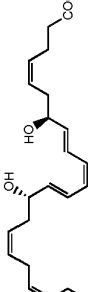
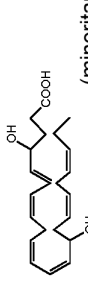
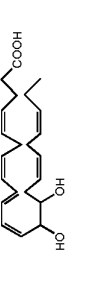


Figura 10. Estructuras, fragmentación por CL-EM y CG-EM de compuestos de la serie 14 novedosos identificados usando lipidómica basada en mediador

Compuesto	Tiempo de retención de CL (min)	CL-EM iones fragmentarios principales*	CG-EM iones fragmentarios principales*	Valor de C	UV λ_{max} ^c
 14S-HDHA	17,1	343(M-H), 325, 299, 281, 233, 205, 189, 161	430(M), 321, 219, 211, 129, 121, 109	24,2	237
 MaR1	12,2	359(M-H), 341, 323, 315, 297, 279, 250, 221, 177, 161, 141, 123, 113	487(M-31), 428, 413, 409, 338, 307, 229, 217, 211, 139, 127, 121, 109	24,2; 26,0	270
 7S,14S-Dihidroxiilo (producto de doble dioxigenación)	12,6	359(M-H), 341, 323, 315, 297, 279, 250, 221, 177, 161, 141, 123, 113	409, 229, 217, 211, 139, 127, 121, 109	24,1	270
 4,14-dihidroxiilo (minoritario)	13,6	359(M-H), 341, 323, 315, 297, 279, 249, 221, 203, 177, 101	487(M-31), 428, 413, 409, 338, 307, 217, 211, 121, 109	24,2	~ 245
 13,14-Dihidroxiilo	-	-	487(M-31), 428, 413, 409, 338, 313, 307, 223, 217, 211, 205, 121, 109	24,2; 25,0	~ 270