

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 133**

51 Int. Cl.:

C07C 69/732 (2006.01)

C07F 7/18 (2006.01)

C07C 59/48 (2006.01)

A61K 31/202 (2006.01)

C07C 59/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2003 E 09009237 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2216318**

54 Título: **Resolvinas: modelos biológicos para intervenciones terapéuticas**

30 Prioridad:

12.08.2002 US 402798 P
12.08.2003 US 639714

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

14.02.2019

73 Titular/es:

BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL (100.0%)
75 Francis Street Boston
Massachusetts 02115, US

72 Inventor/es:

SERHAN, CHARLES, N.

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Observaciones:

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

ES 2 700 133 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

Resolvinas: modelos biológicos para intervenciones terapéuticas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un compuesto y a una composición que contiene dicho compuesto para la utilización en el tratamiento o la prevención de la inflamación en un sujeto.

10 **Antecedentes de la invención**

Las funciones de los eicosanoides en diversos escenarios fisiológicos y patológicos proporcionan claros ejemplos de la importancia de los precursores de ácidos grasos tales como el ácido araquidónico, en la comunicación celular, una clara diferencia respecto a sus funciones estructurales y de almacenamiento (3-5). Entre las clases de eicosanoides bioactivos, incluyendo las prostaglandinas, leucotrienos (LT), lipoxinas (LX) y ácidos *cis*-epoxieicosatrienoicos o EET (4, 6), actualmente resulta evidente que existen autacoides contrarreguladores dentro de estas clases de eicosanoides. De las rutas de la ciclooxigenasa, la prostaciclina y el tromboxano son importantes contrarreguladores vasculares (7). En la inflamación, los productos leucotrieno de la 5-lipooxigenasa son mediadores proinflamatorios (4, 8) y las lipoxonas generadas mediante interacciones de lipooxigenasa pueden contrarregular determinados sucesos mediados por leucotrienos (para una revisión reciente, véase 9). La aparición de separación temporal y espacial en la biosíntesis de los eicosanoides durante la inflamación arroja luz sobre diferentes configuraciones funcionales para las lipoxinas como señales de "parada" o prorrresolución (10). Además, el tratamiento de aspirina (ASA) puede piratear el sistema de lipoxina, induciendo la formación de su isoforma 15-epimérica o su isoforma que contiene R (LX inducido por ASA) que sirve como mimético de LX, para montar un estado prorrresolución (9, 11, 12), así como intensificadores en la defensa antimicrobiana del huésped en el epitelio (13).

Los leucocitos de varias especies de peces ricos en ácidos grasos omega-3 generan prostaglandinas, leucotrienos y lipoxinas a partir de tanto ácido araquidónico (C20:4) como ácido eicosapentaenoico (C20:5). Sus funciones inmunológicas en los organismos marinos aparentemente son similares a aquellas en el ser humano; es decir, como controladores de la motilidad celular. Sin embargo, las células de peces generan niveles cuantitativamente similares de leucotrienos tanto de la serie 4 como 5 (derivados de EPA) y lipoxinas, lo que es claramente diferente en los tejidos humanos, los cuales utilizan predominantemente mediadores derivados de C20:4 (revisión en 14). Los ácidos grasos omega-3, tal como el ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5) y el ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6) puede resultar beneficioso en varias enfermedades humanas, incluyendo aterosclerosis, asma, enfermedades cardiovasculares, cáncer (revisión en 15) y, más recientemente, depresiones mentales (16, 17) y la prevención de la muerte súbita secundaria a infarto de miocardio (18, 19). Resultan de interés resultados del ensayo GISSI-Prevenzione que evaluaba la complementación con ácido graso poliinsaturado omega-3 de más de 11.300 pacientes, que proporciona evidencia de una reducción de 45% de muerte cardiovascular (20).

Cabe destacar que ambos grupos de pacientes recibieron aspirina en el ensayo GISSI, en donde se comparaba la complementación con tocoferol vs. omega-3 (20), al igual que un número significativo de participantes en el informe del estudio más reciente llamado Physician Health Study (18). El impacto de ASA en los resultados de estos estudios no se sometió a ensayo, aunque se concluye firmemente que los ácidos grasos omega-3 resultan beneficiosos en términos de reducción de riesgos (18, 20, 21). Actualmente la American Heart Association recomienda comer pescado rico en omega-3 (véase <http://www.americanheart.org>). Sin embargo, lo que resulta evidente a partir de los estudios con animales es que el DHA es el componente de protección cardiovascular bioactivo de los aceites de pescado (22). El mecanismo o mecanismos para las propiedades protectoras de omega-3 en las enfermedades cardíacas y en el cáncer de próstata sigue sin estar claro y siguen buscándose las bases moleculares que expliquen los fenómenos clínicos asociados a los ensayos con aceites de pescado.

La mayor conciencia de que la inflamación no resuelta es un factor importante en muchos trastornos crónicos, incluyendo las enfermedades cardíacas, la aterosclerosis, el asma y la enfermedad de Alzheimer (23, 24) lleva a preguntarse si el omega-3 utilizado durante la terapia de ASA se convierte en compuestos bioactivos endógenos relevantes para las enfermedades y salud humanas. Recientemente, los datos han sugerido que en los sitios de inflamación el PUFA omega-3 ácido eicosapentaenoico (EPA) se convierte en potentes productos bioactivos con diana en el transporte dirigido de los neutrófilos (2). Por lo tanto, COX-2, que presenta un túnel/canal de sustrato más grande que COX-1 (25, 26), actúa sobre C20:4, así como sustratos adicionales que pueden encajar de manera productiva, tal como ejemplifica la capacidad de convertir la familia de polienos de omega-3 (es decir, C18:3 y C20:5), posiblemente para misiones de COX-2 específicas de tejido (2) tales como las asociadas al preacondicionamiento isquémico (19), resolución (10, 12, 27) y/ otros procesos patológicos. EPA y COX-2 (2) o DHA (28-32) plantean la posibilidad de que, además de ácido araquidónico, los ácidos grasos omega-3 en determinados procesos biológicos, por ejemplo las arritmias cardíacas inducidas por isquemia (22), puedan servir como sustratos para la conversión en potentes productos bioactivos (2). Sin embargo, la función biológica y significancia de los productos que han podido derivarse a partir de DHA en la inflamación todavía no ha sido

determinada.

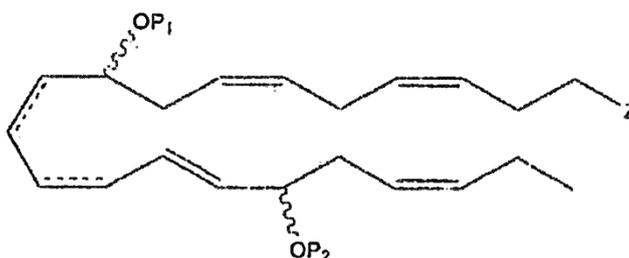
Por lo tanto, existe una necesidad de una mejor comprensión de la función de estos materiales en la fisiología, así como del aislamiento de agentes bioactivos que pueden servir para eliminar o aliviar diversos estados o condiciones patológicas, tales como las asociadas a inflamación.

Serhan, Charles N. *et al.*, "Novel Functional Sets of Lipid-derived Mediators with Antiinflammatory Actions Generated from Omega-3 Fatty Acids via Cyclooxygenase 2-Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs and Transcellular Processing", JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, 192(8), 16 de octubre de 2000 (2000-10-16), páginas 1197 a 1204, XP002267884, da a conocer compuestos derivados de ácidos grasos omega-3 utilizados para el tratamiento de la inflamación.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona lo siguiente.

[1] Un compuesto con una estructura de fórmula:



en la que:

P_1 y P_2 , cada uno individualmente, son átomos de hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo seleccionado de un grupo acilo, un grupo alquilo, un grupo tetrahidropiraniilo, un grupo trialkilsililo, un grupo glicol y un grupo alilo,

Z is $-C(O)OR^d$, $-C(O)NR^cR^c$, $-C(O)H$, $-C(NH)NR^cR^c$, $-C(S)H$, $-C(S)OR^d$, $-C(S)NR^cR^c$ o $-CN$,

cada R^a se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo (C_1-C_6), cicloalquilo (C_3-C_8), ciclohexilo, cicloalquilalquilo (C_4-C_{11}), arilo (C_5-C_{10}), fenilo, arilalquilo (C_6-C_{16}), bencilo, heteroalquilo de 2 a 6 elementos, cicloheteroalquilo de 3 a 8 elementos, morfolinilo, piperacinilo, homopiperacinilo, piperidinilo, cicloheteroalquilalquilo de 4 a 11 elementos, heteroarilo de 5 a 10 elementos y heteroarilalquilo de 6 a 16 elementos,

cada R^b es un grupo adecuado seleccionado independientemente de $=O$, $-OR^d$, haloalquiloxi (C_1-C_3), $-OCF_3$, $=S$, $-SR^d$, $=NR^d$, $=NOR^d$, $-NR^cR^c$, halógeno, $-CF_3$, $-CN$, $-NC$, $-OCN$, $-SCN$, $-NO$, $-NO_2$, $=N_2$, $-N_3$, $-S(O)R^d$, $-S(O)_2R^d$, $-S(O)NR^cR^c$, $-S(O)NR^cR^c$, $-S(O)_2NR^cR^c$, $-OS(O)R^d$, $-OS(O)_2R^d$, $-OS(O)_2NR^cR^c$, $-C(O)R^d$, $-C(O)OR^d$, $-C(O)NR^cR^c$, $-C(NH)NR^cR^c$, $-C(NR^a)NR^cR^c$, $-C(NOH)R^d$, $-C(NOH)NR^cR^c$, $-OC(O)R^d$, $-OC(O)R^d$, $-OC(O)NR^cR^c$, $-OC(NH)NR^cR^c$, $-OC(NR^a)NR^cR^c$, $-[NHC(O)]_nR^d$, $-[NR^aC(O)]_nR^d$, $-[NHC(O)]_nOR^d$, $-[NR^aC(O)]_nOR^d$, $-[NR^aC(O)]_nNR^cR^c$, $-[NR^aC(O)]_nNR^cR^c$, $-[NHC(NH)]_nNR^cR^c$ y $-[NNR^aC(NR^a)]_nNR^cR^c$;

cada R^c es independientemente un grupo protector o R'' , o, alternativamente, cada R^c junto con el átomo de nitrógeno al que se encuentra unido forman un cicloheteroalquilo o heteroarilo de 5 a 8 elementos que puede incluir opcionalmente uno o más heteroátomos adicionales iguales o diferentes y que puede sustituirse opcionalmente con uno o más grupos R^a iguales o diferentes o grupos R^b adecuados,

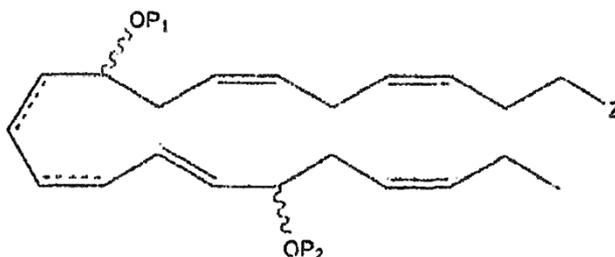
cada R^d es independientemente un grupo protector o R^a , y

cada n independientemente es un número entero entre 0 y 3,

en el que cualquier doble enlace carbono-carbono puede ser *cis* o *trans*,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el grupo protector representado por R^c y R^d se selecciona independientemente de los grupos formilo, acetilo, trifluoroacetilo, bencilo, benciloxycarbonilo, terc-butoxicarbonilo, trimetilsililo, 2-trimetilsilil-etanosulfonilo, trilito y grupos trilito sustituidos, aliloxycarbonilo, 9-fluorenilmetiloxycarbonilo, nitro-veratriloxycarbonilo, tetrahidropiraniilo, glicol y alilo.

[2] Un compuesto de [1], con la fórmula:



5 en la que:

Z es $-C(O)OR^d$,

R^d es un grupo protector o R^a ,

10

R^a es hidrógeno, alquilo (C_1-C_6), cicloalquilo (C_3-C_8), ciclohexilo, cicloalquilalquilo (C_4-C_{11}), arilo (C_5-C_{10}), fenilo, arilalquilo (C_6-C_{16}), bencilo, heteroalquilo de 2 a 6 elementos, cicloheteroalquilo de 3 a 8 elementos, morfolinilo, piperacínilo, homopiperacínilo, piperidinilo, cicloheteroalquilalquilo de 4 a 11 elementos, cicloheteroalquilalquilo, heteroarilo de 5 a 10 elementos y heteroarilalquilo de 6 a 16 elementos, y

15

P_1 y P_2 , cada uno individualmente, son átomos de hidrógeno o grupos protectores de hidroxilo, y en los que cualquier doble enlace carbono-carbono puede estar en *cis* o en *trans*,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20

[3] El compuesto de [2], en el que el átomo de carbono en C-17 presenta una configuración R.

[4] El compuesto de [2], en el que el átomo de carbono C-10 presenta una configuración S y el átomo de carbono en C-17 presenta una configuración S.

25

[5] El compuesto de [2], en el que el átomo de carbono C-10 presenta una configuración R y el átomo de carbono en C-17 presenta una configuración S.

30

[6] El compuesto de [1] a [5], en el que cada uno P_1 y P_2 es un átomo de hidrógeno, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[7] El compuesto de [1] a [6], en el que Z es un ácido carboxílico o un éster carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

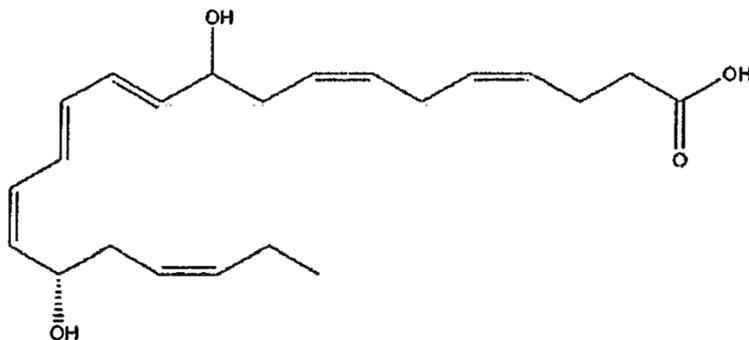
35

[8] El compuesto de [7], en el que Z es $COOR^a$, en el que R^a es hidrógeno, alquilo (C_1-C_6), cicloalquilo (C_3-C_8), cicloalquilalquilo (C_4-C_{11}) o arilalquilo (C_6-C_{16}), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

[9] El compuesto de [7], en el que Z es una sal de ácido carboxílico.

40

[10] El compuesto de [1], en el que el compuesto presenta la estructura:



o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

45

[11] Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de [1] a [10] o una sal o éster

farmacéuticamente aceptable del mismo.

[12] Un compuesto de cualquiera de [1] a [11] para la utilización en el tratamiento o prevención de la inflamación en un sujeto.

5

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa unos exudados inflamatorios en ratones tratados con ASA para generar compuestos nuevos: análisis lipodómico basado en CL-EM-EM. Panel A: Exudados de leucocitos inducidos por TNF α de bolsas de aire dorsales. Se recogieron muestras a las 6 h de ratones FVB en los que se había administrado ASA y DHA (véase métodos). Cromatograma iónico seleccionado (*m/z* 343) que muestra la producción de 17R-HDHA, 7S-HDHA y 4S-HDHA. Utilizando los cromóforos de UV dienos para la cuantificación, el 7-HDHA era ~15% de los materiales exudados y se identificó utilizando una traza de SIM para *m/z* 141 con em/em 343. En algunos exudados, el 17S-HDHA también se encontraba presente de rutas dependientes de lipooxigenasa.

10

15

EM-EM para el Panel B: 17R-HDHA (*m/z* 343); Panel C: 7S,17R-diHDHA (*m/z* 359) y Panel D: 4,11,17R-triHDHA (*m/z* 375). Véase posteriormente para iones diagnósticos. Los resultados son representativos de n=7.

20

La figura 2 ilustra los productos de HDHA inducidos por ASA generados por COX-2-aspirina recombinante humana: 17R-HDHA. Se incubó COX-2 recombinante humana tratada en presencia y en ausencia de ASA (2 mM) con DHA (10 μ M, 30 min, 37°C). Las incubaciones se detuvieron con 2 ml de metanol frío, se extrajeron y se seleccionaron para los análisis de CL-EM-EM. Los resultados son representativos de incubaciones de >8 experimentos independientes, algunos con DHA marcado con 1-¹⁴C. Paneles superiores: cromatograma de CL-EM-EM de *m/z* 343 que muestra la presencia de mono-HDHA. Inferiores: espectro de EM-EM de (izquierda) 13-HDHA sin tratamiento de ASA y (derecha) 17R-HDHA con tratamiento de ASA.

25

La figura 3 ilustra 17R-HDHA endógena de células cerebrales y microgliales humanas tratadas con aspirina. A) Cromatograma de CL-EM-EM obtenido del cerebro para abundancia relativa en *m/z* 327 para DHA y *m/z* 343 para el producto monohidroxi. B) Espectro de EM-EM de 17R-HDHA cerebral (*m/z* 343). Las muestras de cerebro murino se incubaron con ASA (45 min, 37°C). Los resultados son representativos de n=6 ratones tratados con ASA vs. 5 ratones sin ASA. C) Células microgliales humanas (CMH) tratadas con ASA; espectro de EM-EM de HMG 17R-HDHA. Se expusieron 10x10⁶ células a TNF α (50 ng/ml) y se incubaron (24 h, 37°C). Las células se trataron con ASA (500 RM, 30 min, 37°C) seguido de la adición de yonóforo A23187 (5 μ , 25-30 min). Las incubaciones se detuvieron con MeOH, se extrajeron y se analizaron mediante CL de UV-EM-EM en tándem (el gráfico dentro la figura 3 muestra el cromatograma de UV representado a una absorbancia de 235 nm) (n=4, d=20). Se identificó tanto 17R-HDHA como DHA basándose en los tiempos de retención individuales, iones parentales e iones hijos obtenidos.

30

35

40

La figura 4 ilustra cómo las HUVEC hipóxicas tratadas con ASA generan 17R-HDHA. Se expusieron las HUVEC a TNF α e IL-1 β (ambos a 1 ng/ml) y se introdujeron en una cámara de hipoxia (3 h). Las células se trataron con ASA (500 μ M, 30 min) seguido de DHA (20 μ g/10⁶ células/placa de 10 ml) y A23187 (2 μ M, 60 min). Panel A: cromatograma de CL-EM-EM del ion *m/z* 343 muestra la presencia de 17R-HDHA. Panel B: espectro de EM-EM (TR 21,2 min) de 17R-HDHA identificado a partir del tiempo de retención, iones parentales e iones hijos y correspondiente a unas propiedades y estándar auténtico cualificado mediante RMN.

45

La figura 5 representa las propiedades de bioimpacto de las resolvinas derivadas de omega-3. A) Células de glioma humano: Inhibición de transcritos de IL-1 β estimulados por TNF en células DBTRG-05MG (10⁶/ml) estimuladas con 50 ng/ml de TNF α recombinante humano durante 16 horas para inducir la expresión de los transcritos de IL-1 β . Dependencia de la concentración de productos de COX-2: 17-HDHA (■), 13-HDHA (●) y di-/tri-HDHA (▀). La IC₅₀ para ambos compuestos era de ~50 pM. (gráficos insertados) Los resultados son representativos de geles de RT-PCR de células MG expuestas a 100 nM de 13-HDHA o 17-HDHA y representados gráficamente tras la normalización de los transcritos de IL-1 β utilizando GAPDH. B) Influencia de los eicosanoides y docosanoides sobre la migración de neutrófilos inducida por fMLP a través de monocapas endoteliales microvasculares. Se expusieron neutrófilos (1x10⁶ células/monocapa) a vehículo que contenía tampón o las concentraciones indicadas de análogo LXA₄ inducido por aspirina (rombos negros), 5S,12,18R-triHEPE (cuadrados negros), 17R-HDHA (círculos negros) o 13-HDHA (triángulos negros) durante 15 minutos a 37°C. A continuación, los neutrófilos se aplicaron en capas sobre monocapas de HMVEC y se estimularon para transmigrar mediante un gradiente de fMLP 10⁻⁶ M durante 1 h a 37°C. La migración se evaluó mediante cuantificación del marcador de neutrófilos mieloperoxidasa. Los resultados se presentan como medias \pm SEM, número de PMN (n= 8-12 monocapas cada condición). C) Reducción de PMN en la peritonitis murina y la peritonitis de bolsa de piel: se inyectaron compuestos (100 ng en 120 μ l de solución salina estéril) mediante la inyección de bolo intravenoso en la vena de la cola del ratón, seguido de 1 ml de Zymosan-A (1 mg/ml) en el peritoneo. Se recolectaron los lavados peritoneales (2 h) y se realizaron

50

55

60

65

recuentos de los tipos celulares.

5 Bolsa de aire -- los compuestos (disueltos en 500 μ l de PBS si Ca^{2+} o Mg^{2+}) inyectados en la bolsa de aire mediante inyección intrabolsa o mediante la administración por vía intravenosa (en 120 μ l de solución salina estéril) seguido de la inyección intrabolsa de TNF α . Cuatro horas después, se recolectaron los lavados de la bolsa de aire y se realizaron recuentos y se diferenciaron las células. Se prepararon los compuestos mediante síntesis biogénica o se aislaron a partir de exudados *in vivo*. La proporción de 7,17R-diHDHA a 4,17R-diHDHA era de \sim 8:1; la proporción de 4,11,17R-triHDHA y 7,16,17R-triHDHA era de \sim 2:1; y la proporción de di a triHDHA era de \sim 1:1,3. Transferencias de exudado a un ratón nativo (indicado en la presente memoria). ATLa se refiere a 15-epi-16-para(fluoro)-fenoxi-LXA $_4$ (administrado a razón de 100 ng/ratón). Los valores representan medias \pm SEM de 3-4 ratones diferentes; *P<0,05 en la comparación de PMN infiltradas con el control de vehículo.

15 La figura 6 ilustra la producción de resolvinas por PMN humanas expuestas a cimosano microbiano: nuevos 17R di- y triHDHA. Se incubaron las PMN humanas (50×10^6 células/ml) con Zymosan-A (100 ng/ml) y 17R-HDHA (5 μ g/ml, 40 min, 37°C). Los resultados son representativos de n=4.

20 La figura 7 ilustra que el exudado inflamatorio produce di- y trihidroxi tetraenos que contienen 17R y compuestos que contienen trieno. CL-EM-EM. Véase la figura 1 para información. Se obtuvieron exudados y se analizaron mediante procedimientos esencialmente idénticos a los descritos en la figura 1. Panel A: los m/z se representaron gráficamente en 375 (superior), 359 (parte intermedia) y 343 (inferior). Panel B: la absorbancia de UV se representó gráficamente en 300 nm para marcar los cromatóforos que contenían tetraeno. Panel C: EM-EM de 7S,8,17R-triHDHA.

25 La figura 8 ilustra un esquema biosintético propuesto para las resolvinas: la aspirina indujo productos derivados de omega-3. La acetilación de COX-2 con el tratamiento de ASA genera un nuevo 17R-H(p)DHA a partir de DHA que se reduce en su alcohol correspondiente y se convierte mediante acciones secuenciales de una 5-lipooxigenasa leucocitaria y conduce a la formación de docosanoides que contienen dihidroxi y trihidroxi que conservan su configuración 17R. Se indican las rutas para los productos de oxidación de omega que es probable que sean marcadores *in vivo* de inactivación enzimática. Las rutas de resolvina aparentemente resultan inducidas a nivel máximo durante la etapa de "resolución espontánea" de la inflamación y los compuestos resultan activados para atenuar la infiltración de PMN, que reduce los números de PMN de los exudados, estimulando la prorroresolución de la inflamación (se indican las resolvinas de EPA, la serie 18R-HEPE) que conduce a potentes inhibidores de la producción de PMN *in vitro* e *in vivo* (véase la ruta, a la derecha, en el texto y en la ref. 2). Las estereoquímicas completas de los nuevos compuestos que contienen dihidroxi y trihidroxi no se han establecido todavía y se ilustran en la presente memoria en su configuración probable basándose en la síntesis biogénica total. Ver la Tabla 2 y el texto para más información.

40 La figura 9 proporciona un análisis basado en lipodómica/diagrama de flujo para el enfoque de aislamiento y caracterización de compuestos complejos y desconocidos.

45 La figura 10 proporciona una ilustración de la ruta metabólica general en la que se producen compuestos dihidroxi y trihidroxi de resolvina.

La figura 11 es una ilustración con mayor detalle que ilustra la producción de compuestos dihidroxi y trihidroxi de resolvina a partir de HDA o EPA desde un PUFA y aspirina dentro de tejido inflamado.

50 La figura 12 proporciona una ilustración esquemática de algunos compuestos di-HDHA y tri-HDHA.

La figura 13 representa una ruta/conversión bioquímica de EPA con COX-2 para formar compuestos dihidroxi y trihidroxi EPA.

55 La figura 14 es otra ilustración esquemática de una ruta/conversión bioquímica de DHA con COX-2 para formar compuestos di-hidroxi y tri-hidroxi DHA.

La figura 15 representa las propiedades físicas de 5S, 18(+/-)-diHEPE.

60 La figura 16 es una comparación directa de 5S,18(+/-)-diHEPE y la resolvina EI, que demuestra una reducción de la infiltración de neutrófilos en peritonitis inducida por cimosano.

La figura 17 representa una ruta de docosatrieno.

65 La figura 18 es una comparación de 4,17S-diHDHA y 10,17S docosatrieno en la reducción de la infiltración leucocitaria en peritonitis inducida por cimosano.

Descripción detallada

La presente descripción proporciona un nuevo agente antiinflamatorio y da a conocer las estructuras de nuevos mediadores antiinflamatorios generados endógenamente que se generan en la resolución. La preparación de los agentes se basa en la identificación estructural de varias nuevas clases de compuestos que se generan *in vivo* durante la inflamación que se denominan "resolvinas". La identificación estructural de los compuestos y los mecanismos de su biosíntesis en los sitios de inflamación *in vivo* en sistemas murinos mediante interacciones de leucocitos vasculares y en el cerebro al administrar aspirina se presentan en toda la memoria. Esta identificación estructural de nuevas rutas bioquímicas y compuestos que hacen de mediadores endógenos en la antiinflamación y/o en formas preresolución forma la base de un nuevo enfoque de antiinflamatorios activos que aceleran la resolución.

Desde la identificación estructural, dichos nuevos compuestos son "principios activos" que el cuerpo convierte mediante nuevas rutas bioquímicas en mediadores endógenos derivados de ácido graso omega-3 que poseen propiedades antiinflamatorias que los presentes inventores han encontrado en modelos murinos. Estos resultados muestran que estos compuestos, al generarse *in vivo* en el ser humano, son responsables, por lo menos en parte, de las acciones beneficiosas derivadas de la alimentación con pescado y la terapia de aspirina.

La identificación estructural de estas rutas, propiedades biológicas e identificación estructural de nuevos compuestos formula la base de un nuevo enfoque terapéutico: la administración de estos compuestos y/o estructuras relacionadas/análogos con mayor bioestabilidad y estabilidad química como nuevos enfoques terapéuticos para acelerar la resolución e inducir el estado antiinflamatorio.

En este sentido, las nuevas estructuras, rutas y ejemplos de nuevas clases químicas de análogos basados en estos compuestos de resolvina natural se presentan en las ilustraciones y figuras a lo largo de la presente memoria. Más importante, con la descripción de estas nuevas rutas y propiedades físicas de las resolvinas, una reivindicación puede referirse al ensayo de estos compuestos en líquidos humanos (sangre, orina, leche materna), material de biopsia, etc., como marcadores de tratamiento para obtener los niveles efectivos del estado de los n-3 a modo de índice del desarrollo de una base terapéutica para la antiinflamación. Ello incluye propiedades de CL-EM-EM y CG-EM y también podría conducir al desarrollo de ensayos ELISA mucho más fáciles de realizar para la monitorización de estos nuevos productos.

La aspirina es única entre las terapias actuales debido a que acetila la ciclooxigenasa-2 (COX-2), permitiendo la biosíntesis de precursores que contienen R de mediadores endógenos antiinflamatorios y preresolución (1, 2). La presente descripción da a conocer que el análisis lipídico de exudados inducidos por TNF α obtenidos en la etapa de resolución de ratones tratados con aspirina (ASA) y ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6) produce una nueva familia de docosanoides bioactivos dihidroxi y trihidroxi que contienen 17R-hidroxi mediante rutas iniciadas por COX-2. El cerebro murino tratado con aspirina produce ácido 17R-hidroxi docosahexaenoico (17R-HDHA) a partir de fuentes endógenas al igual que las células microgliales humanas activadas con citoquinas.

La COX-2 recombinante humana convirtió el DHA en 13-hidroxi-DHA que cambió a 17R-HDHA con el tratamiento de ASA, demostrando que es una ruta importante en células endoteliales vasculares humanas hipoxicas que expresan COX-2. Los neutrófilos humanos activamente en fagocitosis transformaron el 17R-hidroxi-DHA derivado de COX-2-ASA en dos juegos de nuevos productos dihidroxi y trihidroxi que retenían 17R-hidroxi: uno iniciado mediante oxigenación en el carbono 7 y el otro en el carbono 4, que genera intermediarios epóxido. COX-2-ASA generó docosanoides (es decir, 17R-HDHA) que inhibieron la expresión de citoquinas (IC₅₀ ~ 50 pM) por parte de células microgliales. Tanto en la inflamación dérmica como en la peritonitis murina, la serie 17R de compuestos a dosis ng (por ejemplo, 45,11,17R-triHDHA, 7S,8,17R-triHDHA y 7S,17R-diHDHA) redujeron 40% a 80% de los exudados leucocíticos.

Estos resultados indican que las células murinas y humanas portadoras de COX-2 (es decir, neurales, vasculares, leucocitos y exudados) con el tratamiento de aspirina convierten DHA en una nueva serie de docosanoides que contienen 17R-hidroxi que son potentes reguladores en la resolución de la inflamación aguda. Estas rutas biosintéticas redundantes utilizando ácidos grasos omega-3 durante sucesos multicelulares en la resolución, produciendo compuestos protectores endógenos (denominados resolvinas) que potencian el estado de preresolución. Además, estos resultados pueden proporcionar una explicación molecular para la utilización de DHA omega-3 y aspirina, así como la complementación dietética con ácidos grasos omega-3 en enfermedades inflamatorias crónicas, neoplasias y enfermedades cardiovasculares.

La presente descripción da a conocer que el tratamiento de aspirina de tejidos murinos y humanos *in vivo* portadores de COX-2 inicia la producción de docosanoides de la nueva serie 17R-hidroxi mediante circuitos biosintéticos previamente no descritos que contrarregulan las respuestas proinflamatorias (es decir, la producción de citoquinas, la peritonitis). Durante el estrés, estas rutas celulares utilizan ácidos grasos omega-3 para biosintetizar compuestos endógenos con una función en la señalización antiinflamación. De esta manera, la nueva familia de compuestos se denomina 'resolvinas' debido a que: i) se generan durante la etapa de resolución, e ii) son señales químicamente redundantes que desempeñan funciones protectoras en la atenuación

de la inflamación, estimulando un estado de prorrresolución.

La presente descripción da a conocer métodos de utilización en el tratamiento o prevención de la inflamación en un sujeto mediante la administración de una combinación de uno o más ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y aspirina, es decir, ácidos grasos poliinsaturados, entre ellos C20:5 y C22:6. El ácido graso omega, p.ej., C20:3 o C22:6, y un analgésico, tal como la aspirina, pueden administrarse en dos tiempos diferentes.

La expresión "interacción mediada por resolvina" pretende incluir estados o condiciones de enfermedad causados o asociados a uno o más tipos de inflamación asociada a la regulación de citoquinas, leucocitos o PMN y la regulación de uno o más de los análogos terapéuticos indicados a lo largo de la memoria para la inhibición farmacológica de enfermedades inflamatorias, trastornos vasculares e inflamación neuronal. En una forma de realización, el estado de enfermedad incluye, por ejemplo, aquellas enfermedades que afectan a un sujeto mediante asociación con, o interferencia con la regulación de citoquinas, leucocitos o PMN en el sujeto. Tales estados o condiciones de enfermedad se describen durante toda la memoria, véase *infra*, y se incorporan en su totalidad en la presente memoria.

Las resolvinas son mediadores lipídicos contrarreguladores naturales en mecanismos de defensa del huésped que protegen a los tejidos del huésped de los daños mediados por células efectoras y la sobreamplificación de la inflamación aguda, atenuando la respuesta inflamatoria, es decir, son contrarreguladoras. Algunas enfermedades inflamatorias crónicas conocidas podrían representar la pérdida y/o programación genética de bajos respondedores y/o niveles endógenos de resolvina. Los análogos de resolvina indicados en toda la memoria pueden utilizarse para sustituir, potenciar y/o tratar la pérdida de estas sustancias terapéuticamente y, de esta manera, resolver farmacológicamente la inflamación mediante la inhibición de la producción y amplificación leucocitarias, es decir, la inhibición de la amplificación de la inflamación.

La presente descripción da a conocer métodos para la utilización en el tratamiento de inflamación arterial, artritis, soriasis, urticaria, vasculitis, asma, inflamación ocular, inflamación pulmonar, fibrosis pulmonar, dermatitis seborreica, dermatosis pustular o enfermedades cardiovasculares en un sujeto de mediante la administración de una combinación de un ácido graso omega y un analgésico, tal como aspirina, en el sujeto. Los estados o condiciones de enfermedad que están asociados a inflamación (por lo tanto, "que resuelven"), la producción de neutrófilos, leucocitos y/o citoquinas, están incluidos en el alcance general de la inflamación e incluyen, por ejemplo, adicción, SIDA, trastornos relacionados con el alcohol, alergia, enfermedad de Alzheimer, anestesiología, antiinfecciosos, agentes antiinflamatorios, artritis, asma, aterosclerosis, enfermedades óseas, cáncer de mama, cáncer, enfermedades cardiovasculares, salud pediátrica, cáncer de colon, defectos congénitos, análisis de decisiones, trastornos neurológicos degenerativos, demencia, dermatología, diabetes mellitus, diagnósticos, administración de fármaco, identificación/cribado de fármacos, trastornos endocrinos, ENT, epidemiología, enfermedades oculares, medicina fetal y materna, trastornos gastrointestinales, terapia génica, diagnósticos genéticos, genética, trastornos genitourinarios, medicina geriátrica, crecimiento y desarrollo, audición, trastornos hematológicos, trastornos hepatobiliares, hipertensión, obtención de imágenes, inmunología, enfermedades infecciosas, leucemia/linfoma, cáncer de pulmón, trastornos metabólicos, neonatología, trastornos neurológicos, trastornos neuromusculares, medicina nuclear, trastornos de obesidad/ de la alimentación, ortopedia, otros, enfermedades parasitarias, trastornos perinatales, embarazo, medicina preventiva, cáncer de próstata, trastornos psiquiátricos, trastornos pulmonares, radiología, trastornos renales, reproducción, enfermedades reumáticas, ictus, cirugía, trasplante, vacunas, medicina vascular, cicatrización de heridas, infecciones orales, enfermedad periodontal, lesión cerebral, traumatismos e inflamación neuronal y salud femenina.

Entre los términos y abreviaturas utilizados a lo largo de la memoria se incluyen:

ASA, aspirina
 COX, ciclooxigenasa
 EPA, ácido eicosapentaenoico
 DHA, ácido docosahexaenoico
 CG-EM, cromatografía de gases-espectrometría de masas
 ácido 4S-HDHA, 4S-hidroxi-5E, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z-docosahexaenoico
 ácido 17S-HDHA, 17S-hidroxi-4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 15E, 19Z-docosahexaenoico
 ácido 17R/S-HDHA, 17R/S-hidroxi-4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 15E, 19Z-docosahexaenoico
 ácido 17R-HDHA, 17-hidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-hexaenoico
 ácido 7S,17R-dihidroxi-DHA, 7S,17R-dihidroxi-docosa-4Z,8E,10Z,13Z,15E,19Z-hexaenoico
 ácido 4S,17R-dihidroxi-DHA, 4S-17R-dihidroxi-docosa-5E,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-hexaenoico
 ácido 7S,17R,22-trihidroxi-DHA, 7S,17R,22-trihidroxi-docosa-4Z,8Z,10Z,13Z,15E,19Z-hexaenoico
 ácido 4S,11,17R-trihidroxi-DHA, 4S,11,17S-trihidroxi-docosa-5E,7E,9Z,13Z,15E,19Z-hexaenoico
 CL-UV-EM-EM, cromatografía líquida-detector de matriz de diodos de UV en tándem-espectrometría de masas

LO, lipooxigenasa
 LT, leucotrieno
 LX, lipoxinas
 PDA, detector de matriz de fotodiodos
 PUFA, ácidos grasos poliinsaturados

5

El término "alquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical hidrocarburo monovalente ramificado, de cadena lineal o cíclico saturado o insaturado que presenta el número indicado de átomos de carbono (es decir, C₁-C₆ significa uno a seis átomos de carbono) que se deriva mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un alcano, alqueno o alquino parental. Entre los grupos alquilo típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, metilo; etilos, tales como etanilo, etenilo, etinilo; propilos, tales como propán-1-ilo, propán-2-ilo, ciclopropán-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.; butilos, tales como bután-1-ilo, bután-2-ilo, 2-metil-propán-1-ilo, 2-metil-propán-2-ilo, ciclobután-1-ilo, but-1-en-1-ilo, but-1-en-2-ilo, 2-metil-prop-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. En donde se deseen niveles específicos de saturación, se utiliza la nomenclatura "alcanilo", "alquenilo" y/o "alquinilo", tal como se define posteriormente. En formas de realización preferidas, los grupos alquilo son alquilo (C₁-C₆).

10

15

El término "alcanilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un alquilo ramificado, de cada lineal o cíclico saturado derivado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un alcano parental. Entre los grupos alcanilo típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, metanilo, etanilo, propanilos, tales como propán-1-ilo, propán-2-ilo (isopropilo), ciclopropán-1-ilo, etc.; butanilos, tales como bután-1-ilo, bután-2-ilo (sec-butilo), 2-metil-propán-1-ilo (isobutilo), 2-metil-propán-2-ilo (t-butilo), ciclobután-1-ilo, etc., y similares. En formas de realización preferidas, los grupos alcanilo son alcanilo (C₁-C₆).

20

25

El término "alquenilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un alquilo ramificado, de cadena lineal o cíclico insaturado que presenta por lo menos un doble enlace carbono-carbono derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un alqueno parental. El grupo puede encontrarse en conformación *cis* o *trans* en torno al enlace o enlaces dobles. Entre los grupos alquenilo típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, 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-metil-prop-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 formas de realización preferidas, el grupo alquenilo es alquenilo (C₂-C₆).

30

35

El término "alquinilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un alquilo ramificado, de cadena lineal o cíclico insaturado que presenta por lo menos un triple enlace carbono-carbono derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un alquino parental. Entre los grupos alquinilo típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, 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 formas de realización preferidas, el grupo alquinilo es alquinilo (C₂-C₆).

40

El término "alquildiilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo hidrocarburo divalente ramificado, de cadena lineal o cíclico saturado o insaturado que presenta el número indicado de átomos de carbono (es decir, C₁-C₆ significa uno a seis átomos de carbono) derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de cada uno de dos átomos de carbono diferentes de un alcano, alqueno o alquino parental, o mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno de un único átomo de carbono de un alcano, alqueno o alquino parental. Los dos centros radicales monovalentes o cada valencia del centro radical divalente pueden formar enlaces con los mismos átomos o átomos diferentes. Entre los grupos alquildiilo típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, metandiilo; etildiilos, tales como etán-1,1-diilo, etán-1,2-diilo, etén-1,1-diilo, etén-1,2-diilo; propildiilos, tales como propán-1,1-diilo, propán-1,2-diilo, propán-2,2-diilo, propán-1,3-diilo, ciclopropán-1,1-diilo, ciclopropán-1,2-diilo, prop-1-en-1,1-diilo, prop-1-en-1,2-diilo, prop-2-en-1,2-diilo, prop-1-en-1,3-diilo, cicloprop-1-en-1,2-diilo, cicloprop-2-en-1,2-diilo, cicloprop-2-en-1,1-diilo, prop-1-in-1,3-diilo, etc.; butildiilos, tales como bután-1,1-diilo, bután-1,2-diilo, bután-1,3-diilo, bután-1,4-diilo, bután-2,2-diilo, 2-metil-propán-1,1-diilo, 2-metil-propán-1,2-diilo, ciclobután-1,1-diilo; ciclobután-1,2-diilo, ciclobután-1,3-diilo, but-1-en-1,1-diilo, but-1-en-1,2-diilo, but-1-en-1,3-diilo, but-1-en-1,4-diilo, 2-metil-prop-1-en-1,1-diilo, 2-metanilidén-propán-1,1-diilo, buta-1,3-dién-1,1-diilo, buta-1,3-dién-1,2-diilo, buta-1,3-dién-1,3-diilo, buta-1,3-dién-1,4-diilo, ciclobut-1-en-1,2-diilo, ciclobut-1-en-1,3-diilo, ciclobut-2-en-1,2-diilo, ciclobuta-1,3-dién-1,2-diilo, ciclobuta-1,3-dién-1,3-diilo, but-1-in-1,3-diilo, but-1-in-1,4-diilo, buta-1,3-dién-1,4-diilo, etc., y similares. En donde se deseen niveles específicos de saturación, se utiliza la nomenclatura alcanildiilo, alquendiilo y/o alquindiilo. En donde se desee específicamente que las dos valencias se encuentran en el mismo átomo de carbono, se utiliza la nomenclatura "alquidieno". En formas de realización preferidas, el grupo alquildiilo es alquildiilo (C₁-C₆). También resultan preferidos los grupos alcanildiilo acíclicos saturados en los que los centros radicales se encuentran en los carbonos terminales, por ejemplo, metandiilo (metano), etán-1,2-diilo (etano), propán-1,3-diilo (propano), bután-1,4-diilo (butano), y similares (también denominados alquilenos, definidos posteriormente).

45

50

55

60

65

El término "alquileno" por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo alquildiilo de cadena lineal saturado o insaturado que presenta dos centros radicales monovalentes terminales derivados mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de cada uno de los dos átomos de carbono terminales del alcano, alqueno o alquino parental de cadena lineal. La localización de un doble o triple enlace, en caso de hallarse presente, en un alquileno particular se indica entre corchetes. Entre los grupos alquileno típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, metano; etilenos, tales como etano, eteno y 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]dieno, but[1]ino, but[2]ino, buta[1,3]diino, etc., y similares. En donde se deseen niveles específicos de saturación, se utiliza la nomenclatura alcano, alqueno y/o alquino. En formas de realización preferidas, el grupo alquileno es alquileno (C₁-C₆) o (C₁-C₃). También resultan preferidos los grupos alcano saturados de cadena lineal, p.ej., metano, etano, propano, butano y similares.

Los términos "heteroalquilo", "heteroalcanilo", "heteroalquenilo", "heteroalquinilo", "heteroalquildiilo" y "heteroalquilenilo" por sí mismos o como parte de otro sustituyente se refieren a los grupos alquilo, alcanilo, alquenilo, alquinilo, alquildiilo y alquilenilo, respectivamente, en los que uno o más de los átomos de carbono se sustituyen, cada uno, con los mismos o diferentes heteroátomos o grupos heteroatómicos. Entre los heteroátomos y/o grupos heteroatómicos típicos que pueden sustituir los átomos de carbono se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, -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 donde cada R' es, independientemente, hidrógeno o alquilo (C₁-C₆).

Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo" por sí mismos o como parte de otro sustituyente se refieren a versiones cíclicas de los grupos "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Para los grupos heteroalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición que está unida al resto de la molécula. Entre los grupos cicloalquilo típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, ciclopropilo, ciclobutilos tales como ciclobutanilo y ciclobutenilo; ciclopentilos tales como ciclopentanilo y ciclopentenilo; ciclohexenilos tales como ciclohexanilo y ciclohexenilo, y similares. Entre los grupos heterocicloalquilo típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, tetrahidrofuranilo (por ejemplo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, etc.), piperidinilo (por ejemplo, piperidín-1-ilo, piperidín-2-ilo, etc.), morfolinilo (por ejemplo, morfolín-3-ilo, morfolín-4-ilo, etc.), piperacínilo (por ejemplo, piperazín-1-ilo, piperazín-2-ilo, etc.) y similares.

La expresión "punto heteroatómico acíclico" se refiere a un puente divalente en el que los átomos del esqueleto son exclusivamente heteroátomos y/o grupos heteroatómicos. Entre los puentes heteroatómicos acíclicos típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, -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 donde cada R' es, independientemente, hidrógeno o alquilo (C₁-C₆).

La expresión "sistema parental de anillos aromáticos" se refiere a un sistema de anillos cíclicos o policíclicos insaturados que presenta un sistema conjugado de electrones π. Se encuentran específicamente incluidos en la definición de "sistema parental de anillos aromáticos" los sistemas de anillos fusionados en los que uno o más de los anillos son aromáticos y uno o más de los anillos son saturados o insaturados, tales como, por ejemplo, fluoreno, indano, indeno, fenaleno, tetrahidronaftaleno, etc. Entre los sistemas parentales de anillos aromáticos típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, aceantrileno, acenaftileno, acefenantrileno, 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, pleiadenilo, pireno, pirantreno, rubiceno, tetrahidronaftaleno, trifenileno, trinaftaleno y similares, así como los diversos hidroisómeros de los mismos.

El término "arilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo hidrocarburo aromático monovalente que presenta el número indicado de átomos de carbono (es decir, C₅-C₁₅ se refiere a 5 a 15 átomos de carbono) derivado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un sistema parental de anillos aromáticos. Entre los grupos arilo típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, grupos derivados de aceantrileno, acenaftileno, acefenantrileno, 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, pleiadenilo, pireno, pirantreno, rubiceno, trifenileno, trinaftaleno y similares, así como los diversos hidroisómeros de los mismos. En formas de realización preferidas, el grupo arilo es arilo (C₅-C₁₅), en donde (C₅-C₁₀) resulta todavía más preferido. Son arilos particularmente preferidos, ciclopentadienilo, fenilo y naftilo.

El término "arilarilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo hidrocarburo monovalente derivado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un sistema de anillos en el que dos o más sistemas parentales idénticos o no idénticos de anillos aromáticos se unen directamente entre sí mediante un enlace sencillo, en donde el número de tales uniones directas de anillos es uno menos que el número de sistemas parentales de anillos aromáticos implicados. Entre los grupos arilarilo típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, bifenilo, trifenilo, fenil-naftilo, binaftilo, bifenil-naftilo y similares.

5 En donde se especifique el número de átomos de carbono en un grupo arilarilo, los números se refieren a los átomos de carbono que comprende cada anillo parental aromático. Por ejemplo, arilarilo (C_5-C_{15}) es un grupo arilarilo en el que cada anillo aromático comprende 5 a 15 carbonos, por ejemplo, bifenilo, trifenilo, binaftilo, fenilnaftilo, etc. Preferentemente, cada sistema parental de anillos aromáticos de un grupo arilarilo es independientemente un aromático (C_5-C_{15}), más preferentemente un aromático (C_5-C_{10}). También resultan preferidos los grupos arilarilo en los que la totalidad de los sistemas parentales de anillos aromáticos son idénticos, por ejemplo, bifenilo, trifenilo, binaftilo, trinaftilo, etc.

10 El término "bilarilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo arilarilo que presenta dos sistemas parentales aromáticos idénticos unidos directamente entre sí mediante un enlace sencillo. Entre los grupos bilarilo típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, bifenilo, binaftilo, biantracilo y similares. Preferentemente, los sistemas de anillos aromáticos son anillos aromáticos (C_5-C_{15}), más preferentemente anillos aromáticos (C_5-C_{10}). Un grupo bilarilo particularmente preferente es bifenilo.

15 El término "arilalquilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, típicamente un átomo de carbono terminal o sp^3 , se sustituye con un grupo arilo. Entre los grupos arilalquilo típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, bencilo, 2-feniletán-1-ilo, 2-feniletén-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftiletán-1-ilo, 2-naftiletén-1-ilo, naftobencilo, 2-naftofeniletán-1-ilo y similares. En el caso de que se haga referencia a fracciones alquilo específicas, se utiliza la nomenclatura arilalcanilo, arilalquenilo y/o arilalquinilo. En formas de realización preferidas, el grupo arilalquilo es arilalquilo (C_6-C_{21}), p.ej., la fracción alcanilo, alquenilo o alquinilo del grupo arilalquilo es (C_1-C_6) y la fracción arilo es (C_5-C_{15}). En formas de realización particularmente preferidas, el grupo arilalquilo es (C_6-C_{13}), por ejemplo, la fracción alcanilo, alquenilo o alquinilo del grupo arilalquilo es (C_1-C_3) y la fracción arilo es (C_5-C_{10}).

25 La expresión "sistema parental de anillos heteroaromáticos" se refiere a un sistema parental de anillos aromáticos en el que uno o más átomos de carbono se sustituyen, cada uno independientemente, con los mismos o diferentes heteroátomos o grupos heteroatómicos. Entre los heteroátomos o grupos heteroatómicos típicos para sustituir los átomos de carbono se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, N, NH, P, O, S, S(O), S(O)₂, Si, etc. Se encuentran incluidos específicamente en la definición de "sistemas parentales de anillos heteroaromáticos", los sistemas de anillos fusionados en los que uno o más de los anillos son aromáticos y uno o más de los anillos son saturados o insaturados, tales como, por ejemplo, benzodioxán, benzofurano, cromano, cromeno, indol, indolina, xanteno, etc. Se encuentran incluidos además en la definición de "sistema parental de anillos heteroaromáticos", aquellos anillos reconocidos que incluyen sustituyentes comunes, tales como, por ejemplo, benzopirona y 1-metil-1,2,3,4-tetrazol. Entre los sistemas parentales de anillos heteroaromáticos típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, acridina, bencimidazol, bencisoxazol, benzodioxán, benzodioxol, benzofurano, benzopirona, benzotiadiazol, benzotiazol, benzotriazol, benzoxacina, benzoxazol, benzoxazolina, carbazol, β -carbolina, cromano, cromeno, cinolina, furano, imidazol, indazol, indol, indolina, indolicina, isobenzofurano, isocromeno, isoindol, isoindolina, isoquinolina, isotiazol, isoxazol, naftiridina, oxadiazol, oxazol, perimidina, fenantridina, fenantrolina, fenacina, ftalacina, pteridina, purina, pirano, piracina, pirazol, piridacina, piridina, pirimidina, pirrol, pirrolicina, quinazolina, quinolina, quinolicina, quinoxalina, tetrazol, tiadiazol, tiazol, tiofeno, triazol, xanteno y similares.

45 El término "heteroarilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo heteroaromático monovalente que presenta el número indicado de átomos anulares (por ejemplo, "de 5 a 14 elementos" se refiere a 5 a 14 átomos anulares) derivado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de un sistema parental de anillos heteroaromáticos. Entre los grupos heteroarilo típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, grupos derivados de acridina, bencimidazol, bencisoxazol, benzodioxano, benzodioxol, benzofurano, benzopirona, benzotiadiazol, benzotiazol, benzotriazol, benzoxacina, benzoxazol, benzoxazolina, carbazol, β -carbolina, cromano, cromeno, cinolina, furano, imidazol, indazol, indol, indolina, indolicina, isobenzofurano, isocromeno, isoindol, isoindolina, isoquinolina, isotiazol, isoxazol, naftiridina, oxadiazol, oxazol, perimidina, fenantridina, fenantrolina, fenacina, ftalacina, pteridina, purina, pirano, piracina, pirazol, piridacina, piridina, pirimidina, pirrol, pirrolicina, quinazolina, quinolina, quinolicina, quinoxalina, tetrazol, tiadiazol, tiazol, tiofeno, triazol, xanteno, y similares, así como los diversos hidroisómeros de los mismos. En formas de realización preferidas, el grupo heteroarilo es un heteroarilo de 5 a 14 elementos, donde un heteroarilo de 5 a 10 elementos resulta particularmente preferido.

60 El término "heteroaril-heteroarilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo heteroaromático monovalente derivado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un sistema de anillos en el que dos o más sistemas parentales idénticos o no idénticos de anillos heteroaromáticos se unen directamente entre sí mediante un enlace sencillo, en donde el número de tales uniones directas de anillos es uno menos que el número de sistemas parentales de anillos heteroaromáticos. Entre los grupos heteroaril-heteroarilo típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, bipiridilo, tripiridilo, piridilpurinilo, bipurinilo, etc. En donde se especifica el número de átomos, el número se refiere al número de átomos que comprenden cada sistema parental de anillos heteroaromáticos. Por ejemplo, un heteroaril-heteroarilo de 5 a 15 elementos es un grupo heteroaril-heteroarilo en el que cada sistema parental de anillos heteroaromáticos comprende 5 a 15 átomos, por ejemplo, bipiridilo, tripuridilo, etc. Preferentemente, cada

sistema parental de anillos heteroaromático es, independientemente, un heteroaromático de 5 a 15 elementos, más preferentemente un heteroaromático de 5 a 10 elementos. También resultan preferidos los grupos heteroaril-heteroarilo en los que la totalidad de los sistemas parentales de anillos heteroaromáticos son idénticos.

5 El término "biheteroarilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo heteroaril-heteroarilo que presenta dos sistemas parentales heteroaromáticos idénticos unidos directamente entre sí mediante un enlace sencillo. Entre los grupos biheteroarilo típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, bipiridilo, bipurinilo, biquinolínico y similares. Preferentemente, los sistemas de anillos heteroaromáticos son anillos heteroaromáticos de 5 a 15 elementos, más preferentemente anillos heteroaromáticos de 5 a 10

10

El término "heteroarilalquilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unido a un átomo de carbono, típicamente un átomo de carbono terminal o sp^3 , se sustituye con un grupo heteroarilo. En donde se deseen fracciones alquilo específicas, se utiliza la nomenclatura heteroarilalcanilo, heteroarilalquenilo y/o heteroarilalquinilo. En formas de realización preferidas, el grupo heteroarilalquilo es un heteroarilalquilo de 6 a 21 elementos, por ejemplo, la fracción alcanilo, alquenilo o alquinilo del heteroarilalquilo es alquilo (C_1-C_6) y la fracción heteroarilo es un heteroarilo de 5 a 15 elementos. En formas de realización particularmente preferidas, el grupo heteroarilalquilo es un heteroarilalquilo de 6 a 13 elementos, por ejemplo, la fracción alcanilo, alquenilo o alquinilo es alquilo (C_1-C_3) y la fracción heteroarilo es un heteroarilo de 5 a 10 elementos.

15

20

El término "halógeno" o "halo" por sí mismos o como parte de otro sustituyente, a menos que se indique lo contrario, se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo.

25

El término "haloalquilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo alquilo en el que uno o más de los átomos de hidrógeno se sustituyen por un halógeno. De esta manera, el término "haloalquilo" pretende incluir monohaloalquilos, dihaloalquilos, trihaloalquilos, etc. hasta perhaloalquilos. Por ejemplo, la expresión "haloalquilo (C_1-C_2)" incluye fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, 1-fluoroetilo, 1,1-difluoroetilo, 1,2-difluoroetilo, 1,1,1-trifluoroetilo, perfluoroetilo, etc.

30

Los grupos anteriormente definidos pueden incluir prefijos y/o sufijos que se utilizan comúnmente en la técnica para crear grupos sustituyentes bien reconocidos adicionales. A título de ejemplos, "alquiloxi" o "alcoxi" se refiere a un grupo de fórmula $-OR$, "alquilamina" se refiere a un grupo de fórmula $-NHR$ y "dialquilamina" se refiere a un grupo de fórmula $-NR''R'$, en donde cada R es independientemente un alquilo. A título de otro ejemplo, "haloalcoxi" o "haloalquiloxi" se refiere a un grupo de fórmula $-OR''$, en la que R'' es un haloalquilo.

35

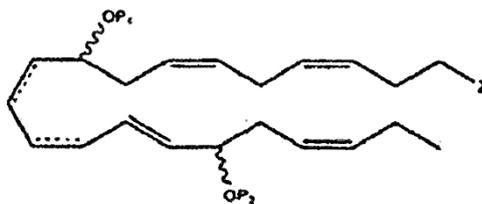
La expresión "grupo protector" se refiere a un grupo de átomos que, unido a un grupo funcional reactivo en una molécula, enmascara, reduce o bloquea la reactividad del grupo funcional. Típicamente, puede eliminarse selectivamente un grupo protector según se desee durante el curso de una síntesis. Pueden encontrarse ejemplos de grupos protectores en Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Chemistry*, 3a ed., 1999, John Wiley & Sons, NY, y Harrison *et al.*, *Compendium of Synthetic Organic Methods*, vol. 1-8, 1971-1996, John Wiley & Sons, NY. Son grupos protectores de nitrógeno, los grupos formilo, acetilo, trifluoroacetilo, bencilo, benciloxicarbonilo ("CBZ"), terc-butoxicarbonilo ("Boc"), trimetilsililo ("TMS"), 2-trimetilsilil-etanosulfonil ("TES"), tritilo y tritilo sustituido, alloxycarbonilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo ("Fmoc") y nitro-veratriloxicarbonilo ("NVOC"). Son grupos protectores de hidroxilo aquellos en los que el grupo hidroxilo se encuentra acilado (esterificado) o alquilado, tales como los éteres de bencilo y tritilo, así como los éteres de alquilo, éteres de tetrahidropirano, éteres de trialquilsililo (por ejemplo, grupos TMS o TIPPS), éteres de glicol, tales como los derivados etilenglicol y propilenglicol, y éteres de alilo.

40

45

50

La presente invención se refiere a análogos de ácido dihidroxi-docosahexaenoico (diHDHA) que presentan la fórmula:



55

Los análogos se denominan 10,17-diHDHA. P_1 y P_2 son tal como se ha definido anteriormente y pueden ser iguales o diferentes. Z es tal como se ha definido anteriormente y en particular puede ser un ácido carboxílico, éster, amida, tiocarbamato, tioéster, tiocarboxamida o un nitrilo. La línea discontinua de doble enlace indica que el isómero E o Z se encuentran dentro del alcance del análogo o análogos. En determinados aspectos, el átomo de carbono quiral en la posición 10 (C-10) presenta una configuración R. En otro aspecto, el átomo de carbono

C-10 presenta una configuración S. En todavía otro aspecto, el átomo de carbono C-10 preferentemente es un racemato R/S. Adicionalmente, el átomo de carbono quiral en la posición 17 (C-17) puede presentar una configuración R. Alternativamente, el carbono C-17 puede presentar preferentemente una configuración S. En todavía otro aspecto, el carbono C-17 puede existir en forma de un racemato R/S. En un ejemplo, la presente invención incluye 10,17S-docosatrieno, análogos de ácido 10,17-S-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,11E,13,15E,19Z-hexaenoico, tales como 10R/S-OCH₃, 17S-HDHA y derivados de ácido 10R/S, metoxi-17S hidroxido-4Z,7Z,11E,13,15E,19Z-hexaenoico.

Debe apreciarse que el experto en la materia podrá alterar "Z" de una fracción particular a otra. Con el fin de llevar a cabo esto, en algunos casos particulares, uno o más grupos pueden requerir protección. Lo anterior también se encuentran comprendido en los conocimientos del experto ordinario en la materia. Por ejemplo, un éster carboxílico (Z) puede convertirse en una amida mediante el tratamiento con una amina. Dicha interconversión es conocida en la técnica.

Debe apreciarse que la referencia a una estereoquímica de "hidroxilo" es ejemplificativa y que el término pretende incluir los grupos hidroxilo protegidos además de los grupos hidroxilo libres. En determinadas formas de realización, la posición C-17 presenta una configuración R. En otra forma de realización, la posición C-17 presenta una configuración S. En otros aspectos, determinadas formas de realización de la invención presentan una configuración R en la posición C-18.

El hidroxilo o hidroxilos en los análogos EPA y DHA pueden protegerse con diversos grupos protectores (P), tales como los conocidos en la técnica. El experto en la materia podrá determinar fácilmente qué grupo o grupos protectores pueden resultar útiles para la protección del grupo o grupos hidroxilo. Los métodos estándares son conocidos en la técnica y se describen más completamente en la literatura. Por ejemplo, el experto en la materia podrá seleccionar grupos protectores adecuados y se describen en Green y Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, capítulos 5 y 7, 1991, las enseñanzas de los cuales se incorporan en la presente memoria como referencia. Entre los grupos protectores preferidos se incluyen éteres de metilo y etilo, el grupo TMS o TIPPS, el grupo acetato (ésteres) o propionato y éteres de glicol, tales como los derivados etilenglicol y propilenglicol.

Por ejemplo, uno o más grupos hidroxilo pueden tratarse con una base suave, tal como trietilamina, en presencia de un cloruro de ácido o cloruro de sililo para facilitar una reacción entre el ion hidroxilo y el haluro. Alternativamente, puede hacerse reaccionar un haluro de alquilo con el ion hidroxilo (generado por una base, tal como amida de diisopropil-litio) con el fin de facilitar la formación de éter.

Debe apreciarse que para los análogos EPA y DHA, no necesitan protegerse todos los grupos hidroxilo. Pueden protegerse uno, dos o la totalidad de los tres grupos hidroxilo. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante la elección estequiométrica de reactivos utilizados para proteger los grupos hidroxilo. Pueden utilizarse métodos conocidos de la técnica para separar los compuestos hidroxilo mono-, di- o triprotegidos, p.ej., HPLC, CL, cromatografía rápida, cromatografía de permeación en gel, cristalización, destilación etc.

Debe apreciarse que existen uno o más centros quirales en cada uno de los compuestos anteriormente identificados. Debe apreciarse que la presente invención comprende la totalidad de las formas estereoquímicas, por ejemplo, enantiómeros, diastereómeros y racematos de cada compuesto. En el caso de se encuentren presentes átomos de carbono asimétrico, resulta posible más de un estereoisómero, y se pretende que todas las formas isoméricas posibles se encuentren incluidas dentro de las representaciones estructurales mostradas. Los isómeros ópticamente activos (R) y (S) pueden resolverse utilizando técnicas convencionales conocidas por el experto ordinario en la materia. La presente invención pretende incluir los posibles diastereoisómeros, así como los isómeros racémicos y resueltos ópticamente.

Los análogos de resolvina ilustrados durante toda la memoria contienen sitios acetilénicos y/o etilénicamente insaturados. En donde existen dobles enlaces carbono-carbono, la química de la configuración puede ser *cis* (E) o *trans* (Z) y las ilustraciones durante toda la memoria no pretenden ser limitativas. Las ilustraciones se presentan, en general, basándose en la química de configuración de compuestos DHA o EPA relacionados, y aunque sin respaldo teórico, se cree que poseen una química de la configuración similar.

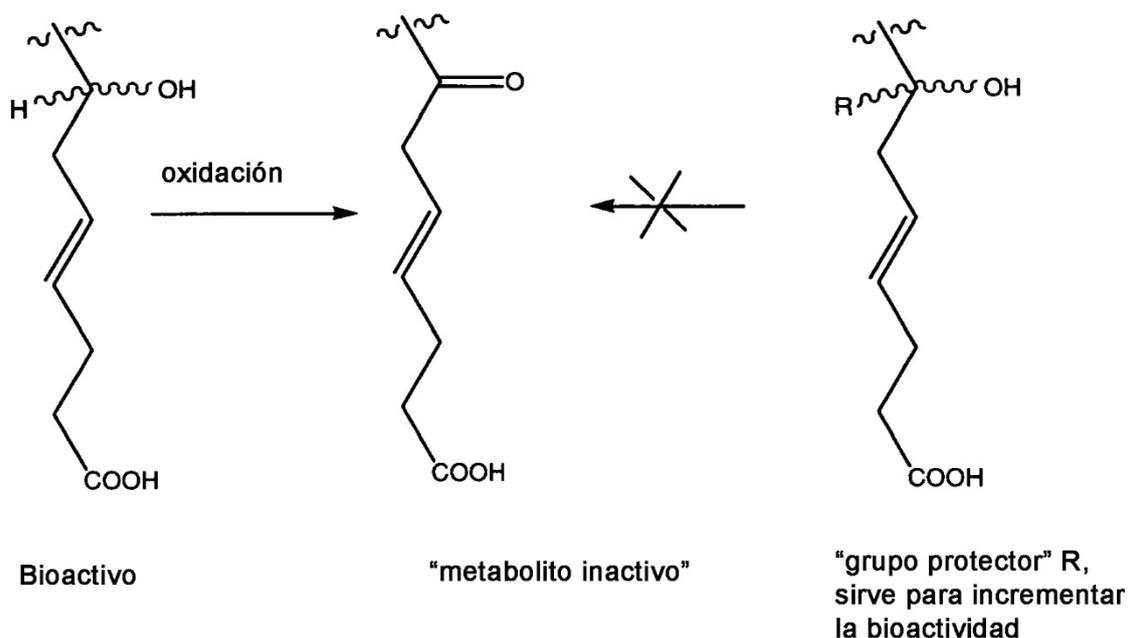
Durante toda la memoria, los enlaces carbono-carbono en particular han sido "distorsionados" para facilitar la ilustración de cómo los enlaces pueden situarse finalmente unos respecto a otros. Por ejemplo, debe entenderse que las partes acetilénicas de las resolvinas de hecho no incluyen una geometría de aproximadamente 180 grados; sin embargo, para ayudar a entender la síntesis y la relación entre el producto o productos finales y las materias primas, dichos ángulos se han tapado para ayudar a la comprensión.

Durante todas las síntesis orgánicas presentadas posteriormente debe entenderse que la hidrogenación de partes acetilénicas del análogo de resolvina pueden resultar en uno o más productos. Se pretende que todos los posibles productos se encuentren incluidos en la presente memoria. Por ejemplo, la hidrogenación de un análogo resolvina diacetilénica puede producir hasta 8 productos (cuatro productos dieno, es decir, *cis*, *cis*, *cis*, *trans*,

trans, cis, trans, trans) en el caso de que se complete la hidrogenación de ambas partes acetilénicas (ello puede seguirse mediante métodos conocidos) y cuatro productos monoacetileno-monoetileno ("monoeno" *cis* o *trans* - acetileno; acetileno-"monoeno" *cis* o *trans*). Todos los productos pueden separarse e identificarse mediante HPLC, CG, EM, RMN e IR.

Pueden utilizarse técnicas conocidas para convertir la funcionalidad de ácido/éster carboxílico del análogo de resolvina en carboxamidas, tioésteres, nitrilo, carbamatos, tiocarbamatos, etc. y se incorporan en la presente memoria. Las fracciones apropiadas, tales como las amidas, pueden sustituirse adicionalmente tal como es conocido de la técnica.

En general, los análogos de resolvina son bioactivos como alcoholes. La acción enzimática o las especies de oxígeno reactivo atacan el sitio de inflamación o de metabolismo de degradación. Dichas interacciones con el hidroxilo o hidroxilos de la molécula de resolvina pueden reducir finalmente la actividad fisiológica, tal como se ilustra a continuación:



La utilización de grupos "R" con alcoholes bioactivos secundarios, en particular, sirve para incrementar la biodisponibilidad y bioactividad del análogo de resolvina mediante la inhibición o reducción del potencial para la oxidación del alcohol en una acetona, produciendo un metabolito inactivo. Entre los "grupos protectores" R se incluyen, por ejemplo, grupos alquilo lineales y ramificados, sustituidos y no sustituidos, grupos arilo, grupos alquilarilo, grupos fenoxi y halógenos.

Generalmente, la utilización de "química de protección de R" no resulta necesaria con dioles vecinos dentro del análogo de resolvina. Típicamente, los dioles vecinos no resultan fácilmente oxidados y, por lo tanto, generalmente no requieren dicha protección mediante sustitución del átomo de hidrógeno contiguo al átomo de oxígeno del grupo hidroxilo. Aunque se considera generalmente que dicha protección no resulta necesaria, resulta posible preparar dichos compuestos en donde cada uno de los grupos hidroxilo de diol vecino, independientemente podría "protegerse" mediante la sustitución del átomo de hidrógeno contiguo al átomo de oxígeno del grupo hidroxilo con un "grupo protector R", tal como se ha indicado anteriormente.

El término "tejido" pretende incluir células intactas, sangre, preparaciones de sangre, tales como plasma y suero, huesos, articulaciones, músculos, músculos lisos y órganos.

El término "sujeto" pretende incluir organismos vivos susceptibles de sufrir condiciones o enfermedades causadas o contribuidas por bacterias, patógenos, estados o condiciones patológicas, tal como se da a conocer de manera general, aunque sin limitación, durante toda la presente memoria. Entre los ejemplos de sujetos se incluyen seres humanos, perros, gatos, vacas, cabras y ratones. El término sujeto pretende además incluir las especies transgénicas.

En el caso de que los compuestos de la presente invención se administren como farmacéuticos en el ser humano y en mamíferos, pueden administrarse de por sí o como composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, 0,1% a 99,5% (más preferentemente 0,5% a 90%) de principio activo, es decir, por lo menos un análogo EPA o DHA, en combinación con un "portador farmacéuticamente aceptable".

La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente, solvente o material de encapsulado, que participa en llevar o transportar uno o más compuestos de la presente invención dentro o al sujeto de manera que puede llevarse a cabo su función pretendida. Típicamente, dichos compuestos se llevan o transportan de un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada portador debe resultar "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación y no perjudicial para el paciente. Entre algunos ejemplos de materiales que pueden servir de portadores farmacéuticamente aceptables se 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 sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; 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 amortiguación, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones tampón de fosfato, y otras sustancias compatibles no tóxicas utilizadas en las formulaciones farmacéuticas.

En determinadas formas de realización, los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más grupos funcionales ácidos y, de esta manera, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables: con bases farmacéuticamente aceptables. La expresión "sales, ésteres, amidas y profármacos farmacéuticamente aceptables" se refiere a aquellas sales carboxilato, sales de adición de aminoácido, ésteres, amidas y profármacos de los compuestos de la presente invención que resulta dentro del alcance del criterio médico razonable, adecuados para la utilización en contacto con los tejidos de los pacientes sin toxicidad, irritación o respuesta alérgica indebida y similares, proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable y eficaces para el uso pretendido de los compuestos de la invención. El término "sales" se refiere a sales de adición de ácido inorgánico y orgánico no tóxicas de compuestos de la presente invención. Estas sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento final y purificación 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 formada de esta manera. Entre ellos pueden incluirse cationes a base de metales alcalinos y alcalino-térreos, tales como sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares, así como cationes no tóxicos de amonio, amonio cuaternario y amina, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, amonio, tetrametil-amonio, tetraetil-amonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina y similares (ver, por ejemplo, Berge S.M. *et al.*, "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19, 1977, que se incorpora en la presente memoria como referencia).

La expresión "ésteres farmacéuticamente aceptables" se refiere a los productos esterificados relativamente no tóxicos de los compuestos de la presente invención. Estos ésteres pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento final y purificación de los compuestos o mediante la reacción separada del compuesto purificado en su forma de ácido libre o de hidroxilo con un agente esterificante adecuado. Los ácidos carboxílicos pueden convertirse en ésteres mediante el tratamiento con un alcohol en presencia de un catalizador. La expresión pretende incluir además grupos de hidrocarburo inferior capaces de solvatarse bajo condiciones fisiológicas, p.ej., ésteres de alquilo, y ésteres de metilo, etilo y propilo.

También pueden encontrarse presentes en las composiciones, agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato sódico y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes desmoldantes, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, saborizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes.

Entre los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables se incluyen: antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreto de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfato sódico, sulfito sódico y similares; antioxidantes solubles en aceites, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares, y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilén-diamina-tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Entre las formulaciones de la presente invención se incluyen las adecuadas para la administración intravenosa, oral, nasal, tópica, transdérmica, bucal, sublingual, rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosis unitaria y pueden prepararse mediante cualesquiera métodos bien conocidos de la técnica farmacéutica. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de administración individual generalmente será aquella cantidad de un compuesto que produce un efecto terapéutico. Generalmente, en una escala de porcentaje, esta cantidad se encontrará comprendida entre aproximadamente 1 por ciento y aproximadamente noventa y nueve por ciento de principio activo, preferentemente entre aproximadamente 5 por ciento y aproximadamente 70 por ciento, lo más preferentemente entre aproximadamente 10 por ciento y aproximadamente 30 por ciento.

Entre los métodos para preparar dichas formulaciones o composiciones se incluye la etapa de asociar un compuesto de la presente invención con el portador y, opcionalmente, uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima un compuesto de la presente invención y portadores líquidos, o portadores sólidos finamente divididos, o ambos, y después, en caso necesario, conformando el producto.

Las formulaciones de la invención adecuadas para la administración oral pueden encontrarse en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas (utilizando una base saborizada, habitualmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos o en forma de una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o en forma de una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite, o como elixir o jarabe, o en forma de pastillas (utilizando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o en forma de colutorio y similares, en donde cada uno contiene una cantidad predeterminada de un compuesto de la presente invención como principio activo. Un compuesto de la presente invención también puede administrarse en forma de un bolo, electuario o pasta.

En las formas de administración sólidas de la invención para la administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), el principio activo se mezcla con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato sódico o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: materiales de relleno o de carga, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; ligantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; humectantes, tales como glicerol; agentes desintegrantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca; ácido alginico, determinados silicatos, y carbonato sódico; agentes de retardo de la solución, tales como parafina; aceleradores de la 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 bentonita; lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato sódico y mezclas de los mismos, y agentes colorantes. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas pueden comprender además agentes de amortiguación. Las composiciones sólidas de un tipo similar también pueden utilizarse como rellenos en cápsulas rellenas de gelatina blanda y dura utilizando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Un comprimido puede prepararse mediante prensado o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos prensados pueden prepararse utilizando ligante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetil-celulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, desintegrante (por ejemplo, glicolato de almidón sódico o carboximetilcelulosa sódica entrecruzada), agente activo en superficie o dispersante. Pueden prepararse comprimidos moldeados mediante el moldeo en un aparato adecuado de una mezcla del compuesto en polvo humectado con un diluyente líquido inerte.

Los comprimidos y otras formas de administración sólidas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden recubrirse opcionalmente o prepararse con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. También pueden formularse de manera que proporcionen una liberación lenta o controlada del principio activo en el mismo utilizando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices de polímero, liposomas y/o microesferas. Pueden esterilizarse mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención bacteriana o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de la utilización. Estas composiciones también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden ser de una composición con la que liberan el principio o principios activos sólo, o preferentemente, en una determinada parte del tracto intestinal, opcionalmente de manera retardada. Entre los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden utilizarse se incluyen sustancias poliméricas y ceras. El agente activo también puede encontrarse en forma microencapsulada, en caso apropiado, con uno o más de los excipientes anteriormente indicados. En un aspecto, puede administrarse una solución de un análogo EPA o DHA en forma de gotas óticas para tratar la otitis.

Entre las formas de administración líquidas para la administración oral de los compuestos de la invención se incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del principio activo, las formas de administración líquidas pueden comprender diluyentes inertes utilizados comúnmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizadores y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (por ejemplo aceites de semilla de algodón, de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitán y mezclas de los mismos.

Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes,

perfumantes y conservantes.

5 Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilén-sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

10 Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas de la invención para la administración rectal o vaginal pueden presentarse en forma de supositorio, que puede prepararse mediante la mezcla de uno o más compuestos de la invención con uno o más excipientes o portadores no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera de supositorio o un salicilato y que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura corporal y, por lo tanto, que se fundirá en el recto o cavidad vaginal y liberará el compuesto activo.

15 Las formulaciones de la presente invención que resultan adecuadas para la administración vaginal incluyen además pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de spray que contienen dichos portadores, tal como es conocido en la técnica que resulta apropiado.

20 Entre las formas de administración para la administración tópica o transdérmica de un compuesto de la presente invención se incluyen polvos, sprays, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo puede mezclarse bajo condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable y con cualesquiera conservantes, tampones o propelentes que puedan resultar necesarios.

25 Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto activo de la presente invención, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos.

30 Los polvos y sprays pueden contener, además de un compuesto de la presente invención, excipientes, tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y poliamida en polvo, o mezclas de estas sustancias. Los sprays pueden contener adicionalmente propelentes habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos no sustituidos volátiles, tales como butano y propano.

35 Los parches transdérmicos presentan la ventaja añadida de proporcionar una administración controlada de un compuesto de la presente invención en el cuerpo. Dichas formas de administración pueden prepararse mediante la disolución o dispersión del compuesto en el medio apropiado. Los intensificadores de absorción también pueden incrementarse para incrementar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad de dicho flujo puede controlarse proporcionando una membrana de control de la velocidad o mediante la dispersión del compuesto en una matriz o gel de polímero.

40 Las formulaciones oftálmicas, pomadas oculares, polvos, soluciones y similares, también se encuentran contempladas como comprendidas dentro del alcance de la presente invención. Dichas soluciones resultan útiles para el tratamiento de la conjuntivitis.

45 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para la administración parenteral comprenden uno o más compuestos de la invención en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles inmediatamente antes de la utilización, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor deseado o agentes de suspensión o espesantes.

50 Entre los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden utilizarse en las composiciones farmacéuticas de la invención se 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 correcta, por ejemplo mediante la utilización de materiales de recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento de un tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante la utilización de tensioactivos.

60 Dichas composiciones pueden contener además adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. El bloqueo de la acción de los microorganismos puede garantizarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabeno, clorobutanol, ácido fenol-sórbico y similares. También puede resultar deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, puede conseguirse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

65 En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto de un fármaco, resulta deseable enlentecer la absorción del

fármaco a partir de la inyección subcutánea o intramuscular. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante la utilización de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo de baja solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende entonces de su tasa de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de fármaco administrada por vía parenteral se consigue mediante la disolución o suspensión del fármaco en un vehículo aceite.

Las formas de depósito inyectable se preparan mediante la formación de matrices de microcápsulas de los compuestos de la invención en polímeros biodegradables, tales como poliláctido-poliglicólido. Dependiendo de la proporción de fármaco a polímero y de la naturaleza del polímero particular utilizado, puede controlarse la tasa de liberación de fármaco. Entre los ejemplos de otros polímeros biodegradables se incluyen (poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones de depósito inyectable también se preparan atrapando el compuesto en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

Las preparaciones de la presente invención pueden administrarse por vía oral, parenteral, tópica o rectal. Evidentemente se administran mediante formas adecuadas a cada vía de administración. Por ejemplo, se administran en forma de comprimidos o cápsulas, mediante inyección, inhalado, loción oftálmica, pomada, supositorio, etc., la administración mediante inyección, infusión o inhalación; por vía tópica mediante loción o pomada, y por vía rectal mediante supositorios. Resulta preferente la administración mediante inyección intravenosa.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitarse a las mismas, las inyecciones e infusiones intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal, y la infusión.

Las expresiones "administración sistémica", "administrado sistémicamente", "administración periférica" y "administrado periféricamente", tal como se utilizan en la presente memoria, se refieren a la administración de un compuesto, fármaco u otro material no directamente en el sistema nervioso central, de manera que entra en el sistema del paciente y, de esta manera, se somete al metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo la administración subcutánea.

Estos compuestos pueden administrarse en el ser humano y otros animales para la terapia mediante cualquier vía de administración, incluyendo la oral, la nasal, tal como mediante, por ejemplo, un spray, vía rectal, intravaginal, parenteral, intracisternal y tópica, tal como mediante polvos, pomadas o gotas, incluyendo por vía bucal y sublingual.

Con independencia de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden utilizarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por el experto ordinario en la materia.

Los niveles reales de las dosis de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden modificarse de manera que se obtenga una cantidad del principio activo que resulte eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin resultar tóxicos para el paciente.

El nivel de dosis seleccionado dependerá de una diversidad de factores, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención utilizadas, o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto particular utilizado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con el compuesto particular utilizado, la edad, el sexo, el peso, la condición, el estado general de salud y la historia médica anterior del paciente bajo tratamiento, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Un médico o veterinario con conocimientos ordinarios en la materia podrá determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría iniciar las dosis de los compuestos de la invención utilizados en la composición farmacéutica a niveles más bajos que los requeridos con el fin de conseguir el efecto terapéutico deseado y gradualmente incrementar las dosis hasta conseguir el efecto deseado.

En general, una dosis diaria adecuada de un compuesto de la invención será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz generalmente dependerá de los factores indicados anteriormente. Generalmente, las dosis intravenosas y subcutáneas de los compuestos de la presente invención para un paciente, al utilizar para los efectos analgésicos indicados, se encontrarán comprendidas entre aproximadamente 0,0001 y aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal por

día, más preferentemente entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 50 mg por kg por día, y todavía más preferentemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 40 mg por kg por día. Por ejemplo, entre aproximadamente 0,01 microgramos y 20 microgramos; entre aproximadamente 20 microgramos y 100 microgramos y entre aproximadamente 10 microgramos y 200 microgramos de los compuestos de la invención se administran por cada 20 gramos de peso del sujeto.

Si se desea, la dosis diaria eficaz del compuesto activo puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados durante el día, opcionalmente en formas de administración unitarias.

Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de uno o más análogos EPA o DHA de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado, p.ej., una reducción o bloqueo de los efectos asociados a diversos estados o condiciones patológicos. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" del análogo EPA o DHA puede variar según factores tales como el estado de enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del compuesto terapéutico de inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una cantidad en la que cualesquiera efectos tóxicos o perjudiciales del agente terapéutico se ven superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Típicamente, debido a que se utiliza una dosis profiláctica en sujetos antes o durante un estadio más temprano de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

Los regímenes de administración pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse un solo bolo, pueden administrarse varias dosis divididas durante el tiempo o la dosis puede reducirse o incrementarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en una forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma de dosis unitaria, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos mamíferos que deben tratarse; cada unidad que contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosis unitaria de la invención está dictada y es directamente dependiente de: (a) las características únicas del análogo EPA o DHA y el efecto terapéutico o profiláctico particular que debe conseguirse, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición de dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Un intervalo ejemplificativo para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un análogo EPA o DHA es de 0,1 a 20 mg/kg, más preferentemente de 1 a 10 mg/kg. Debe indicarse que los valores de dosis pueden variar con el tipo y gravedad de la condición que debe aliviarse. Debe entenderse además que, para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosis específicos deberían ajustarse durante el tiempo según la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y los intervalos de dosis indicados en la presente memoria son meramente ejemplares.

La administración de los análogos EPA o DHA en el pulmón mediante inhalación es un método importante de tratamiento de una diversidad de condiciones respiratorias (inflamación de las vías respiratorias) indicada durante toda la especificación, incluyendo condiciones locales comunes tales como el asma bronquial y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Los análogos EPA o DHA pueden administrarse en el pulmón en forma de un aerosol de partículas de tamaño respirable (menos de aproximadamente 10 μm de diámetro). La formulación de aerosol puede presentarse en forma de un líquido o de unos polvos secos. Con el fin de garantizar el tamaño de partícula apropiado en un aerosol líquido, como suspensión, pueden prepararse partículas de tamaño respirable y después incorporarse en la formulación de suspensión que contiene un propelente. Alternativamente, pueden prepararse formulaciones en forma de solución con el fin de evitar la preocupación por un tamaño de partícula apropiado en la formulación. Las formulaciones en solución deben dispensarse de una manera que produzca partículas o gotas de tamaño respirable.

Una vez preparada, la formulación de aerosol se utiliza para llenar un cartucho de aerosol dotado de una válvula de dosis medida. La formulación se dispensa mediante un actuador adaptado para dirigir la dosis desde la válvula hasta el sujeto.

Las formulaciones de la invención pueden prepararse mediante la combinación de: (i) por lo menos un análogo EPA o DHA en una cantidad suficiente para proporcionar una pluralidad de dosis terapéuticamente eficaces, (ii) la adición de agua en una cantidad eficaz para estabilizar cada una de las formulaciones, (iii) el propelente en una cantidad suficiente para propeler una pluralidad de dosis a partir de un cartucho de aerosol, y (iv) cualesquiera componentes opcionales adicionales, por ejemplo etanol como cosolvente, y la dispersión de los componentes. Los componentes pueden dispersarse utilizando un mezclador u homogeneizador convencional,

mediante agitación o mediante energía ultrasónica. La formulación en volumen puede transferirse a viales de aerosol individuales más pequeños mediante la utilización de métodos de transferencia válvula a válvula, rellenado bajo presión o mediante la utilización de métodos de llenado en frío convencionales. No resulta necesario que el estabilizador en utilizado en una formulación de aerosol en suspensión sea soluble en el propelente. Aquellos que no sean suficientemente solubles pueden utilizarse para recubrir partículas de fármaco en una cantidad apropiada y seguidamente las partículas recubiertas pueden incorporarse en una formulación tal como se ha indicado anteriormente.

Los cartuchos de aerosol dotados de válvulas convencionales, preferentemente válvulas de dosis medida, pueden utilizarse para administrar las formulaciones de la invención. Los cauchos de válvula convencionales de neopreno y buna utilizados en las válvulas de dosis medida para la administración de formulaciones de CFC convencionales pueden utilizarse con formulaciones que contienen HFC-134a o HFC-227. Entre otros materiales adecuados se incluyen el caucho de nitrilo, tal como DB-218 (American Gasket and Rubber, Schiller Park, Ill.) o un caucho de EPDM, tal como Vistalon™ (Exxon), Royalene™ (UniRoyal) y bunaEP (Bayer). También resultan adecuados los diafragmas moldeados mediante extrusión, moldeo por inyección o moldeo por compresión a partir de un material elastomérico termoplástico, tal como la poliolefina FLEXOMER™ GERS 1085 NT (Union Carbide).

Las formulaciones de la invención pueden estar contenidas en cartuchos de aerosol convencionales, recubiertos o no recubiertos, anodizados o no anodizados, p.ej., los realizados en aluminio, vidrio, acero inoxidable y tereftalato de polietileno.

La formulación o formulaciones de la invención pueden administrarse en el tracto respiratorio y/o pulmones mediante inhalación oral con el fin de producir la broncodilatación o con el fin de tratar una condición susceptible de tratamiento mediante inhalación, por ejemplo, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, etc., tal como se indica en la presente la memoria.

Las formulaciones de la invención también pueden administrarse mediante inhalación nasal, tal como es conocido en la técnica, con el fin de tratar o prevenir las condiciones respiratorias mencionadas en toda la memoria.

Aunque resulta posible que un compuesto de la presente invención se administre solo, resulta preferente administrar el compuesto en forma de una composición farmacéutica.

La presente descripción da a conocer un artículo fabricado que contiene material de envasado y una formulación de análogo EPA o DHA contenido dentro del material de envasado. Esta formulación contiene por lo menos un análogo EPA o DHA y el material de envasado contiene una etiqueta o impreso en el paquete que indica que la formulación puede administrarse en el sujeto para tratar una o más condiciones tales como las indicadas en la presente memoria, en una cantidad, a una frecuencia y durante un periodo eficaz para tratar o prevenir dichas condiciones. Dichas condiciones se mencionan durante toda la memoria y se incorporan en la presente memoria como referencia. Los análogos EPA y análogos DHA adecuados se indican en la presente memoria.

Más específicamente, la invención proporciona un artículo fabricado que contiene material de envasado y por lo menos un análogo EPA o DHA contenido dentro del material de envasado. El material de envasado contiene una etiqueta o impreso en el paquete que indica que la formulación puede administrarse en el sujeto para el asma en una cantidad, a una frecuencia y durante un periodo eficaces para tratar o prevenir síntomas asociados a dichos estados o condiciones de enfermedad comentados a lo largo de toda la presente memoria.

Materiales y métodos:

Zymosan-A, hematina, NADPH, 15-lipooxigenasa, ASA y otros AINE eran de Sigma. La 5-lipooxigenasa (LO) de patata, DHA y EPA era de Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI) y otros estándares sintéticos, ácidos grasos hidroxil e intermediarios utilizados para la identificación mediante EM y las referencias de fragmentos iones se obtuvieron de Cascade Biochem Ltd. (Reading, Reino Unido). Se obtuvieron estándares auténticos para ácido 4S-hidroxi-5E, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z-docosahexaenoico (4S-HDHA), ácido 17S-hidroxi-4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 15E, 19Z-docosahexaenoico (17S-HDHA) y el racemato de ácidos 17R/S-hidroxi-4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 15E, 19Z-docosahexaenoico (indicado como 17R/S-HDHA) de Penn Bio-Organics (Bellefonte, PA), y los análisis de RMN establecieron las configuraciones respectivas de los dobles enlaces. Los materiales adicionales utilizados en los análisis de CL-EM-EM se obtuvieron de los proveedores informados en las refs. (2, 33).

Incubaciones

Las PMN humanas se aislaron frescas a partir de sangre venosa de voluntarios sanos (que declinaron el tomar medicación durante ~2 semanas antes de la donación; protocolo BHW n° 88-02642) en gradiente de Ficoll y se realizaron los recuentos. Las células se dividieron en 50x10⁶ células, 1 ml de DPBS con Ca²⁺ y Mg²⁺, indicados como +/-, y se llevaron a cabo incubaciones (40 min, 37°C) con 17-R/S-HDHA (Penn Bio-Organics) o 17R-HDHA

con Zymosan-A (100 ng/ml, Sigma). Se cultivaron células de vena umbilical humana (HUVEC) o endoteliales microvasculares (HMVEC, Cascade Biologies, Portland, OR) para la migración transendotelial (34) y las incubaciones con monocapas de HMVEC (1, 2 o 3 pases) se sembraron (a $\sim 2 \times 10^5$ células/cm²) sobre soportes permeables de policarbonato prerrecubiertos con gelatina al 0,1% para ASA y DHA. Para los experimentos de hipoxia, las placas de HUVEC tratadas con TNF α e IL-1 β (ambos 1 ng/ml) se introdujeron en una cámara hipóxica (3 h, 37°C) y se devolvieron a normoxia (21 h, 37°C). A continuación, se añadió ASA (500 μ M, 30 min) seguido de DHA ($\sim 5 \mu$ M) y A23187 (2 μ M, 60 min, 37°C). Los cerebros completos individuales se aislaron rápidamente a partir de ratones sacrificados inmediatamente antes de las incubaciones (cada mitad/2 ml), se lavaron con DPBS^{+/+} frío y se incubaron con ASA (45 min, 37°C, 500 μ M). Las incubaciones se detuvieron con 5 ml de metanol frío y se mantuvieron a -20°C para los análisis.

Análisis de ciclooxigenasa-2 (cox-2) recombinante y del producto

Se sobreexpresó COX-2 recombinante humana en células de insecto Sf9 (ATCC). Se suspendieron las fracciones microsómicas ($\sim 8 \mu$ l) en Tris (100 mM, pH 8,0) tal como en (35). Se incubó ASA (~ 2 mM, 37°C, 30 min) con COX-2 antes de añadir DHA (10 μ M) o, en algunos experimentos, DHA marcado con [1-¹⁴C] (de American Radiolabeled Chemicals, Inc.) y se monitorizaron las conversiones en paralelo utilizando C20:4 marcado con [1-¹⁴C] (con ASA) (tal como en la figura 2; ver también el texto).

Las incubaciones se extrajeron con estándares internos marcados con deuterio (15-HETE y C20:4) para el análisis de CL-EM-EM tal como en (33) utilizando una cromatografía líquida LCQ de Finnigan con trampa de iones en tándem con espectrómetro de masas (San Jose, CA) dotado de una columna LUNA C18-2 (150 x 2 mm x 5 μ m o 100 x 2 mm x 5 μ m) y un detector de matriz de diodos de UV de escaneo rápido de espectros que monitorizaba la absorbancia de UV -0,2 min antes de entrar las muestras en el EM-EM. Todas las incubaciones de células intactas y exudados *in vivo* se detuvieron con 2 ml de metanol frío y se mantuvieron a -80°C durante >30 minutos. Se extrajeron las muestras utilizando una extracción en fase sólida en C18 y se analizaron utilizando CG-EM (ver la Tabla 2) (Hewlett-Packard), cromatografía de capa fina o cromatografía líquida en tándem-espectrometría de masas (CL-EM-EM). Además, se utilizó una columna Chiralcel OB-H (4,6 x 250 mm, J.T. Baker) para determinar las configuraciones R y S del alcohol de monohidroxi-PUFA utilizando una fase móvil isocrática (hexano:isopropanol, 97,5:2,5 v:v con un caudal de 0,6 ml/min). Se han informado recientemente (36) procedimientos detallados para el aislamiento, cuantificación y determinación estructural de los mediadores derivados de lípidos y se utilizaron en la presente invención esencialmente tal como se informa para la identificación de nuevos productos. Se llevó a cabo la síntesis biogénica de los nuevos docosanoides utilizando enzimas aislados, es decir, 5-LO de patata, rhCOX-2 o rhCOX-2 tratado con ASA y 15-LO incubados cada uno en reacciones secuenciales en tándem con DHA o 17R-HDHA para producir los nuevos compuestos en cantidades ampliadas para el aislamiento y confirmación de las propiedades físicas y biológicas.

Migración de PMN, exudados de bolsas de aire murinas y peritonitis

Se cuantificó la migración transendotelial de PMN humanas mediante monitorización de la mieloperoxidasa (MPO), un marcador de gránulos azurófilos tal como en (34, 37). Se iniciaron exudados inflamatorios con la inyección en la bolsa de TNF α recombinante de ratón (100 ng/bolsa; R&D Systems) en las bolsas de aire dorsales (10) de ratones FVB macho de 6 a 8 semanas alimentados con dieta de roedores de laboratorio 5001 (Lab Diet, Purina Mills) que contenía menos de 0,25% de ácido araquidónico, 1,49% de EPA y 1,86% de DHA, seguido de ASA (500 μ g) a las 3,5 h y 300 μ g de DHA/bolsa 4 h después de la inyección de TNF α . A las 6 h (dentro de la etapa de resolución), se lavaron las bolsas (3 ml de solución salina) y se realizó un recuento de las células en el exudado. Se determinó la infiltración de PMN estimulada por la inhibición de TNF α (100 ng/bolsa) con la inyección i.v. en la cola de 17R-HDHA (preparado con COX-2, ver después), 5S 12,18-R-HEPE o un análogo de 15-epi-LXA₄ con lavados de las bolsas realizados a las 4 h. Se provocó peritonitis en ratones FVB macho de 6 a 8 semanas de edad (Charles River Laboratories) alimentados con dieta de laboratorio Rodent Diet 5001 (Purina Mills) que se anestesiaron con isoflurano y los compuestos que debían someterse a ensayo (125 μ l) se administraron por vía intravenosa. Se inyectó Zymosan-A en 1 ml (1 mg/ml) -1-1,5 min después en el peritoneo. Cada compuesto de ensayo (100 ng/incubación, es decir, 17R-HDHA en etanol) o vehículo solo se suspendió en $\sim 5 \mu$ l y se mezcló en solución salina estéril (120 μ l). Dos horas después de las inyecciones intraperitoneales, y de acuerdo con el protocolo n° 02570 del Harvard Medical Area Standing Committee on Animals, los ratones fueron eutanizados y se recogieron rápidamente los lavados peritoneales para los recuentos.

Cultivos celulares

Se cultivaron células de glioma humano DBTRG-05MG (ATCC) según las recomendaciones de la ATCC. Para los análisis, se estimularon 10×10^6 células por pocillo en placas de 6 pocillos (Falcon) durante 16 h con 50 ng/ml de TNF α recombinante humano (Gibco) en presencia de concentraciones especificadas de compuestos de ensayo (es decir, 17R-HDHA) o vehículo (etanol al 0,04%). Las células se lavaron en DPBS^{+/+} y se recolectaron en 1 ml de Trizol (Gibco). Para la RT-PCR, se llevó a cabo la purificación del ARN y la RT-PCR tal como en (38). Los cebadores utilizados en las amplificaciones fueron: ⁵GGAAGATGCTGGTTCCTGC³ (SEC ID n° 1) y

5⁵CAACACGCAGGACAGGTACA³ (SEC ID n° 2) para IL-1 β ; 5⁵TCCACCACCGTGTGCTGTAG³ (SEC ID n° 3) y 5⁵GACCACAGTCCATGACATCACT³ (SEC ID n° 4) para GAPDH. Los productos de PCR obtenidos con estos cebadores se confirmaron mediante secuenciación. Los análisis se llevaron a cabo para ambos genes (es decir, GAPDH e IL-1 β) en el intervalo lineal de la reacción. Los resultados se analizaron utilizando el programa NIH Image (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image>).

Síntesis biogénica de resolvinas naturales y análogos

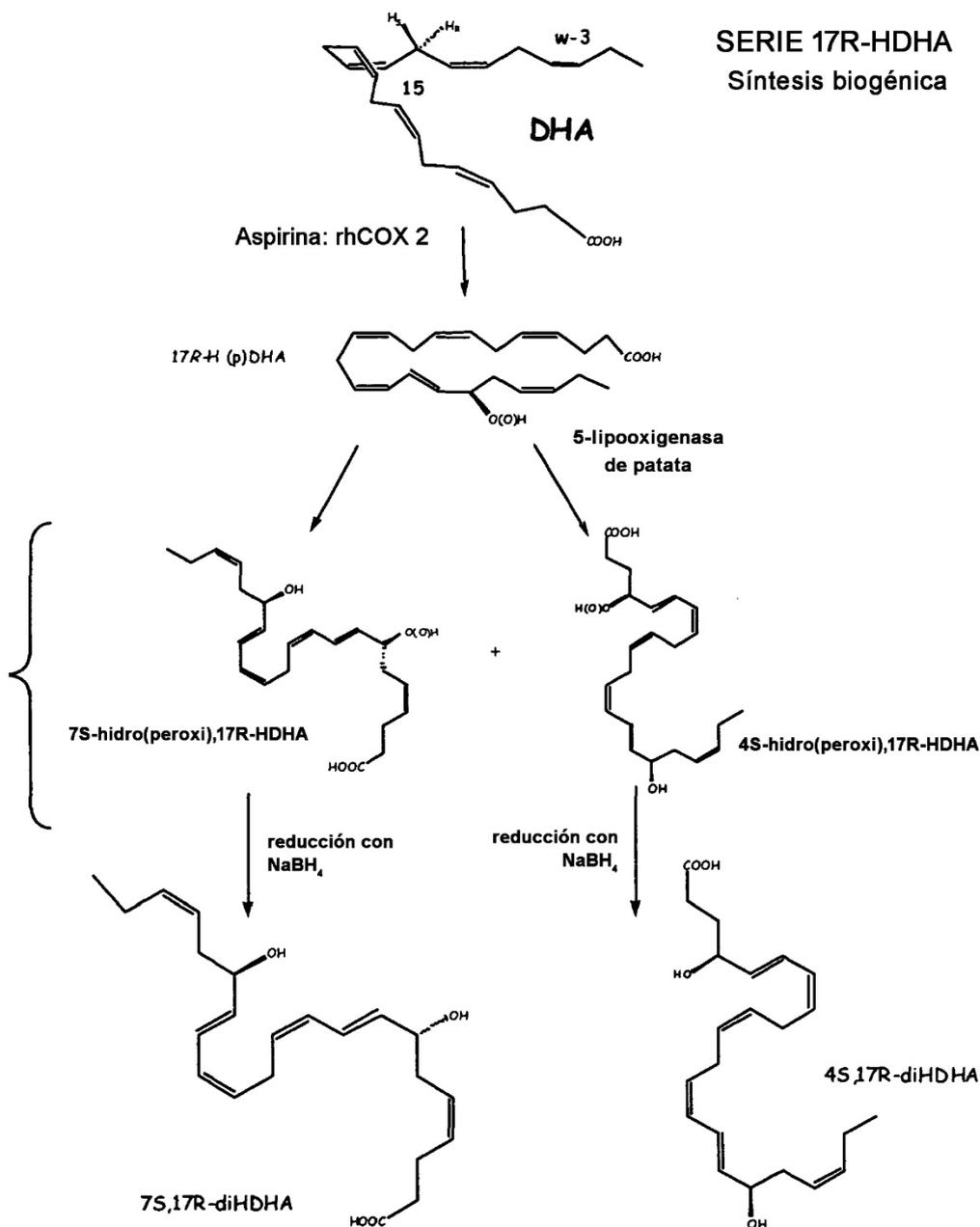
Síntesis biogénica de productos HDHA que contienen 17R:

para la producción a mayor escala de productos diHDHA, se expresó ciclooxigenasa-2 (COX-2) recombinante humana en células de insecto Sf9 y las fracciones microsómicas aisladas se prepararon y se suspendieron en tampón Tris (100 mM, pH 8,0). Se añadió aspirina (2 mM) (30 min, TA) para evaluar la formación de 17R HDHA a partir de DHA (10 μ M) antes de las preparaciones a gran escala, que se confirmaron mediante análisis de CL-EM-EM, tal como en la figura 2 (ver especificación). A continuación, se suspendió DHA (100 mg, de Sigma D-2534) en EtOH y se añadió a 1% v/v a tampón de borato (H₃BO₃ 0,1 mM, pH 8,5) y se agitó con vórtex en un matraz de fondo redondo (5 a 10 min bajo un flujo de nitrógeno) para formar suspensiones de micelas (densidad óptica >650 nm) para la reacción en primer lugar con COX-2 acetilado (60 min, TA) a fin de generar la oxigenación de 17R (ver una ilustración en el Esquema A).

Estas mezclas de reacción se transfirieron inmediatamente y se centrifugaron a través de una columna de centrifuga Millipore YM-30 durante 20 min a TA. A continuación, la 5-lipooxigenasa de patata aislada que se había obtenido de Cayman Chemical se añadió en un volumen de 400 μ l (de acuerdo con la actividad enzimática específica de cada preparación) a reacciones de 10 ml durante 30 min a 4°C en un matraz de fondo redondo enjuagado con O₂ que giraba en un baño de hielo-agua. A intervalos de tiempo, se extrajeron muestras de las reacciones con el fin de monitorizar la formación de producto mediante CL-EM-EM con espectros de UV en tándem registrados en línea con un detector de PDA con una fase móvil de MeOH:H₂O y un gradiente lineal.

A continuación, los aductos de hidroperoxi de posición 4 y posición 7, respectivamente, introducidos al sustrato de 17RHDHA por las actividades de la 5-lipooxigenasa se redujeron como mezcla con la adición de granos sólidos de borohidruro sódico (5 min, TA) y se detuvieron las incubaciones con la adición de 2 vol. de MeOH frío. Se realizó una extracción líquido-líquido de los productos de diHDHA utilizando éter ácido (pH 3,5) y se lavaron hasta pH aproximadamente neutro con agua. Se establecieron las estructuras de los isómeros posiciones 4S,17R y 7S,17R-diHDHA mediante CL-EM-EM (utilizando las condiciones citadas en la memoria). Estos compuestos se resolvieron bien en rp-HPLC utilizando MeOH:H₂O (65:35 v/v) para su aislamiento y acciones biológicas.

Esquema A



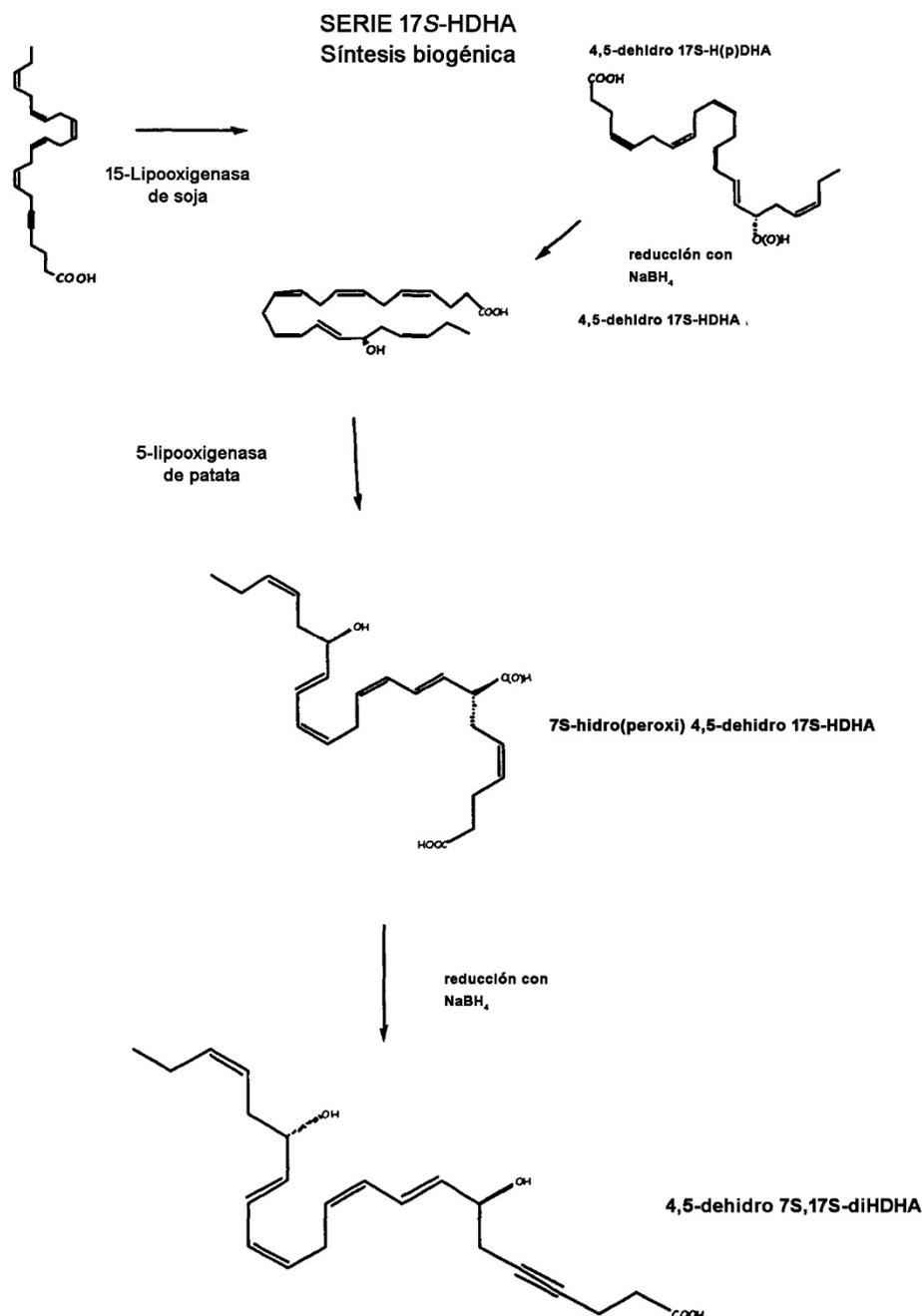
Síntesis biogénica de productos de HDHA que contienen 17S:

- 5 la preparación de los productos 17S se llevó a cabo utilizando 15-lipoxygenasa secuencial (lipoxygenasa de soja; Sigma) seguido de la adición de 5-lipoxygenasa de patata (Cayman Chemical) para la ampliación de las reacciones para producir 4S, 17S-diHDHA y 7S, 17S-diHDHA mostrados en el Esquema B. Ambas lipoxygenas insertan oxígeno molecular predominantemente en la configuración S con la abstracción antarafacial de hidrógeno en posiciones específicas de DHA (ver la especificación). Para estas preparaciones, se suspendió DHA (100 mg) en 10 ml de tampón de borato (0,1 M, pH 9,2), se agitó con vórtex en un matraz de fondo redondo (250 ml) para formar micelas y se añadió la 15-lipoxygenasa de soja a la suspensión de micelas a 4°C en un baño de hielo-agua utilizando la rotación para la mezcla continua durante 30 a 40 min a fin de convertir DHA en 17S-H(p) DHA. Este hidroperoxi DHA se redujo con la adición de unos cuantos granos de NaBH₄ al matraz para producir el 17S hidrox-DHA correspondiente (ver el Esquema B). A continuación, se añadió la 5-lipoxygenasa de pata aislada al matraz mantenido a 4°C, pH 9,0, bajo rotación y oxígeno para insertar el 4S hidroperoxi (y 7S hidroperoxi) en 17S-HDHA seguido de la reducción con NaBH₄. Las reacciones se monitorizaron mediante CL-EM-EM (ver anteriormente), se
- 10
- 15

detuvieron con 2 vol. de MeOH y se extrajeron con éter ácido y se aislaron los isómeros posicionales mediante RP-HPLC. Estos productos que contienen 17S presentaban propiedades biológicas en la inflamación murina y propiedades físicas similares (es decir, cromóforos de UV) a las correspondientes en los productos 17R (ver la Tabla 2), aunque mostraron tiempos de retención diferentes en la CG-EM.

5

Esquema B



Síntesis biogénica de 5S, 18R/S diHEPA y 5,12,18tri-EPE:

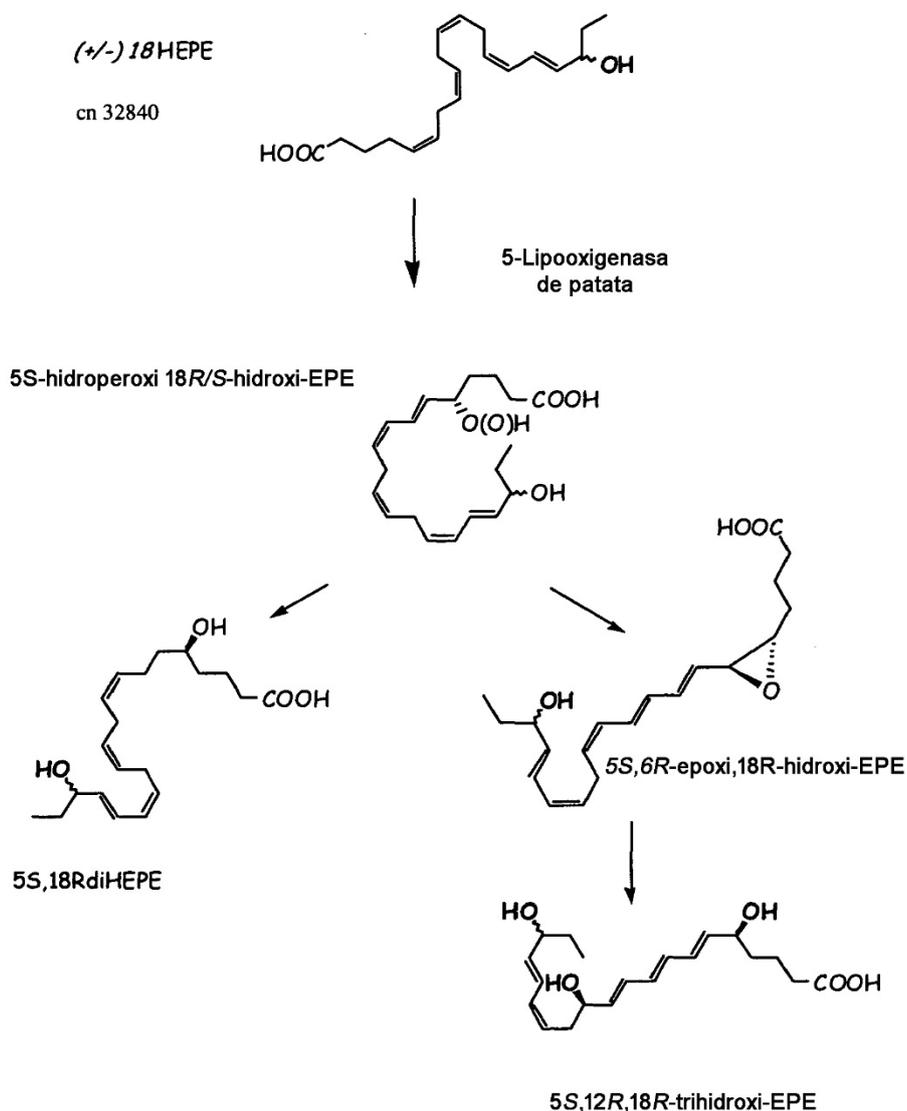
10 se obtuvo (+/-) 18-HEPE de Cayman Chemical (nº de cat. 32840; registro CAS nº 141110-17-0) y se utilizó para producir los nuevos compuestos derivados de EPA (ver el Esquema C) mediante las reacciones y procedimientos descritos (ver anteriormente) utilizando la 5-lipooxigenasa de patata para las reacciones ampliadas. El racemato 18+/-HEPE (alícuotas de 100 µg en EtOH) se suspendió en tampón de borato (pH 9,2) en matraces de fondo redondo (250 ml) en EtOH al 0,1% v/v, se agitó con vórtex durante 5 a 10 min para formar micelas y se sometió a rotación a 4°C tal como se ha indicado anteriormente, en un baño de hielo-agua. Se añadió la 5-lipooxigenasa en alícuotas de 25 µl en dos adiciones de bolo consecutivas para el enzima aislado. El primer bolo inició reacciones que condujeron a la producción de 5S-18R/S-diHEPE tras la

15

5 reducción con NaBH₄ como producto principal (ver el Esquema C) generado tras reacciones de 30 a 40 min, según monitorización mediante CL-EM-EM. La segunda adición de bolo de 5-lipooxigenasa a la mezcla dio lugar a 5,12,18R/S-triHEPA mediante la producción de un intermediario 5(6)-epóxido formado mediante la reacción de LTA sintasa de la 5-lipooxigenasa de patata a este pH y concentración de sustrato. El epóxido se abre en una reacción de tipo SN₂ en presencia de agua, con adición en el carbono menos impedido del catión carbonio generado en el extremo (carbono 12) del sistema trieno conjugado (ver a continuación el Esquema C). Las estructuras se confirmaron mediante CL-EM-EM y se aislaron mediante HPLC para la evaluación de las acciones biológicas.

Esquema C

Síntesis biogénica de 5S, 18+/- diHEPA



10

Ejemplos de análogos mediante síntesis biogénica:

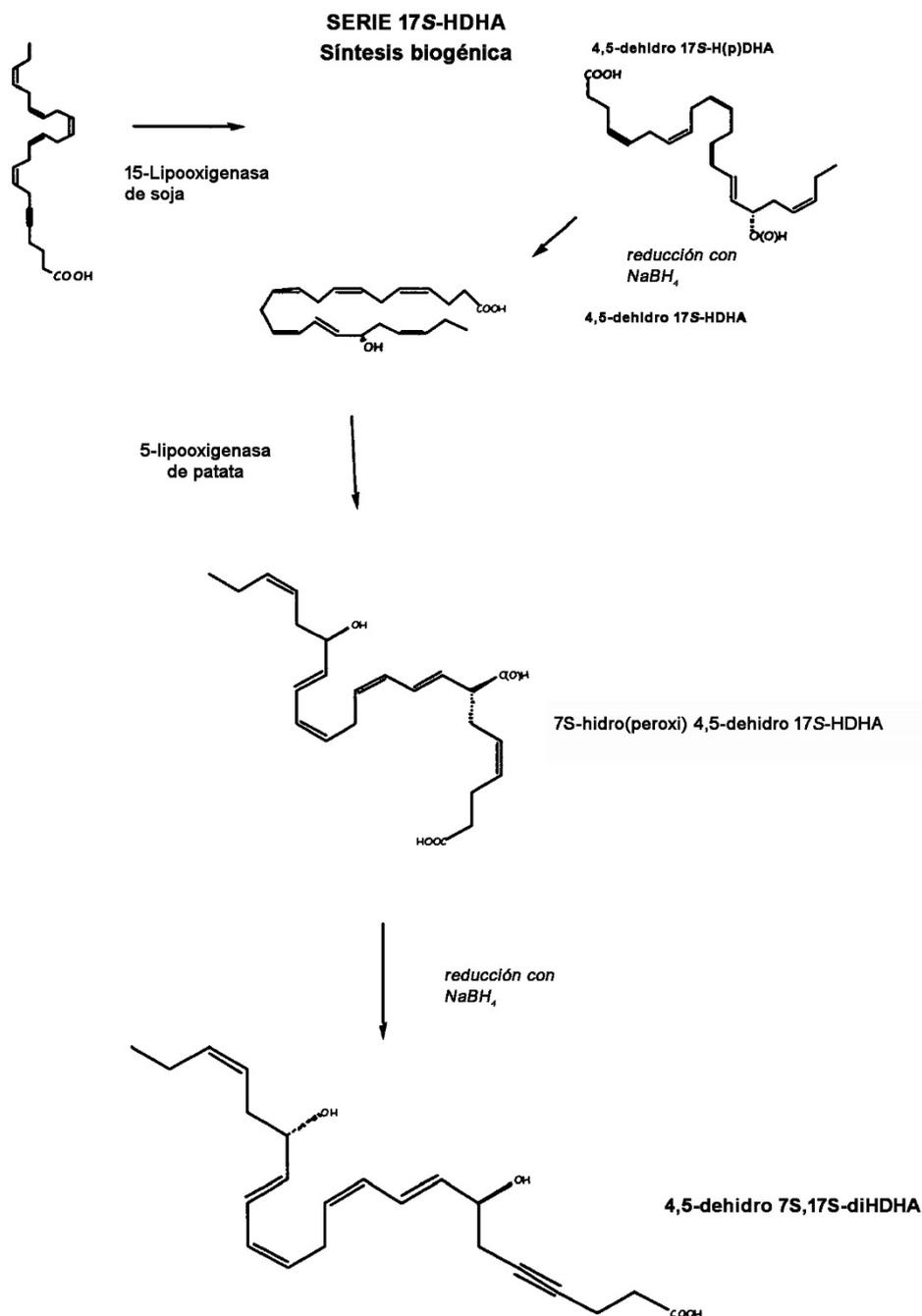
15

síntesis de 4,5-dehidro 7S,17S-diHDHA. El ácido 4,5-dehidro docosahexaenoico (número de cat. 90312) se obtuvo de Cayman Chemical (MI) y se utilizó sin purificación adicional para producir análogos para el análisis biológico de ampliación de escala. El 4,5-dehidro DHA en suspensiones alícuotas de 100 µg se preparó en tampón de borato 0,1 M (pH 9,2) en un matraz de fondo redondo de 25 ml para la agitación con vórtex y la formación de micelas antes de la adición de la 15-lipooxigenasa en alícuotas de 25 µl. Tras la reducción con NaBH₄ del hidroperoxi añadido en la configuración S en la posición 17, el alcohol correspondiente se convirtió a continuación mediante adición de 5-lipooxigenasa de patata, seguido de reducción, proporcionando 4,5-

20

dehidro 7S,17S-diHDHA (ver el Esquema D). Este esquema también puede utilizarse para generar los análogos que contienen 17R correspondientes mediante la sustitución de COX-2 recombinante tratado con ASA como enzima de posición 1 por 15-lipooxigenasa.

Esquema D



5

Otro ejemplo de esta ruta para la ampliación se proporciona en el Esquema E para la síntesis biogénica de un nuevo análogo: 4,5-dehidro 10,17S-dihidroxi-DHA (ver también la figura 17). Brevemente, tras la adición de 15-LO que se convirtió en el aducto 17S, una segunda adición de 15-LO de soja proporcionó la reacción de sintasa similar a LTA4, rindiendo el epóxido 16(17) del precursor 4,5-dehidro, que sometido a hidrólisis proporcionó 4,5-dehidro 10,17S-dihidroxi-DHA. Este producto a una dosis de 100 ng en una peritonitis inducida por Zymosan-A murina produjo una inhibición de 40% de la infiltración de PMN, indicando que este análogo de resolvina es un potente agente antiinflamatorio *in vivo*.

10

15

La figura 18 demuestra que 4,17S-diHDHA es aproximadamente la mitad de potente que el 10,17-docosatrieno. Mediante el incremento de la dosis administrada mediante bolo intravenoso a 200 ng, los dos compuestos

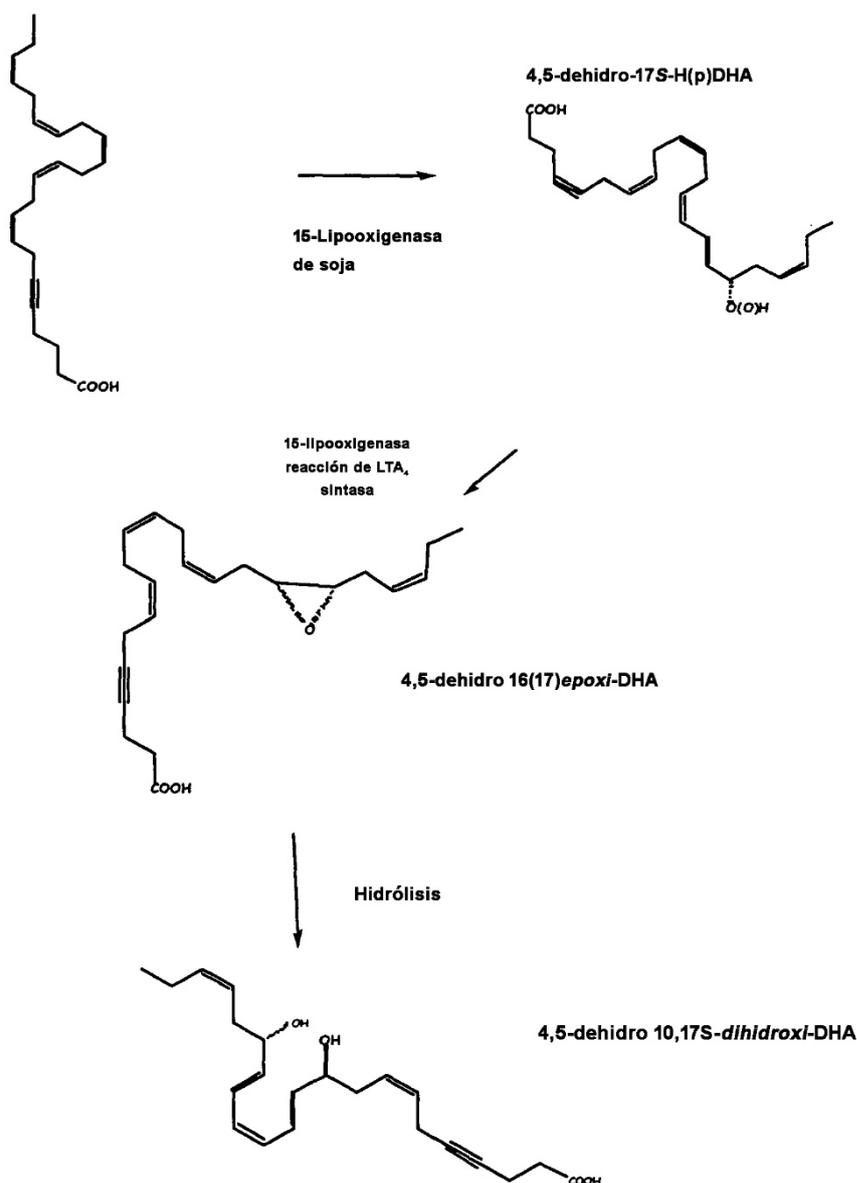
resultaron esencialmente igual de eficaces. Estos resultados indican que 4,17S-diHDHA, aunque menos potente a igual cantidad, es esencialmente igual de eficaz tanto en la regulación como la inhibición de la infiltración de los leucocitos y la inflamación en el modelo de peritonitis murina.

- 5 Para la figura 18, 4,17S-diHDHA causó una inhibición dependiente de dosis de la infiltración de los leucocitos PMN. 100 ng de 10,17S-docosatrienos causaron una inhibición potente. Se indujo peritonitis en ratones FVB de 6 a 8 semanas mediante inyección peritoneal de 1 mg de Zymosan-A. Los compuestos 4,17S y 10,17S-diHDHA se inyectaron mediante la inyección de un bolo intravenoso 1,5 minutos antes del tratamiento con Zymosan-A. Dos horas después de la inducción de peritonitis, se recolectaron lavados peritoneales rápidos y se llevó a cabo el recuento de tipos celulares.
- 10

Esquema E
ejemplo

SERIE 17S-HDHA
Síntesis biogénica

4,5-dehidro-DHA nº 90312



Síntesis orgánicas de los análogos de resolvina

Las rutas sintéticas siguientes ejemplifican métodos para preparar las familias de análogos de resolvina de interés. Las preparaciones no pretenden ser limitativas, sino que sirven como otro medio para preparar dichos análogos junto con prácticas más tradicionales y deben considerarse complementarios de las síntesis biogénicas indicadas anteriormente. Entre los métodos de aislamiento se incluyen la cromatografía de columna, HPLC, CG, cristalización y destilación, en caso necesario. La caracterización puede llevarse a cabo mediante UV, EM, EM/EM, CG/EM, RMN, etc. El experto en la materia puede apreciar los diversos métodos para preparar, aislar y caracterizar dichos nuevos compuestos basándose en las enseñanzas en la presente memoria.

Los esquemas sintéticos generales proporcionados posteriormente ilustran métodos para preparar las diversas "clases" o familias de resolvinas.

Durante todas las síntesis de estas familias, se utilizan grupos R para indicar que pueden unirse diversos grupos a la cadena de carbono de las resolvinas. Cada grupo R se selecciona independientemente, puede ser igual o diferente y puede contemplarse que cada grupo R no se encuentre necesariamente presente. En estos casos, el sitio de unión puede incluir un átomo de hidrógeno. Tal como se ha indicado anteriormente, el grupo R se considera un "grupo R protector" y puede un grupo alquilo sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, un grupo arilalquilo, un grupo alquilarilo o un átomo de halógeno.

Durante todos los esquemas sintéticos, se ilustran diversos grupos protectores de hidroxilo. Estos no deben considerarse limitativos; estos son grupos protectores ejemplares que pueden utilizarse y se seleccionaron como ilustrativos.

La fracción denominada "U" tal como se utiliza durante la totalidad de los esquemas sintéticos se describe en toda la solicitud y se incorpora como referencia en la presente memoria. "U" tal como se utiliza en la totalidad de los esquemas sintéticos en la presente memoria pretende incluir un átomo de carbono terminal. El grupo terminal puede ser un grupo mono-, di- o trisustituido, un metileno (sustituido o no sustituido) unido a un grupo fenoxi (sustituido o no sustituido), un grupo arilo sustituido o no sustituido, grupos arilalquilo, etc.

Se pretende que "Q" en toda la memoria incluya uno o más sustituyentes situados en torno a una estructura de anillo. Entre los sustituyentes adecuados se incluyen átomos de hidrógeno, átomos de halógeno, grupos alquilo (sustituidos y no sustituidos, ramificados y no ramificados), grupos alquilarilo, grupos arilalquilo, ésteres, hidroxilos, etc.

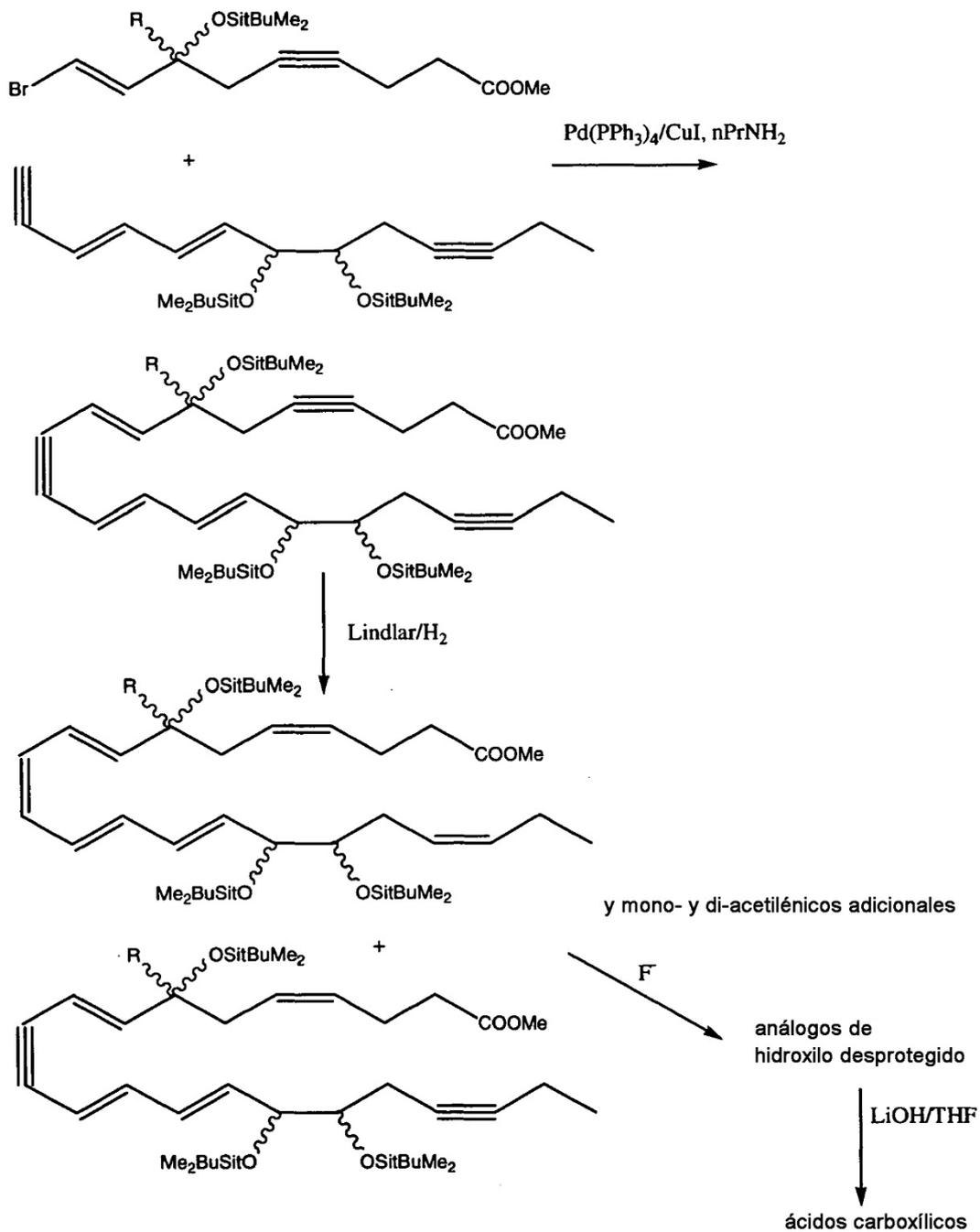
La fracción denominada "X" tal como se utiliza durante la totalidad de los esquemas sintéticos se describe en toda la solicitud y se incorpora como referencia en la presente memoria. "X" tal como se utiliza a lo largo de los esquemas sintéticos pretende incluir un átomo de oxígeno, un metileno, un átomo de nitrógeno o de azufre sustituido o no sustituido.

Tal como se ha indicado anteriormente, la hidrogenación de partes acetilénicas de la resolvina puede llevarse a cabo para proporcionar uno o más productos. La hidrogenación selectiva puede proporcionar múltiples productos de reacción dependiendo del grado de hidrogenación que se desee. El producto o productos resultantes pueden proporcionar uno o más isómeros geométricos (*cis* o *trans*) en torno al doble enlace resultante en donde ha tenido lugar la hidrogenación. Adicionalmente, la hidrogenación selectiva puede proporcionar análogos de resolvina que conservan una o más partes acetilénicas, proporcionando de esta manera todavía más análogos adicionales. La separación e identificación de los compuestos puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la técnica (CCF, HPLC, CG, etc.).

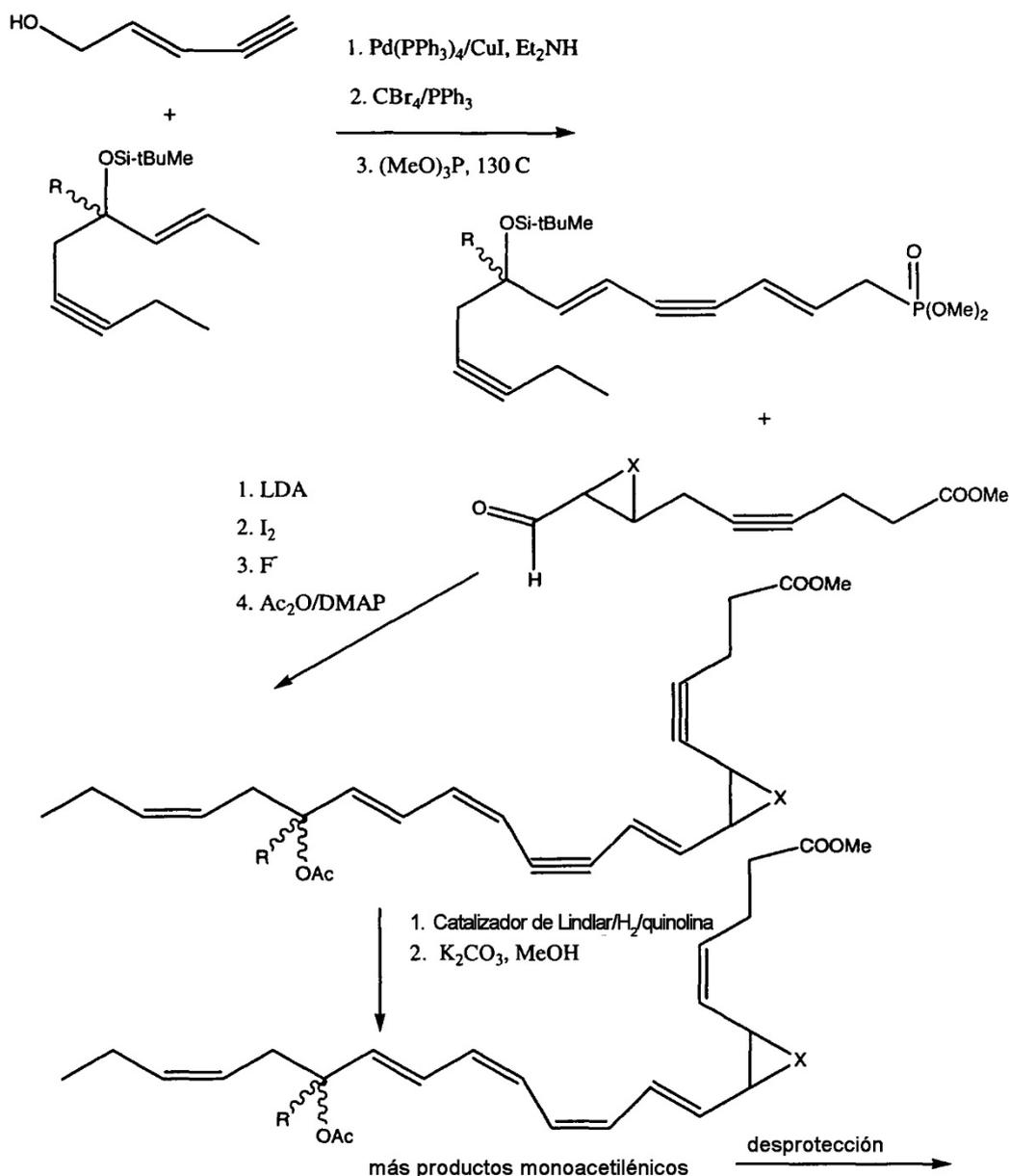
La conservación de partes acetilénicas dentro del análogo de resolvina se considera ventajosa. La síntesis puede acortarse (la etapa o etapas de hidrogenación pueden eliminarse o monitorizarse para que sólo se produzca la hidrogenación selectiva). Los compuestos resultantes de resolvina que contienen acetileno conservan bioactividades similares a las de las resolvinas que contienen olefinas totalmente hidrogenadas. Además, se cree que resulta ventajoso evitar la hidrogenación de los enlaces olefínicos que se generan a partir de partes acetilénicas que corresponden a los isómeros configuracionales "*cis*" con respecto a los compuestos DHA y EPA naturales. Es decir, retrosintéticamente, resulta ventajoso preparar compuestos DHA y EPA que presentan partes acetilénicas en donde existían previamente dobles enlaces *cis* en la molécula.

Por ejemplo, el Esquema I proporciona la preparación general de una clase de resolvinas.

Esquema I



Esquema II



Debe indicarse, por ejemplo, que los grupos "R" se utilizan como inhibidores para bloquear la oxidación de 7-OH y/o 17-OH, formando cetonas en la posición o posiciones C-7 o C-17.

5 En el esquema sintético II, la síntesis del análogo 7(8)-metano se basa en el modelo biológico del intermediario epóxido en la biosíntesis de los productos bioactivos generados por exudados y células a partir de DHA como precursor. En el presente ejemplo, el acoplamiento catalizado por Pd⁰/Cu¹ del bromuro de vinilo acetileno con el alcohol alquínilico se produce después de la bromación y producción de fosfato, proporcionando un fosfonato como intermediario. El fosfonato se somete a condensación del derivado litio con el aldehído, rindiendo una mezcla de isómeros Δ 9-10 *cis* (E)(Z) *trans*. Estos pueden convertirse mediante tratamiento con cantidades catalíticas de yodo. Para proteger los triples enlaces, el grupo protector sililo en el carbono 17 se sustituye por acetato. Se utiliza la reducción catalítica de Lindlar para reducir los triples enlaces en la quinolina. El producto o productos se desacetilan, proporcionando el análogo ciclopropil 7(8) metano estable del análogo epóxido lábil equivalente que participa en la biosíntesis de resolvina en los exudados *in vivo* y/o en las células, tales como las células microgliales en el cerebro o los leucocitos humanos.

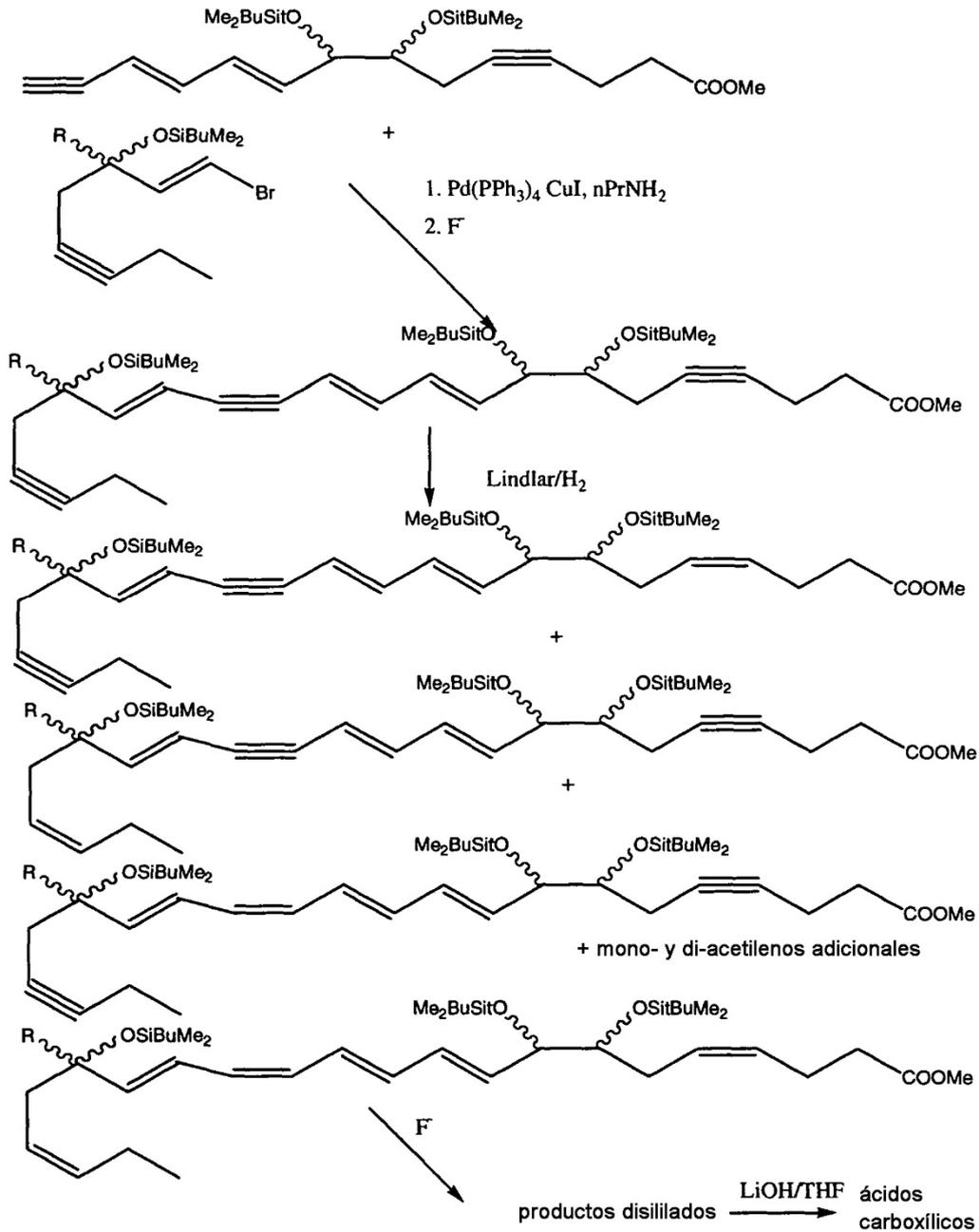
10

15

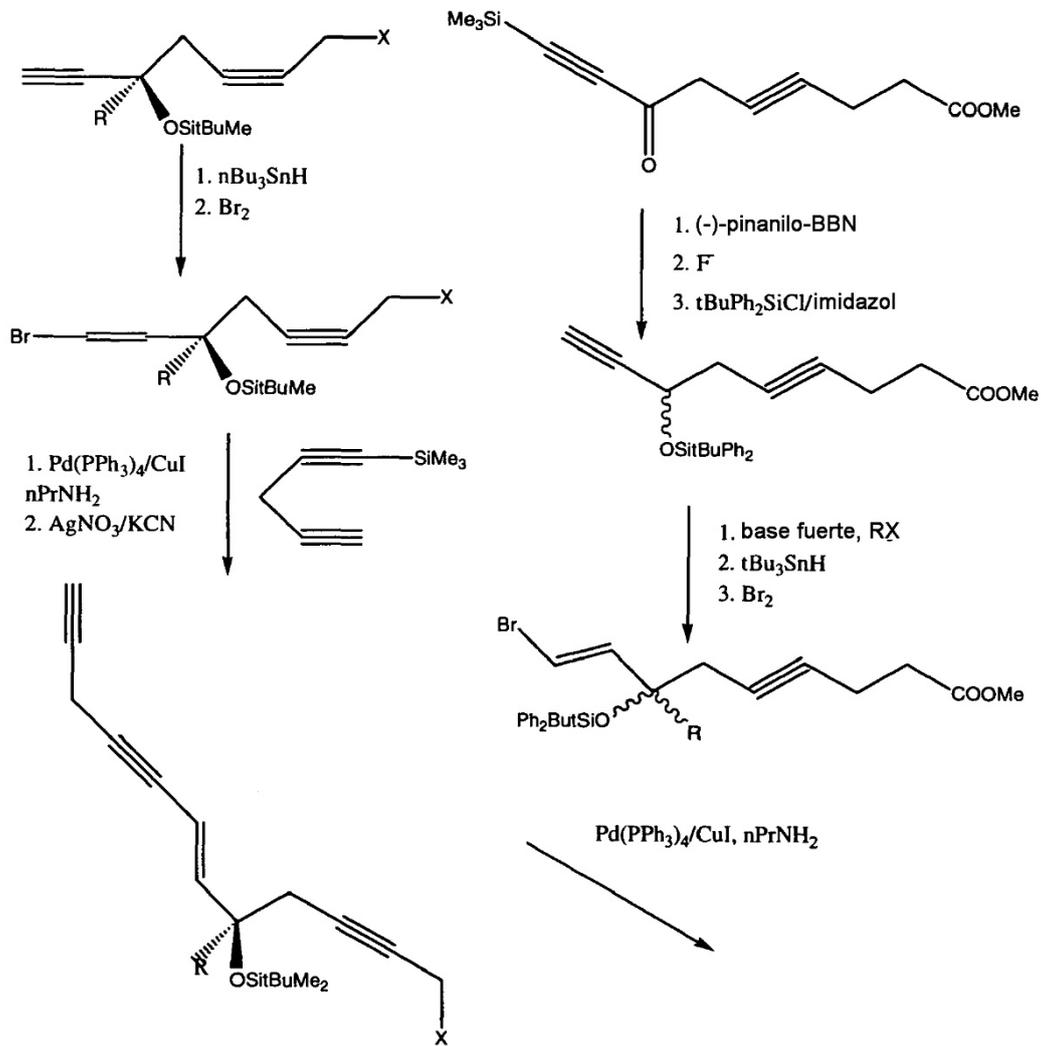
Estos análogos son importantes terapéuticos debido a que además de actuar en el sitio/receptor para la resolvina 7,8,17R-triHDHA como mimético para detener la producción de leucocitos como agonista,

5 estimulando/fomentando la resolución y de inhibir farmacológicamente la inflamación, también sirve como inhibidor de enzimas *in vivo*. De esta manera, los compuestos inhiben los mediadores lipídicos proinflamatorios, tales como los leucotrienos, y también conducen a una acumulación *in situ* de resolvinas anteriores en la ruta biosintética (ver la figura 8). De esta manera, esta clase de compuestos sirve a un doble propósito: mimético de la resolvinina 7,8,17-tri-HDHA y como inhibidor a nivel de sustrato.

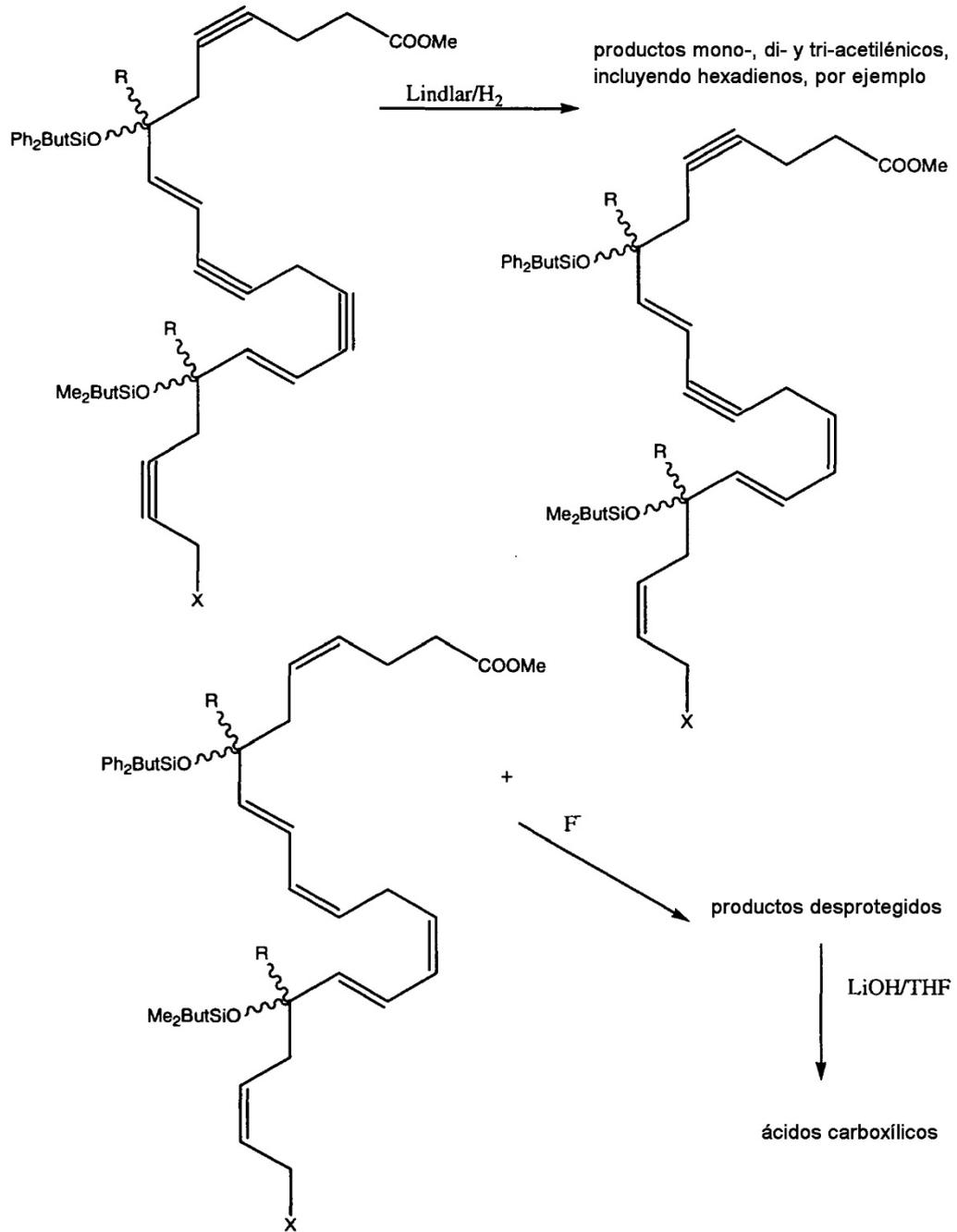
Esquema III



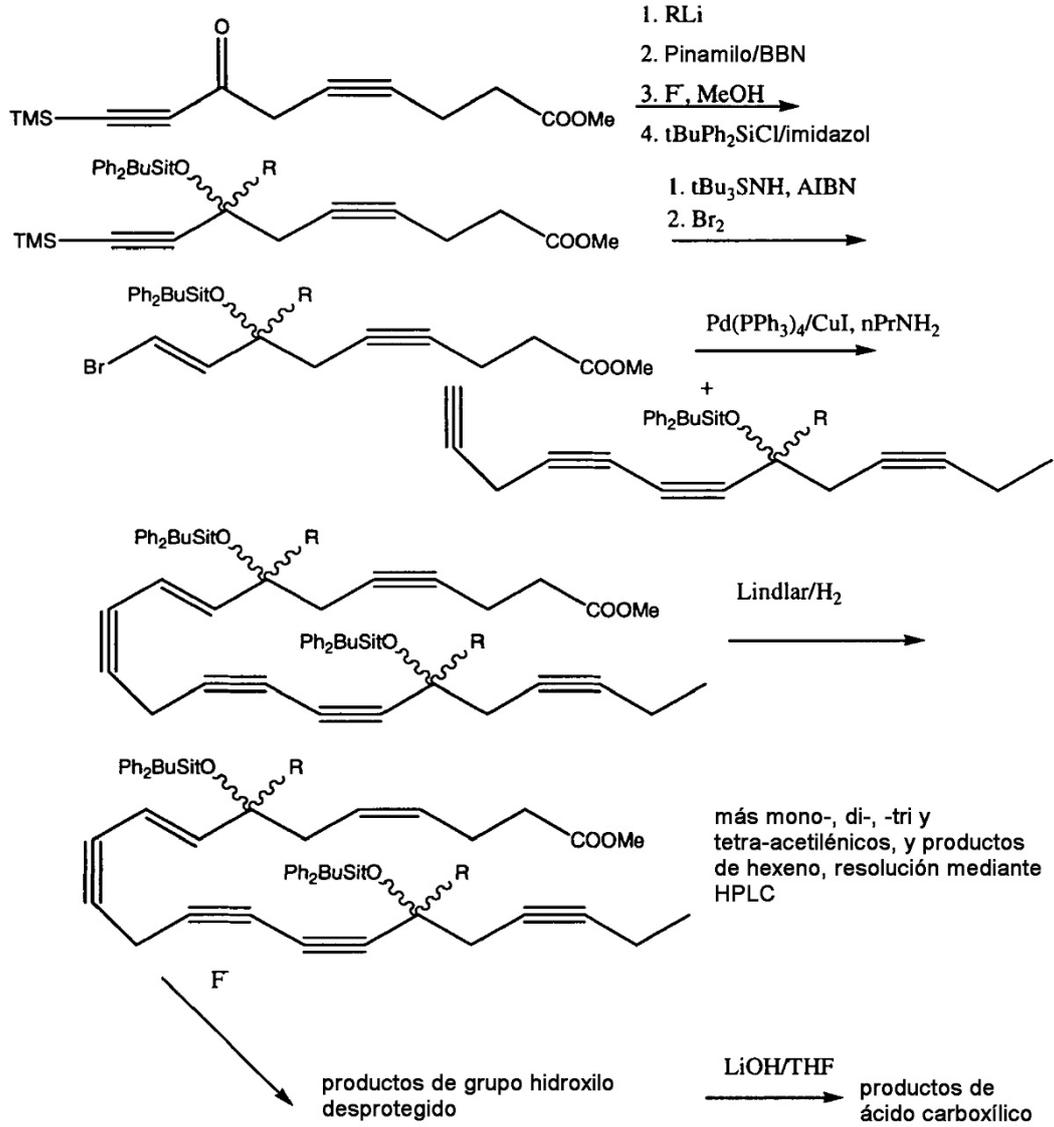
Esquema IV



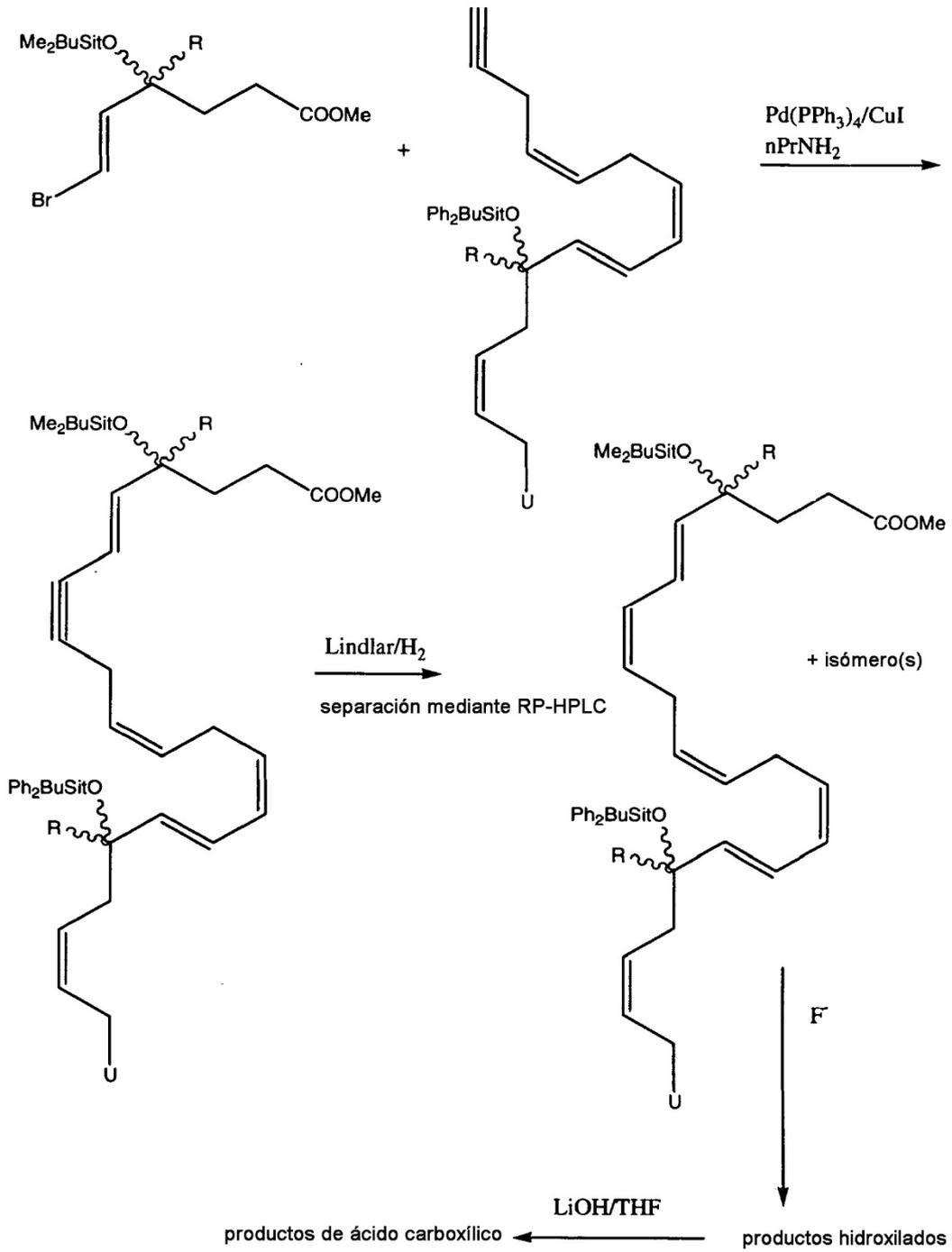
Esquema IV (continuación)



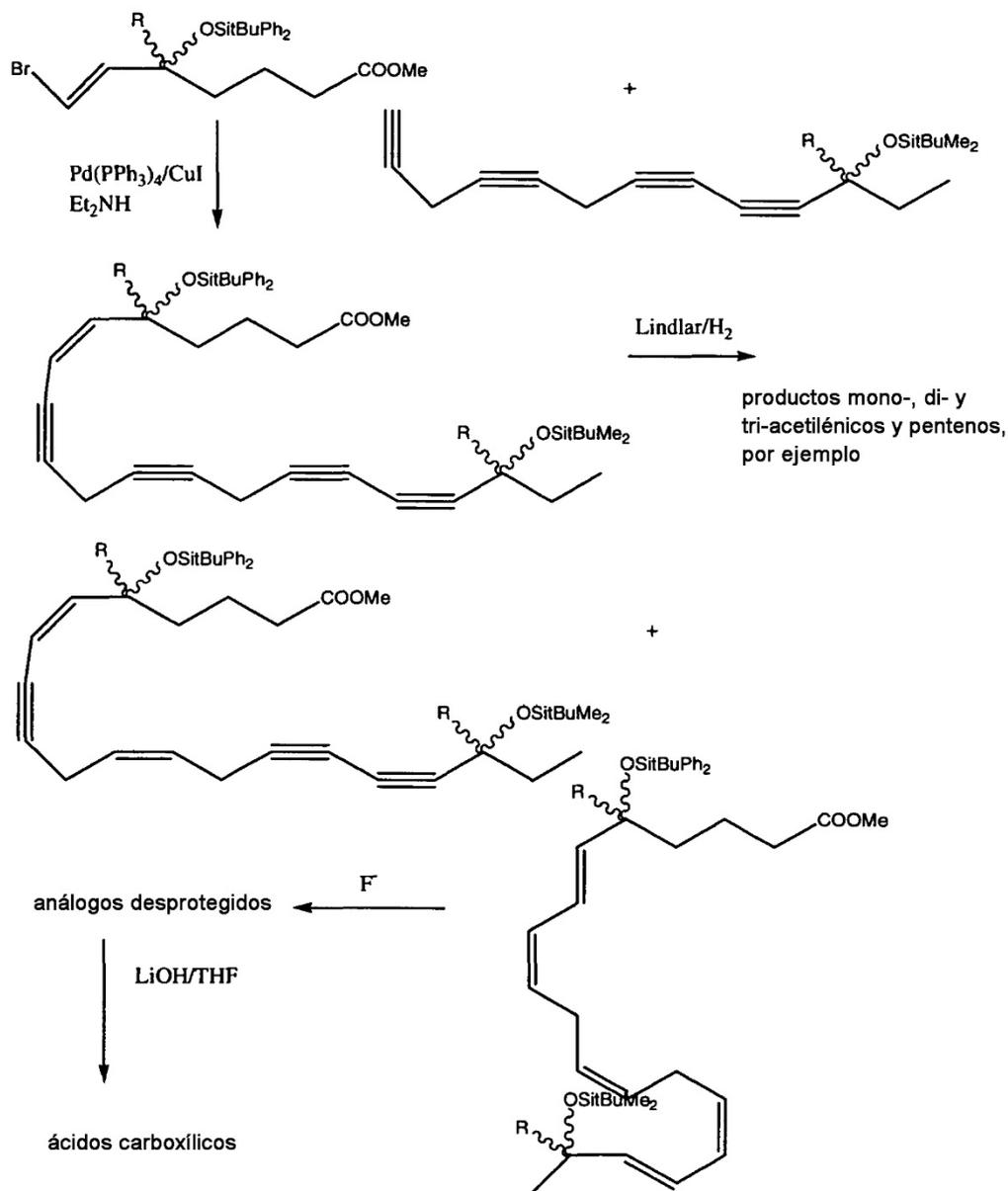
Esquema V



Esquema V (alternativa)



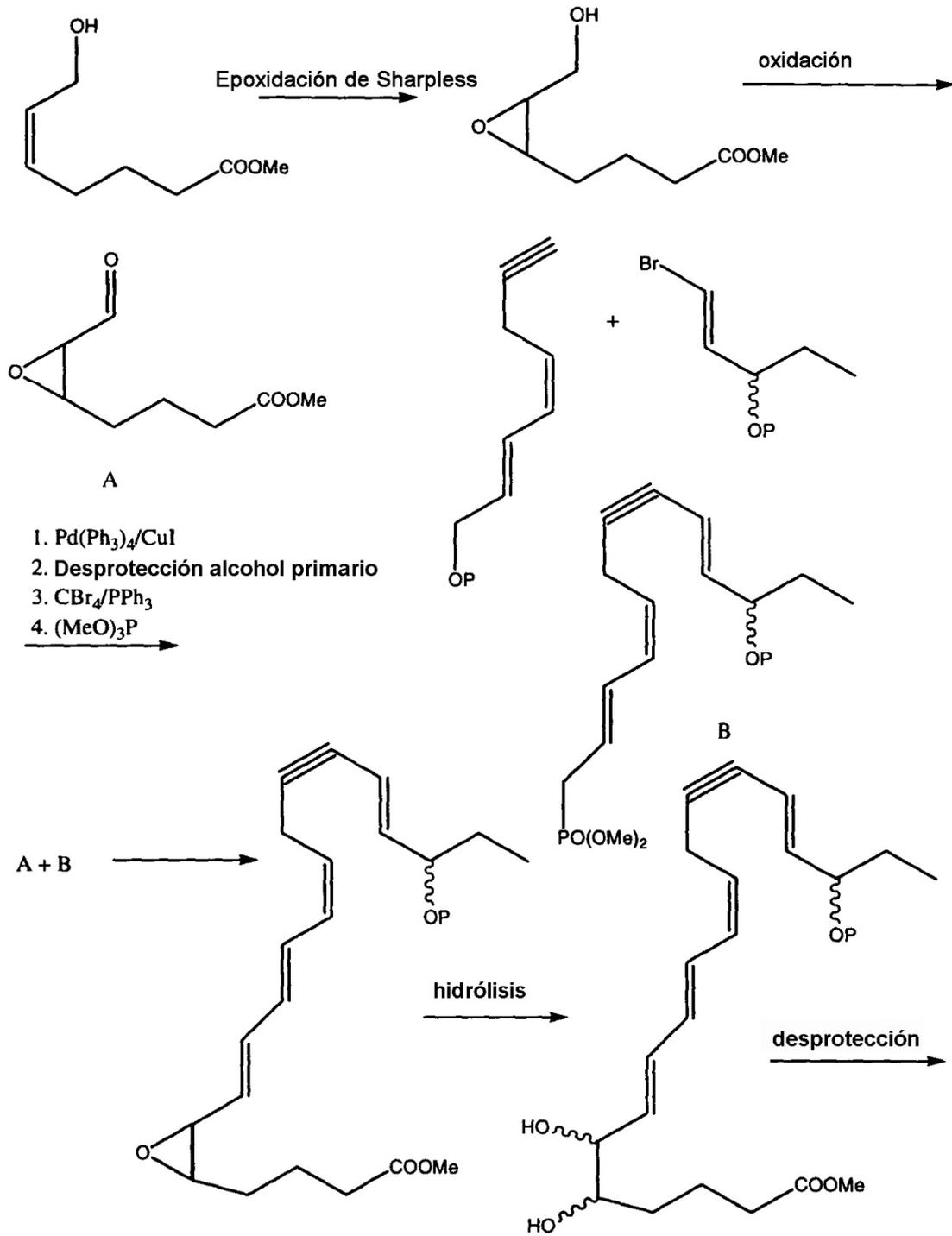
Esquema VI



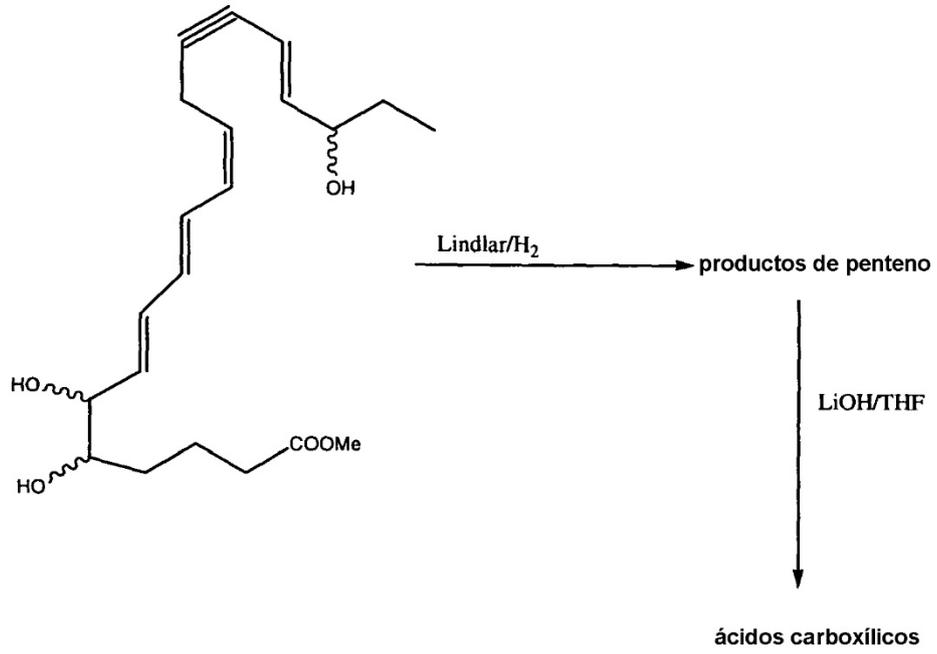
5 El Esquema VI representa otra clase de compuestos, en la que nuevamente "protege" a los hidroxilos 5 y/o 18 potencialmente oxidables en cetonas. La utilización de grupos "R", tal como se indica en la presente memoria, proporciona la capacidad de evitar la oxidación y, por lo tanto, la biodisponibilidad del compuesto bioactivo.

10 Los análogos en el esquema sintético VI pueden prepararse mediante acoplamiento del bromuro de vinilo tal como se prepara en K.C. Nicolaou *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30:1100-1116, 1991, y acoplarse utilizando química de acoplamiento de Pd/Cu. El intermediario resultante puede hidrogenarse selectivamente con el catalizador de Lindlar e hidrógeno para producir diversos productos acetilénicos, así como productos que contienen penteno. La desprotección de los alcoholes y la conversión en ácidos carboxílicos, ésteres, etc. puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos.

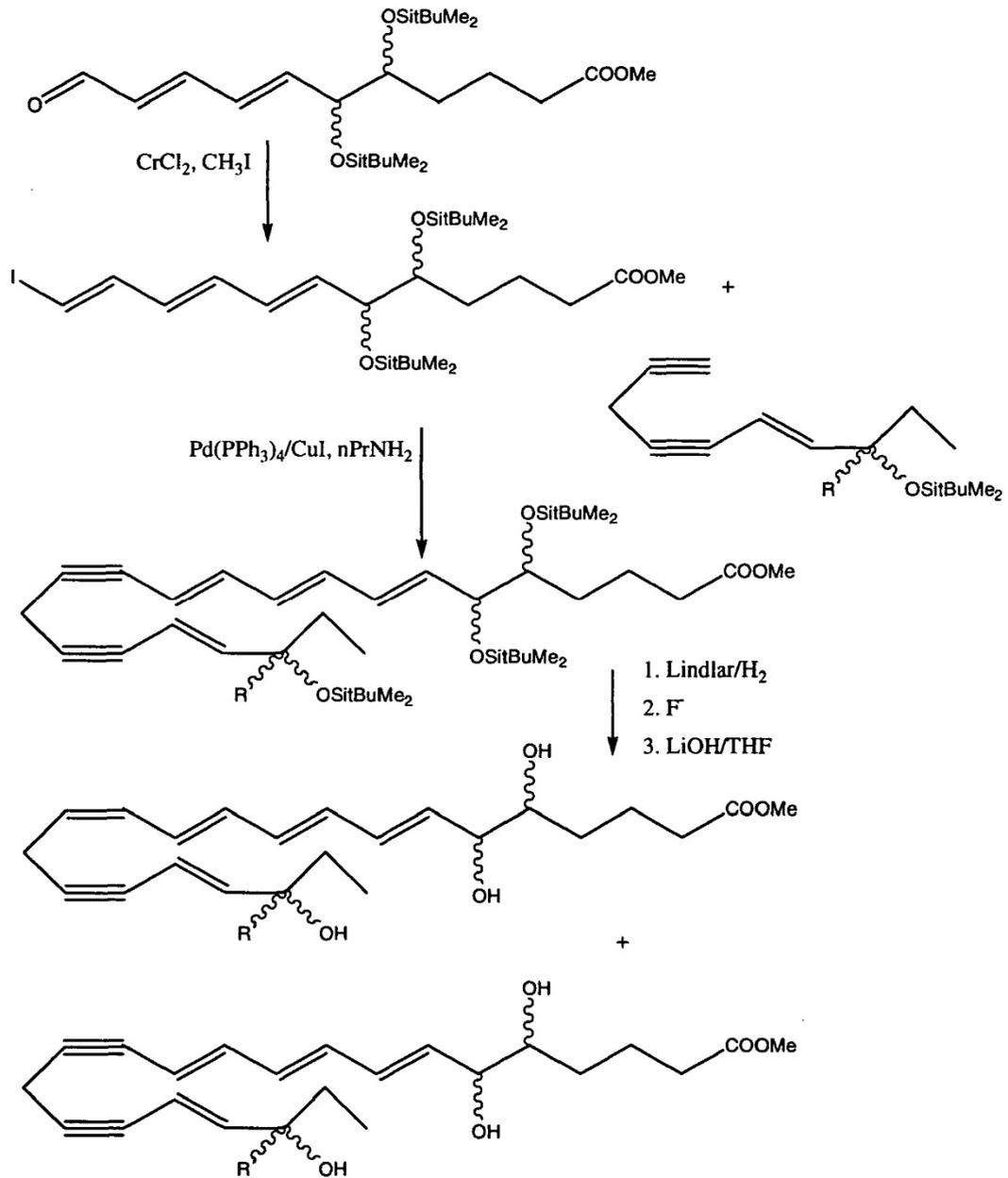
Esquema VII



Esquema VII (continuación)

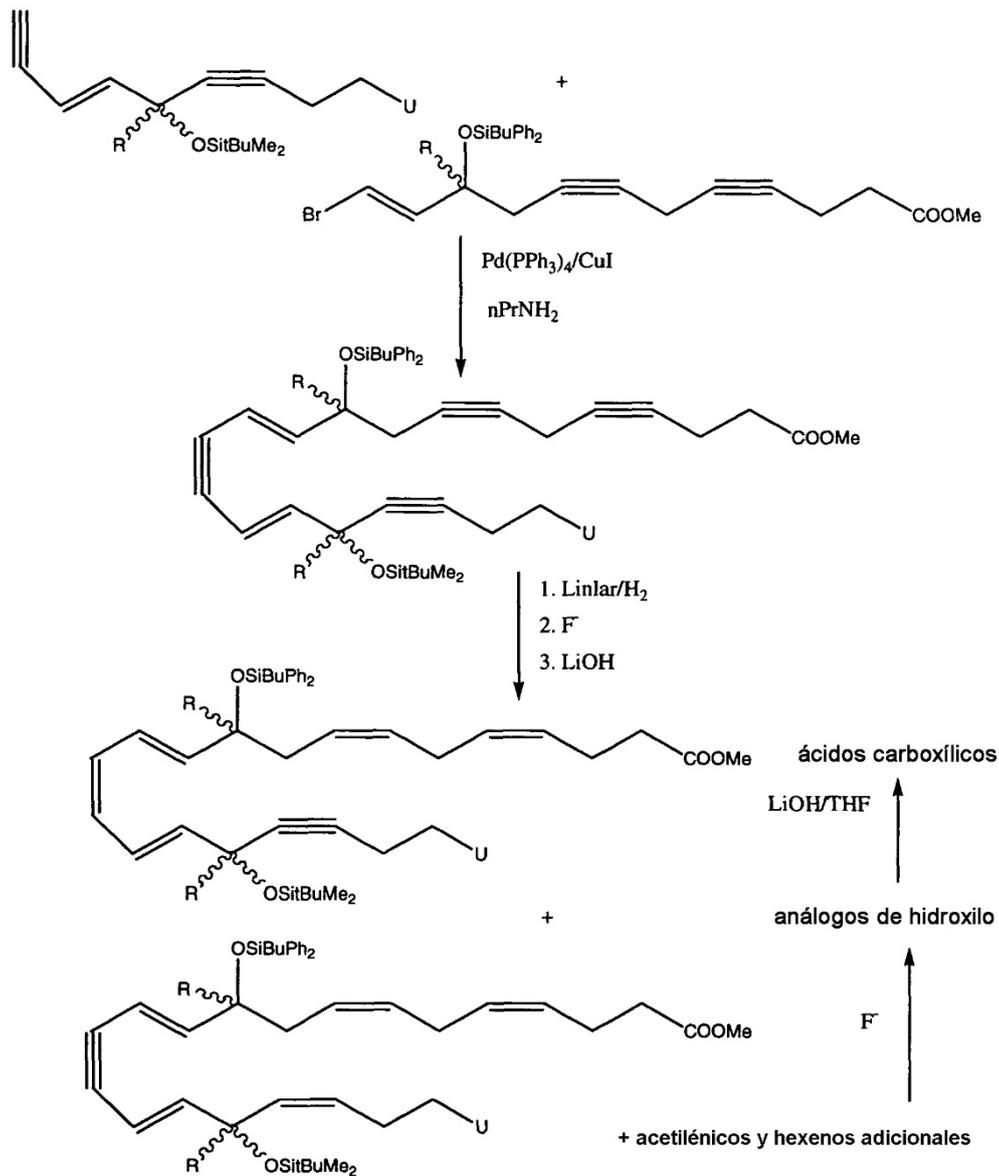


Esquema VIII



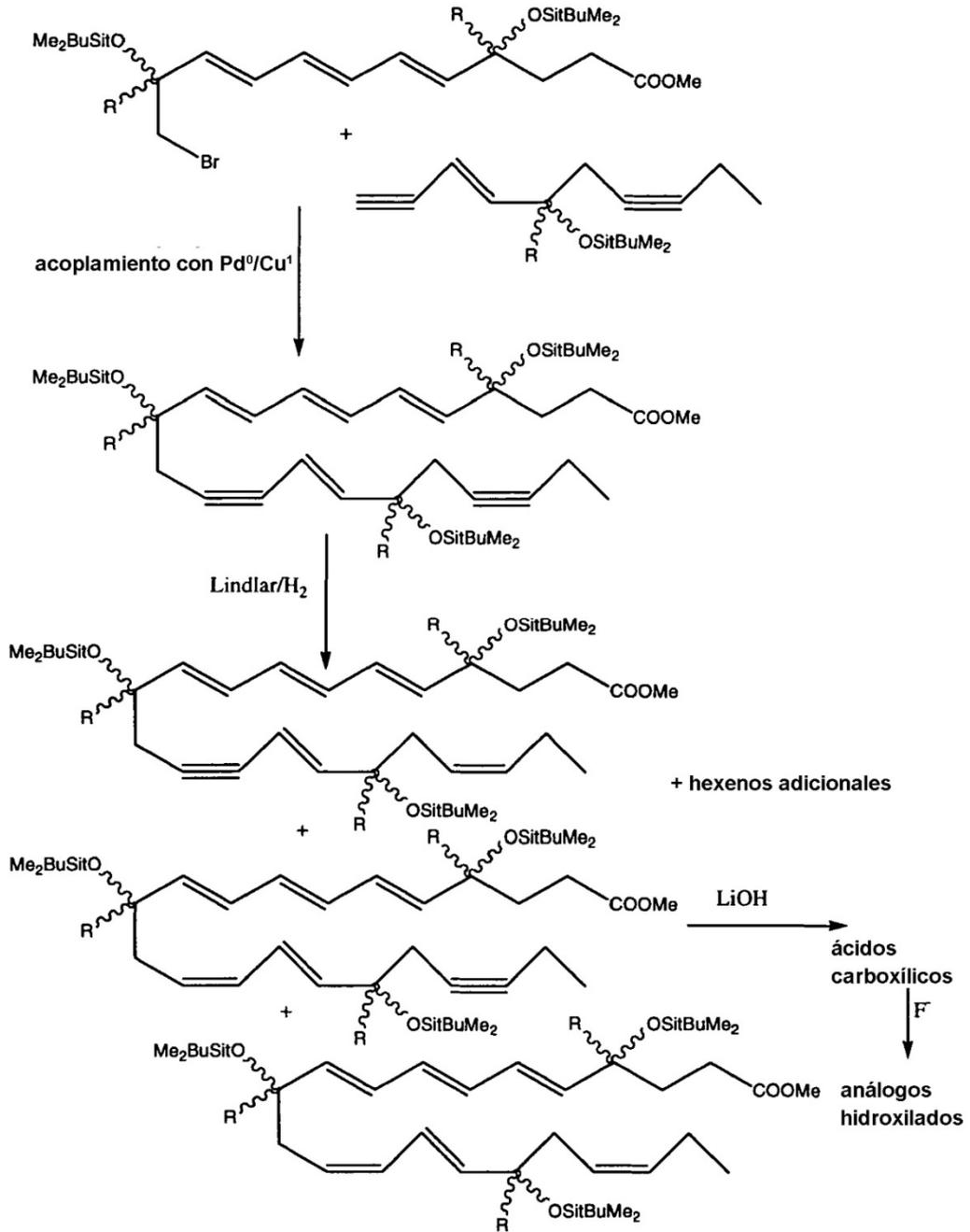
y otros análogos acetilénicos y que contienen hexeno

Esquema para los análogos 10,17 diHDHA

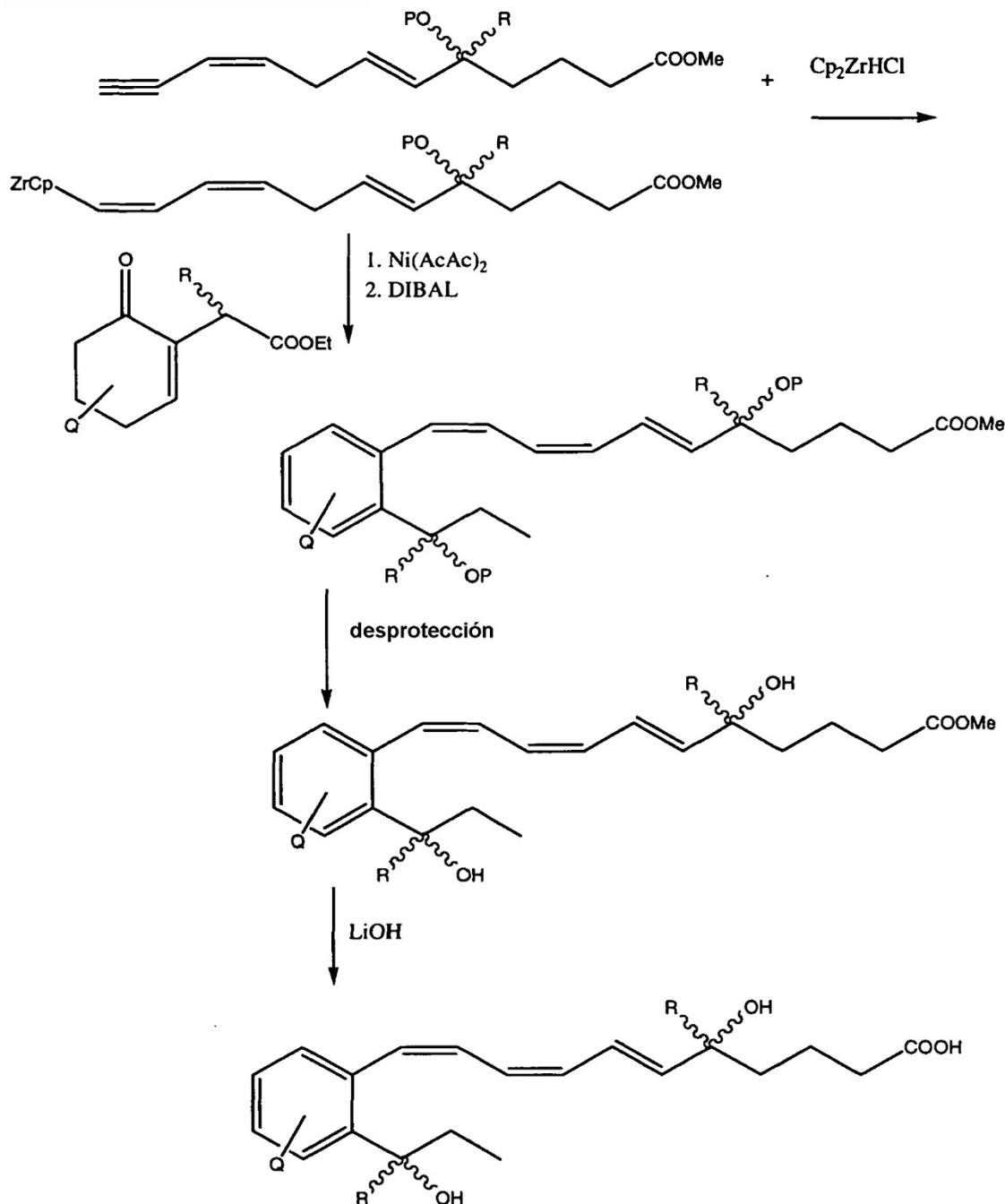


Los 10,17-diHDHA se ilustran en la figura 8 y resultan de interés porque la biosíntesis de 10,17-di-HDHA difiere de los demás compuestos de la figura 8. Se produce mediante la acción de la 15-lipooxigenasa sobre DHA (pH de aproximadamente 8,5) bajo condiciones que favorecen la hidroperoxidación en la posición 17 de DHA, que a continuación se convierte en el epóxido 16,17. El epóxido 16(17) porta el cromóforo de trieno conjugado y se abre mediante un intermediario catión carbonio con ataque de OH en la posición 10, proporcionando 10,17-diHDHA. Los tejidos humanos y células aisladas producen mediante esta vía la 15-lipooxigenasa, así como enzimas adicionales. Este compuesto ha sido preparado mediante la utilización de 15-lipooxigenasa de soja con DHA como el sustrato a un pH de aproximadamente 8,5, presentando en configuración de micelas. Se aisló el 10,17-diHDHA utilizando RP-HPLC tal como se indica en la presente memoria. Se encontró que 10,17-di-HDHA inhibía tanto la migración de PMN hacia el interior del peritoneo (peritonitis inducida por cimosano) de ratones en los que se había administrado cimosano, como la inflamación. Por lo tanto, la protección en la posición hidroxilo de C-10 con un "grupo protector R" debería evitar la conversión metabólica e incrementar la estabilidad y activación, bloqueando la infiltración de PMN y la inflamación aguda.

Esquema para 4,11,17-triHDHA



Esquema para 5,18 di-HEPA

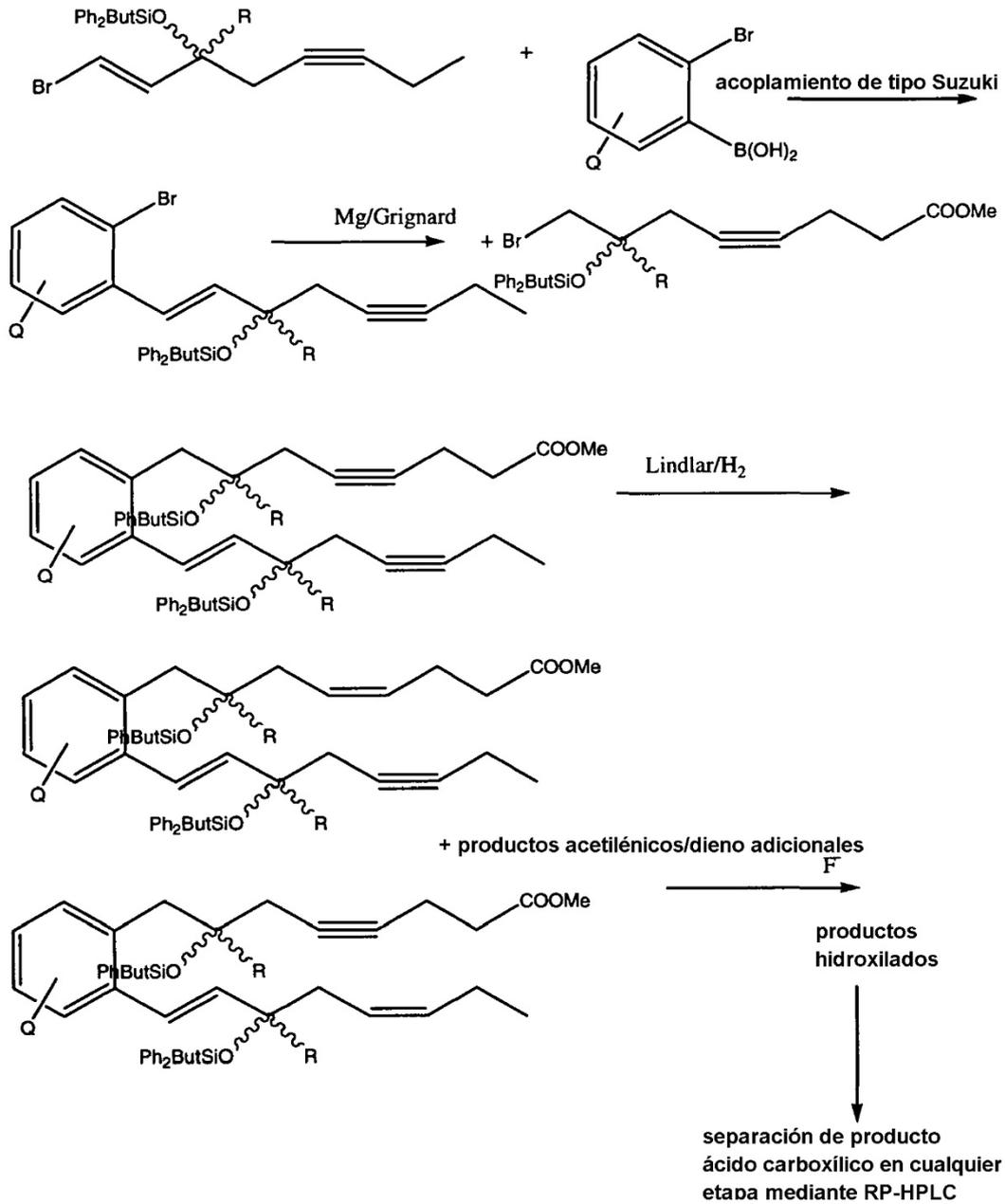


- La preparación de análogos 5,18-diHEPA se consigue utilizando una adición conjugada de un reactivo vinil-circonio 3-(1-octén-1-il)ciclohexanona, tal como en Sun R.C., M. Okabe, D.L. Coffen y J. Schwartz , 1992.
- 5 Conjugate addition of a vinyl zirconium reagent: 3-(1-octen-1-yl)cyclopentanone (cyclopentanone, 3-(1-octenyl)-, (E)-). En: Organic Syntheses, vol. 71. L.E. Overman, editor. Organic Syntheses, Inc., Notre Dame, IN. 83-88 utilizando reactivo de Schwartz tal como se prepara en Buchwald, S.L., S.J. LaMaire, R.B. Nielsen, B.T. Watson y S.M. King. 1992. Schwartz's reagent (zirconium, chlorobis(h5-2,4-cyclopentadien-1-yl)hydro-). En: Organic Synthesis, vol. 71. L.E. Overman, editor. Organic Syntheses, Inc., Notre Dame, IN. Para construir el intermediario circoniato. El tratamiento con DIBAL tal como en Ishiyama, T., N. Miyaura, y A. Suzuki. 1992. Palladium(0)-catalyzed reaction of 9-alkyl-9-borabicyclo[3.3.1]nonane with 1-bromo-1-phenylthioethene: 4-(3-cyclohexenyl)-2-phenylthio-1-butene, en: Organic Syntheses, vol. 71. L.E. Overman, editor. Organic Syntheses, Inc., Notre Dame, IN, proporciona el análogo que contiene el anillo di-HEPA. Debe apreciarse que el reactivo ciclohexanona puede sustituirse por cualquier de entre varios sustituyentes, proporcionando de esta manera el anillo aromático sustituido o no sustituido resultante en el análogo di-HEPA.
- 10
- 15

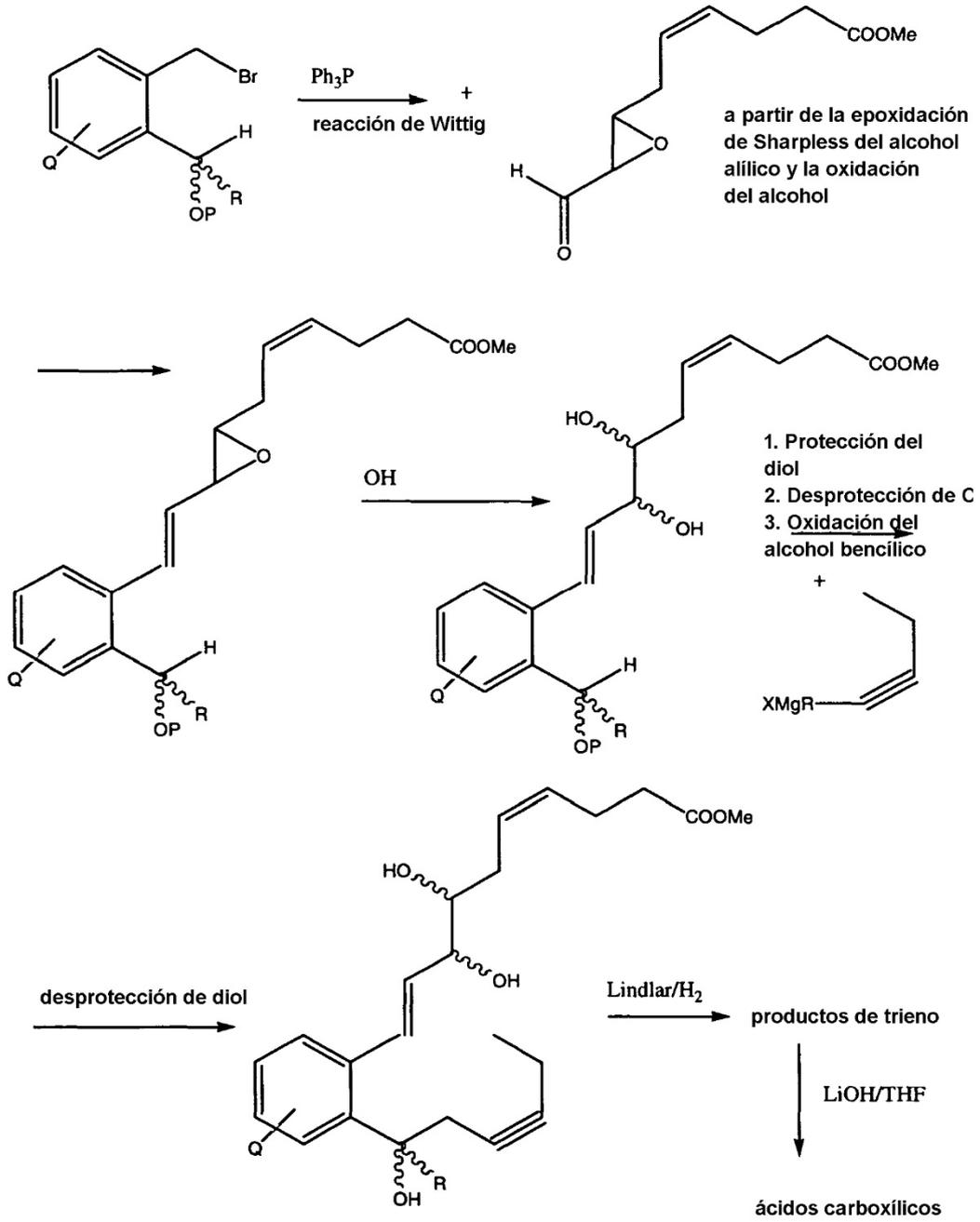
Nuevamente, debe indicarse que la inclusión de un "grupo protector R" en las posiciones C-5 y/o C-18 ayuda a inhibir la oxidación del grupo hidroxilo para formar una cetona. Adicionalmente, se cree que la utilización de un anillo dentro de la estructura ayuda a restringir la conformación en torno a la molécula y afecta a la interacción o interacciones de los ligandos de receptor.

5

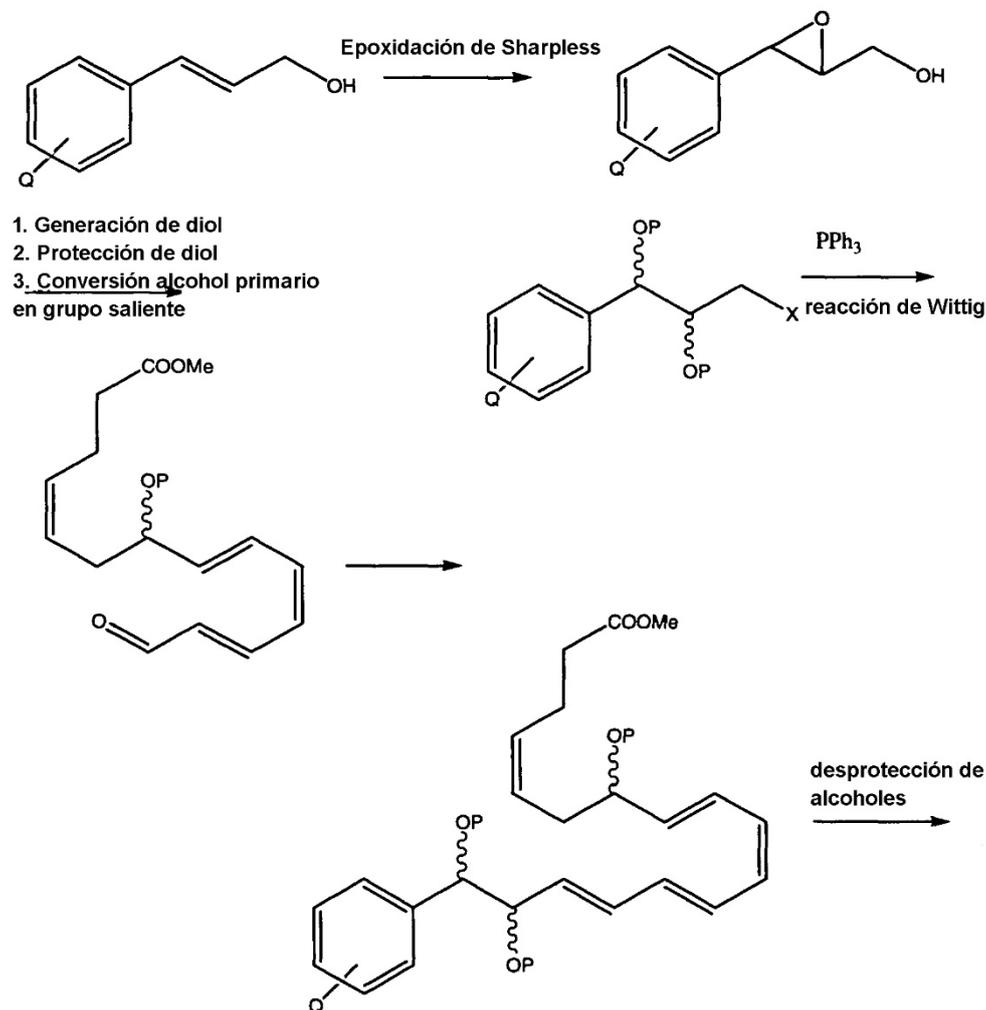
Esquema para análogos que contienen anillo 7,17-resolvina



Esquema para 7,8,17-trihidroxi-HDHA con estructura anular



Esquema para análogos anulares de 7,16,17-tri-HDHA



Resultados

5 Lipodómica de la fase de resolución del exudado

Es bien apreciado que la resolución ordenada en individuos sanos se ve influida por factores tanto sistémicos como locales en el huésped, incluyendo la nutrición, el estado metabólico (es decir, la diabetes se asocia a una cicatrización lenta) y el estado circulatorio, así como algunos de los determinantes clave en la duración de la resolución (39). En el desafío inflamatorio agudo experimental que experimenta una resolución espontánea, es decir, en el modelo de bolsa de aire murino de formación de exudados y resolución, se encontró una disociación temporal entre la formación y las acciones de los mediadores químicos locales (10). Los leucotrienos y prostaglandinas se generan rápidamente y aparecen con la infiltración de leucocitos en el exudado de bolsas de aire de acuerdo con sus acciones conocidas como mediadores proinflamatorios. La biosíntesis de lipoxina coincide con la resolución espontánea y pérdida de PMN del exudado de bolsas de aire murinas, proporcionando evidencia de que los perfiles de mediadores lipídicos funcionalmente diferentes cambian de mediadores proinflamatorios a antiinflamatorios, tales como lipoxinas durante la resolución (10).

Recientemente se ha encontrado que EPA se transforma en exudados murinos tratados con ASA en productos nuevos que presentan propiedades antiinflamatorias, proporcionando un mecanismo potencial para las acciones beneficiosas de omega-3 en muchas enfermedades (2). Debido a que DHA es cardioprotector (22), abundante en el cerebro y la retina y muestra un impacto en muchos procesos fisiológicos (28-32), se llevaron a cabo análisis lipodómicos para determinar si los exudados inflamatorios utilizan DHA en la fase de resolución con el tratamiento de ASA.

La figura 9 ilustra el enfoque desarrollado para aislar, examinar, caracterizar y separar los diversos componentes de los exudados. Hasta ahora, no se había apreciado cómo se generan muchos compuestos diferentes a través

de la ruta bioquímica. Cada compuesto es único y se requirieron separaciones y caracterización únicas y precisas para aislar cada componente. En general, se extrajo una muestra de los exudados y después se separó en componentes mediante extracción en fase sólida seguido de cromatografía y análisis espectral de masas. También puede utilizarse la CG-EM para ayudar a identificar los componentes separados. El análisis de UV con frecuencia también resulta útil. Las propiedades físicas de los compuestos seguidamente se identifican y se introducen en una biblioteca para determinar qué compuestos son únicos y previamente desconocidos. Se lleva a cabo una identificación estructural adicional (RMN, EM/EM, IR, etc.) antes de la ampliación de escala. La producción de los compuestos puede llevarse a cabo mediante biosíntesis biogénica y/o síntesis orgánica tradicional, tal como se proporciona en la presente memoria.

Los exudados inflamatorios obtenidos en la fase de resolución dentro de las bolsas de aire en la piel dorsal tras la inyección de TNF α , DHA y el tratamiento con aspirina contenían varios nuevos compuestos previamente no conocidos que se encontraron mediante análisis de LC-EM-EM (figura 1). Es reseñable que la dieta Lab Diet 5001 utilizado para alimentar dichos ratones contenía 1,86% de DHA y 1,49% de EPA con <0,25% de ácido araquidónico (Purina Mills). El análisis espectral de masas adicional mediante CG-EM (con producto derivatizados) y análisis basados en CL-UV-EM-EM (que no requieren derivatización) indicó que los materiales derivados del exudado inflamatorio contenían nuevos hidroxiácidos producidos a partir de tanto DHA como EPA, es decir, estos productos no se conocían como mediadores lipídicos publicados. Los productos derivados de EPA han sido determinados recientemente (2). Los cromatogramas iónicos seleccionados y EM-EM de los resultados adquiridos en m/z 343 eran consistentes con la producción de 17-HDHA (figura 1, paneles A y B) con cantidades más bajas de 7S- y 4S-HDHA (figura 1, panel A) dentro de los exudados. Estos productos coeluyeron con 17(R/S racémico)-HDHA auténtico y 4S-HDHA (identificado mediante RMN; ver métodos) en 3 sistemas cromatográficos diferentes (no mostrados) y sus propiedades estructurales básicas eran consistentes con las relacionadas con productos derivados de DHA (ver 28, 29 y 30). El tratamiento de ASA también proporcionó nuevos productos di- y trihidroxi que llevaban el esqueleto DHA dentro de los exudados inflamatorios; a esta dosis, ASA inhibió por completo la producción *in vivo* de tromboxano y prostanoideos. Resulta importante que el tratamiento de ASA *in vivo* y COX-2 proporcionasen productos anteriormente no conocidos a partir de DHA que poseen propiedades bioactivas (ver posteriormente).

Los resultados en la figura 1, panel C, muestran que los espectros de EM-EM de un DHA que contiene dihidroxi con fragmentos iónicos consistentes con la estructura mostrada en el gráfico interior, es decir, 7,17-diHDHA; m/z 359 [M-H], m/z 341 [M-H-H₂O], m/z 323 [M-H-2H₂O], m/z 315 [M-H-CO₂] y m/z 297 [M-H-CO₂-H₂O]. Los iones diagnósticos adicionales consistentes con las posiciones que contienen 7- y 17-hidroxi se encontraban presentes en m/z 261, 247 y 217. Un representante de los varios nuevos compuestos derivados de DHA que contienen trihidroxi también presentes en los exudados inflamatorios se muestra en la figura 1, panel D. Los iones presentes eran consistentes con su [M-H]=m/z 375, 357 [M-H-H₂O], 339 [M-H-2H₂O], 331 [M-H-CO₂], 313 [M-H-CO₂-H₂O], 306, 303, 276, 273, 255 [273-H₂O], 210, 195 y 180. Estas propiedades físicas (es decir, EM-EM, UV, tiempo de retención en la CL) se utilizaron en todos los casos para identificar estos compuestos y compuestos relacionados y para evaluar su impacto biológico. Estos compuestos se consideran de interés debido a que la transferencia de materiales extraídos de exudados inflamatorios en bolsas con DHA más ASA a ratones no expuestos (i.v. o mediante administración i.p.) redujo drásticamente la infiltración de PMN inducida por cimosano, en ~60%, indicando que la utilización *in vivo* de DHA y la producción de productos bioactivos dentro de los exudados (ver posteriormente).

45 Función de COX-2 y ASA en la biosíntesis de HDHA que contiene R

Se determinó la quiralidad del grupo alcohol en el carbono-17 (figura 1B) para el producto que correspondía a 17-HDHA derivado de exudado utilizando una columna de HPLC quiral. El alcohol en la posición del carbono-17 demostró que se encontraba predominantemente en la configuración R (>95%, n=4), indicando que éste en efecto era un nuevo producto de origen enzimático formado *in vivo* que no se conocía anteriormente. Por ejemplo, se generó 17S-HDHA mediante 15-lipooxigenación o mediante autooxidación en una proporción racémica ~50:50 de mezclas R/S, ver (40, 41). Por lo tanto, la presencia del grupo alcohol en la configuración R como 17R-HDHA de exudados (figura 1) era indicativa de un origen enzimático. El canal de sustrato de COX-2 es más grande que el de COX-1 (26), lo que sugiere la posibilidad de sustratos más grandes que el ácido araquidónico. Consistentemente con ello, se transformó DHA mediante rhCOX-2 en 13-HDHA (figura 2, panel izquierdo). El EM-EM obtenido era consistente con la adición de oxígeno en la posición 13 (es decir, m/z 193 y m/z 221) y, al tratar COX-2 con aspirina para acetilar la serina dentro del sitio catalítico (1, 26, 42), se convirtió enzimáticamente DHA en 17R-HDHA (figura 2, panel derecho). La EM-EM y los iones diagnósticos en m/z 343 [M-H], 325 [M-H-H₂O], 299 [M-H-CO₂], 281 [M-H-H₂O-CO₂], 245 y 274 consistentes con el grupo alcohol en el carbono 17 y el análisis quiral mediante HPLC quiral con materiales de referencia (ver Métodos) indicó que la conversión de DHA por COX-2 acetilado por aspirina rendía predominantemente (>98%) 17R-HDHA. El producto de COX-2 correspondía con las propiedades físicas del compuesto dominante derivado de DHA que contenía 17-hidroxi identificado en los exudados inflamatorios (figura 1) *in vivo* con el tratamiento de aspirina. Al contrario que la ciclooxigenasa-1, que se había mostrado anteriormente que no convertía la DHA (43), los resultados con COX-2 recombinante en la Tabla 1 y figura 2 indicaban que el tratamiento de aspirina de este enzima generaba predominantemente 17R-HDHA. Otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos utilizados comúnmente, es

decir, indometacina, acetaminofeno o el inhibidor de COX-2 (p.ej., NS-398) no proporcionaron cantidades apreciables de 17R-HDHA. El tratamiento de aspirina proporcionó una relación recíproca entre las oxigenaciones en las posiciones 17 y 13. También en estas incubaciones, la indometacina, el acetaminofeno y NS-398 redujeron cada uno la oxigenación global de DHA [a 13- así como a 17-HDHA (ver la Tabla 1)] pero no compartían la capacidad de ASA de producir 17R-HDHA. Para una comparación directa, se realizó un seguimiento de la conversión de C20:4 por COX-2 acetilado por ASA en 15R-HETE (67% ± 5% de conversión de sustrato; n=3) en paralelo con la conversión de DHA en 17R-HDHA (52 ± 3%; media ± S.E.M.; n=3).

Biosíntesis cerebral y vascular de los nuevos compuestos

En el cerebro, COX-2 está presente en un pool tanto constitutivo como también inducible (28, 44). Los resultados en la figura 3 (A y B) indican que el cerebro tratado con aspirina contenía 17R-HDHA producido a partir de las fuentes endógenas de DHA. Para tratar los posibles tipos celulares que participan en la generación de 17R-HDHA en el cerebro, se expusieron células microgliales humanas a TNF α , que regula positivamente la expresión de COX-2, seguido del tratamiento con ASA y el ionóforo agonista A23187. Las células microgliales humanas generaron 17R-HDHA de una manera dependiente de ASA (figura 3C). La hipoxia también es conocido que induce COX-2 (45) y las células endoteliales hipóxicas expuestas a citoquina IL-1 β , que pueden encontrarse en focos inflamatorios o en sucesos isquémicos (23), tratadas con aspirina eran una fuente de 17R-HDHA (figura 4).

Resulta de interés que, en ausencia de tratamiento con ASA, 17S-HDHA y diHDHA y triHDHA que contiene 17S-hidroxi correspondientes eran productos observados en los exudados murinos y en las células humanas. Su formación difiere de la presente biosíntesis en que, en lugar de COX-2-ASA, la 15-lipooxigenasa inicia la biosíntesis en reacciones de lipooxigenación secuenciales para producir di- y trihidroxi-DHA (es decir, 7S,17S-diHDHA, 10,17S-diHDHA, 4S,17S-diHDHA, 4S,11,17S-triHDHA y 7S,8,17S-triHDHA; ver la Tabla 2) mediante intermediarios epóxido.

Acciones biológicas de los nuevos compuestos

Debido a que las células microgliales participan en las defensas del huésped y en la inflamación en tejidos neurológicos, se incubaron células microgliales humanas con los productos de COX-2 13- y 17R-HDHA (cada uno a 100 nM) para determinar si presentaban un impacto sobre la generación de mediadores inflamatorios (gráfico interior en figura 5A). A concentraciones nM, estos nuevos productos de la ciclooxigenasa-2 inhibían la producción de citoquinas inducida por TNF α con una IC₅₀ aparente ~ 50 pM, al igual que los compuestos di- y trihidroxi-HDHA que contenían 17 (figura 5A). A continuación, se sometió a ensayo HDHA para su capacidad de regular la migración transendotelial de las PMN humanas. En el intervalo de nM, ninguno de los productos monohidroxi-DHA derivados de COX-2 presentó un impacto directo sobre la trans migración de PMN a través de las monocapas de células endoteliales (figura 5B). Este resultado contrasta con los resultados obtenidos con productos eicosanoides derivados tanto de EPA como de ácido araquidónico que regulan negativamente de manera directa la trans migración de PMN *in vitro* (2, 3). Con fines de comparación directa, los resultados con un producto de la ruta de EPA inducida por ASA, 18R,5,12-triHEPE (P<0,01 según ANOVA) (ver la ref. 2) se compararon con los obtenidos con 15-epi-16-para(fluoro)-fenoxi-lipoxina A₄ (P<0,01, según ANOVA), un análogo estable de 15R-lipoxina A₄ inducida por aspirina producida con el tratamiento de aspirina a partir de ácido araquidónico (10, 37).

Biosíntesis de nuevos docosanoides por PMN humanas: productos de interacción célula-célula identificados en exudados

A continuación, debido a que las PMN interactúan con células vasculares durante la inflamación (7), se evaluó la contribución de los leucocitos en la producción de los nuevos compuestos di- y trihidroxi presentes en los exudados inflamatorios (figura 1 A-D). Con este fin, se expusieron las PMN humanas a cimosano y 17R-HDHA producido por COX-2 tratado con ASA o células endoteliales. Las PMN en fagocitosis transforman 17R-HDHA en tanto di- como tri-hidroxi-DHA (figura 6). Las conversiones principales fueron a productos de dióxigenación, incluyendo 7S,17R-diHDHA y 10,17R-diHDHA con cantidades más bajas de 4S,17R-diHDHA como productos que contienen dihidroxi principales presentes al monitorizar en m/z 359 (ver la figura 6). Además, se encontraban presentes nuevos productos que contenían 17R-trihidroxi monitorizados en m/z 375, incluyendo 4S,11,17R-triHDHA, así como un juego trihidroxitetraenos que contienen 7,8,17R-triHDHA (ver la Tabla 2). Estos compuestos formados por las PMN humanas se corresponden con los producidos dentro de los exudados generados *in vivo* tanto en su comportamiento cromatográfico como iones prominentes presentes en sus espectros de masas respectivos. Los perfiles de CL-EM y matriz de diodos de UV en línea mostrados en la figura 7 de exudados de ratones tratados con ASA indican la producción *in vivo* de ambos juegos de productos de la serie 17R que contienen di- y trihidroxi que portan cromóforos trieno y tetraeno (ver la Tabla 2). Entre las fuentes de estos productos trihidroxi-DHA tal como se ilustra esquemáticamente se incluyen la hidroxilación de omega-1 en el carbono 22 de 7S,17R-diHDHA o 4S,17R-diHDHA mediante una reacción similar a p450 (ver la ref. 6 y la figura 8) que probablemente representa los productos de la ruta de inactivación y también leucotrienos, tal como la formación de 20-OH-LTB₄, un producto de omega oxidación de LTB₄ (2, 3, 6).

La transformación de 17R-HDHA por PMN humanas activadas implicaba una 5-lipooxigenasa y una reacción de LTA₄ sintasa que proporcionó productos tri-HDHA mediante la formación de los intermediarios respectivos que contenían 4S-hidro(peroxi)-17R-hidroxi- y 7S-hidro(peroxi)-17R-hidroxi. Se convirtió cada uno en intermediarios que contenían epoxi (es decir, 4(5) epóxidos o 7(8) intermediarios epóxido) que se abren mediante hidrólisis dando lugar a 4S,11,17R-triHDHA o, en una ruta paralela, a dioles, tales como el juego de trihidroxitetraenos 7S,8,17R-triHDHA (ver las figuras 4, 7 y 8). El mecanismo utilizado por las PMN para convertir el precursor 17R-HDHA aparentemente era similar al establecido e identificado para la capacidad generadora de epóxidos de la 5-lipooxigenasa de las PMN humanas, que lleva a cabo tanto una etapa de lipooxigenación como de epoxidación (2, 4) tal como se demuestra con la 5-lipooxigenasa de patata (46). La conversión de 17R-HDHA en las PMN humanas mostraba características similares a las establecidas para la conversión del ácido araquidónico en leucotrieno B₄ o lipoxinas, así como la recientemente encontrada serie 18R de productos EPA (4, 9). Estos eran secuencias biosintéticas modeladas *in vivo* de sucesos que utilizan enzimas tanto vegetales (5-LO de patata o 15-LO de soja) como enzimas humanas añadidos en incubaciones "en un solo pote" en tándem que producen estos compuestos y se corresponden con los de las PMN humanas y exudados murinos (ver métodos y Tabla 2). Estos resultados con 17R-HDHA resultan de interés debido a que el isómero S, 17S-HDHA, un producto de la 15-lipooxigenasa, puede inhibir la producción por la 5-lipooxigenasa de neutrófilos humanos de leucotrienos a partir de sustrato endógeno (47). En esta línea, se encontró que 17R-HDHA era convertido por 5-LO de patata aislado en productos tanto 4S-hidro-(peroxi)-17R-hidroxi- como 7S-hidro-(peroxi)-17R-hidroxi- que se redujeron a 4S,17R-diHDHA y 7S,17R-diHDHA, respectivamente. Estos, así como trihidroxi-DHA (ver la Tabla 2), son nuevos productos e indican que 17R-HDHA es un sustrato para la 5-lipooxigenasa y su actividad de epoxidasa. La síntesis biogénica y propiedades físicas de los compuestos producidos (es decir, los iones principales de los derivados metil éster de trimetilsililo) mediante análisis de CG-EM eran consistentes con los fragmentos obtenidos sin derivatización utilizando CL-EM-EM (ver la Tabla 2) y confirman las estructuras propuestas, al igual que la biosíntesis tanto en el exudado murino como en las PMN humanas a partir de DHA (ver 29 para los productos monohidroxi). Resulta de interés que, al añadir a las PMN humanas, 17R-HDHA bloqueó la formación de leucotrienos tanto *in vitro* como en PMN humanas y en exudados murinos (n=4, no mostrado).

Inhibición de la producción de PMN en la peritonitis y bolsas de aire: propiedades antiinflamatorias (i.v. y tópicas) de las resolvinas

Aunque 17R-HDHA no inhibió directamente la trans migración de neutrófilos *in vitro* (figura 5B), 17R-HDHA reguló el número de células PMN *in vivo* en la peritonitis, así como en la bolsa de aire dérmica (figura 5C). Además, 17R-HDHA era un potente inhibidor de la peritonitis inducida por cimosano, al igual que tanto los compuestos que contienen dihidroxi y que contienen trihidroxi (es decir, 7S,17R-diHDHA y 4S,11,17R-triHDHA). Además de su capacidad de inhibir la producción de PMN al inyectar i.v. En la peritonitis inducida por cimosano, los productos que contenían dihidroxi y trihidroxi derivados de 17R-hidroxi-HDHA demostraron ser potentes reguladores de la producción de leucocitos en la bolsa de aire al administrarlo i.v., así como tópicamente con administración local (figura 5C). De esta manera, los presentes resultados indican que los leucocitos humanos y murinos convierten 17R-HDHA en una nueva serie de diHDHA y triHDHA que contienen 17R-hidroxi; es decir, un circuito inducido por ASA para utilizar DHA para producir una serie 17R de docosanoides (figura 8).

Los presentes resultados indican que las células que expresan ciclooxigenasa-2 en los exudados y en cerebros tratados con aspirina transforman enzimáticamente DHA omega-3 en compuestos anteriormente no conocidos con propiedades bioactivas en la resolución de la inflamación, es decir, una nueva serie 17R de ácidos di-hidroxi- y tri-hidroxi-docosahexanoicos. La COX-2 acetilada por ASA presente en estos tejidos genera predominantemente 17R-HDHA que se convierte adicionalmente de manera enzimática en una potente serie 17R bioactiva mediante lipooxigenación y epoxidación en leucocitos en nuevos docosanoides tanto que contienen dihidroxi como que contienen trihidroxi (ver la figura 8). DHA es el más insaturado de los ácidos grasos de la familia de omega-3 polieno en los tejidos de mamífero y de pescado. En el ser humano, el DHA es abundante en el cerebro, retina y testículos (28, 48). Los niveles de DHA en el cerebro humano adulto se incrementan con la edad, lo que resulta necesario para un desarrollo neurológico óptimo (49) y DHA es rápidamente esterificado en los fotorreceptores del epitelio retiniano, así como en los fosfolípidos de los neutrófilos humanos quiescentes (28, 50). A valores micromolares elevados, se cree que DHA posee funciones tanto fisiológicas como de acción directa sobre los canales neurales de K⁺ activados por voltaje (51), se une a RXR en los tejidos neurales (52) y se cree que es el compuesto activo de los suplementos de aceite de pescado que es cardioprotector (21). Además, la adición de DHA puede corregir y revertir la patología asociada a la fibrosis quística en ratones *cfr-l-* (53). Sin embargo, no resulta claro a partir de los resultados de estos estudios (21, 51, 52) o de muchos de los ensayos clínicos publicados si DHA es precursor de potentes estructuras bioactivas que son responsables para las muchas propiedades informadas que se atribuyen a DHA mismo en la regulación de los sistemas biológicos de interés.

Las tres lipooxigenasas principales (es decir, 5-LO, 12-LO y 15-LO) que actúan sobre el araquidonato pueden convertir, cada una, DHA en productos que contienen S aunque su función en el sistema inmunológico o en otros sitios no está clara. En el cerebro, la 12-lipooxigenasa del cuerpo pineal convierte DHA en 14S-HDHA y la 15-lipooxigenasa, en 17S-HDHA (40). DHA también puede ser convertido por los neutrófilos humanos en 7S-HDHA que no estimula la quimiotaxis (31) y la retina convierte DHA en productos tanto mono- como di-hidroxi mediante

una o más lipooxigenasas (28). Aunque no es un sustrato para COX-1 (43), también pueden producirse compuestos similares a isoprostano oxidado a partir de DHA que aparentemente reflejan sucesos oxidativos catalizados por radicales libres (54). Por lo tanto, la nueva serie 17*R*-hidroxi de docosanoides generados por tejidos neurales, leucocitos y exudados inflamatorios encontrada en los presentes experimentos y su función o funciones resultan de interés en la resolución de la inflamación, un proceso que ahora se considera que está asociado a muchas enfermedades humanas.

Aunque los aceites de pescado omega-3 que comprenden tanto EPA como DHA podrían presentar un impacto beneficioso en el tratamiento de muchas enfermedades crónicas (tales como las enfermedades cardiovasculares, la aterosclerosis y el asma, así como propiedades antitumorales y antiproliferativas (15, 55)), el argumento molecular para su utilización sigue siendo de interés. La mayoría de los primeros estudios se centraba en la incorporación de PUFA omega-3 (es decir, EPA y DHA), es decir, su esterificación en fosfolípidos y otras reservas lipídicas de muchos tejidos humanos que en algunas células reduce la disponibilidad del ácido araquidónico endógeno para el procesamiento a prostaglandinas proinflamatorias (55). Los resultados ahora disponibles indican que, además de las funciones proinflamatorias, la 15-lipooxigenasa específica, 5-LO y/o los productos de interacción LO-LO formados durante las interacciones célula-célula, tales como las lipoxinas, sirven de mediadores antiinflamatorios endógenos que estimulan la resolución (9, 10, 12). Al igual que otros eicosanoides derivados de lipooxigenasa, las lipoxinas son potentes en su acción local a niveles subnanomolares, con requisitos estereoquímicos precisos para inducir su acción (4, 9). Por lo tanto, la producción de productos de las series 18*R* y 15*R* de EPA que inhiben la trans migración de PMN y la inflamación dentro del rango nanomolar bajo enfatiza las redundancias funcionales dentro de los mediadores químicos producidos a partir de la familia omega-3 de ácidos grasos polieno, es decir, los compuestos recién identificados a partir de compuestos derivados de COX-2 EPA (2) o DHA, tal como indican los presentes resultados (figuras 6 a 8). Es importante indicar que, con estos mediadores de bajo peso molecular, cambios sutiles en la quiralidad del alcohol, es decir, S a R, pueden modificar un compuesto de activo a inactivo o viceversa (3, 4, 9). A este respecto, los compuestos que contienen 15*R*-hidroxi generados a partir de ácido araquidónico o EPA y la serie 18*R* a partir de EPA, así como la serie 17*R*-hidroxi a partir de DHA, muestran cada uno redundancias funcionales similares en la resolución de la inflamación. Por lo tanto, la identificación de la serie 17*R* de productos tanto de mono-oxigenación como di-oxigenación en exudados inflamatorios y una función para COX-2 en la generación de la configuración 17*R*-hidroxilo en HDHA descrita en la presente memoria por primera vez abre nuevos caminos para considerar las redundancias funcionales globales de los mediadores que atenúan y/o contrarrestan las muchas señales proinflamatorias, fomentando la resolución.

La ciclooxigenasa-2 resulta inducida en la mayoría de tipos celulares inflamatorios, aunque también puede ser constitutiva en el tejido neurológico y vascular (44, 56). La importancia del túnel de sustrato agrandado en la ciclooxigenasa-2 resulta de interés al considerar posibles funciones fisiológicas de este enzima en estos sitios *in vivo*. Ahora resulta evidente a partir de numerosos estudios que la aspirina presenta efectos beneficiosos aparte de otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos (57, 58). A este respecto, la aspirina presenta una capacidad única de acetilar ambas isoformas de ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2). También cabe destacar que DHA es cardioprotector en el corazón isquémico (22) y que COX-2 participa en el precondicionamiento (19), así como en la resolución (12). DHA es un precursor y es convertido en 17*R*-HDHA mediante COX-2 acetilado por aspirina en los sitios de inflamación *in vivo* (figura 1), el cerebro murino (figura 3) y por COX-2 recombinante acetilado *in vitro* (figura 2). Tanto 13- como 17*R*-HDHA inhiben la generación de citoquinas por las células microgliales al nivel de la transcripción en el rango picomolar (figura 5A). Las células microgliales humanas generan esta serie 17*R*-HDHA de productos al recibir aspirina y TNF α , los cuales regulan positivamente la expresión de COX-2 (figura 3C). Además, los exudados inflamatorios murinos producen una familia de nuevos productos dihidroxi y trihidroxi que también son producidos por las PMN humanas mediante procesamiento transcelular de 17*R*-HDHA. Las rutas propuestas para el procesamiento transcelular de COX-2 acetilado derivan 17*R*-HDHA que subrayan la generación de intermediarios dioxigenados y la epoxidación, formando nuevo diHDHA durante los sucesos asociados a la inflamación vascular se ilustran en la figura 8.

Debe indicarse que estas estructuras y estructuras relacionadas pueden generarse mediante interacciones célula-célula o tipos celulares individuales tal como se ilustra en la figura 8, aunque en teoría también pueden ser producidos mediante varias rutas secuenciales de oxigenación por un solo enzima también (ver la leyenda de la figura 8). Al preparar estos productos mediante síntesis total biogénica y añadirse de vuelta mediante administración tópica en la bolsa de aire, inhibieron la infiltración de leucocitos inducida por TNF α . Además, con la administración *i.v.*, estos compuestos inhibieron la producción de leucocitos tanto en bolsas de aire murinas como en peritonitis inducida por cimosano (figura 5). Juntos estos resultados indican que los productos derivados de COX-2 acetilado con aspirina pueden regular negativamente la generación de citoquinas y el transporte de leucocitos (es decir, neutrófilos) a los sitios de inflamación. El producto de la serie 5,12,18*R* derivada de EPA demostró ser tan eficaz como un potente análogo estable de 15-epi-lipoxina A₄ en la prevención de la diapédesis de leucocitos y la formación de exudados (ver la figura 5C). Debido a que 17*R*-HDHA no presentó un impacto directo sobre la trans migración de las PMN humanas bajo estas condiciones, sino que redujo el número de PMN en exudados *in vivo* así como regulaba la expresión génica en células microgliales humanas, es altamente probable que un mecanismo multinivel de acción explique las propiedades *in vivo* de esta ruta inducida por ASA. Además, existen aparentemente redundancias funcionales entre las rutas en que la serie de compuestos 18*R*

derivados de EPA y la serie 17R derivados de DHA que contienen hidroxilo comparten su capacidad de regular el número de PMN en exudados (figura 5).

La aparición del resultado de que las lipoxinas derivadas de ácido araquidónico inhiben el tráfico de PMN y actúan como mediadores antiinflamatorios endógenos, activando simultáneamente activadores de manera no flogística (11, 59), así como acelerando la incorporación de PMN apoptóticas por macrófagos en los sitios de inflamación (28), indica que no todos los productos de ruta de lipooxigenasa derivados de precursor ácido araquidónico son "pro"-inflamatorios. Dada su semivida y biodisponibilidad más prolongadas, los análogos más estables metabólicamente de estos mediadores lipídicos de acción local derivados de araquidonato *in vivo* y preparados mediante síntesis orgánica total proporcionan pruebas adicionales de su función en el fomento de la resolución (37). Además, estos resultados sugieren que las nuevas propiedades resolutorias pertenecen a una clase más grande de compuestos endógenos con mecanismos dirigidos a potenciar la resolución. Además, la asociación entre las actividades antiinflamación y antimicrobiana endógena potenciada (13) por las lipoxinas y las lipoxinas inducidas por aspirina establece un precedente único de la importancia de la comunicación intercelular y de la biosíntesis transcelular en la defensa del huésped y en el lavado y resolución de las secuelas inflamatorias.

Los presentes resultados en los que se da a conocer la serie 17R de productos de DHA oxigenados y con las series 15R y 18R del ácido eicosapentaenoico como prototipos (2), juntos sugieren que la generación de mediadores lipídicos de acción local con actividades beneficiosas relevantes en enfermedades humanas podría no estar restringida al ácido araquidónico solo como precursor importante. Además, indican que la biosíntesis transcelular revela rutas previamente no identificadas que son inducidas por el tratamiento con aspirina con DHA. COX-2 acetilado actúa en un mecanismo de "R-oxigenación" para iniciar la conversión de DHA en una serie 17R de docosanoides dihidroxilo y trihidroxilo que muestra acciones reguladoras negativas *in vivo* en la inflamación, al igual que los productos de la serie 18R derivada del omega-3 EPA. Por lo tanto, la consecuencia es que, una vez se ha iniciado la inflamación, tras el tratamiento con aspirina con suplementación de omega-3, estas rutas pueden ser operativas en tejidos vasculares para generar productos que aparentemente presentan propiedades como mediadores lipídicos inducidos por aspirina similares a los de las 15-epi-lipoxinas o los productos de la serie 18R y 15R de EPA. Estos compuestos se generan mediante lipooxigenación seguido de epoxidación y etapas posteriores (figura 8 y ver la ref. 2). También resultan de interés los resultados de que, en ausencia de aspirina, COX-2 convierte DHA en 13-HDHA, una ruta previamente no conocida que también podría resultar relevante en tejidos que expresan constitutivamente COX-2, que también se convierte en productos DHA dihidroxilo (4,13-diHDHA, 7,13-diHDHA y 13,20-diHDHA) y durante la resolución, inducción y conversión por la 15-lipooxigenasa (10) en 10,17S-diHDHA y 7S,17S-diHDHA (ver las figuras 10, 11, 12 y 14).

Debido a las propiedades de los productos derivados de omega-3 de COX-2 acetilado mediante biosíntesis transcelular aparentemente atenúan sucesos en la inflamación, aparentemente de una manera funcionalmente redundante (es decir, la serie 17R-HDHA, las series 18R-HEPA y 15R-HEPA), se crea el término "resolvinas" para esta familia de nuevos compuestos y acciones biológicas. Las resolvinas, por definición, se generan endógenamente dentro de la etapa de resolución inflamatoria y regulan negativamente el número de células leucocíticas en el exudado para preparar una resolución ordenada y a tiempo. Los presentes resultados indican que la serie 17R de rutas de DHA dihidroxilo y trihidroxilo es potente en modelos relevantes de inflamación. Es probable que estos compuestos también presentarán acciones en otros tejidos, en vista de los muchos informes de las acciones clínicas de EPA y DHA, en los que las concentraciones elevadas de estos PUFA se utilizan y se requieren para inducir respuestas *in vitro*. Los presentes resultados indican que las interacciones célula-célula en sitios de resolución de la inflamación utilizan ácidos grasos omega-3 para generar nuevos productos derivados de omega-3, incluyendo la serie 17R-HDHA y la serie 18R-HEPE de productos bioactivos oxigenados denominados resolvinas (figuras 8 y 13). Dadas sus potentes acciones, la producción de resolvinas puede proporcionar, en parte, una argumentación que subyace a las acciones beneficiosas de los ácidos grasos omega-3 (15-22) en las enfermedades inmunológicas y vasculares crónicas, así como servir como nuevos modelos biológicos para el desarrollo terapéutico.

Tabla 1: impacto de los AINE sobre la conversión por COX-2 de DHA

AINE	% de inhibición de 13-HDHA	% de incremento de 17-HDHA
ASA	85,7 ± 5,6%	97,8 ± 2,0%
Indometacina	89,8 ± 0,5%	0,0%
Acetaminofeno	87,7 ± 4,3%	0,0%
NS398 (inhibidor de COX-2)	97,3 ± 1,0%	0,0%

Los resultados son de medias ± SEM, n=3. Se extrajeron los productos, se identificaron y se cuantificaron utilizando estándares internos de deuterio y CL-EM-EM (ver Métodos). Los AINE se incubaron durante 30 min con COX-2 recombinante humano (ver Métodos), ASA [2 mM], indometacina [200 µM], acetaminofeno (500 µM) y NS398 (100 µM).

Referencias

- 5 1. Clària, J., y C.N. Serhan. 1995. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92:9475-9479.
2. Serhan, C.N., C.B. Clish, J. Brannon, S.P. Colgan, N. Chiang, y K. Gronert. 2000. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J. Exp. Med.* 192:1197-1204.
- 10 3. Samuelsson, B. 1982. From studies of biochemical mechanisms to novel biological mediators: prostaglandin endoperoxides, thromboxanes and leukotrienes. In *Les Prix Nobel: Nobel Prizes, Presentations, Biographies and Lectures*. Almqvist & Wiksell, Stockholm. 153-174.
- 15 4. Samuelsson, B., S.E. Dahlén, J.Å. Lindgren, C.A. Rouzer, y C.N. Serhan. 1987. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* 237:1171-1176.
- 5 5. Gunstone, F.D., J.L. Harwood, y F.B. Padley. 1994. *The Lipid Handbook*. 2nd ed. Chapman & Hall, London. 551 pp.
- 20 6. Zeldin, D.C. 2001. Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. *J Biol. Chem.* 276:36059-36062.
7. Marcus, A.J. 1999. Platelets: their role in hemostasis, thrombosis, and inflammation. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. J.I. Gallin y R. Snyderman, editors. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 77-95.
- 25 8. Palmantier, R., y P. Borgeat. 1991. Transcellular metabolism of arachidonic acid in platelets and polymorphonuclear leukocytes activated by physiological agonists: enhancement of leukotriene B4 synthesis. In *Cell-Cell Interactions in the Release of Inflammatory Mediators*, vol. 314. P.Y.-K. Wong y C.N. Serhan, editors. Plenum, New York. 73-89.
- 30 9. Serhan, C.N., y E. Oliw. 2001. Unorthodox routes to prostanoid formation: new twists in cyclooxygenase-initiated pathways. *J. Clin. Invest.* 107:1481-1489.
- 35 10. Levy, B.D., C.B. Clish, B. Schmidt, K. Gronert, y C.N. Serhan. 2001. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nature Immunol.* 2:612-619.
11. McMahon, B., S. Mitchell, H.R. Brady, y C. Godson. 2001. Lipoxins: revelations on resolution. *Trends in Pharmacological Sciences* 22:391-395.
- 40 12. Bandeira-Melo, C., M.F. Serra, B.L. Diaz, R.S.B. Cordeiro, P.M.R. Silva, H.L. Lenzi, Y.S. Bakhle, C.N. Serhan, y M.A. Martins. 2000. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 and lipoxin A4 accelerate resolution of allergic edema in *Angiostrongylus costaricensis*-infected rats: relationship with concurrent eosinophilia. *J. Immunol.* 164:1029-1036.
- 45 13. Canny, G., O. Levy, G.T. Furuta, S. Narravula-Alipati, R.B. Sisson, C.N. Serhan, y S.P. Colgan. 2002. Lipid mediator-induced expression of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:3902-3907.
- 50 14. Rowley, A.F., D.J. Hill, C.E. Ray, y R. Munro. 1997. Haemostasis in fish - an evolutionary perspective. *Thromb. Haemost.* 77:227-233.
15. De Caterina, R., S. Endres, S.D. Kristensen, y E.B. Schmidt, editors. 1993. *n-3 Fatty Acids and Vascular Disease*. Springer-Verlag, London.
- 55 16. Hibbeln, J.R. 1998. Fish consumption and major depression. *Lancet* 351:1213.
17. Olfson, M., S.C. Marcus, B. Druss, L. Elinson, T. Tanielian, y H.A. Pincus. 2002. National trends in the outpatient treatment of depression. *JAMA* 287:203-209.
- 60 18. Albert, C.M., H. Campos, M.J. Stampfer, P.M. Ridker, J.E. Manson, W.C. Willett, y J. Ma. 2002. Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death. *N. Engl. J. Med.* 346:1113-1118.
- 65 19. Shinmura, K., X.-L. Tang, Y. Wang, Y.-T. Xuan, S.-Q. Liu, H. Takano, A. Bhatnagar, y R. Bolli. 2000. Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:10197-10202.

20. GISSI-Prevenzione Investigators. 1999. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet* 354(9177):447-455.
- 5 21. Marchioli, R., F. Barzi, E. Bomba, C. Chieffo, D. Di Gregorio, R. Di Mascio, M.G. Franzosi, E. Geraci, G. Levantesi, A.P. Maggioni, L. Mantini, R.M. Marfisi, G. Mastrogioseppe, N. Mininni, G.L. Nicolosi, M. Santini, C. Schweiger, L. Tavazzi, G. Tognoni, C. Tucci, y F. Valagussa. 2002. Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation* 105:1897-1903.
- 10 22. McLennan, P., P. Howe, M. Abeywardena, R. Muggli, D. Raederstorff, M. Mano, T. Rayner, y R. Head. 1996. The cardiovascular protective role of docosahexaenoic acid. *Eur. J. Pharmacol.* 300:83-89.
- 15 23. Libby, P. 2002. Atherosclerosis: the new view. *Sci. Am.* 286:46-55.
- 20 24. Drazen, J.M., E.K. Silverman, y T.H. Lee. 2000. Heterogeneity of therapeutic responses in asthma. *Br. Med. Bull.* 56:1054-1070.
- 25 25. Vane, J.R., y R.M. Botting, editors. 2001. Therapeutic Roles of Selective COX-2 Inhibitors. William Harvey Press, London.
- 30 26. Rowlinson, S.W., B.C. Crews, D.C. Goodwin, C. Schneider, J.K. Gierse, y L.J. Marnett. 2000. Spatial requirements for 15-(R)-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid synthesis within the cyclooxygenase active site of murine COX-2. *J. Biol. Chem.* 275:6586-6591.
- 35 27. Gilroy, D.W., P.R. Colville-Nash, D. Willis, J. Chivers, M.J. Paul-Clark, y D.A. Willoughby. 1999. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nature Med.* 5:698-701.
- 40 28. Bazan, N.G., E.B. Rodriguez de Turco, y W.C. Gordon. 1993. Pathways for the uptake and conservation of docosahexaenoic acid in photoreceptors and synapses: biochemical and autoradiographic studies. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71:690-698.
- 45 29. Whelan, J., P. Reddanna, V. Nikolaev, G.R. Hildenbrandt, y T.S. Reddy. 1990. The unique characteristics of the purified 5-lipoxygenase from potato tubers and the proposed mechanism of formation of leukotrienes and lipoxins. In *Biological Oxidation Systems*, vol. 2. Academic Press. 765-778.
- 50 30. Fischer, S., C.v. Schacky, W. Siess, T. Strasser, y P.C. Weber. 1984. Uptake, release and metabolism of docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 ω 3) in human platelets and neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120:907-918.
- 55 31. Lee, T.H., J.-M. Mencia-Huerta, C. Shih, E.J. Corey, R.A. Lewis, y K.F. Austen. 1984. Effects of exogenous arachidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids on the generation of 5-lipoxygenase pathway products by ionophore-activated human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 74:1922-1933.
- 60 32. Yergey, J.A., H.-Y. Kim, y N. Salem, Jr. 1986. High-performance liquid chromatography/thermospray mass spectrometry of eicosanoids and novel oxygenated metabolites of docosahexaenoic acid. *Anal. Chem.* 58:1344-1348.
- 65 33. Clish, C.B., B.D. Levy, N. Chiang, H.-H. Tai, y C.N. Serhan. 2000. Oxidoreductases in lipoxin A4 metabolic inactivation. *J. Biol. Chem.* 275:25372-25380.
34. Colgan, S.P., C.N. Serhan, C.A. Parkos, C. Delp-Archer, y J.L. Madara. 1993. Lipoxin A4 modulates transmigration of human neutrophils across intestinal epithelial monolayers. *Journal of Clinical Investigation* 92:75-82.
35. George, H.J., D.E. Van Dyk, R.A. Straney, J.M. Trzaskos, y R.A. Copeland. 1996. Expression purification and characterization of recombinant human inducible prostaglandin G/H synthase from baculovirus-infected insect cells. *Protein Expres. Purif.* 7:19-26.
36. Gronert, K., C.B. Clish, M. Romano, y C.N. Serhan. 1999. Transcellular regulation of eicosanoid biosynthesis. In *Eicosanoid Protocols*. E.A. Lianos, editor. Humana Press, Totowa, NJ. 119-144.
37. Serhan, C.N., J.F. Maddox, N.A. Petasis, I. Akritopoulou-Zanze, A. Papayianni, H.R. Brady, S.P. Colgan, y J.L. Madara. 1995. Design of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. *Biochemistry* 34:14609-14615.

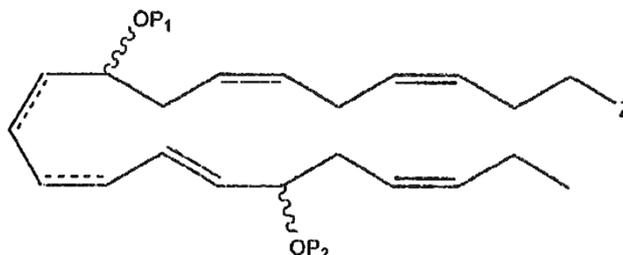
38. Qiu, F.-H., P.R. Devchand, K. Wada, y C.N. Serhan. 2001. Aspirin-triggered lipoxin A4 and lipoxin A4 up-regulate transcriptional corepressor NAB1 in human neutrophils. *FASEB J.*:10.1096/fj.1001-0576fje (available at www.fasebj.org).
- 5 39. Cotran, R.S., V. Kumar, y T. Collins. 1999. Cellular pathology I: cell injury and cell death. In *Robbins Pathologic Basis of Disease*. R.S. Cotran, V. Kumar y T. Collins, editors. W.B. Saunders, Philadelphia. 1-29.
40. Sawazaki, S., N. Salem, Jr., y H.-Y. Kim. 1994. Lipoxygenation of docosahexaenoic acid by the rat pineal body. *J. Neurochem.* 62:2437-2447.
- 10 41. Miller, C.C., W. Tang, V.A. Ziboh, y M.P. Fletcher. 1991. Dietary supplementation with ethyl ester concentrates of fish oil (n-3) and borage oil (n-6) polyunsaturated fatty acids induces epidermal generation of local putative anti-inflammatory metabolites. *J. Invest. Dermatol.* 96:98-103.
- 15 42. Xiao, G., A.-L. Tsai, G. Palmer, W.C. Boyar, P.J. Marshall, y R.J. Kulmacz. 1997. Analysis of hydroperoxide-induced tyrosyl radicals and lipoxygenase activity in aspirin-treated human prostaglandin H synthase-2. *Biochemistry* 36:1836-1845.
43. Corey, E.J., C. Shih, y J.R. Cashman. 1983. Docosahexaenoic acid is a strong inhibitor of prostaglandin but not leukotriene biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3581-3584.
- 20 44. O'Banion, M.K., V.D. Winn, y D.A. Young. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4888-4892.
45. Schmedtje, J.F., Jr., Y.-S. Ji, W.-L. Liu, R.N. DuBois, y M.S. Runge. 1997. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF- κ B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 272:601-608.
- 25 46. Shimizu, T., O. Rådmark, y B. Samuelsson. 1984. Enzyme with dual lipoxygenase activities catalyzes leukotriene A4 synthesis from arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:689-693.
- 30 47. Ziboh, V.A., C.C. Miller, y Y. Cho. 2000. Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(Suppl.):361S-366S.
48. Simopoulos, A.P., A. Leaf, y N. Salem, Jr. 1999. Workshop on the essentiality of an recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *J. Am. Coll. Nutr.* 18:487-489.
- 35 49. Salem, N., Jr., B. Wegher, P. Mena, y R. Uauy. 1996. Arachidonic and docosahexaenoic acids are biosynthesized from their 18-carbon precursors in human infants. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93:49-54.
- 40 50. Tou, J.-s. 1986. Acylation of docosahexaenoic acid into phospholipids by intact human neutrophils. *Lipids* 21:324-327.
51. Poling, J.S., S. Vicini, M.A. Rogawski, y N. Salem, Jr. 1996. Docosahexaenoic acid block of neuronal voltage-gated K⁺ channels: subunit selective antagonism by zinc. *Neuropharmacology* 35:969-982.
- 45 52. Mata de Urquiza, A., S. Liu, M. Sjöberg, R.H. Zetterström, W. Griffiths, J. Sjövall, y T. Perlmann. 2000. Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 290:2140-2144.
53. Freedman, S.D., D. Weinstein, P.G. Blanco, P. Martinez-Clark, S. Urman, M. Zaman, J.D. Morrow, y J.G. Alvarez. 2002. Characterization of LPS-induced lung inflammation in *cftr*^{-/-} mice and the effect of docosahexaenoic acid. *J. Appl. Physiol.* 92:2169-2176.
- 50 54. Reich, E.E., W.E. Zackert, C.J. Brame, Y. Chen, L.J. Roberts, II, D.L. Hachey, T.J. Montine, y J.D. Morrow. 2000. Formation of novel D-ring and E-ring isoprostane-like compounds (D4/E4-neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *Biochemistry* 39:2376-2383.
- 55 55. Lands, W.E.M., editor. 1987. *Proceedings of the AOCS Short Course on Polyunsaturated Fatty Acids and Eicosanoids*. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL.
- 60 56. Garcia-Cardena, G., J. Comander, K.R. Anderson, B.R. Blackman, y M.A. Gimbrone, Jr. 2001. Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:4478-4485.
- 65 57. Gum, P.A., M. Thamarasan, J. Watanabe, E.H. Blackstone, y M.S. Lauer. 2001. Aspirin use and all-cause mortality among patients being evaluated for known or suspected coronary artery disease: a propensity analysis. *J.A.M.A.* 286:1187-1194.

58. Rosenberg, I.H. 2002. Fish -- food to calm the heart. *N. Engl. J. Med.* 346:1102-1103.

59. Maddox, J.F., y C.N. Serhan. 1996. Lipoxin A4 and B4 are potent stimuli for human monocyte migration and adhesion: selective inactivation by dehydrogenation and reduction. *J. Exp. Med.* 183:137-146.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que presenta una estructura de la fórmula:



5

en el que

10

P₁ y P₂ cada uno individualmente es un átomo de hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo seleccionado de entre un grupo acilo, un grupo alquilo, un grupo tetrahidropiraniolo, un grupo trialquilsililo, un grupo glicol y un grupo alilo;

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;

15

cada R^a se selecciona independientemente de entre hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₈), ciclohexilo, cicloalquilalquilo (C₄-C₁₁), arilo (C₅-C₁₀), fenilo, arilalquilo (C₆-C₁₆), bencilo, heteroalquilo de 2 a 6 miembros, cicloheteroalquilo de 3 a 8 miembros, morfolinilo, piperacínilo, homopiperacínilo, piperidinilo, cicloheteroalquilalquilo de 4 a 11 miembros, heteroarilo de 5 a 10 miembros y heteroarilalquilo de 6 a 16 miembros;

20

25

cada R^b es un grupo adecuado seleccionado independientemente de entre =O, -OR^d, haloalquiloxi (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, -[NR^aC(O)]_nNR^cR^c, -[NR^aC(O)]_nNR^cR^c, -[NHC(NH)]_nNR^cR^c y -[NR^aC(NR^a)]_nNR^cR^c;

30

cada R^c es independientemente un grupo protector o R^a, o, alternativamente, cada R^c es tomado junto con el átomo de nitrógeno al que se encuentra unido para formar un cicloheteroalquilo o heteroarilo de 5 a 8 miembros que puede incluir opcionalmente uno o más de los heteroátomos adicionales iguales o diferentes y que puede sustituirse opcionalmente con uno o más de los grupos R^a iguales o diferentes o R^b adecuados;

35

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

cada n es independientemente un número entero de 0 a 3,

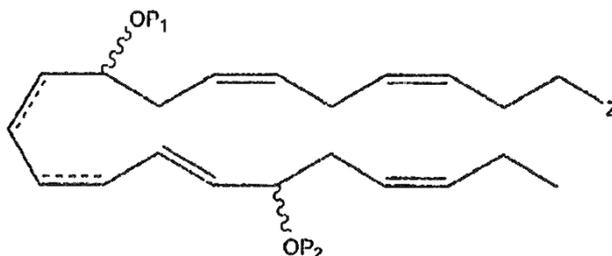
40

en el que cualquier doble enlace carbono-carbono puede ser *cis* o *trans*,

45

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el grupo protector representado por R^c y R^d se selecciona independientemente de entre un grupo formilo, acetilo, trifluoroacetilo, bencilo, benciloxicarbonilo, terc-butoxicarbonilo, trimetilsililo, 2-trimetilsilil-etanosulfonilo, tritilo y tritilo sustituido, aliloxicarbonilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, nitro-veratriloxicarbonilo, tetrahidropiraniolo, glicol y alilo.

2. Compuesto según la reivindicación 1, que presenta la fórmula:



en el que

Z es -C(O)OR^d,

5 R^d es un grupo protector o R^a,

10 R^a es hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₈), ciclohexilo, cicloalquilalquilo (C₄-C₁₁), arilo (C₅-C₁₀), fenilo, arilalquilo (C₆-C₁₆), bencilo, heteroalquilo de 2 a 6 miembros, cicloheteroalquilo de 3 a 8 miembros, morfolinilo, piperacínilo, homopiperacínilo, piperidinilo, cicloheteroalquilalquilo de 4 a 11 miembros, heteroarilo de 5 a 10 miembros o heteroarilalquilo de 6 a 16 miembros, y

P₁ y P₂ cada uno individualmente son un átomo de hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo, y en el que cualquier doble enlace carbono-carbono puede ser cis o trans,

15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Compuesto según la reivindicación 2, en el que el átomo de carbono en C-17 presenta una configuración R.

20 4. Compuesto según la reivindicación 2, en el que el átomo de carbono C-10 presenta una configuración S y el átomo de carbono en C-17 presenta una configuración S.

5. Compuesto según la reivindicación 2, en el que el átomo de carbono C-10 presenta una configuración R y el átomo de carbono en C-17 presenta una configuración S.

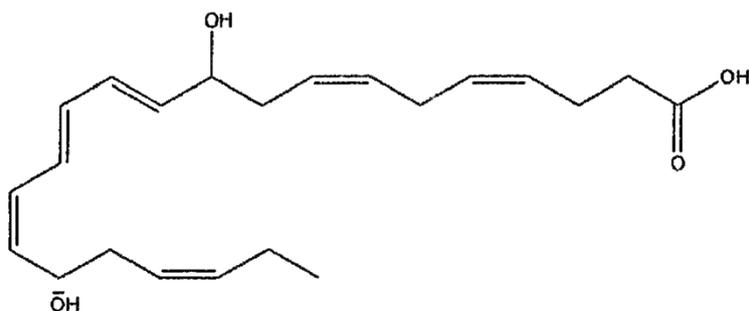
25 6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cada P₁ y P₂ son átomos de hidrógeno, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que Z es un ácido carboxílico o un éster carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. Compuesto según la reivindicación 7, en el que Z es COOR^a, en el que R^a es hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₈), cicloalquilalquilo (C₄-C₁₁) o arilalquilo (C₆-C₁₆) o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

35 9. Compuesto según la reivindicación 7, en el que Z es una sal de ácido carboxílico.

10. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto presenta la estructura:



40 o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

11. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

45 12. Compuesto o composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la utilización en el tratamiento o la prevención de la inflamación en un sujeto.

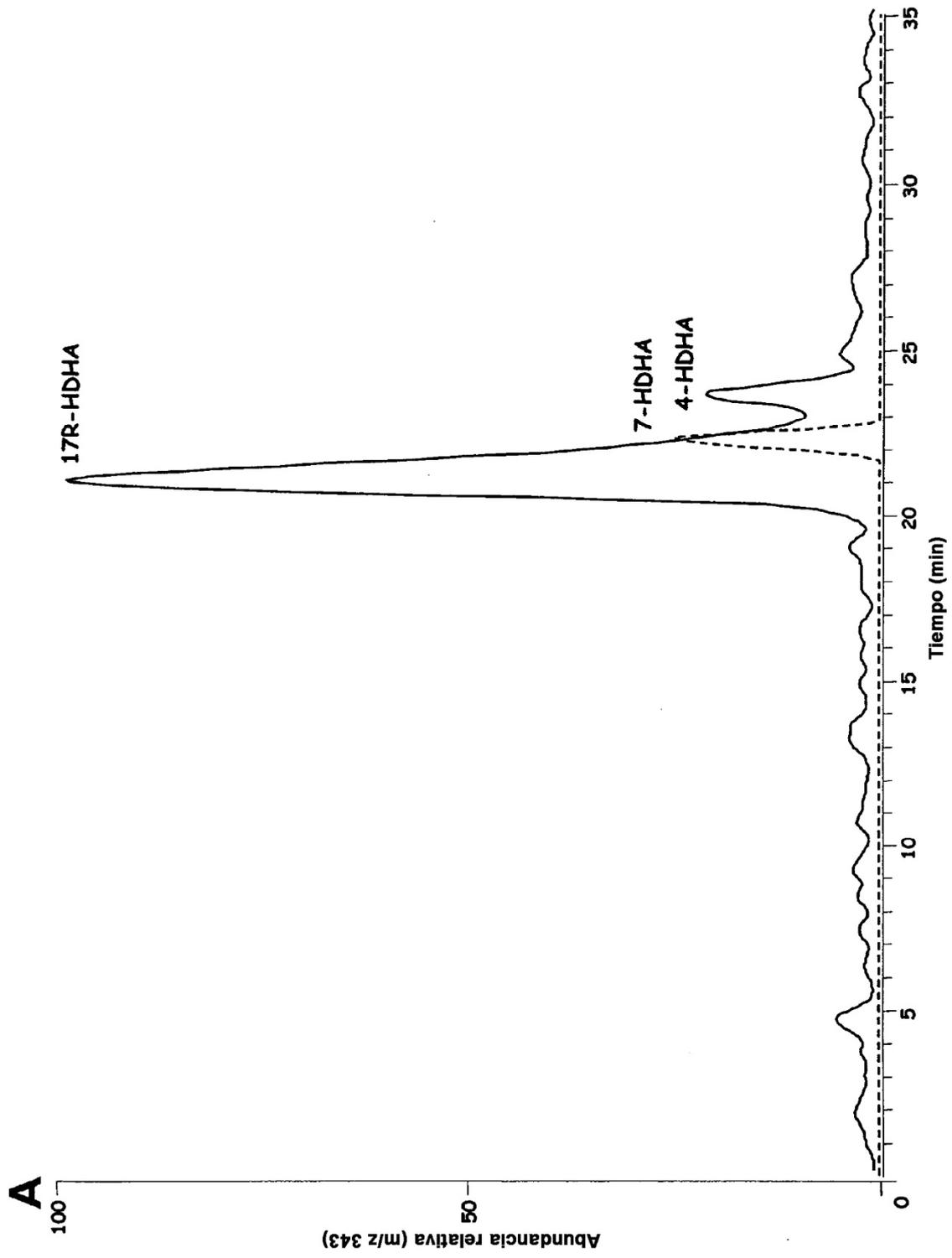


Fig. 1A

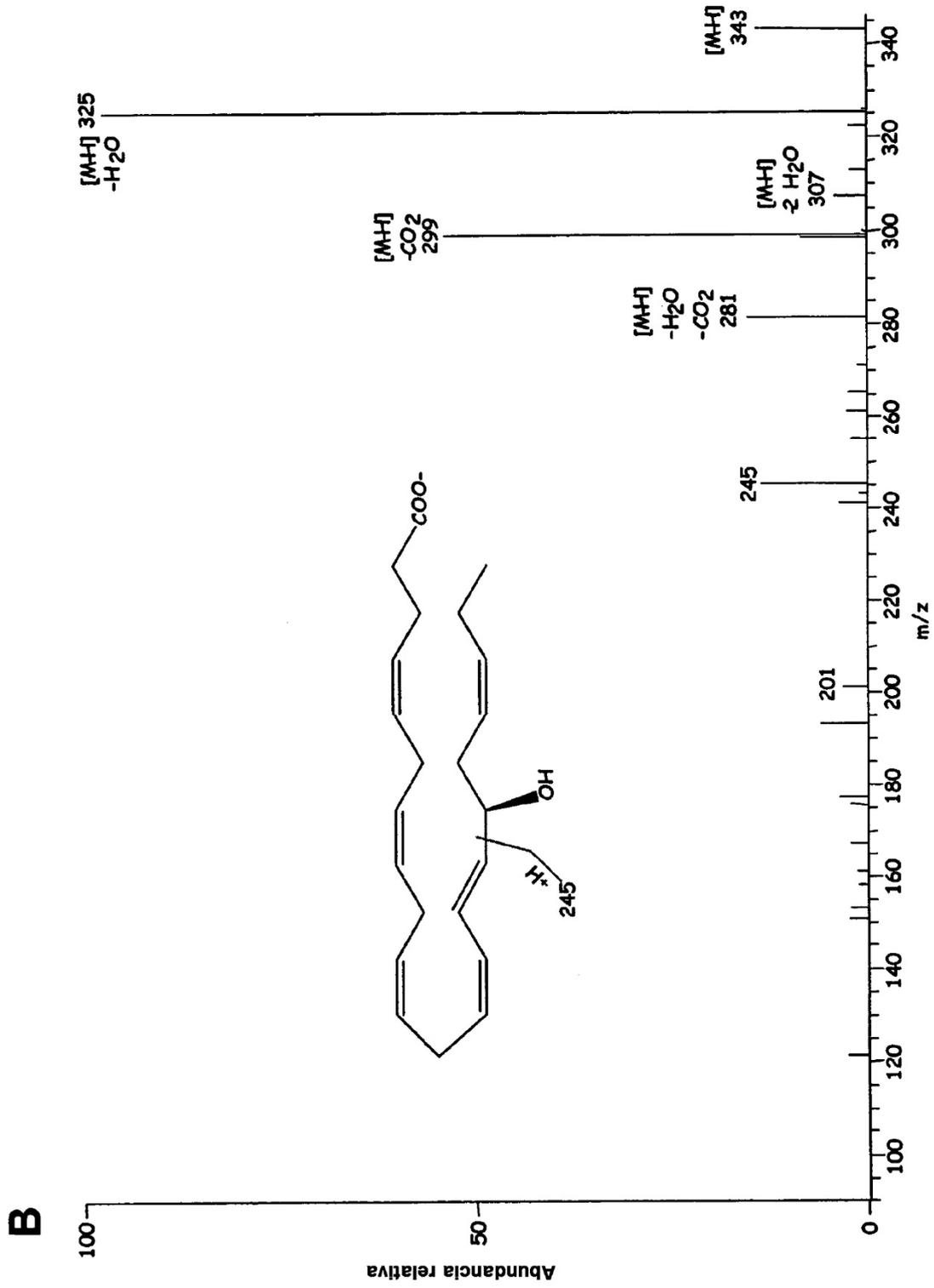


Fig. 1B

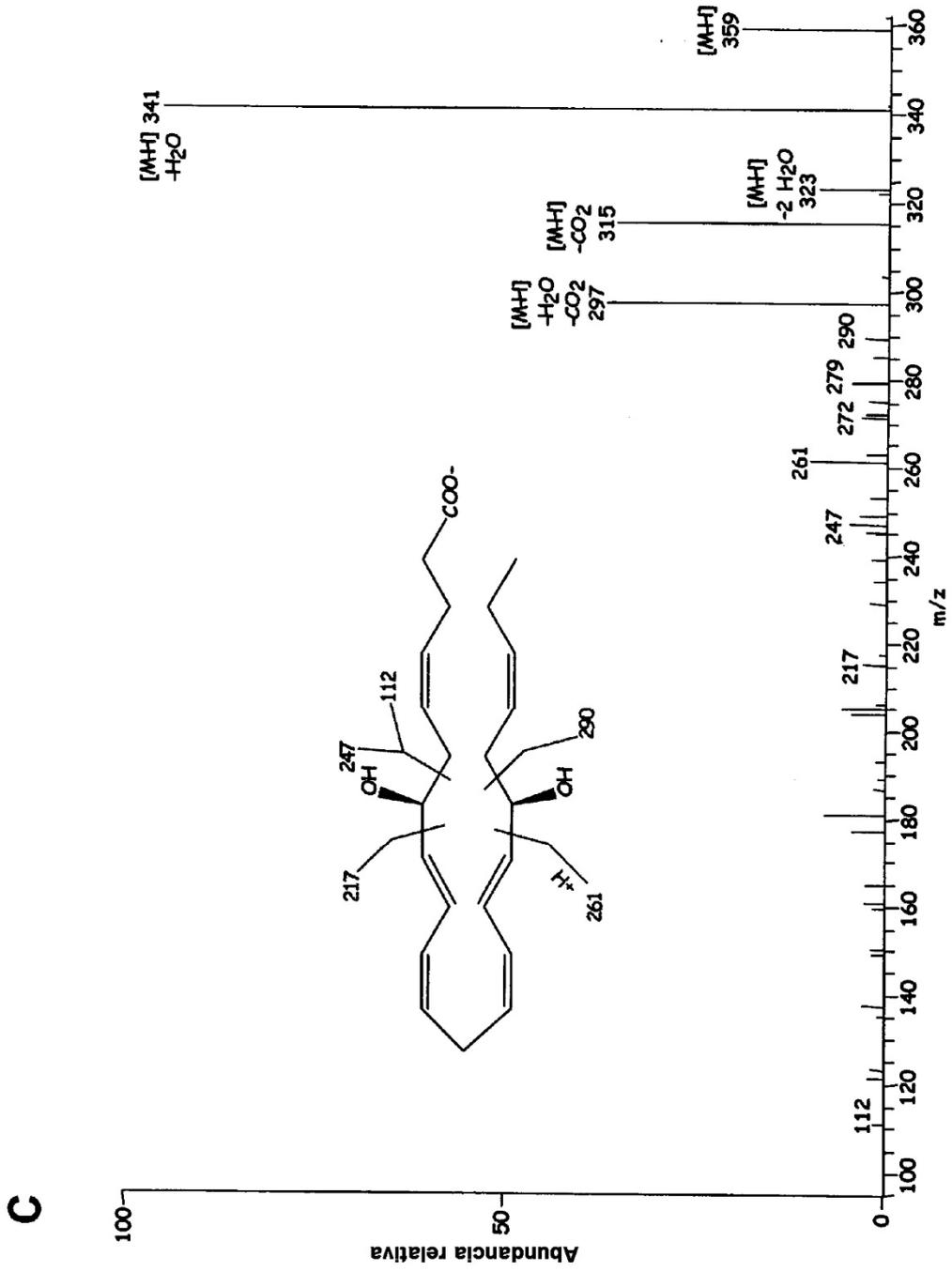


Fig. 1C

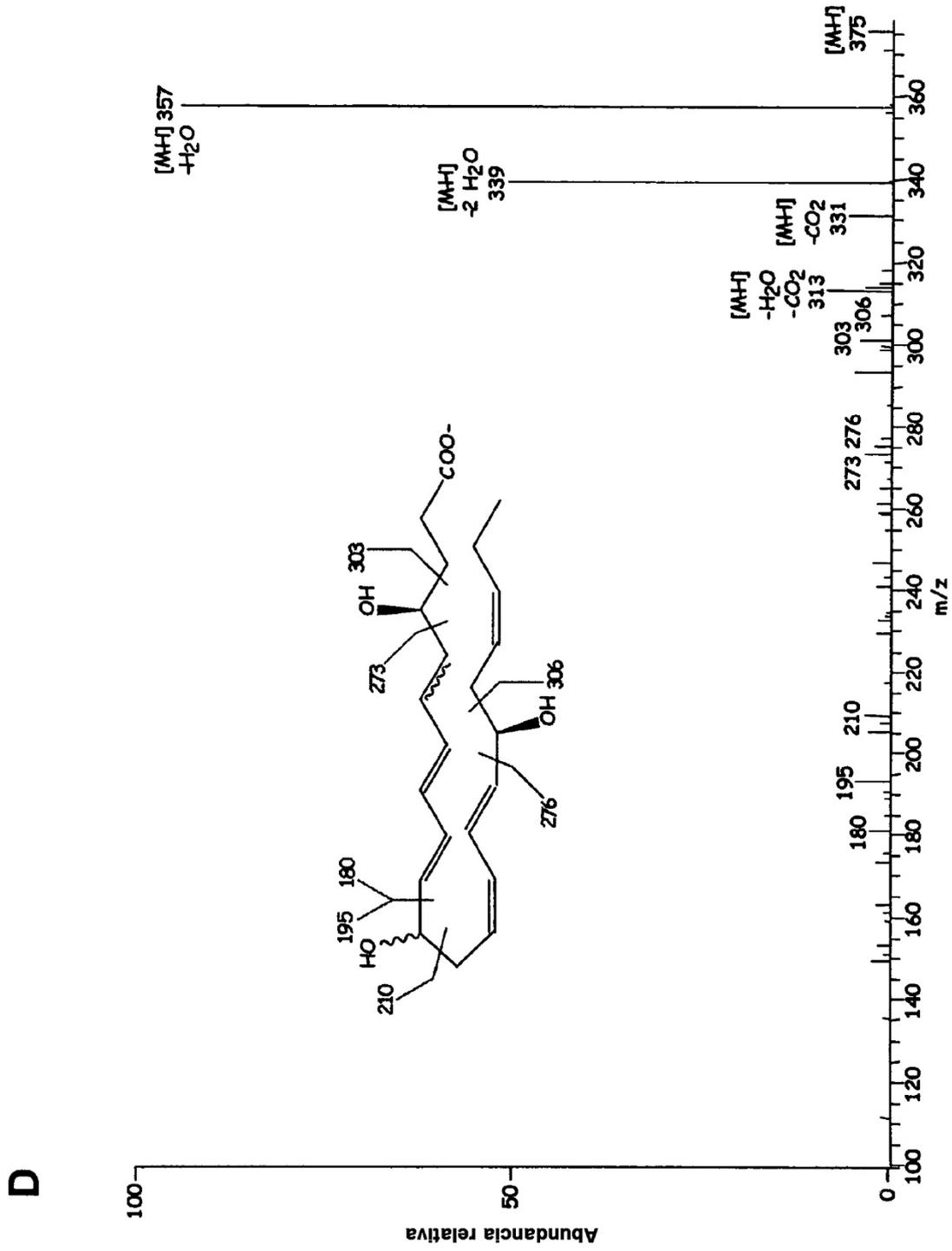


Fig. 1D

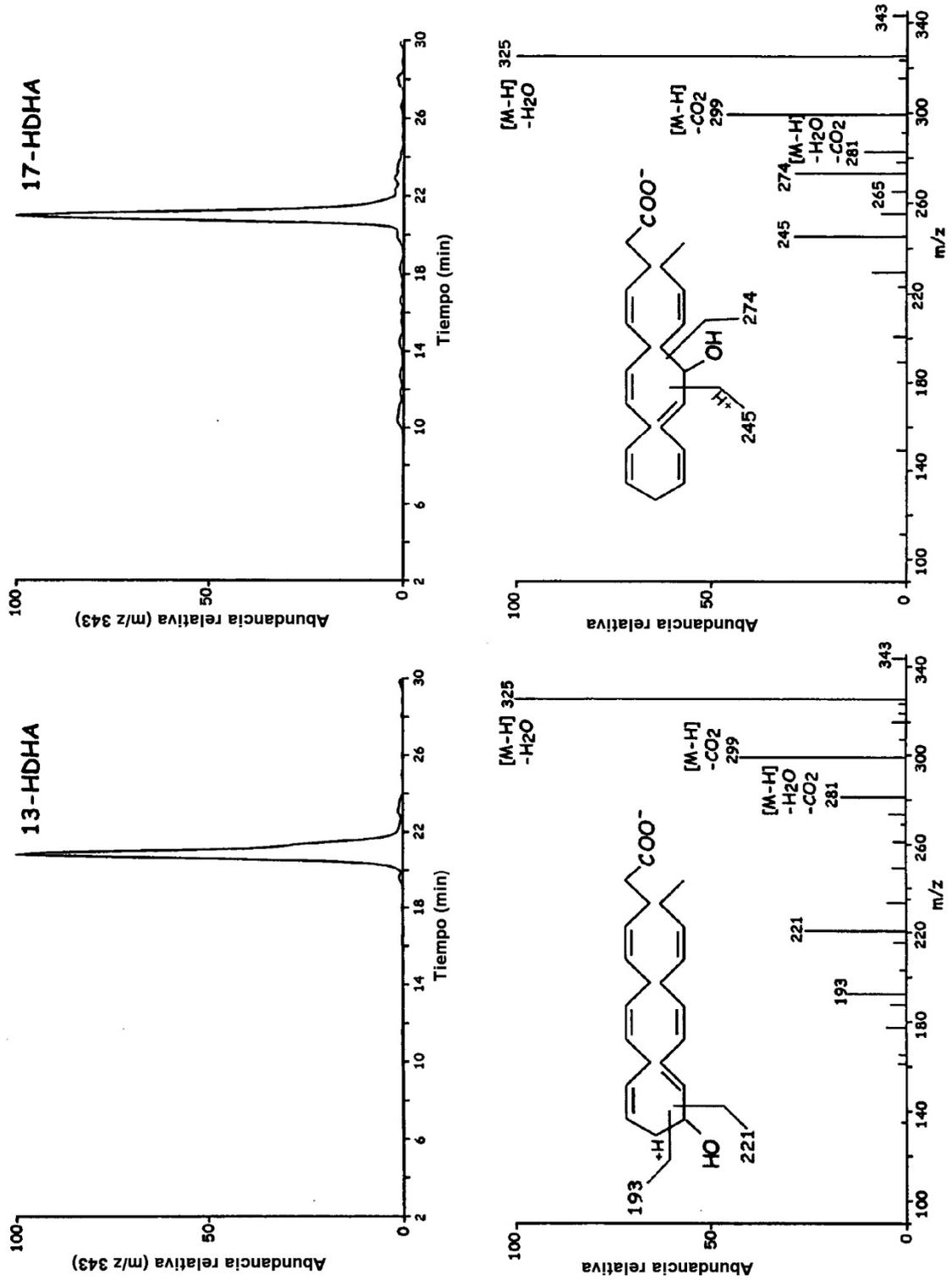


Fig. 2

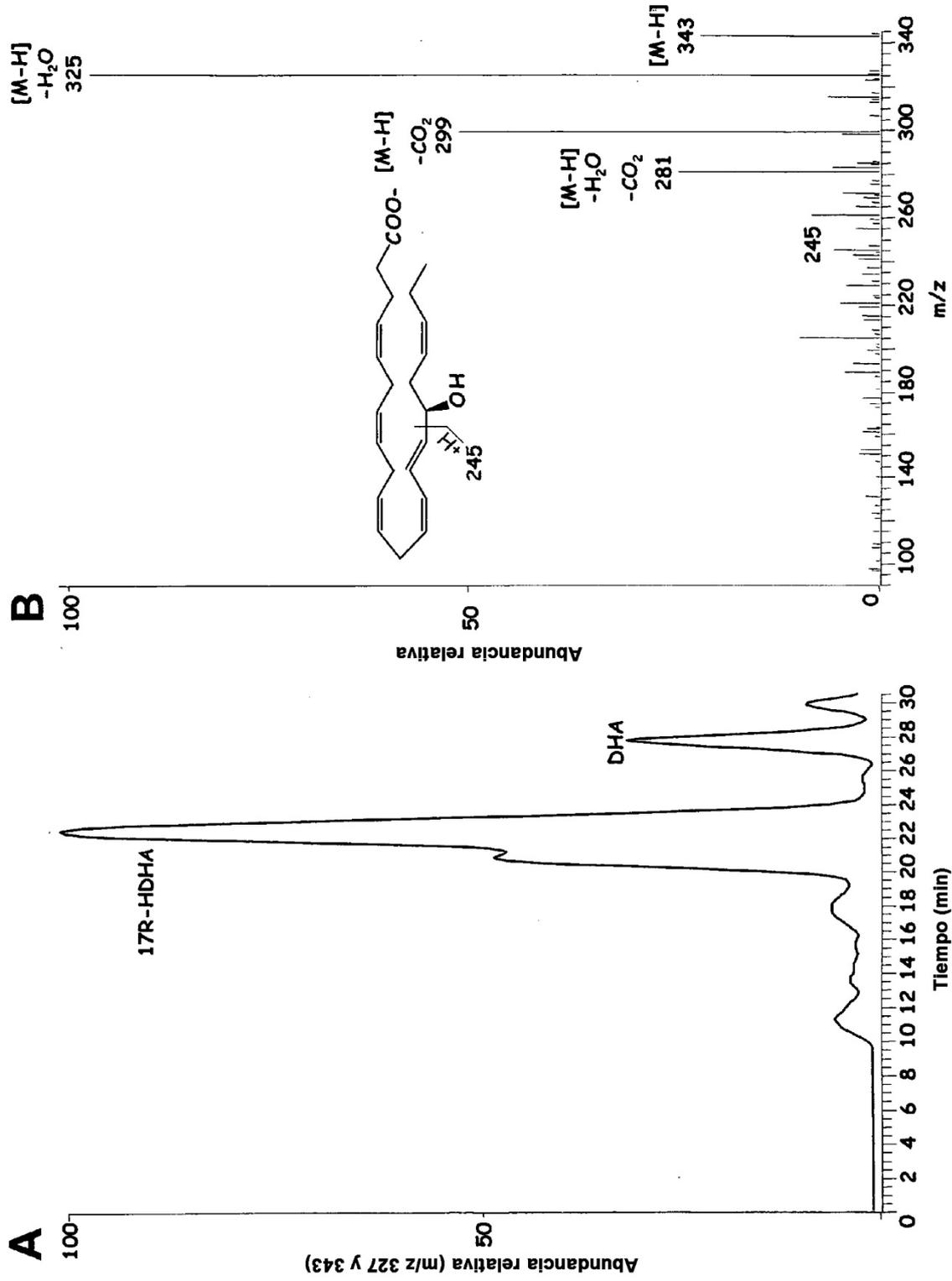


Fig. 3A y B

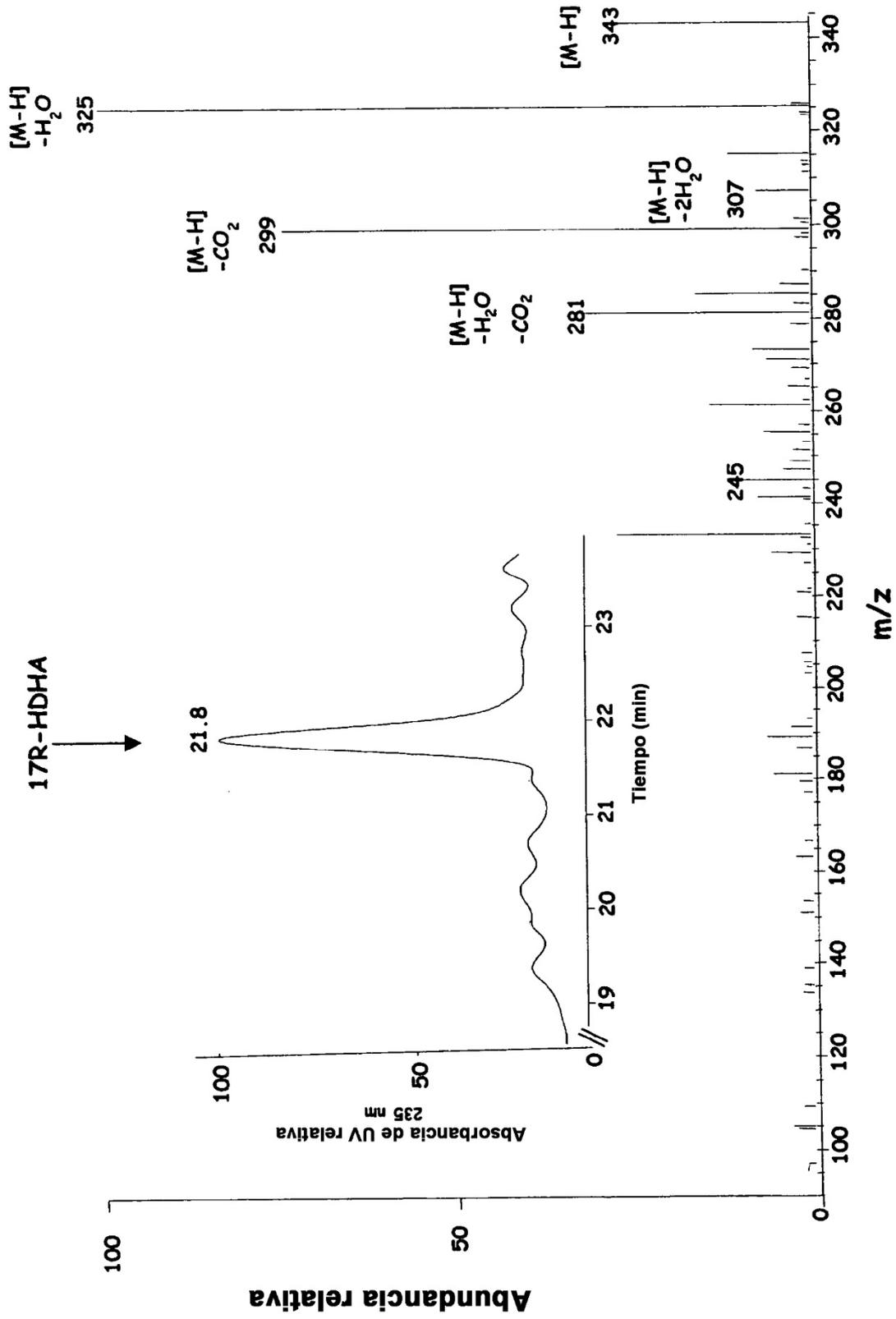


Fig. 3C

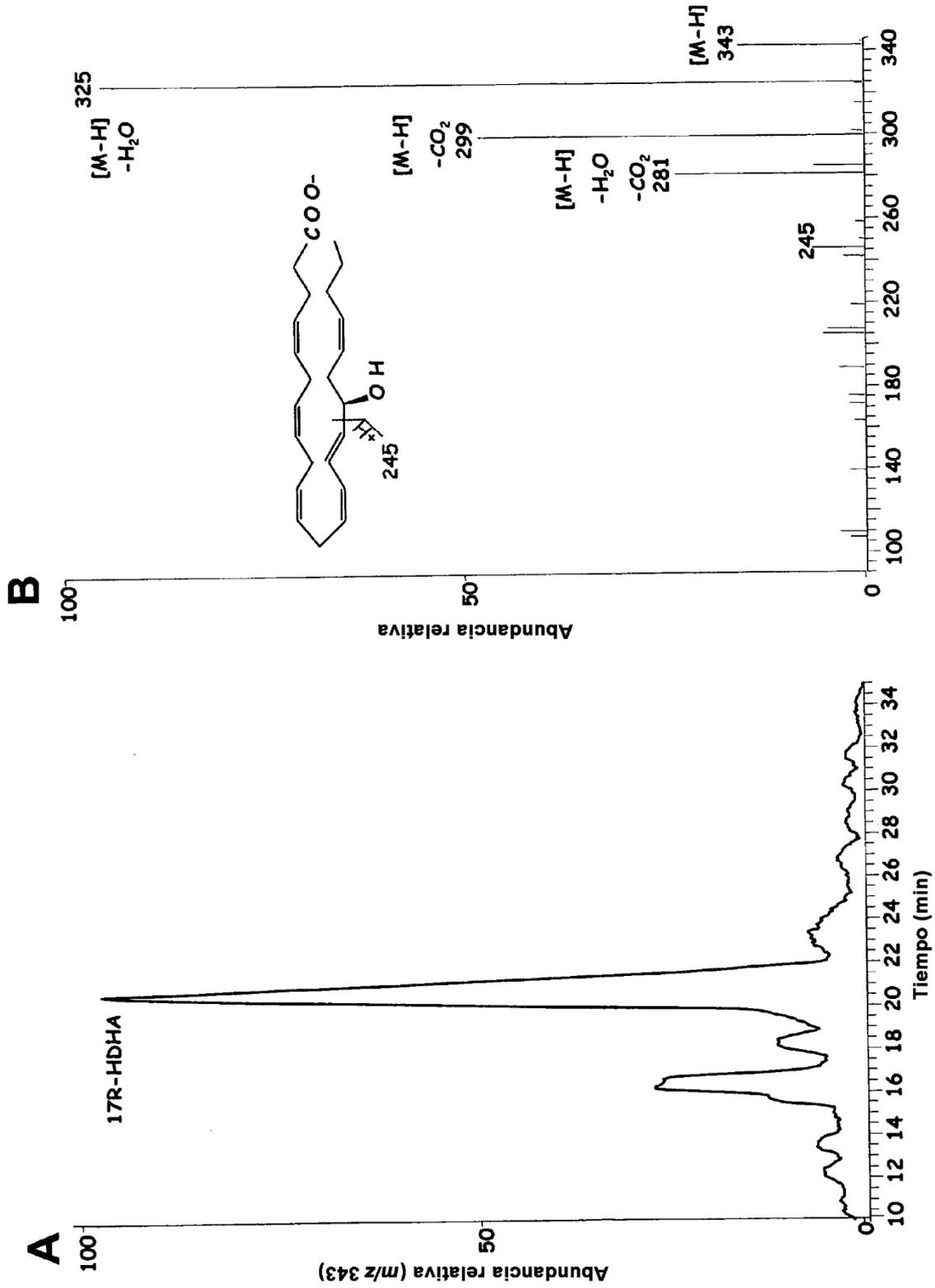


Fig. 4

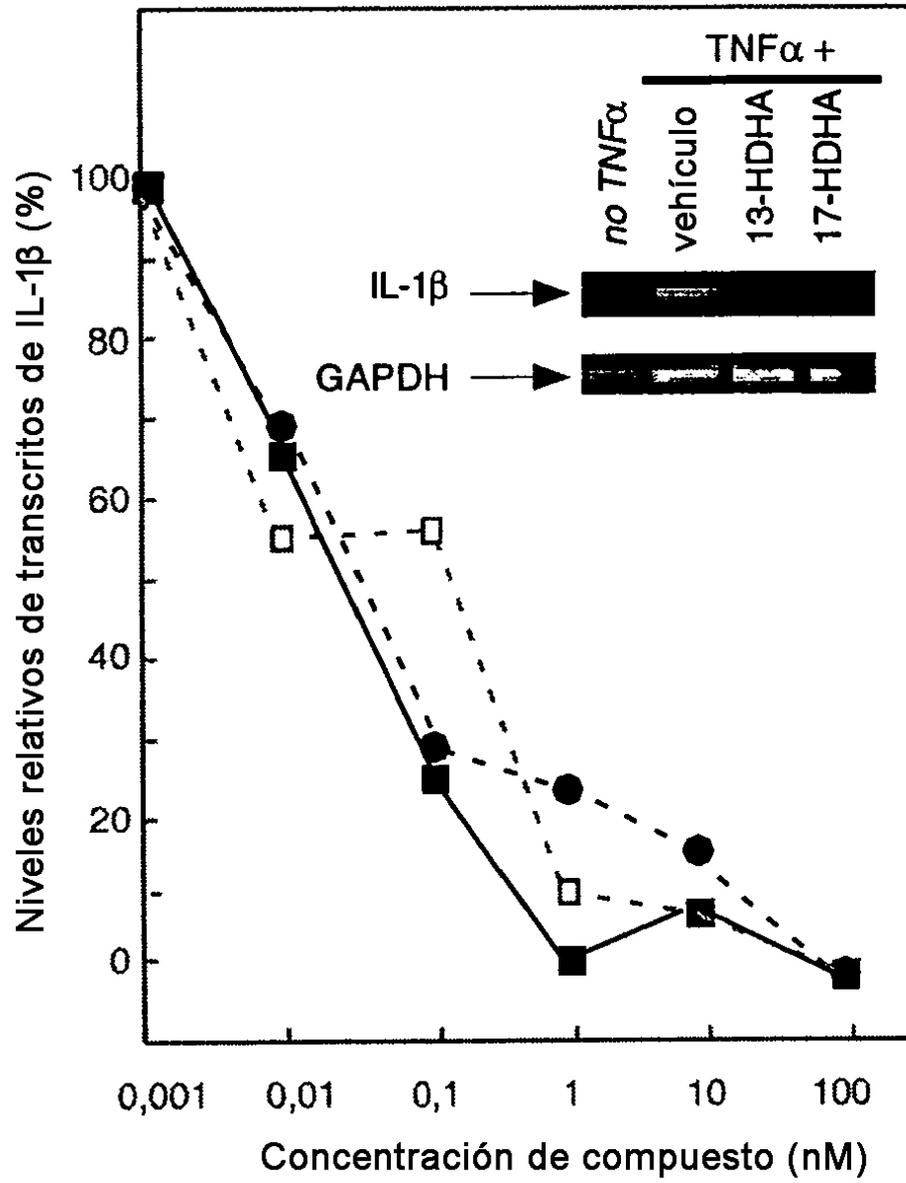


Fig. 5A

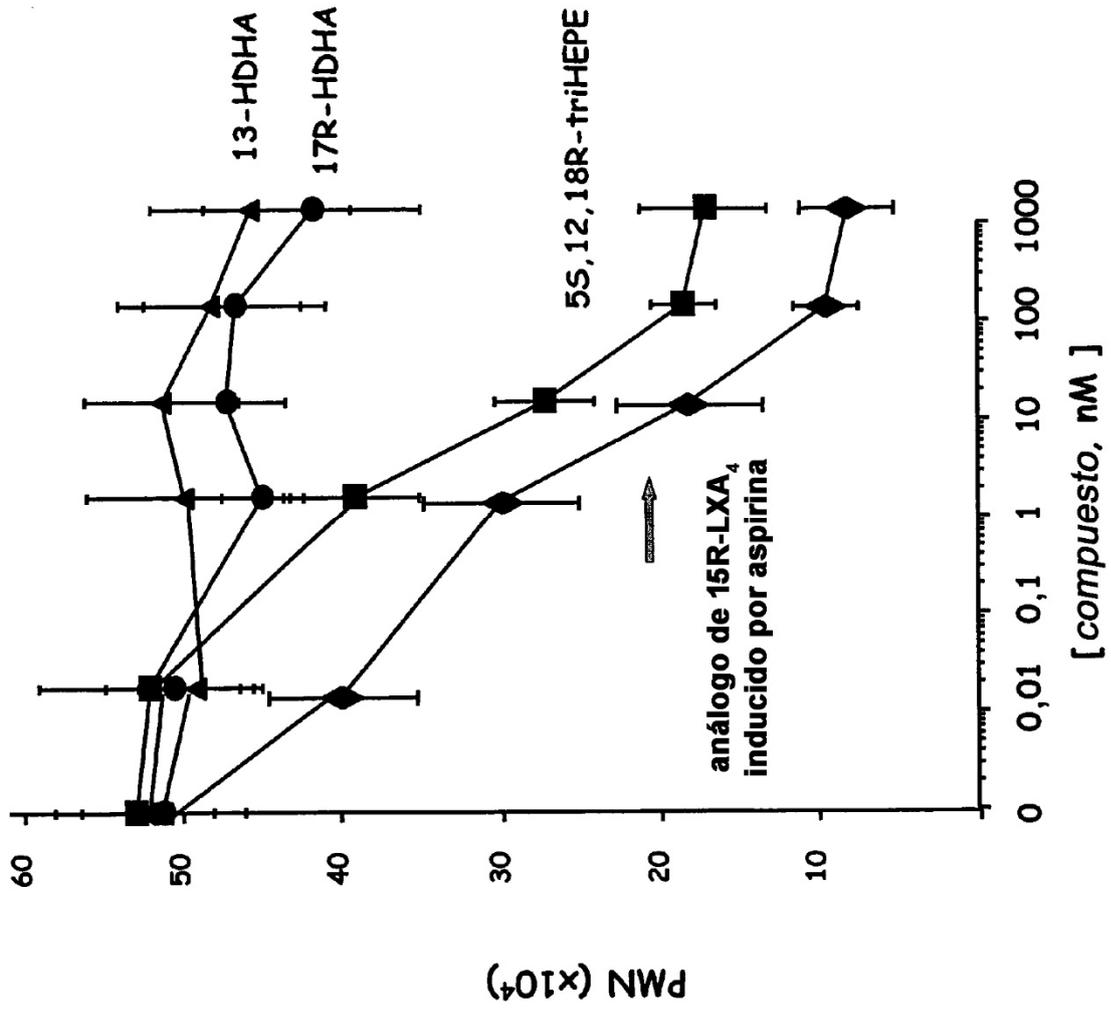


Fig. 5B

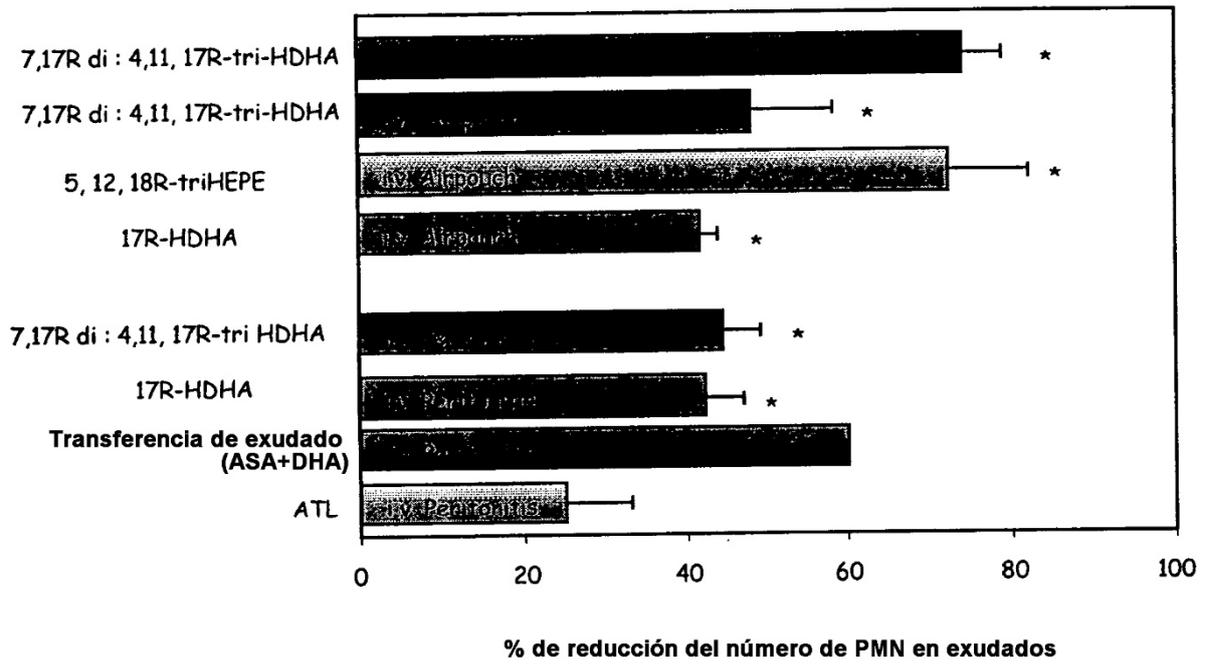


Fig. 5C

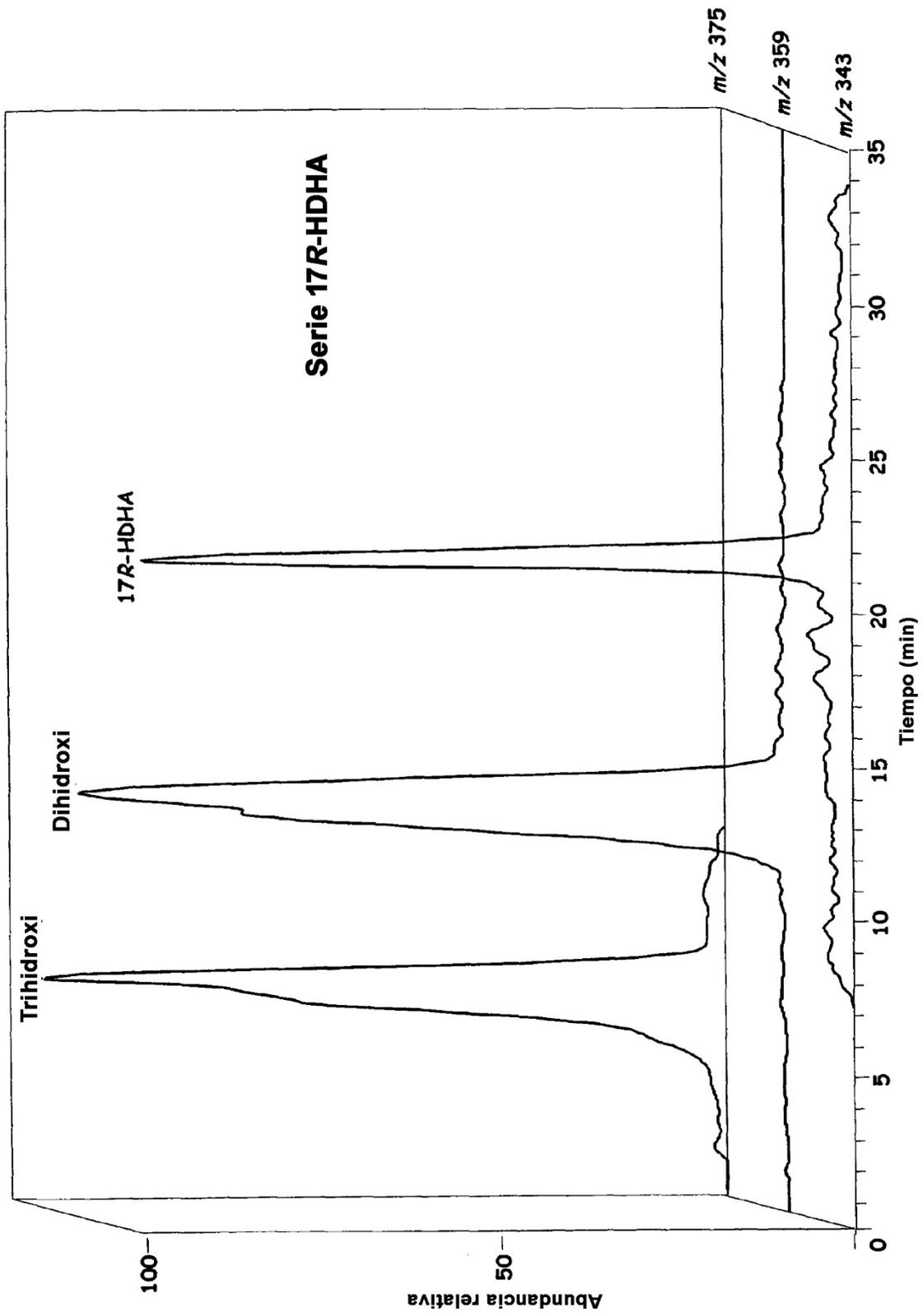


Fig. 6

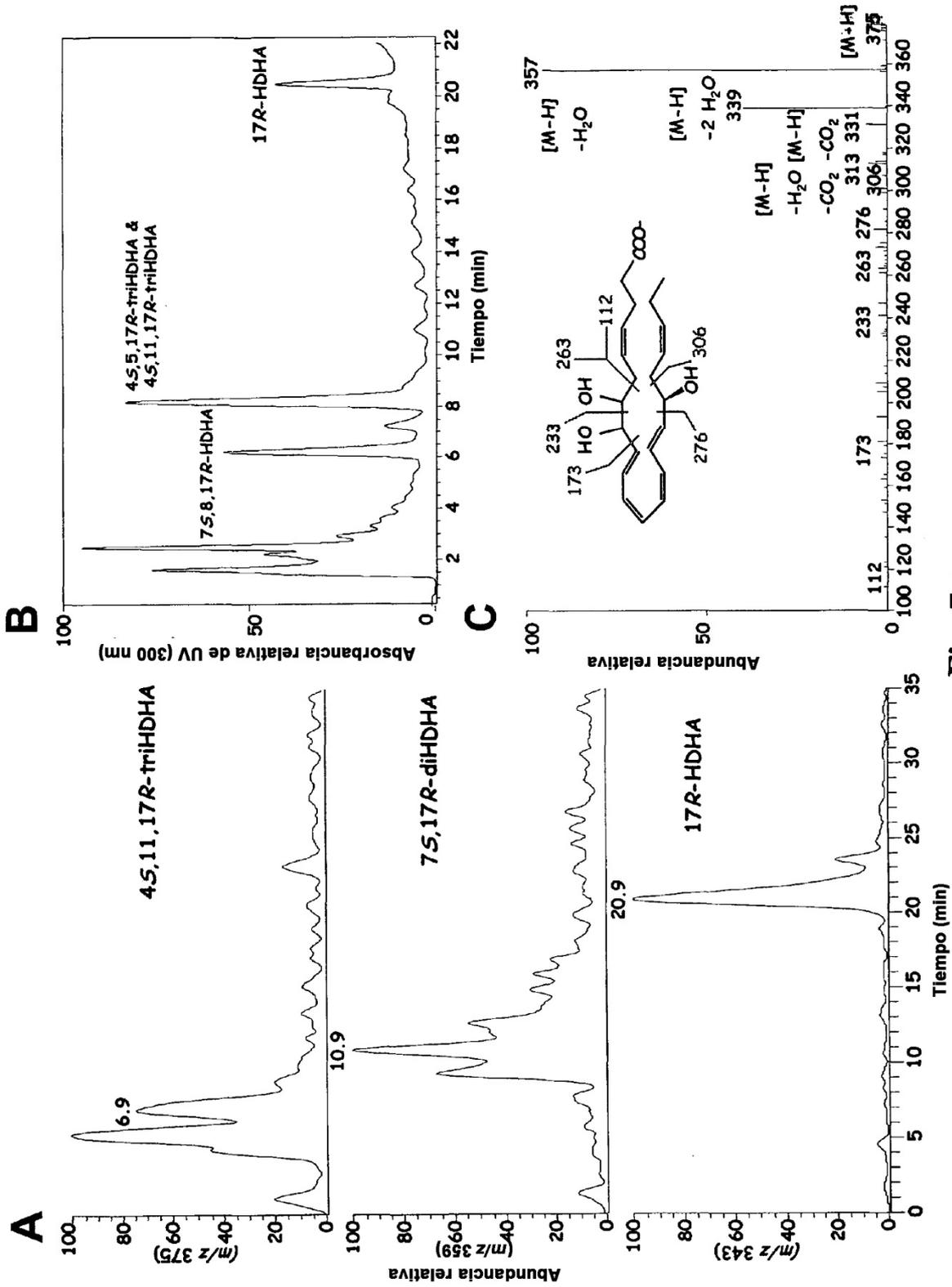


Fig. 7

Lipidómica: análisis basado en CL-EM-EM

Mediadores lipídicos en la resolución de la inflamación

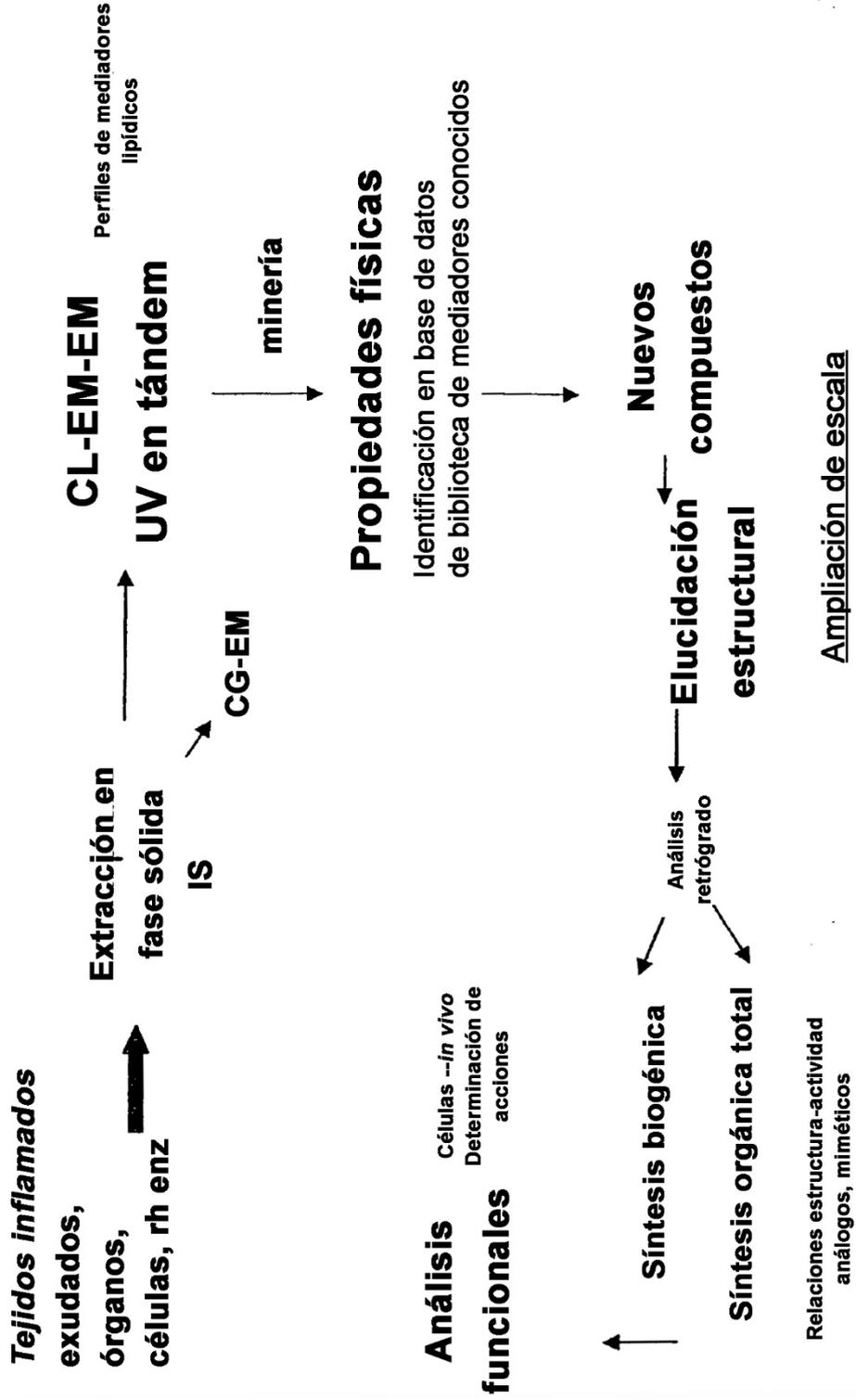


Fig. 9

Mediador químico redundante en la resolución de la inflamación
Nuevas señales antiinflamación endógenas metabólicas

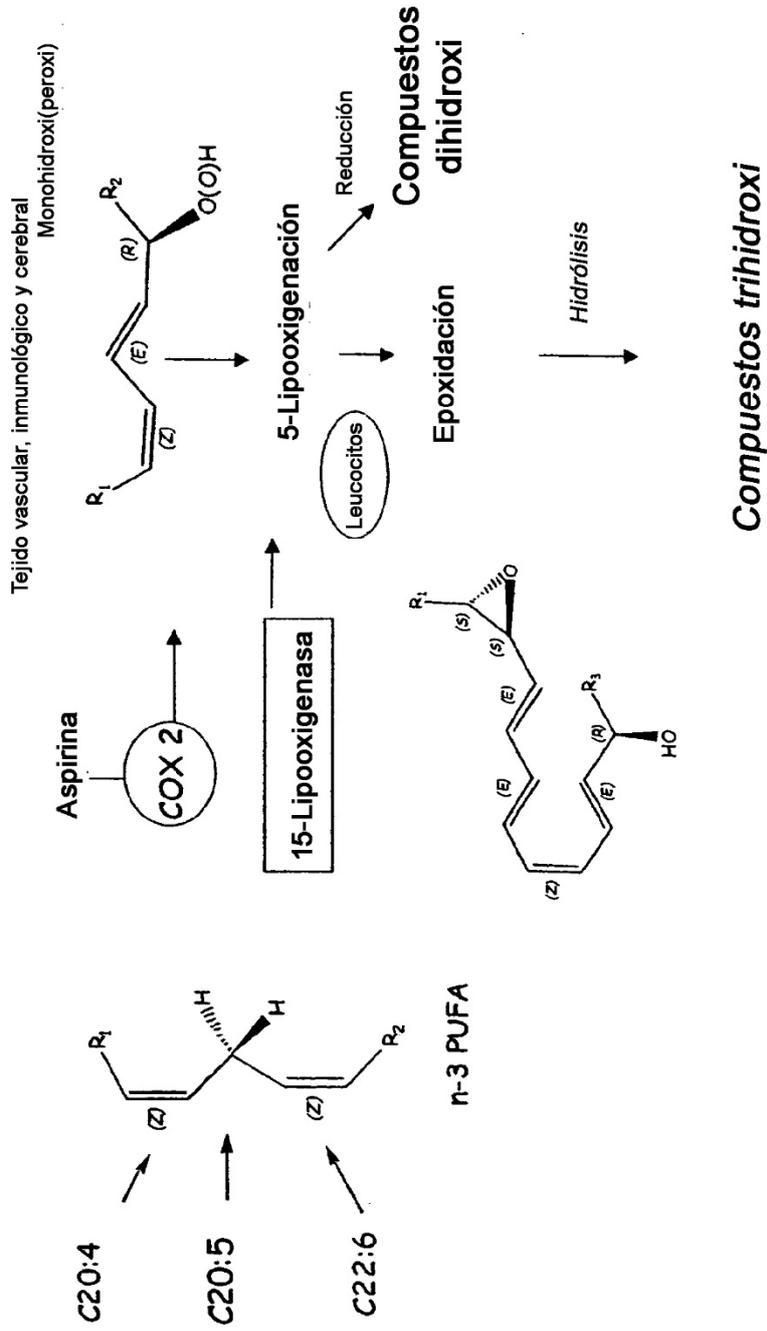


Fig. 10

SERIE 17R-HDHA

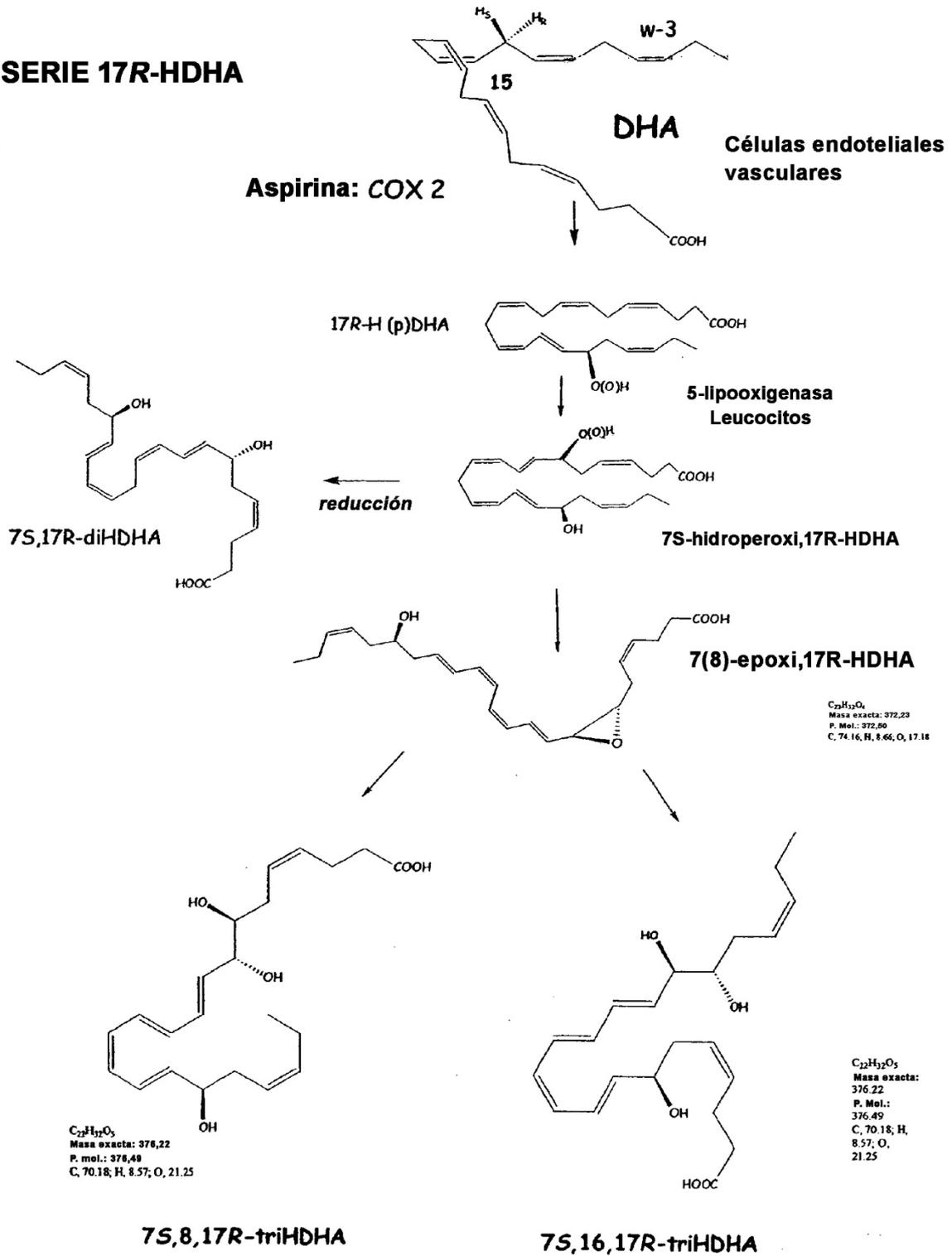
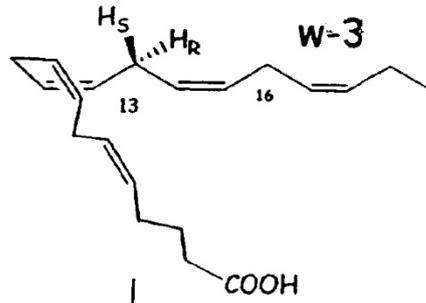
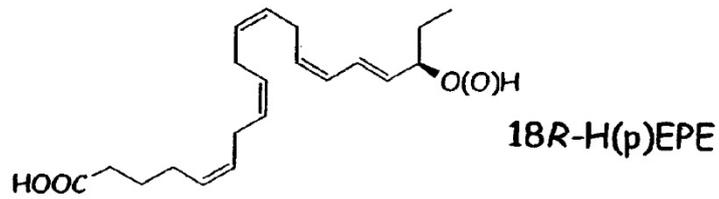


Fig. 12

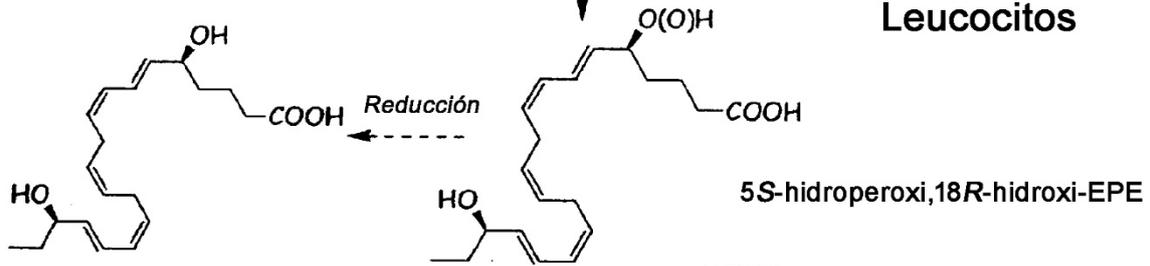
SERIE 18R-HEPE



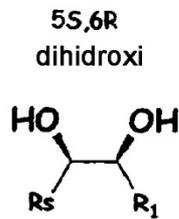
Aspirina: COX 2



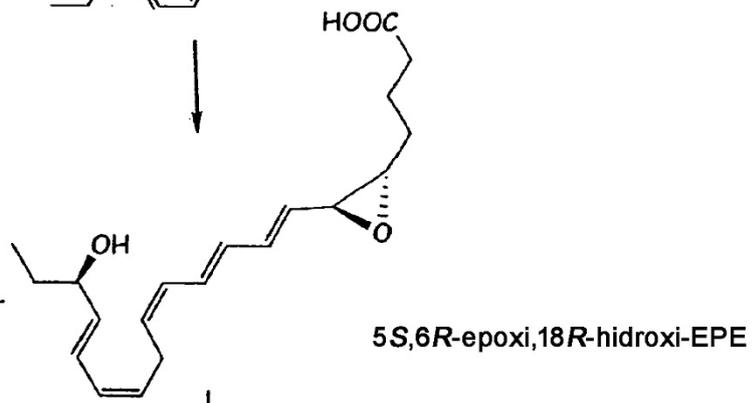
**5-Lipooxigenasa
Leucocitos**



5S,18R-Dihidroxi-EPE

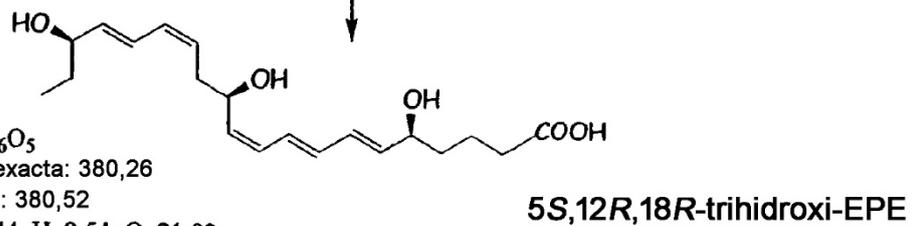


**5S,6R
dihidroxi**



5S,6R-epoxi,18R-hidroxi-EPE

$C_{22}H_{36}O_5$
Masa exacta: 380,26
P. Mol.: 380,52
C, 69.44; H, 9.54; O, 21.02



5S,12R,18R-trihidroxi-EPE

Fig. 13

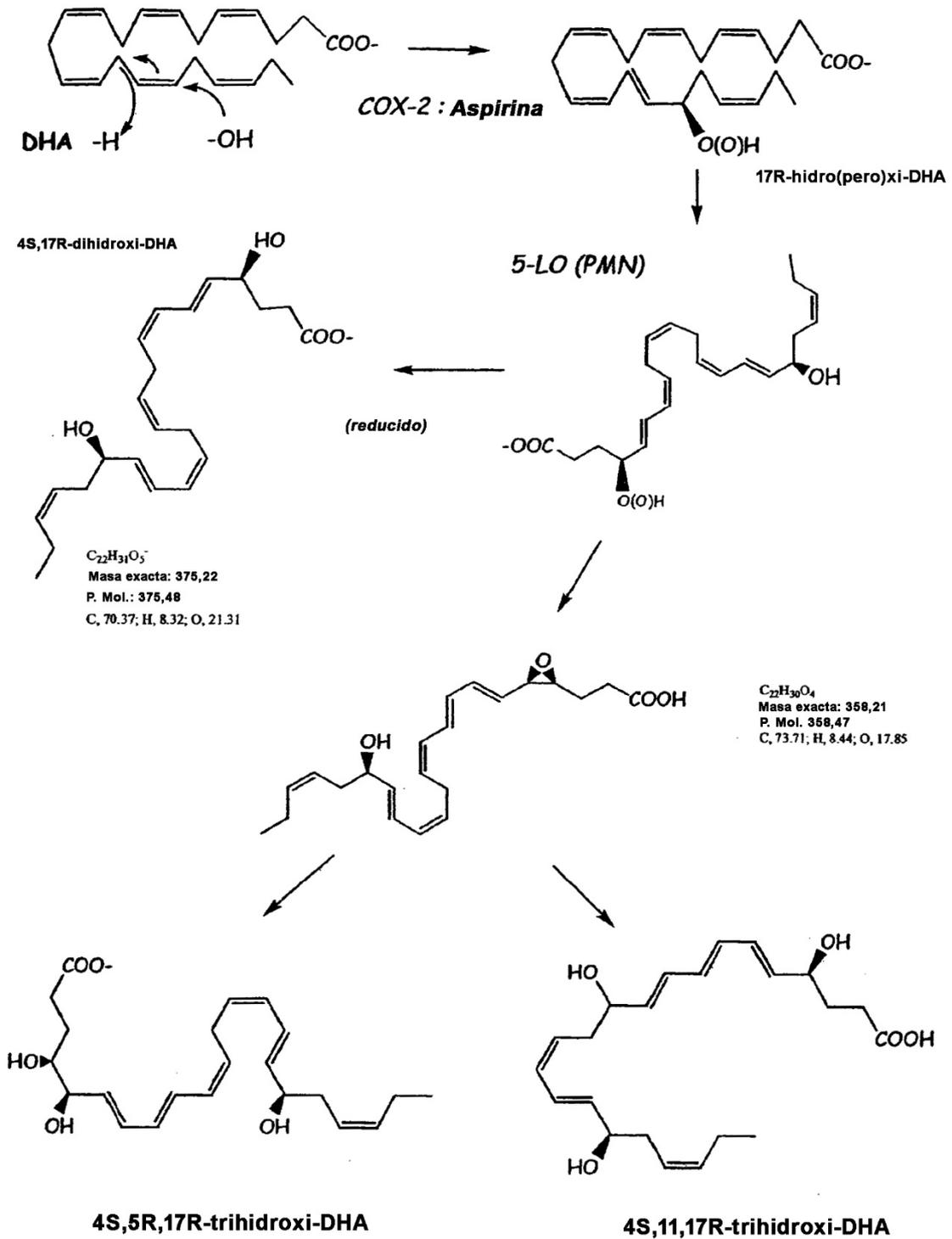


Fig. 14

Fig. 15
Propiedades físicas para la identificación de
5*S*, 18(+/-)-diHEPE

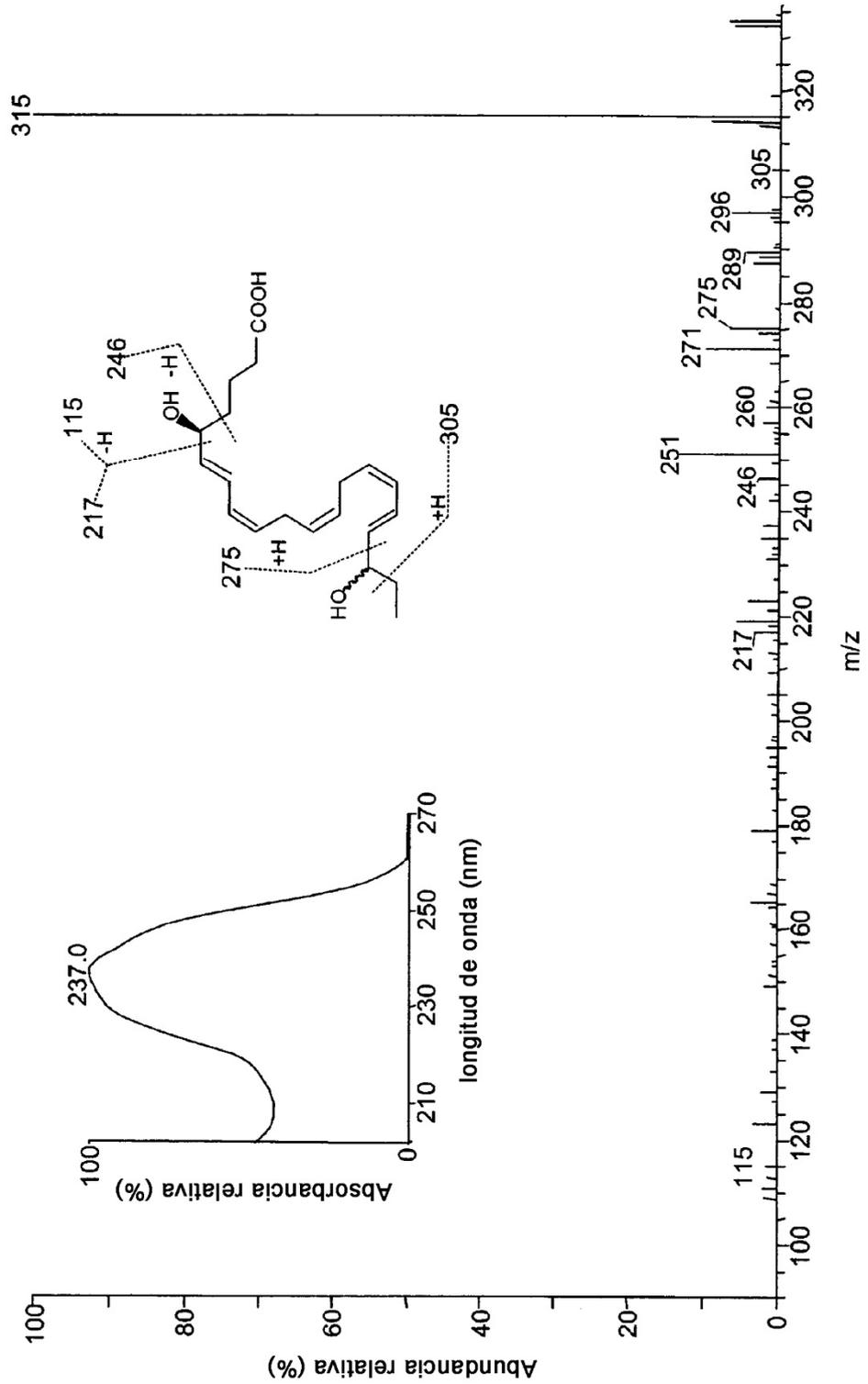
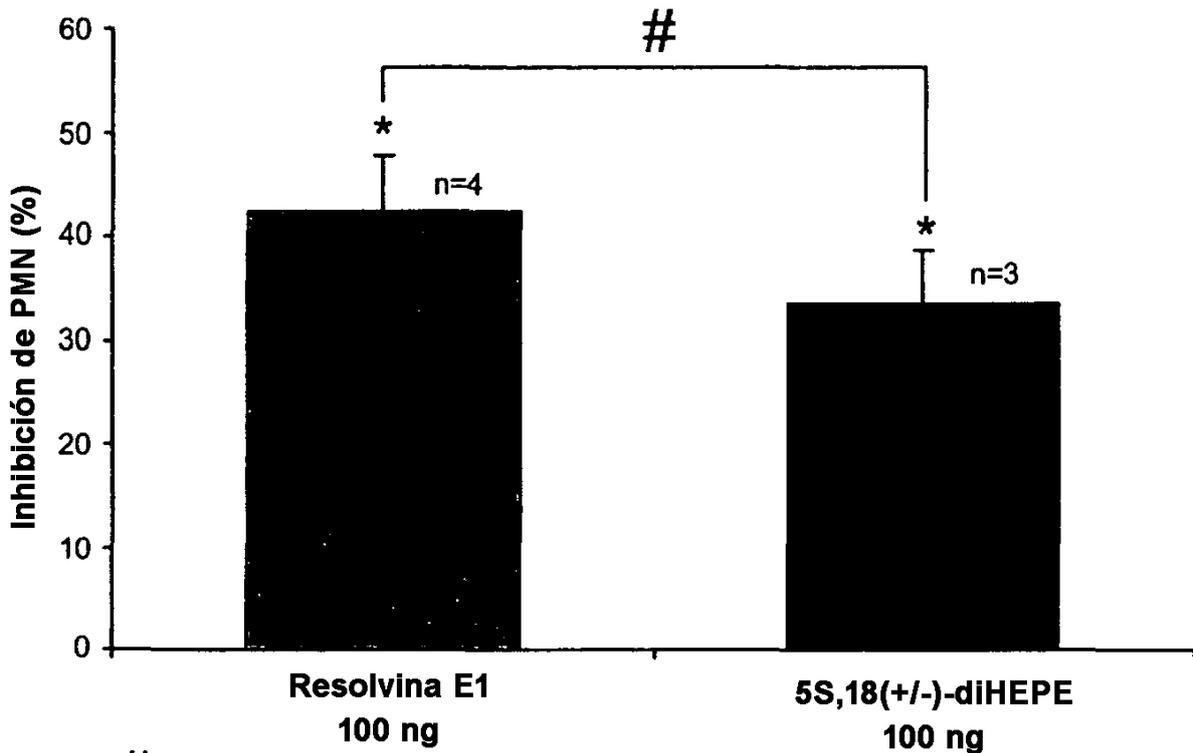


Fig. 16

**Comparación directa de nuevo 5S,18(+/-)-diHEPE y resolvina E1:
reducen la infiltración de neutrófilos en la peritonitis inducida por cimosano**

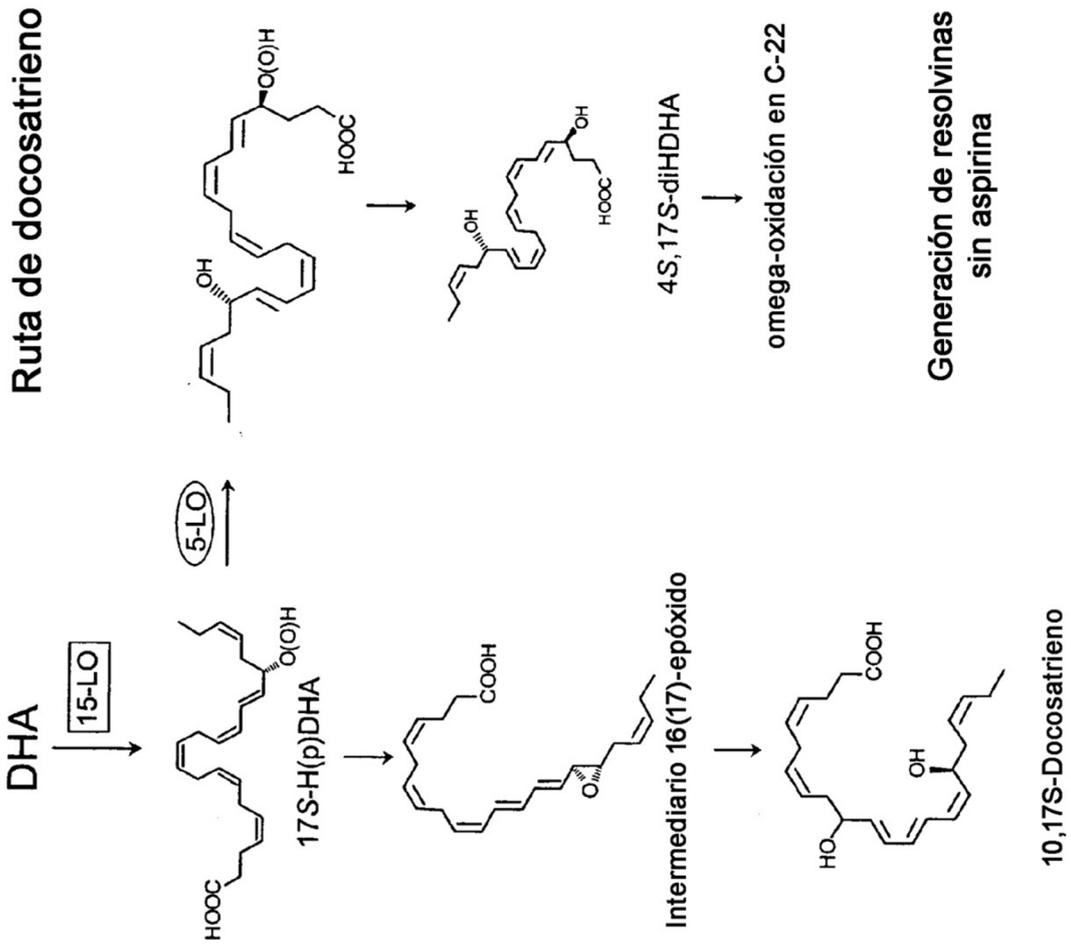


$p > 0,05$ - diferencia estadísticamente no significativa entre compuestos

* $p < 0,05$ - estadísticamente significativo en comparación con el control de peritonitis

§ Se inyectaron los compuestos (100 ng en 100 μ l de solución salina estéril) mediante inyección intravenosa de bolo en la vena de la cola de ratones FVB macho, seguido de 1 ml de cimosano A (1 mg/ml) en el peritoneo. Se recolectaron los lavados peritoneales (2 h) y se realizaron recuentos de los tipos celulares

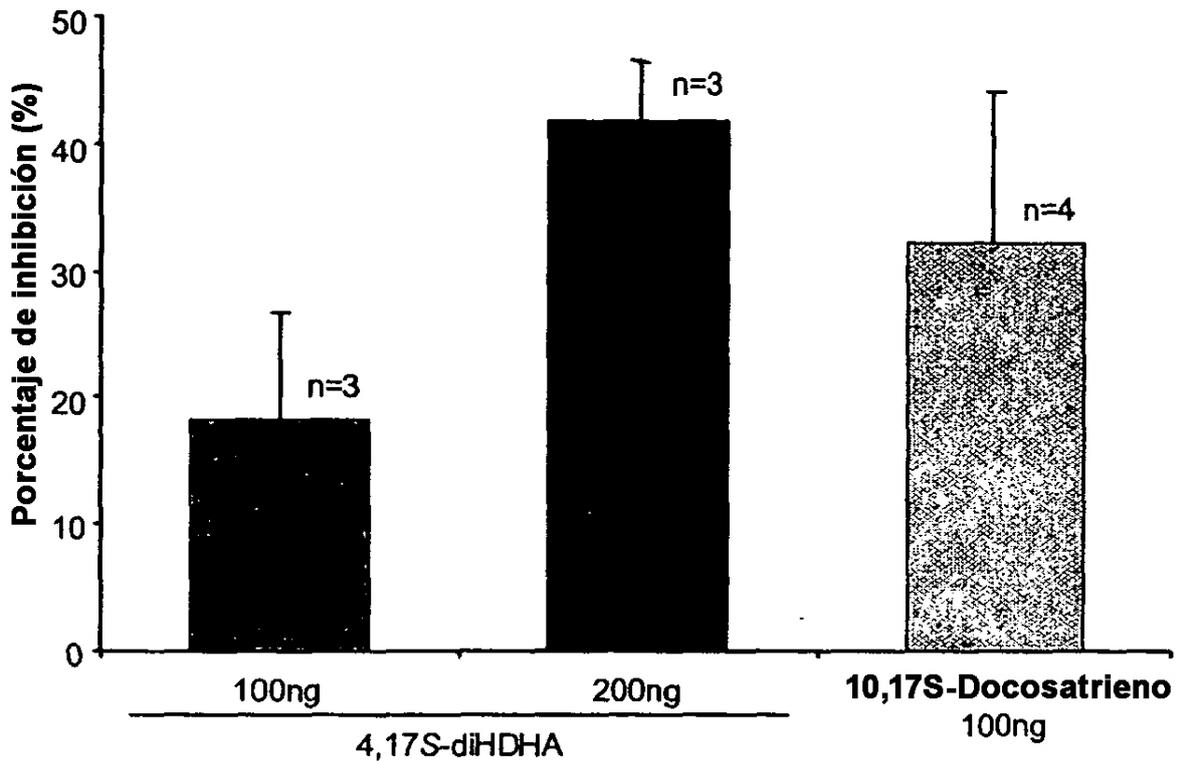
Fig. 17



Limita la producción de PMN:
"DETIENE" la lesión cerebral

Fig. 18

**Nuevo 4,17S-diHDHA y 10,17S-Docosatrieno:
reducen la infiltración de leucocitos en peritonitis inducida
por cimosano**



§ Se inyectaron los compuestos (100 ng o 200 ng en 100 μ l de solución salina estéril) mediante inyección intravenosa de bolo en la vena de la cola de ratones FVB macho seguido de 1 ml de cimosano A (1 mg/ml) en el peritoneo. Se recolectaron los lavados peritoneales (2 h) y se realizaron recuentos de los tipos celulares.