

ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE CADENA MUY LARGA, DERIVADOS HIDROXILADOS ELOVANOIDES Y MÉTODOS DE USO

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos N.º 62/829,322, presentada el 4 de abril de 2019, cuyo contenido completo se incorpora a este documento en su totalidad mediante referencia.

Todas las patentes, solicitudes de patente y publicaciones citadas en este documento se incorporan mediante este documento en su totalidad mediante referencia. Las divulgaciones de estas publicaciones se incorporan a esta solicitud en su totalidad mediante referencia para describir mejor el estado de la técnica conocido por los expertos en la técnica a la fecha de la invención descrita y reivindicada en este documento.

Esta divulgación de patente contiene material que está sujeto a protección de derechos de autor. El propietario de los derechos de autor no tiene ninguna objeción en cuanto a que se reproduzca por fax el documento de la patente o la divulgación de la patente según consta en el archivo o los registros de patentes de la Oficina de Patentes y Marcas de EE. UU., pero se reserva por otra parte todos los derechos de autor.

DECLARACIÓN SOBRE INVESTIGACIÓN O DESARROLLO PATROCINADOS FEDERALMENTE

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno en virtud de los contratos EY019465 otorgados por *National Institutes of Health*. El gobierno federal tiene determinados derechos respecto a la invención.

CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

Esta divulgación se refiere a compuestos, composiciones y métodos de uso protectores de órganos, preventivos de enfermedades, restauradores de la salud y antienviejecimiento relacionados con ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga omega-3 (VLC-PUFA n-3) y sus derivados hidroxilados conocidos como elovanoides.

ANTECEDENTES

Si bien el proceso de envejecimiento humano es inevitable, descubrimientos recientes han llevado a la identificación de factores que alteran la homeostasis y/o

aceleran el daño celular y tisular, y promueven la aparición de enfermedades y afecciones relacionadas con la edad. Por ejemplo, la exposición prolongada a estrés oxidativo no compensado, la acumulación de células dañadas y restos celulares, y el retraso en la reparación y eliminación de tejidos, se asocia a la aparición de afecciones y enfermedades relacionadas con la edad, como enfermedades cardiovasculares, enfermedades cerebrovasculares y enfermedades neurodegenerativas de inflamación crónica. Al reducir los factores clave que alteran la homeostasis, aceleran el daño celular y la muerte celular (senescencia celular), es posible prevenir o retrasar las enfermedades y afecciones relacionadas con la edad, mejorar la calidad de vida y aumentar la esperanza de vida humana.

Las enfermedades y afecciones inflamatorias o degenerativas oftálmicas normalmente afectan la córnea, el nervio óptico, la red trabecular y la retina. Sin una prevención o tratamiento eficaces, pueden provocar enfermedades oculares que ocasionan ceguera, como glaucoma, cataratas, retinopatía diabética y degeneración macular relacionada con la edad (AMD).

Con el descubrimiento de los efectos antiinflamatorios y que contribuyen a la resolución de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de 20 o 22 carbonos (PUFA n-3 o n3), es decir, ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) o ácido docosapentaenoico (DPA), estas moléculas lipídicas beneficiosas y determinados tipos de sus derivados hidroxilados enzimáticamente se utilizan cada vez más con fines terapéuticos y como suplementos nutricionales o alimenticios para la prevención y el tratamiento de la inflamación excesiva.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Se proporcionan compuestos, composiciones farmacéuticas, composiciones cosméticas y dermatológicas o composiciones de suplementos nutricionales, que comprenden ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga omega-3 (VLC-PUFA n3) y/o sus derivados hidroxilados endógenos, conocidos como elovanoides. Esta divulgación proporciona métodos para la neuroprotección, protección o restauración de órganos y tejidos, prevención o ralentización de enfermedades y afecciones relacionadas con la edad, y el mantenimiento de la función durante el proceso de envejecimiento.

Los VLC-PUFA n3 se convierten *in vivo* en varios tipos previamente desconocidos de derivados hidroxilados de VLC-PUFA llamados elovanoides (ELV) que

pueden proteger y prevenir el daño progresivo a tejidos y órganos, cuya integridad funcional ha sido alterada.

Los VLC-PUFA n3 en células y tejidos neuronales en el cerebro y la retina se liberan localmente en respuesta a condiciones de estrés neuronal y se convierten enzimáticamente en elovanoides que proporcionan neuroprotección localizada para asegurar la supervivencia neuronal.

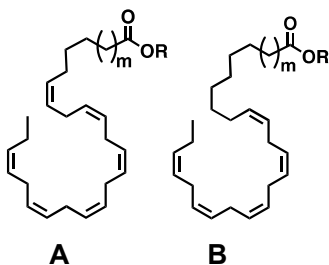
La senescencia celular relacionada con la edad se puede suprimir de manera eficaz al proporcionar determinados compuestos relacionados con VLC-PUFA n3 y sus correspondientes elovanoides (ELV). Por consiguiente, la divulgación está relacionada con la prevención y el tratamiento de afecciones que afectan la salud y enfermedades y afecciones relacionadas con la edad. En particular, la divulgación proporciona compuestos, composiciones y métodos que protegen y previenen de lesiones que amenazan la función y la integridad de los tejidos y órganos vitales, previenen el envejecimiento acelerado y retrasan la senescencia celular.

La presente divulgación proporciona compuestos, composiciones y métodos que pueden favorecer la protección, prevención y el tratamiento de alteraciones en muchos órganos desencadenadas por inflamación, lesión o traumatismo persistentes. Por ejemplo, la presente divulgación proporciona compuestos, composiciones y métodos que pueden favorecer la protección, prevención y el tratamiento de alteraciones de la superficie ocular, como queratoconjuntivitis seca y afecciones inflamatorias de la superficie ocular.

Por consiguiente, un aspecto de la divulgación abarca modalidades de una composición que comprende al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga omega-3 que tiene al menos 23 átomos de carbono en su cadena carbonada.

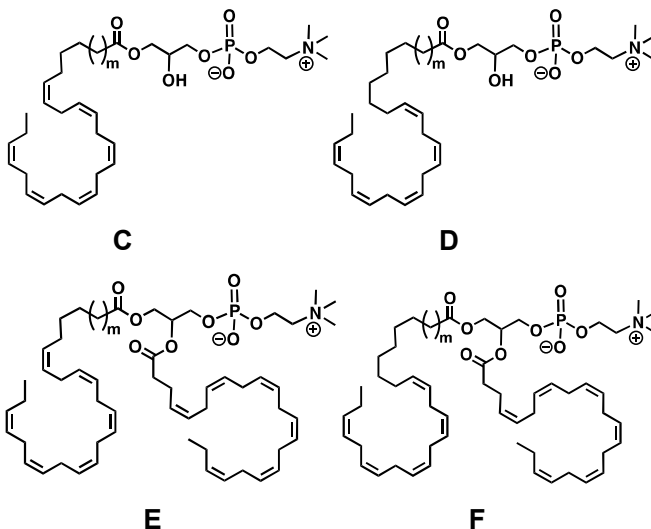
En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición comprende al menos un VLC-PUFA n3 que tiene al menos 23 átomos de carbono en su cadena carbonada, en donde el VLC-PUFA n3 puede estar en forma de un ácido carboxílico, éster carboxílico, sal de carboxilato o derivado de fosfolípidos.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el compuesto de VLC-PUFA n3 puede seleccionarse del grupo que consiste en las fórmulas **A** o **B**:



en donde: m puede ser de 0 a 19 y -CO-OR puede ser un grupo de ácido carboxílico, o una sal o un éster de este, y en donde: si -CO-OR puede ser un grupo de ácido carboxílico y el compuesto **A** o **B** puede ser una sal de este, el catión de la sal puede ser un catión farmacéuticamente aceptable, y si -CO-OR puede ser un éster, R puede ser un grupo alquilo.

En algunas de otras modalidades, la divulgación, el compuesto de VLC-PUFA n3 puede estar en forma de un fosfolípido seleccionado del grupo que consiste en las fórmulas **C**, **D**, **E** o **F**, en donde m puede ser de 0 a 19:



En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable y formulada para la administración de una cantidad del al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga omega-3 eficaz para reducir un proceso patológico de un tejido de un sujeto receptor o la aparición de un proceso patológico de un tejido de un sujeto receptor.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el proceso patológico puede ser el envejecimiento o la inflamación de un tejido del sujeto receptor.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede formularse para administración tópica del al menos un tejido de ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga a la piel de un sujeto receptor.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el proceso patológico puede ser de un tejido nervioso del sujeto receptor.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender además al menos un componente nutricional, y la composición puede formularse para la administración oral o parenteral del al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga a un sujeto receptor.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga omega 3 puede tener de aproximadamente 26 a aproximadamente 42 átomos de carbono en su cadena carbonada.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga omega 3 puede tener 32 o 34 átomos de carbono en su cadena carbonada.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga omega 3 puede tener en su cadena carbonada cinco o seis dobles enlaces alternos con geometría *cis*.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga omega 3 es ácido 14Z,17Z,20Z,23Z,26Z,29Z)-dotriaconta-14,17,20,23,26,29-hexaenoico o ácido (16Z,19Z,22Z,25Z,28Z,31Z)-tetratriaconta-16,19,22,25,28,31-hexaenoico.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga omega 3 puede ser ácido 14Z,17Z,20Z,23Z,26Z,29Z)-dotriaconta-14,17,20,23,26,29-hexaenoico o ácido (16Z,19Z,22Z,25Z,28Z,31Z)-tetratriaconta-16,19,22,25,28,31-hexaenoico.

Otro aspecto de la divulgación abarca modalidades de una composición que comprende al menos un elovanoide que tiene al menos 23 átomos de carbono en su cadena carbonada.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable y puede formularse para la administración de una cantidad del al menos un elovanoide eficaz para reducir un proceso patológico de un tejido de un sujeto receptor o para retrasar al menos un efecto del envejecimiento en un tejido de un sujeto receptor.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el proceso patológico puede ser el envejecimiento o la inflamación de un tejido del sujeto receptor.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede formularse para administración tópica del al menos un elovanoide a la piel de un sujeto receptor.

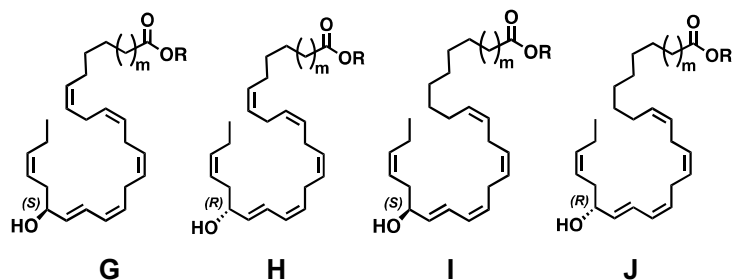
En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el proceso patológico puede ser de un tejido nervioso del sujeto receptor.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender además al menos un componente nutricional, y la composición puede formularse para la administración oral o parenteral del al menos un elovanoide a un sujeto receptor.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el al menos un elovanoide puede seleccionarse del grupo que consiste en: un elovanoide monohidroxiado, un elovanoide dihidroxiado, un elovanoide alquinilo monohidroxiado y un elovanoide alquinilo dihidroxiado, o cualquier combinación de estos.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el al menos un elovanoide puede ser una combinación de elovanoides, en donde la combinación se selecciona del grupo que consiste en: un elovanoide monohidroxiado y un elovanoide dihidroxiado; un elovanoide monohidroxiado y un elovanoide alquinilo monohidroxiado; un elovanoide monohidroxiado y un elovanoide alquinilo dihidroxiado; un elovanoide dihidroxiado y un elovanoide alquinilo monohidroxiado; un elovanoide dihidroxiado y un elovanoide alquinilo dihidroxiado; un elovanoide monohidroxiado, un elovanoide dihidroxiado y un elovanoide alquinilo monohidroxiado; un elovanoide monohidroxiado, un elovanoide dihidroxiado y un elovanoide alquinilo dihidroxiado; y un elovanoide monohidroxiado, un elovanoide dihidroxiado y un elovanoide alquinilo monohidroxiado un elovanoide alquinilo dihidroxiado, en donde cada elovanoide es independientemente una mezcla racémica, un enantiómero aislado o una combinación de enantiómeros en donde la cantidad de un enantiómero mayor que la cantidad de otro enantiómero; y en donde cada elovanoide es independientemente una mezcla diastereomérica, un diastereómero aislado o una combinación de diastereómeros en donde la cantidad de un diastereómero es mayor que la cantidad de otro diastereómero.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el elovanoide monohidroxiado puede seleccionarse del grupo que consiste en las fórmulas **G**, **H**, **I** o **J**:



en donde: m puede ser de 0 a 19 y -CO-OR puede ser un grupo de ácido carboxílico, o una sal o un éster de este, y en donde: si -CO-OR puede ser un grupo de ácido carboxílico y el compuesto **G**, **H**, **I** o **J** puede ser una sal de este, el catión de la sal puede ser un catión farmacéuticamente aceptable, y si -CO-OR puede ser un éster, R puede ser un grupo alquilo.

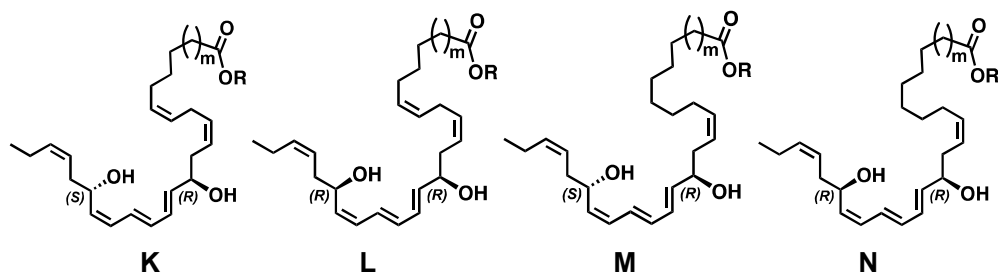
En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender cantidades equimolares de los enantiómeros **G** y **H** en donde los enantiómeros tienen quiralidad (S) o (R) en el carbono n-6 que tiene el grupo hidroxilo.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender cantidades de los enantiómeros **I** y **J** en donde los enantiómeros tienen quiralidad (S) o (R) en el carbono n-6 que tiene el grupo hidroxilo.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender uno de los enantiómeros de **G** o **H** en una cantidad que supera la cantidad del otro enantiómero de **G** o **H**.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender uno de los enantiómeros de **I** o **J** en una cantidad que supera la cantidad del otro enantiómero de **I** o **J**.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el elovanoide dihidroxilado puede seleccionarse del grupo que consiste en las fórmulas **K**, **L**, **M** y **N**:



en donde: m puede ser de 0 a 19 y -CO-OR puede ser un grupo de ácido carboxílico, o una sal o un éster de este, y en donde: si -CO-OR puede ser un grupo de ácido carboxílico y el compuesto **K**, **L**, **M** o **N** puede ser una sal de este, el catión de la sal puede ser un catión farmacéuticamente aceptable, y si -CO-OR puede ser un éster, R puede ser un grupo alquilo.

puede ser un grupo alquilo, y en donde: cada uno de los compuestos **K** y **L** tiene un total de 23 a 42 átomos de carbono en la cadena carbonada, con 4 dobles enlaces carbono-carbono en *cis* que comienzan en las posiciones n-3, n-7, n-15 y n-18, y 2 dobles enlaces carbono-carbono en *trans* que comienzan en las posiciones n-9 y n-11; y cada uno de los compuestos **M** y **N** tiene un total de 23 a 42 átomos de carbono en la cadena carbonada, con 3 dobles enlaces carbono-carbono en *cis* que comienzan en las posiciones n-3, n-7 y n-15; y 2 dobles enlaces carbono-carbono en *trans* que comienzan en las posiciones n-9 y n-11.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender una relación molar de diastereómeros **K** y **L** en donde los diastereómeros tienen o bien quiralidad (*S*) o (*R*) en la posición n-6, y quiralidad (*R*) en la posición n-13. En algunas modalidades, la composición puede comprender una relación molar de enantiómeros de **K** y **L**, donde los enantiómeros tienen tanto centros estereogénicos (*S*) como (*R*) en la posición n-6 y n-13. Por ejemplo, la relación molar de diastereómeros y/o enantiómeros puede ser una relación equimolar, de aproximadamente 1:1,1, aproximadamente 1:1,3, aproximadamente 1:1,5, aproximadamente 1:1,7, aproximadamente 1:2 o cualquier relación de estas.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender cantidades equimolares de uno o más diastereómeros **K** y **L** en donde los diastereómeros tienen o bien quiralidad (*S*) o (*R*) en la posición n-6, y o bien quiralidad (*S*) o (*R*) en la posición n-13.

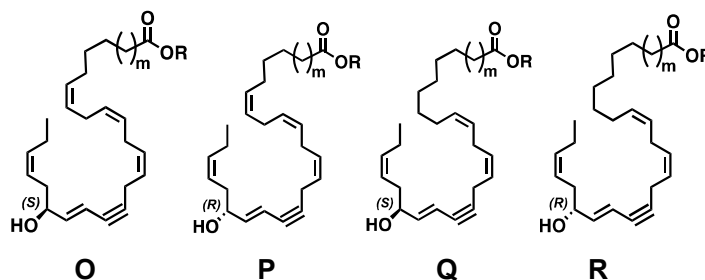
En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender uno de los diastereómeros de **K** o **L** en una cantidad que supera la cantidad de los otros diastereómeros de **K** o **L**.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender cantidades equimolares de diastereómeros **M** y **N** en donde los diastereómeros tienen o bien quiralidad (*S*) o (*R*) en la posición n-6, y quiralidad (*R*) en la posición n-13.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender cantidades equimolares de uno o más diastereómeros **M** y **N** en donde los diastereómeros tienen o bien quiralidad (*S*) o (*R*) en la posición n-6, y o bien quiralidad (*S*) o (*R*) en la posición n-13.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender uno de los diastereómeros de **M** o **N** en una cantidad que supera la cantidad de los otros diastereómeros de **M** o **N**.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el elovanoide alquinilo monohidroxilado puede seleccionarse del grupo que consiste en las fórmulas **O**, **P**, **Q** o **R**:



en donde: m puede ser de 0 a 19 y -CO-OR puede ser un grupo de ácido carboxílico, o una sal o un éster de este, y en donde: si -CO-OR puede ser un grupo de ácido carboxílico y el compuesto **O**, **P**, **Q** o **R** puede ser una sal de este, el catión de la sal puede ser un catión farmacéuticamente aceptable, y si -CO-OR puede ser un éster, R puede ser un grupo alquilo, y en donde: cada uno de los compuestos **O** y **P** tiene un total de 23 a 42 átomos de carbono en la cadena carbonada, con 4 dobles enlaces carbono-carbono en *cis* ubicados en las posiciones que comienzan en n-3, n-12, n-15 y n-18; con un doble enlace carbono-carbono en *trans* en la posición que comienza en n-7, y un triple enlace carbono-carbono que comienza en la posición n-9; y cada uno de los compuestos **Q** y **R** tiene un total de 23 a 42 átomos de carbono en la cadena carbonada, con 3 dobles enlaces carbono-carbono en *cis* que comienzan en las posiciones n-3, n-12 y n-15, con un doble enlace carbono-carbono en *trans* en la posición que comienza en n-7, y un triple enlace carbono-carbono que comienza en la posición n-9.

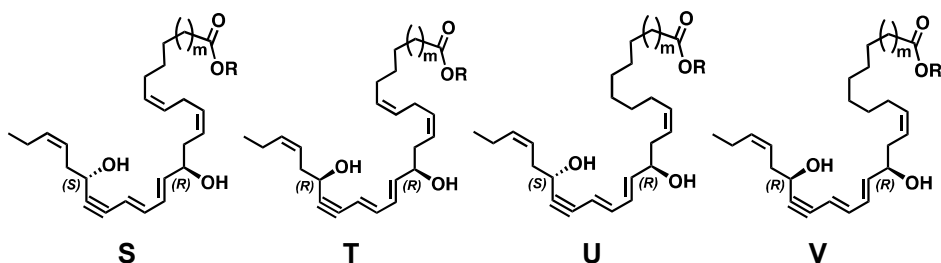
En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender cantidades equimolares de los enantiómeros **O** y **P** en donde los enantiómeros tienen quiralidad (*S*) o (*R*) en el carbono n-6 que tiene el grupo hidroxilo.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender cantidades equimolares de los enantiómeros **Q** y **R** en donde los enantiómeros tienen quiralidad (*S*) o (*R*) en el carbono n-6 que tiene el grupo hidroxilo.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender uno de los enantiómeros de **O** o **P** en una cantidad que supera la cantidad del otro enantiómero de **O** o **P**.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender uno de los enantiómeros de **Q** o **R** en una cantidad que supera la cantidad del otro enantiómero de **Q** o **R**.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el elovanoide puede ser un elovanoide alquinilo dihidroxilado seleccionado del grupo que consiste en las fórmulas **S**, **T**, **U** o **V**:



en donde: m puede ser de 0 a 19 y -CO-OR puede ser un grupo de ácido carboxílico, o una sal o un éster de este, y en donde: si -CO-OR puede ser un grupo de ácido carboxílico y el compuesto **S**, **T**, **U** o **V** puede ser una sal de este, el catión de la sal puede ser un catión farmacéuticamente aceptable, y si -CO-OR puede ser un éster, R puede ser un grupo alquilo, y en donde: cada uno de los compuestos **S** y **T** tiene un total de 23 a 42 átomos de carbono en la cadena carbonada, con 3 dobles enlaces carbono-carbono en *cis* ubicados en las posiciones que comienzan en n-3, n-15 y n-18, con 2 dobles enlaces carbono-carbono en *trans* ubicados en las posiciones que comienzan en n-9 y n-11, y un triple enlace carbono-carbono que comienza en la posición n-7; y cada uno de los compuestos **U** y **V** tiene un total de 23 a 42 átomos de carbono en la cadena carbonada, con 2 dobles enlaces carbono-carbono en *cis* que comienzan en las posiciones n-3 y n-15, con 2 dobles enlaces carbono-carbono en *trans* ubicados en las posiciones que comienzan en n-9, n-11, y un triple enlace carbono-carbono que comienza en la posición n-7.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender cantidades equimolares de diastereómeros **S** y **T** en donde los diastereómeros tienen o bien quiralidad (S) o (R) en la posición n-6, y quiralidad (R) en la posición n-13.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender cantidades equimolares de uno o más diastereómeros **S** y **T** en donde los diastereómeros tienen o bien quiralidad (S) o (R) en la posición n-6, y o bien quiralidad (S) o (R) en la posición n-13.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender uno de los diastereómeros de **S** o **T** en una cantidad que supera la cantidad de los otros diastereómeros de **S** o **T**.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender cantidades equimolares de diastereómeros **U** y **V** en donde los diastereómeros tienen o bien quiralidad (*S*) o (*R*) en la posición n-6, y quiralidad (*R*) en la posición n-13.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender cantidades equimolares de uno o más diastereómeros **U** y **V** en donde los diastereómeros tienen o bien quiralidad (*S*) o (*R*) en la posición n-6, y o bien quiralidad (*S*) o (*R*) en la posición n-13.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender uno de los diastereómeros de **U** o **V** en una cantidad que supera la cantidad de los otros diastereómeros de **U** o **V**.

En determinadas modalidades ventajosas, la divulgación proporciona cantidades eficaces de al menos un compuesto proporcionado y/o una composición proporcionada con el fin de llevar a cabo potentes acciones neuroprotectoras, protectoras de tejidos y neurorrestauradoras, que son adecuadas para la neuroprotección, protección de órganos y protección de tejidos.

En otras modalidades, la divulgación proporciona compuestos y composiciones dermatológicas o cosméticas para la protección, prevención o el tratamiento eficaz de la piel que dañada por la luz solar u otras causas o afectada por el envejecimiento de la piel. Los compuestos, composiciones y métodos proporcionados inducen la supervivencia y la función normal de las células de la piel, protegen la piel, mejoran la salud y el aspecto de la piel y retrasan el envejecimiento de la piel.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

El expediente de la patente o solicitud contiene al menos un dibujo a color. La Oficina proporcionará copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujo(s) a color según se le solicite y previo pago de la tarifa necesaria.

La presente divulgación se centra en compuestos, composiciones y métodos para aplicaciones en enfermedades oculares, enfermedades inflamatorias, dermatopatías, enfermedades de la retina, enfermedades cardiovasculares, enfermedades gastrointestinales/hepáticas y encefalopatías. Por ejemplo, la presente divulgación proporciona compuestos, composiciones y métodos que pueden favorecer la protección, prevención y el tratamiento de alteraciones de la superficie ocular, como

queratoconjuntivitis seca y afecciones inflamatorias de la superficie ocular. Las estructuras únicas, la biosíntesis y las funciones de los compuestos y composiciones proporcionados se estudiaron inicialmente en el cerebro y la retina, según se resume en las siguientes figuras. Se observarán fácilmente aspectos adicionales de la presente divulgación al analizar la descripción detallada de sus diversas modalidades, descritas a continuación, junto con los dibujos adjuntos.

La Fig. 1 es un esquema que ilustra la biosíntesis planteada de elovanoides (ELV) a partir de ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga omega-3 (n-3 o n3) (VLC-PUFA n3).

La Fig. 2 es un esquema que ilustra la biosíntesis planteada de VLC-PUFA n3.

Las Figs. 3A-3K ilustran la generación y caracterización estructural de elovanoides ELV-N32 y ELV-N34 a partir de células primarias cultivadas del epitelio pigmentario de la retina (RPE) humana.

La Fig. 3A es un esquema que ilustra la síntesis de ELV-N32 y ELV-N34 a partir de intermedios (**1**, **2** y **3**), cada uno de los cuales se preparó en forma estereoquímicamente pura. La estereoquímica de los intermedios **2** y **3** se definió previamente mediante el uso de productos de partida de epóxidos enantioméricamente puros. Los ELV finales (**4**) se ensamblaron mediante acoplamientos iterativos de los intermedios **1**, **2** y **3**, y se aislaron como ésteres metílicos (Me) o sales de sodio (Na).

La Fig. 3B ilustra el perfil de elución de C32:6n3, monohidroxi-C32:6n3 endógeno y ELV-N32 mostrados con el patrón de ELV-N32. La MRM de ELV-N32 muestra dos picos grandes eluidos antes que el pico en el que se eluye el patrón de ELV-N32, que muestran los mismos patrones de fragmentación (que se muestran en el espectro de la inserción de la gráfica), lo que indica que son isómeros.

La Fig. 3C ilustra el cromatograma para barridos de iones producto completos para ELV-N32 y ELV-N34.

La Fig. 3D ilustra el patrón de fragmentación de ELV-N32.

La Fig. 3E ilustra el perfil de elución de C34:6n3 y ELV-N34.

La Fig. 3F ilustra que el espectro UV de ELV-N34 endógeno muestra características de trieno análogas a NPD1, con $\lambda_{\text{máx}}$ a 275 nm y hombros a 268 y 285 nm.

La Fig. 3G ilustra el patrón de fragmentación de ELV-N32.

La Fig. 3H ilustra los espectros de fragmentación completos de ELV-N32 endógeno.

La Fig. 3I ilustra que el patrón de ELV-N32 muestra que todos los picos principales del patrón coinciden con los picos endógenos. Sin embargo, el ELV-N32 endógeno tiene más fragmentos que no aparecen en el patrón, lo que indica que incluye diferentes isómeros.

La Fig. 3J ilustra que los espectros de fragmentación completos de los picos de ELV-N34 endógeno coinciden con el patrón de ELV-N34.

La Fig. 3K ilustra la existencia de isómeros de ELV-N34.

Las Figs. 4A-4K ilustran la caracterización estructural de elovanoides ELV-N32 y ELV-N34 a partir de cultivos de células neuronales. Se incubaron células neuronales mixtas de la corteza cerebral con 10 μ M de 32:6n3 y 34:6n3 cada una en condiciones de OGD.

La Fig. 4A es un esquema que ilustra la síntesis de ELV-N32 y ELV-N34 a partir de intermedios (**a**, **b** y **c**), cada uno de los cuales se preparó en forma estereoquímicamente pura. La estereoquímica de los intermedios **b** y **c** se definió previamente mediante el uso de productos de partida de epóxidos enantioméricamente puros. Los ELV finales (**d**) se ensamblaron mediante acoplamientos iterativos de los intermedios **a**, **b** y **c**, y se aislaron como ésteres metílicos (Me) o sales de sodio (Na).

La Fig. 4B ilustra el patrón de 32:6n3, monohidroxi-32:6 endógeno, ELV-N32 y ELV-N32 en la inserción de la gráfica. La MRM de ELV-N32 muestra dos picos grandes eluidos antes que el pico en el que se eluye el patrón de ELV-N32, pero muestran los mismos patrones de fragmentación, lo que indica que son isómeros.

La Fig. 4C ilustra las mismas características que la Fig. 4A, se mostraron en 34:6n3 y ELV-N34.

La Fig. 4D ilustra que el espectro UV de ELV-N32 endógeno muestra características de trieno, pero estas no son claras con esta concentración.

La Fig. 4E ilustra los espectros de fragmentación completos de ELV-N32 endógeno.

La Fig. 4F ilustra que el espectro UV de ELV-N34 endógeno muestra características de trieno análogas a NPD1, con $\lambda_{\text{máx}}$ a 275 nm y hombros a 268 y 285 nm.

La Fig. 4G ilustra el patrón de fragmentación de ELV-N34 endógeno.

La Fig. 4H ilustra el patrón de fragmentación completo de ELV-N32 endógeno.

La Fig. 4I ilustra que el patrón de ELV-N34 muestra que todos los picos principales del patrón coinciden con los picos endógenos, pero no coinciden

perfectamente; el ELV-N34 endógeno tiene más fragmentos que no aparecen en el patrón, lo que indica que puede contener isómeros.

La Fig. 4J ilustra los espectros de fragmentación completos de ELV-N34; los picos de ELV-N34 endógeno coinciden con el patrón de ELV-N34

La Fig. 4K ilustra la existencia indicada de isómeros de ELV-N34.

La Fig. 5A y 5B ilustran la detección de ELV-N32 y ELV-N34 en cultivos de células neuronales. Se incubaron células con 5 μ M de C32:6n3 y C34:6n3 cada una, en condiciones de OGD.

La Fig. 5A ilustra el VLC-PUFA C32:6n3, 27-hidroxi-32:6n3 endógeno, 27,33-dihidroxi-32:6n3 endógeno (ELV-N32) y ELV-N32 sintético preparado en forma estereoquímica pura mediante síntesis orgánica total estereocontrolada. La MRM de ELV-N32 endógeno coincide bien con la MRM del patrón de ELV-N32 sintético.

La Fig. 5B ilustra las mismas características que en la Fig. 5A se muestran en C34:6n3 y ELV-N34, con más picos en las MRM de ELV-N34, lo que implica posibles isómeros.

La Fig. 6A ilustra imágenes confocales de inmunotinción de células primarias del RPE humana mediante el uso de marcadores específicos ZO-1 (zona occludens-1), RPE65, MITF (factor de transcripción asociado a microftalmia) y β -catenina.

La Fig. 6B ilustra imágenes de microscopía óptica que representan la morfología de células primarias del RPE humana en diferentes pases en cultivo. Barras de aumento, 50 μ m.

Las Figs. 7A-7L ilustran la citoprotección de 32:6n3 y 34:6n3 en células del RPE humana sometidas a UOS.

La Fig. 7A ilustra la actividad antiapoptótica en función de la concentración de C32:6n3 y C34:6n3 en células del RPE humana (células ARPE-19). Las células ARPE-19 confluentes (80 %) en placas de 12 pocillos se privaron de suero durante 8 h, se indujo UOS y a continuación se pusieron a prueba con 50-500 nM de ácidos libres C32:6n3 o 34:6n3 durante 16 h. Se recolectaron las células tratadas y se detectaron células picnóticas positivas para Hoechst. Los datos son promedios de los recuentos de 15 pocillos de células picnóticas positivas para Hoechst de tres experimentos independientes.

La Fig. 7B ilustra la comparación de la citoprotección de DHA (100 nM) con 32:6n3 y 34:6n3 (250 nM cada uno) durante 16 h. Se introdujo UOS en células ARPE-19 privadas de suero y se detectó muerte celular apoptótica según se describe en la Fig. 7A. Los resultados son promedios de los tres experimentos independientes.

La Fig. 7C ilustra el aumento regulado de SIRT1 por C32:6n3 y C34:6n3 en RPE sometidas a UOS. El efecto de PD146176, un inhibidor de 15-LOX-1 en C32:6n3 y C34:6n3 provocó un aumento regulado de SIRT1 en RPE sometidas a UOS. Los resultados son los promedios de tres experimentos independientes (9 pocillos para cada experimento) a menos que se indique lo contrario.

La Fig. 7D ilustra que el inhibidor de 15-LOX-1 PD146176 atenúa el aumento regulado de Iduna causado por C32:6n3 o C34:6n3 en células del RPE sometidas a UOS.

La Fig. 7E-7I ilustra el efecto de C32:6n3 o C34:6n3 en proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas en células ARPE-19 sometidas a UOS. Detección por inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) del efecto de C32:6n3 y C34:6n3 en el aumento y el descenso regulados de las proteínas anteriores en células ARPE-19 sometidas a UOS.

La Fig. 7E ilustra el efecto de C32:6n3 o C34:6n3 en la proteína antiapoptótica Bcl-2.

La Fig. 7F ilustra el efecto de C32:6n3 o C34:6n3 en la proteína antiapoptótica Bc-xL.

La Fig. 7G ilustra el efecto de C32:6n3 o C34:6n3 en la proteína proapoptótica Bax.

La Fig. 7H ilustra el efecto de C32:6n3 o C34:6n3 en la proteína proapoptótica Bim.

La Fig. 7I ilustra el efecto de C32:6n3 o C34:6n3 en la proteína proapoptótica Bid.

La Fig. 7J ilustra el aumento regulado en función de la concentración (100 y 250 nM) de prohibitina (tipo 1) por C32:6n3 y C34:6n3 en células del RPE sometidas a UOS.

La Fig. 7K ilustra los efectos de NPD1 (200 nM), C32:6n3 o C34:6n3 (3 μ M) en la supervivencia de células primarias del RPE humana.

La Fig. 7L ilustra la citoprotección de C32:6n3 o C34:6n3 en células primarias del RPE humana en presencia de 10 μ M de PD146176. Barras de error, SEM; * $p < 0,05$.

La Fig. 8A (paneles a-d) ilustra que los VLC-PUFA 32:6n3 y 34:6n3 atenúan la muerte celular de células primarias del RPE humana causada por estrés oxidativo no compensado (UOS). Panel a: células del RPE sin tratar (control); panel b: células del RPE con UOS durante 16 h; panel c: células del RPE con UOS durante 16 h + 32:6n3; panel d: células del RPE con UOS durante 16 h + 34:6n3. Cuando se añadió 32:6n3 o

34:6n3, se evitó la muerte celular (paneles c y d). Los campos típicos de cultivos celulares están representados en la imagen de la derecha en cada panel. Los núcleos están marcados con tinción con Hoechst y están resaltadas las células muertas. Estos se separaron mediante el uso de un algoritmo de umbral de intensidad y se contaron mediante el uso de un macro Image J (columna de la izquierda).

La Fig. 8B ilustra que la cuantificación de células vivas (células de control) y muertas (células UOS) tuvo como base el tamaño del núcleo. Barras de error, SEM; * $p < 0,05$.

La Fig. 8C ilustra que cuando se añadió 32:6n3 o 34:6n3, se evitó la muerte celular.

Las Figs. 9A-9C ilustran que un inhibidor de 15-LOX-1 no modifica la citoprotección contra el UOS con 32:6n3 y 34:6n3 como mediadores en células primarias del RPE humana. Se incubaron células primarias del RPE humana privadas de suero (Fig. 9A, paneles a y b) y con suero bajo (Fig. 9A, paneles c y d) con el inhibidor de 15-lipoxigenasa-1 (15-LOX-1) (10 micromolar, PD146176) durante 1 h, a continuación se sometieron a estrés oxidativo (H_2O_2 /TNF α) durante 16 h para provocar la apoptosis (Fig. 9A, paneles a-d, Fig. 9C).

La adición de 32:6n3 y 34:6n3 protegió a las células del RPE humana (Fig. 9A, paneles b y d, Fig. 9C) de la muerte celular. Los campos típicos de cultivos celulares están representados en la Fig. 9A, paneles a-d, columna de la derecha. Los núcleos están marcados con tinción con Hoechst y están resaltadas las células muertas. Estos se separaron mediante el uso de un algoritmo de umbral de intensidad y se contaron mediante el uso de un macro Image J (Fig. 9A, paneles a-d, columna de la izquierda).

La Fig. 9B ilustra que la cuantificación de células vivas (células de control) y muertas (células UOS) tuvo como base el tamaño del núcleo. Barras de error, SEM; * $p < 0,05$.

Las Figs. 10A-10H ilustran que ELV-N32 y ELV-N34 mejoran la abundancia de proteínas prohomeostáticas y disminuyen la abundancia de proteínas que dañan las células en células del RPE sometidas a UOS.

La Fig. 10A ilustra el aumento regulado en función de la concentración (100 y 250 nM) de SIRT1 en células ARPE-19 sometidas a UOS. Los resultados son los promedios de tres experimentos independientes.

La Fig. 10B ilustra el efecto de PD146176 en el aumento regulado de Iduna causado por ELV-N32 y ELV-N34 en células del RPE sometidas a UOS.

La Fig. 10C ilustra las capacidades citoprotectoras de ELV-N32 y ELV-N34 en células del RPE sometidas a UOS. Efecto de los inhibidores de lipoxigenasa en la inhibición de la apoptosis.

La Fig. 10D ilustra el efecto de ELV-N32 Na o ELV-N32 Me en las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-xL y la proteína proapoptótica Bax en células ARPE-19 sometidas a UOS.

La Fig. 10E ilustra una comparación del efecto de ELV-N32 Na o ELV-N32 Me y ELV-N34 Na o ELV-N34 Me en la inducción de la proteína proapoptótica Bim (e) en RPE sometidas a UOS.

La Fig. 10F ilustra una comparación del efecto de ELV-N32 Na o ELV-N32 Me y ELV-N34 Na o ELV-N34 Me en la inducción de la proteína proapoptótica Bid (f) en RPE sometidas a UOS.

La Fig. 10G ilustra la reducción en función de la concentración (50, 100, 250 y 500 nM) de la apoptosis causada por UOS por ELV-N32 Na o ELV-N34 Me en células ARPE-19.

La Fig. 10H ilustra que el aumento regulado de prohibitina (tipo 1) por ELV-N32 o ELV-N34 en células ARPE-19 sometidas a UOS depende de la concentración (100 y 250 nM). Barras de error, SEM; * $p < 0,05$.

Las Figs. 11A-11D ilustran que la ablación genética del receptor de adiponectina 1 conduce a la disminución de los VLC-PUFA y de sus derivados en la retina.

La Fig. 11A ilustra que el DHA de la dieta, o el derivado del 18:3n3 de la dieta, es suministrado por el hígado y capturado por el AdipoR1, seguido por elongación en el segmento interno del PRC por ELOVL4 hasta VLC-PUFA e incorporación en especies moleculares de fosfatidilcolina, que también contiene DHA. Durante la renovación diaria del segmento externo del PRC, estas especies moleculares de fosfatidilcolina interactúan con la rodopsina y, después de la eliminación y la fagocitosis, pasan a formar parte de las células del RPE. El UOS u otros disruptores de la homeostasis desencadenan la liberación de los VLC-PUFA. C32:6n3 y C34:6n3 se representan como generadoras de formas hidropoxi y, a continuación, ELV-N32 o ELV-N34, respectivamente.

La Fig. 11B ilustra que el tamaño de la mezcla de C32:6n3 libre en las retinas de ratones con genes inactivados (KO) para AdipoR1 se reduce en comparación con los WT. La inserción de la gráfica 1 muestra ELV-N32 en KO y genéticamente intactos (WT); la inserción de la gráfica 2 muestra monohidroxi 32:6n3, el derivado estable del precursor hidropoxi de ELV-N32, en WT y falta de señal detectable en KO.

La Fig. 11C ilustra que el tamaño de la mezcla similar de 34:6n3 libre en las retinas de ratones KO para AdipoR1 se reduce en comparación con los WT. La inserción de la gráfica 1 muestra ELV-N32 en KO y WT; la inserción 2 muestra monohidroxi C34:6n3, el derivado estable del precursor hidroperoxi de ELV-N34, en WT y falta de señal detectable en KO.

La Fig. 11D ilustra que las células del RPE mantienen la integridad funcional del PRC (izquierda); a la derecha, la ablación del receptor de adiponectina 1 (AdipoR1) desactiva la disponibilidad de DHA y se produce degeneración del PRC.

Las Figs. 12A y 12B ilustran que los elovanoides de la divulgación tienen una función en la neuroprotección y en el mantenimiento de la integridad de las células fotorreceptoras en las degeneraciones retinianas.

La Fig. 12A ilustra que la vía de elovanoides se reduce en las células madre pluripotentes iPSC-RPE derivadas de una familia afectada por la degeneración retiniana de inicio tardío (L-ORD). Esta enfermedad se debe a una mutación (S163R) en CTRP5. Se utilizaron células madre pluripotentes (iPSC) diferenciadas en células del epitelio pigmentario de la retina (RPE) de pacientes con L-ORD y hermanos sin la afección. Las células se incubaron en medio sin suero y se alimentaron con aproximadamente 5 segmentos externos de fotorreceptores (POS)/célula durante 4 h para dar lugar a la eliminación y la fagocitosis del disco o se incubaron con 1 μ M de ácidos grasos libres (VLC-PUFA) 32:6 y 34:6 durante 24 h en medio con suero al 0,5 %. Se adquirieron los medios y el lisado celular para el análisis metabolómico y lipidómico por LC-MS/MS. El análisis metabolómico y lipidómico mostró que las iPSC-RPE alimentadas con POS o VLC-PUFA secretan intermedios biosintéticos de elovanoides estables (27s-hidroxi 32:6 n-3 y 29s-hidroxi 34:6 n-3) de manera polarizada, predominantemente en el lado apical de las células. Las iPSC-RPE de control secretan significativamente más de los elovanoides ELV-N32 y ELV-N34, en comparación con los pacientes.

La Fig. 12B ilustra que en ausencia de POS o VLC-PUFA, aún se detectó 27s-hidroxi 32:6 n-3 en los controles, pero no en las iPSC-RPE de pacientes. Además, se encontró que el mediador de lípidos derivado de DHA, neuroprotectina D1 (NPD1), se secretaba significativamente más en los controles ($p < 0,05$). Debido a que la NPD1 y los elovanoides se derivan del mismo precursor de fosfolípidos, puede producirse un déficit en ambos mediadores de lípidos en la L-ORD.

Las Figs. 13A-13D ilustran un modelo *in vitro* de privación de oxígeno y glucosa (OGD) en neuronas corticales primarias. VLC-PUFA omega-3 y elovanoides son

liberados localmente en respuesta al estrés neuronal y brindan protección a las neuronas corticales expuestas a la privación de oxígeno y glucosa.

La Fig. 13A ilustra que el medio con OGD tiene más ácidos grasos libres (FA32:6 y FA34:6) liberados que el medio de control (sin OGD).

La Fig. 13B ilustra que se detecta 27-S-hidroxi 32:6 en medio con OGD (rojo), pero el medio de control tiene cantidades insignificantes de 27-S-hidroxi 32:6 (azul). Se muestran barridos de iones producto para ELV-N32 (en la inserción de la gráfica) que representan un posible pico de ELV-N32.

La Fig. 13C ilustra que se detecta 29-S-hidroxi 34:6 en medio con OGD, pero el medio de control tiene cantidades insignificantes de 29-S-hidroxi 34:6.

La Fig. 13D ilustra el patrón de fragmentación completo de 27-S-hidroxi 32:6 con valores teóricos de posibles moléculas hijas que coinciden bien.

Las Figs. 14A-14C ilustran que los elovanoides suprimen factores clave que aceleran el daño celular y la muerte celular (senescencia celular), lo que provoca el retraso de la muerte celular relacionada con la edad y enfermedades y afecciones relacionadas, lo que resulta en un aumento de la esperanza de vida humana.

La Fig. 14A ilustra que los elovanoides suprimen la activación de las vías de señalización de la senescencia.

La Fig. 14B ilustra que los elovanoides activan la autofagia al inducir la expresión de factores de autofagia (ATG3, ATG5, ATG7, beclina 1), lo que conduce a la depuración y eliminación autofágica de péptido A β oligomérico, lo que suprime la evolución de la senescencia celular. Hay más de 100 genes involucrados en el proceso autofágico. Los siguientes genes se encuentran elevados en la enfermedad AMD:

La Fig. 14C ilustra que los elovanoides reducen la expresión génica de factores proinflamatorios (CHF, IL-1 β) causados por el péptido A β oligomérico.

Las Figs. 15A-15L ilustran que los ELV-N32 y ELV-N34 provocan la protección de cultivos neuronales mixtos de la corteza cerebral expuestos a privación de oxígeno y glucosa (OGD) o excitotoxicidad por NMDA.

La Fig. 15A ilustra imágenes de campo claro (10X) de neuronas de la corteza cerebral y del hipocampo en cultivo que muestran morfología.

La Fig. 15B ilustra una imagen inmunofluorescente representativa de neuronas de la corteza cerebral en cultivo durante 12 días *in vitro* (DIV12) con tinción para tubulina β III, GFAP y Hoechst.

Las Figs. 15C y 15F ilustran neuronas de la corteza cerebral expuestas a excitotoxicidad por NMDA (50 μ M) (Fig. 15C) o a OGD (Fig. 15F) y la neuroprotección

provocada por ELV-N32-Na o ELV-N34-Me con una concentración (500 nM) determinada al fijar y teñir las células con Hoechst 33258. (**** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,05$, $n=9$, ANOVA unidireccional, seguido de prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

Las Figs. 15D y 15G ilustran un método de análisis de imágenes sin sesgos aplicado para el recuento de núcleos positivos para Hoechst y la distribución de frecuencias de núcleos picnóticos frente a no picnóticos en presencia de NMDA (Fig. 15D) u OGD (Fig. 15G) respectivamente.

Las Figs. 15E y 15H ilustran imágenes representativas que muestran el umbral y la exclusión por tamaño de núcleos positivos para Hoechst puestos a prueba con NMDA (Fig. 15E) o estrés por OGD (Fig. 15H) respectivamente.

Las Figs. 15I-15L ilustran la neuroprotección provocada por ELV-N32-Na o ELV-N34-Me determinada por el recuento de células positivas para calceína después de la exposición a NMDA (Figs. 15I y 15J) u OGD (Figs. 15K-15L).

Las Figs. 16A-16I ilustran que los ELV-N32 y ELV-N34 provocan la protección de cultivos neuronales mixtos de la corteza cerebral y del hipocampo expuestos a estrés oxidativo no compensado, privación de oxígeno y glucosa (OGD) o excitotoxicidad por NMDA.

La Fig. 16A ilustra la supervivencia celular determinada por un ensayo MTT después de exponer neuronas mixtas de la corteza cerebral en cultivo a excitotoxicidad por NMDA (100 μM) en presencia de antagonista no competitivo del receptor NMDA maleato (dizocilpina) MK801 (10 μM) o neuroprotectina D1 (NPD1) (100 nM) o ELV-N32-Na (200 nM) o ELV-N32-Me (200 nM). (# $p < 0,001$ $n=6$, ANOVA unidireccional, seguido de prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

Las Figs. 16B y 16C ilustran los efectos neuroprotectores de ELV-N32-Na o ELV-N32-Me con una concentración de 200 nM después de la exposición de las neuronas corticales o bien a estrés oxidativo no compensado por TNF α (10ng/mL) más H₂O₂ (50 μM , 100 μM o 200 μM) (Fig. 16B) o a excitotoxicidad por NMDA (25 μM , 50 μM o 100 μM) (Fig. 16C) respectivamente. La supervivencia celular se determinó mediante análisis de imágenes sin sesgos y recuento de núcleos positivos para Hoechst. (# $p < 0,0001$, and * $p < 0,05$, $n=9$, ANOVA unidireccional, seguido de prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

Las Figs. 16D y 16E ilustran la supervivencia celular determinada mediante tinción con Hoechst (Fig. 16D) y ensayo MTT (Fig. 16E) después de la exposición a OGD en presencia de ELV-N32-Na, ELV-N32-Me, ELV-N34-Na o ELV-N34-Me con una

concentración de 1 μ M. ($\#p<0,0001$, $**p<0,001$, y $*p<0,05$, $n=9$, ANOVA unidireccional, seguido de prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

Las Figs. 16F y 16G ilustran la neuroprotección determinada en neuronas del hipocampo (DIV 12) (Fig. 16F) o neuronas corticales en cultivo (DIV12) (Fig. 16G) después de estrés por OGD en presencia o ausencia de ELV-N32-Na o ELV-N34-Me con una concentración (de 500 nM) mediante recuento de células positivas para Hoechst. 32:6 o 34:6 cuando se añadieron con una concentración (de 500 nM) también mostraron neuroprotección.

Las Figs. 16H y 16I ilustran neuronas mixtas de la corteza cerebral en cultivo (DIV 28) expuestas o bien a NMDA (50 μ M) (Fig. 16H) o a OGD (Fig. 16I) en presencia o ausencia de ELV-N32-Na o ELV-N34-Na o 32:6 o 34:6 (500 nM) determinadas mediante tinción con Hoechst y recuento celular.

La Fig. 17 ilustra la supervivencia celular determinada mediante recuento de núcleos positivos para Hoechst y análisis de imágenes sin sesgos después de exponer las neuronas corticales en cultivo (DIV 12) a NMDA (50 μ M) (gráficas A-C) o a OGD (gráficas E-G), respectivamente, en presencia o bien de ELV-N32-Na o de ELV-N32-Me (500 nM). Resultados de tres experimentos independientes. ($\#p<0,0001$, $**p<0,001$ y $*p<0,05$, $n=9$, ANOVA unidireccional, seguido de prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

El 32:6 (250 nM) puede atenuar la excitotoxicidad por NMDA (gráfica D) y 34:6 (250 nM) provoca la neuroprotección de las neuronas corticales en cultivo (DIV 28) expuestas a OGD ($\#p<0,0001$, y $**p<0,001$) (gráfica H).

Las Figs. 18A-18I ilustran que los ELV-N32 y ELV-N34 provocan la protección de cultivos neuronales mixtos de la corteza cerebral o del hipocampo expuestos a privación de oxígeno y glucosa (OGD) o estrés oxidativo no compensado (UOS).

La Fig. 18A ilustra imágenes representativas de cultivos neuronales mixtos de la corteza cerebral (DIV 12) puestos a prueba con 90 min de OGD. Las células se fijaron y se tiñeron con Hoechst 33258 después de 12 h de tratamiento con ELV-N32 Na o ELV-N34 Me con una concentración (500 nM) y mostraron picnosis como resultado de la OGD y neuroprotección provocada por ELV-N32 Na o ELV-N34 Me.

La Fig. 18B ilustra un resumen de datos de la Fig. 18A ($***p<0,0001$ y $**p<0,001$, $n=9$, ANOVA unidireccional, seguido de prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

La Fig. 18C y 18D ilustran un método de análisis de imágenes sin sesgos aplicado para el recuento de núcleos positivos para Hoechst y el % de distribución de

frecuencias relativa de núcleos picnóticos frente a no picnóticos se muestra en presencia de OGD + ELV-N32 Na (Fig. 18C) u OGD + ELV-N34 Me (Fig. 18D) respectivamente. Al someterse a estrés por OGD, las células experimentaron picnosis, según muestra la desviación a la izquierda del pico nuclear. Tras el tratamiento o bien con ELV-N32 Na o con ELV-N34 Me, hubo una desviación positiva a la derecha hacia el pico de población nuclear de control, lo que indica que estos nuevos mediadores de lípidos provocaron la supervivencia celular. El límite de tamaño nuclear para definir núcleos picnóticos frente a no picnóticos está representado por líneas discontinuas negras y resaltado por un rectángulo.

La Fig. 18E ilustra la neuroprotección provocada por ELV-N32 Na o ELV-N34 Me determinada por el recuento de células positivas para calceína después de la exposición de cultivos neuronales mixtos de la corteza cerebral (DIV 12) puestos a prueba con 90 min de OGD ($***p<0,0001$, $n=3$, ANOVA unidireccional, seguido de prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

La Fig. 18F ilustra la supervivencia celular determinada por un ensayo MTT después de exponer cultivos neuronales mixtos de la corteza cerebral (DIV 12) puestos a prueba con 90 min de OGD seguido de tratamiento con ELV-N32 Me, ELV-N32 Na, ELV-N34 Me o ELV-N34 Na con una concentración de 1 μ M. ($\#p<0,0001$, $**p<0,001$, y $*p<0,05$, $n=9$, ANOVA unidireccional, seguido de prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

Las Figs. 18G ilustran la neuroprotección provocada por ELV-N32 Na, ELV-N34 Na, 32:6 o 34:6 determinada por análisis de imágenes sin sesgos seguido de recuento de núcleos positivos para Hoechst después de que un cultivo neuronal mixto del hipocampo (DIV 12) es sometido a estrés por OGD en presencia o ausencia de ELV-N32 Na o ELV-N34 Me con una concentración (de 500 nM).

La adición de 32:6 o 34:6 con una concentración (de 500 nM) también mostró que la neuroprotección ($\#p<0,0001$, $n=3$ ANOVA unidireccional, seguido de prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak) (Fig. 18G) o el cultivo neuronal mixto de la corteza cerebral (DIV 28) ($\#p<0,0001$, $**p<0,001$ y $*p<0,05$, $n=3$, ANOVA unidireccional, seguido de prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak) fueron sometidos respectivamente a 90 min de OGD.

La Fig. 18I ilustra la neuroprotección provocada por ELV-N32 Na o ELV-N34 Na con una concentración de 200 nM determinada por un análisis de imágenes sin sesgos después de un recuento de núcleos positivos para Hoechst después de que un cultivo neuronal mixto de la corteza cerebral (DIV 12) fue sometido a 12 h de estrés oxidativo

no compensado (UOS) causado por la adición de TNF α (10 ng/mL) y H₂O₂ (50 μ M, 100 μ M o 200 μ M) ($\#p<0,0001$ y $*p<0,001$, $n=9$ ANOVA unidireccional, seguido de prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

Las Figs. 19A-19H ilustran la protección causada por ELV-N32 y ELV-N34 de cultivos neuronales mixtos de la corteza cerebral expuestos a excitotoxicidad por NMDA.

La Fig. 19A ilustra imágenes representativas de cultivos neuronales mixtos de la corteza cerebral (DIV 12) sometidos a 12 h de excitotoxicidad por NMDA. Las células se fijaron y se tiñeron con Hoechst 33258 después de 12 h de tratamiento con ELV-N32 Na o ELV-N34 Me con una concentración (de 500 nM) junto con una concentración de NMDA (de 100 μ M), y mostraron picnosis como resultado de la excitotoxicidad por NMDA y neuroprotección provocada por ELV-N32 Na o ELV-N34 Me.

La Fig. 19B ilustra un resumen de datos de la (Fig. 19A) ($****p<0,0001$ y $**p<0,05$, $n=9$, ANOVA unidireccional, seguido de prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

Las Figs. 19C y 19D ilustran un método de análisis de imágenes sin sesgos aplicado para el recuento de núcleos positivos para Hoechst y el % de distribución de frecuencias relativa de núcleos picnóticos frente a no picnóticos en presencia de NMDA + ELV-N32 Na (Fig. 19C) o NMDA + ELV-N34 Me (Fig. 19D) respectivamente. Cuando las células fueron sometidas a excitotoxicidad por NMDA, experimentaron picnosis según muestra la desviación a la izquierda del pico nuclear. Tras el tratamiento o bien con ELV-N32 Na o con ELV-N34 Me, hubo una desviación positiva a la derecha hacia el pico de población nuclear de control, lo que indica que estos elovanoides provocaron la supervivencia celular. El límite de tamaño nuclear para definir núcleos picnóticos frente a no picnóticos está representado por líneas discontinuas y resaltado por un rectángulo.

La Fig. 19E ilustra la neuroprotección provocada por ELV-N32 Na o ELV-N34 Me determinada por el recuento de células positivas para calceína después de la exposición de cultivos neuronales mixtos de la corteza cerebral (DIV 12) puestos a prueba con 12 h con una concentración de NMDA (de 100 μ M) ($****p<0,0001$, $n=3$, ANOVA unidireccional, seguido de prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

La Fig. 19F ilustra la supervivencia celular determinada por un ensayo MTT después de exponer neuronas mixtas de la corteza cerebral en cultivo (DIV 12) a excitotoxicidad por NMDA (100 μ M) en presencia de antagonista no competitivo del receptor NMDA maleato (dizocilpina) MK801 (10 μ M) o ELV-N32 Na (200 nM) o ELV-

N32 Me (200 nM). ($\#p<0,001$ $n=6$, ANOVA unidireccional, seguido de prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

La Fig. 19G ilustra los efectos neuroprotectores de ELV-N32 Na o ELV-N32 Me con una concentración de 200 nM después de exponer neuronas mixtas de la corteza cerebral (DIV 12) a excitotoxicidad por NMDA (25 μ M, 50 μ M o 100 μ M). La supervivencia celular se determinó mediante análisis de imágenes sin sesgos y recuento de núcleos positivos para Hoechst. ($\#p<0,0001$, and $*p<0,05$, $n=9$, ANOVA unidireccional, seguido de prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

La Fig. 19H ilustra neuronas mixtas de la corteza cerebral en cultivo (DIV 28) expuestas a NMDA (50 μ M) en presencia o ausencia de ELV-N32 Na o ELV-N34 Na o 32:6 o 34:6 (500 nM) determinadas mediante tinción con Hoechst y recuento celular. ($\#p<0,0001$, $n=3$, ANOVA unidireccional, seguido de prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

Las Figs. 20A-20D ilustran que. ELV-N32 y ELV-N34 mejoran la puntuación neurológica/conductual, protegen la penumbra y reducen los volúmenes de lesiones según RMN después de un ataque cerebrovascular isquémico.

La Fig. 20A ilustra la puntuación neurológica total (puntuación normal=0, puntuación máxima=12) durante la MCAo (60 min) y en diferentes momentos después del tratamiento. A los 60 minutos de la MCAo, todos los animales tenían una puntuación de 11 (de un posible 12). Las ratas tratadas con elovanoides tuvieron puntuaciones neurológicas significativamente mejores en los días 1, 3 y 7 en comparación con el grupo tratado con vehículo (líquido cefalorraquídeo; CSF).

La Fig. 20B ilustra el núcleo isquémico, la penumbra y los volúmenes de lesiones totales, calculados a partir de T2WI el día 7, se redujeron significativamente mediante el tratamiento con elovanoides en comparación con el grupo tratado con vehículo.

Las Figs. 20C y 20D ilustran los volúmenes de infarto representativos de T2WI, pseudoimágenes, núcleo/penumbra (Fig. 20C) y (Fig. 20D) 3D calculados a partir de T2WI el día 7. El núcleo y la penumbra se extrajeron de todo el cerebro. Los tejidos del núcleo y de la penumbra se identificaron automáticamente en animales tratados con vehículo y con elovanoides mediante el método de RMN computacional de división jerárquica de regiones para la identificación de la penumbra. Se observaron hiperintensidades en T2 en el núcleo isquémico y en la penumbra de ratas tratadas con vehículo, compatibles con la formación de edema. Por el contrario, los animales tratados con elovanoides tenían lesiones de menor tamaño. Las reconstrucciones en 3D son del mismo animal en cada grupo el día 7. Los valores que se muestran son medias $\pm$ SD

(n=5-6 por grupo). * $p<0,05$, frente al grupo de CSF (ANOVA con medidas repetidas seguido de pruebas de Bonferroni).

Las Figs. 21A 20C ilustran que ELV-N32 y ELV-N34 atenúan el daño celular neuronal y en astrocitos causado por ataque cerebrovascular isquémico experimental.

Las Figs. 21A y 21B ilustran secciones cerebrales teñidas para NeuN, SMI-71 y GFAP representativas de todos los grupos. Las ratas tratadas con vehículo (líquido ceforraquídeo; CSF) mostraron gran pérdida neuronal, reducción de astrocitos reactivos a GFAP y vasos positivos para SMI-71. Por el contrario, el tratamiento con elovanoides aumentó las células positivas para NeuN, SMI-71 y GFAP.

La Fig. 21C ilustra el diagrama coronal del cerebro (bregma +1,2 mm) que muestra ubicaciones de regiones para los recuentos de células positivas para NeuN, SMI-71 y GFAP en la corteza (columnas a, b y c) y el cuerpo estriado (columna s). Cantidad de neuronas positivas para NeuN, vasos positivos para SMI y astrocitos positivos para GFAP, aumentados por el tratamiento con elovanoides en el núcleo isquémico (S) y en diferentes zonas de penumbra (a, b y c). Los valores que se muestran son medias $\pm$ SD (n=5-6 por grupo). *, significativamente diferente del vehículo ($p<0,05$; ANOVA con medidas repetidas seguido de pruebas de Bonferroni).

Las Figs. 22A-22D ilustran que ELV-N32 y ELV-N34 disminuyen la disrupción de la NVU y reducen el infarto cerebral después de un ataque cerebrovascular isquémico.

La Fig. 22A ilustra la degradación de la NVU determinada por inmunodetección de inmunoglobulina G (IgG) dentro del parénquima. La tinción de IgG indicó la degradación de la NVU. Las ratas tratadas con vehículo (líquido ceforraquídeo; CSF) mostraron un aumento en la inmunorreactividad de IgG en la corteza y en la subcorteza. El tratamiento con ELV-N34-Na o ELV-N34-Me mostró menos tinción de IgG en la corteza y se localizó principalmente en el núcleo del infarto (subcorteza).

La Fig. 22B ilustra gráficas de barras que muestran que ELV-N34-Na y ELV-N34-Me redujeron significativamente la inmunorreactividad de IgG en la corteza, en la subcorteza y en todo el hemisferio (total). Los valores que se muestran son medias $\pm$ SD (n=5-6 por grupo). * $p<0,05$, frente al grupo de vehículo (ANOVA con medidas repetidas seguido de pruebas de Bonferroni).

La Fig. 22C ilustra secciones cerebrales teñidas con Nissl de ratas tratadas con vehículo y elovanoides. Las ratas tratadas con vehículo muestran un gran infarto cortical y subcortical. Por el contrario, las ratas tratadas con elovanoides muestran un daño de menor extensión, principalmente en el área subcortical.

La Fig. 22D ilustra los volúmenes de infarto corregidos en la corteza, en la subcorteza y en el total. Todos los tratamientos con ELV redujeron drásticamente los volúmenes de infarto en la corteza, en la subcorteza y en el total en comparación con el grupo tratado con vehículo. Los valores que se muestran son medias $\pm$ SD (n=5-6 por grupo). *, significativamente diferente del vehículo ($p < 0,05$; ANOVA con medidas repetidas seguido de pruebas de Bonferroni).

Las Figs. 23A-23C ilustran que los elovanoides proporcionan neuroprotección y mejoran el déficit neurológico después de un traumatismo craneoencefálico (TBI). La puntuación neurológica total se redujo significativamente después del tratamiento con un éster metílico o sal de sodio elovanoide de 32 carbonos o 34 carbonos. Figs. 23A y 23C: administración mediante una inyección intravenosa; Fig. 23B: administración mediante inyección subdural. Las ratas SD se sometieron a un modelo de lesión por percusión de fluido (FPI) moderada y se trataron (1 μ g/por rata) con elovanoides de 32 y 34 carbonos como el éster metílico (ME) o la sal de sodio (Na) (ELV-N32-ME, ELV-N34-ME, ELV-32-Na-d2, ELV-N34-alquino) o de vehículo (líquido cefalorraquídeo; CSF). Los tratamientos se administraron en el espacio subdural 1 h después del TBI. Los animales tuvieron una evaluación neuroconductual (normal=0, déficit máximo=12) los días 1, 2, 3, 7 o 14. Todos los tratamientos con ELV mejoraron la puntuación neurológica a partir del día 1, lo que persistió durante un período de supervivencia de 2 semanas en comparación con los grupos tratados con CSF. Los valores que se muestran son medias $\pm$ SEM (n=6-8 por grupo) *significativamente diferentes del grupo de solución salina correspondiente ($P < 0,05$; ANOVA con medidas repetidas seguido de pruebas de Bonferroni). ELV-N34-alquino (IV, 300 μ g/por animal). Todos los animales tuvieron una evaluación neuroconductual (normal=0, déficit máximo=12) los días 1, 2, 3, 7 o 14.

La Fig. 24 ilustra el Esquema 1 para la síntesis total de los elovanoides monohidroxilados **G, H, I, J, O, P, Q, R**.

Reactivos y condiciones: (a) catecolborano, calor; (b) N-yodo succinimida, MeCN; (c) 4-clorobut-2-in-1-ol, Cs_2CO_3 , NaI, CuI, DMF; (d) CBr_4 , PPh_3 , CH_2Cl_2 , 0 °C; (e) etinil-trimetilsilano, CuI, NaI, K_2CO_3 , DMF; (f) cat. Lindlar, H_2 , EtOAc; (g) Na_2CO_3 , MeOH; (h) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, CuI, Et_3N ; (i) $^t\text{Bu}_4\text{NF}$, THF; (j) cat. Lindlar, H_2 , EtOAc o $\text{Zn}(\text{Cu}/\text{Ag})$, MeOH; (k) NaOH, THF, H_2O , a continuación acidificación con $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$; (l) NaOH, KOH o similares o amina, imina, etc.

La Fig. 25 ilustra el Esquema 2 para la síntesis total de los elovanoides dihidroxilados **K, L, S y T**.

Reactivos y condiciones: (a) CuI, NaI, K₂CO₃, DMF; (b) ácido canforsulfónico (CSA), CH₂Cl₂, MeOH, temp. amb.; (c) cat. Lindlar, H₂, EtOAc; (d) DMSO, (COCl)₂, Et₃N, -78 °C; (e) Ph₃P=CHCHO, PhMe, reflujo; (f) CHI₃, CrCl₂, THF, 0 °C; (g) cat. Pd(Ph₃)₄, CuI, PhH, temp. amb.; (h) ^tBu₄NF, THF, temp. amb.; (i) Zn(Cu/Ag), MeOH, 40 °C; (j) NaOH, THF, H₂O, a continuación acidificación con HCl/H₂O; (k) NaOH, KOH, etc. o amina, imina, etc.

La Fig. 26 ilustra el Esquema 3 para la síntesis total de los elovanoides dihidroxilados **M**, **N**, **U** y **V**.

Reactivos y condiciones: (a) cloruro cianúrico, Et₃N, acetona, temp. amb.; (b) (3-metiloxetan-3-il)metanol, piridina, CH₂Cl₂, 0 °C; (c) BF₃.OEt₂, CH₂Cl₂; (d) ⁿBuLi, BF₃.OEt₂, THF, -78 °C, a continuación **1**; (e) ^tBuPh₂SiCl, imidazol, DMAP, CH₂Cl₂, temp. amb.; (f) ácido canforsulfónico, CH₂Cl₂, ROH, temp. amb.; (g) cat. Lindlar, H₂, EtOAc; (h) DMSO, (COCl)₂, Et₃N, -78 °C; (i) Ph₃P=CHCHO, PhMe, reflujo; (j) CHI₃, CrCl₂, THF, 0 °C; (k) cat. Pd(Ph₃)₄, CuI, PhH, temp. amb.; (l) ^tBu₄NF, THF, temp. amb.; (m) Zn(Cu/Ag), MeOH, 40 °C; (n) NaOH, THF, H₂O, a continuación acidificación con HCl/H₂O; (o) NaOH, KOH, etc. o amina, imina, etc.

La Fig. 27 ilustra el Esquema 4 para la síntesis total de elovanoides dihidroxilados de 32 carbonos.

La Fig. 28 ilustra el Esquema 5 para la síntesis total de elovanoides dihidroxilados de 34 carbonos.

La Fig. 29 ilustra que la cicatrización de la herida corneal se aceleró con elovanoides 32 y 34 después de la quemadura alcalina. (A) Diseño del estudio, incluido el tipo de lesión, esquema de tratamiento con gotas oftálmicas tópicas y esquema de aislamiento de muestras/datos. (B) Áreas heridas representativas teñidas con azul de metileno después de 24 horas de lesión y tratamiento. (C) Porcentaje calculado de cierre de heridas por grupos de tratamiento con un único punto de datos como la córnea de un único ratón (* p <0,05 con comparación de prueba de la t de Student con el grupo de vehículo).

La Fig. 30 ilustra la supresión de la activación de IL-1β y SP después de la quemadura alcalina. La gráfica del análisis densitométrico de detección por inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) por capilares para IL-1β (A) y SP (B) los días 1, 2, 3, 5 y 12 después de la lesión. El control es una muestra de lágrima de ratón antes de la lesión. Los datos se mostraron como media ± SEM de 3 a 7 ratones (Gracias al uso del sistema de análisis de detección por inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) por capilares Jess, ahora podemos detectar IL-1β y SP a partir de un pequeño volumen de lágrimas de un único ratón).

La Fig. 31 ilustra que la infiltración de células inmunitarias se suprime mediante la administración de gotas oftálmicas tópicas de compuestos 32 y 34. (A) La imagen completa representativa de células positivas para F4/80 en la córnea. (B-D) Las imágenes representativas tomadas con mayor aumento para resaltar y cuantificar las células positivas para F4/80 (B), neutrófilos (C) y CD11b (D). (E-G) El cálculo de la cantidad de células a partir de imágenes tomadas en (B-D). Se mostró el diagrama de caja para la cuantificación celular en los días 5, 7 y 14 después de la lesión y tratamiento con vehículo, 32-N o 34-N por vía tópica. Cada punto de datos fue una única imagen tomada a partir de las córneas con inmunomarcaje completas (4-8 imágenes tomadas a partir de una córnea en la misma posición entre ratón y ratón). * $p < 0,05$, NS - No significativo, mediante el uso de comparación de prueba de la t de Student.

La Fig. 32 ilustra el VEGF-A secretado en las lágrimas del ratón después del daño por quemadura alcalina y del tratamiento. El VEGF-A secretado se evaluó mediante el uso de detección por inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) por capilares Jess. Después de la quemadura alcalina, se encontró un aumento significativo de VEGF en las lágrimas del ratón en la córnea tratada con vehículo y el VEGF alcanzó su punto máximo el día 2 después de la lesión. Por el contrario, la administración de gotas oftálmicas de compuesto 32 y 34 mostró un buen manejo de la secreción de VEGF donde este factor proangiogénico resultó estable en comparación con la muestra de lágrima de control. *, $p < 0,05$ mediante el uso de prueba de la t de Student con las córneas tratadas con vehículo en el mismo momento.

La Fig. 33 ilustra la imagen en bruto de la detección por inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) por capilares Jess para VEGF el día 1 después de la lesión. Hay 4 grupos: control, córneas tratadas con vehículo, córneas tratadas con 32 y córneas tratadas con 34. Hay 3 ratones en cada grupo.

La Fig. 34 ilustra la imagen en bruto de la detección por inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) por capilares Jess para VEGF el día 2 después de la lesión. Hay 3 grupos: córneas tratadas con vehículo, córneas tratadas con 32 y córneas tratadas con 34. Hay 4 ratones en cada grupo.

La Fig. 35 ilustra la imagen en bruto de la detección por inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) por capilares Jess para VEGF el día 3 después de la lesión. Hay 3 grupos: córneas tratadas con vehículo, córneas tratadas con 32 y córneas tratadas con 34. Hay 4 ratones en cada grupo.

La Fig. 36 ilustra la imagen en bruto de la detección por inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) por capilares Jess para VEGF el día 4

después de la lesión. Hay 3 grupos: córneas tratadas con vehículo, córneas tratadas con 32 y córneas tratadas con 34. Hay 4 ratones en cada grupo.

La Fig. 37 ilustra la imagen en bruto de la detección por inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) por capilares Jess para VEGF el día 5 después de la lesión. Hay 3 grupos: córneas tratadas con vehículo, córneas tratadas con 32 y córneas tratadas con 34. Hay 4 ratones en cada grupo.

La Fig. 38 ilustra la imagen en bruto de la detección por inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) por capilares Jess para VEGF el día 9 después de la lesión. Hay 3 grupos: córneas tratadas con vehículo, córneas tratadas con 32 y córneas tratadas con 34. Hay 4 ratones en cada grupo.

La Fig. 39 ilustra la imagen en bruto de la detección por inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) por capilares Jess para VEGF el día 12 después de la lesión. Hay 3 grupos: córneas tratadas con vehículo, córneas tratadas con 32 y córneas tratadas con 34. Hay 4 ratones en cada grupo.

La Fig. 40 ilustra la evaluación de anticuerpos con diferente velocidad de dilución. Los anticuerpos IL-1Beta mostraron una gran eficacia de detección lineal con 4 puntos de dilución (color naranja). Los 4 puntos de datos representan 4, 8, 16 y 32 tiempos de dilución.

La Fig. 41 ilustra la evaluación de anticuerpos con diferente velocidad de dilución. Los anticuerpos de la sustancia P mostraron una gran eficacia de detección lineal con 3 puntos de dilución (color naranja). 4 puntos de datos representan 4, 8, 16 y 32 tiempos de dilución.

La Fig. 42 ilustra la evaluación de anticuerpos con diferente velocidad de dilución. Los anticuerpos VEGF mostraron una gran eficacia de detección lineal con 3 puntos de dilución (color naranja). Los 4 puntos de datos representan 4, 8, 16 y 32 tiempos de dilución.

Fig. 43 infiltración de células positivas para CD11b a los 5, 7 y 14 días después de la lesión y tratamiento con vehículo, 32-N y 34-N.

Fig. 44 infiltración de macrófagos a los 5, 7 y 14 días después de la lesión y tratamiento con vehículo, 32-N o 34-N.

Fig. 45 infiltración de neutrófilos a los 5, 7 y 14 días después de la lesión y tratamiento con vehículo, 32-N o 34-N.

La Fig. 46 ilustra imágenes completas representativas de células positivas para F4/80, neutrófilos y CD11b después de la lesión y tratamiento con vehículo, 32-N o 34-N por vía tópica.

La Fig. 47 ilustra imágenes completas representativas de células positivas para F4/80, neutrófilos y CD11b después de la lesión y tratamiento con vehículo, 32-N o 34-N por vía tópica.

La Fig. 48 ilustra imágenes completas representativas de células positivas para F4/80, neutrófilos y CD11b después de la lesión y tratamiento con vehículo, 32-N o 34-N por vía tópica.

La Fig. 49 ilustra imágenes completas representativas de corte transversal de células positivas para F4/80, CD11b y DAPI el día 7 después de la quemadura alcalina y tratamiento con vehículo, 32-N o 34-N por vía tópica. En el panel inferior de la figura se muestra una superposición que muestra la coexpresión de células positivas para F4/80, CD11b y DAPI.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las enfermedades y afecciones inflamatorias, degenerativas o neurodegenerativas dentro del alcance de esta divulgación incluyen trastornos agudos y crónicos en los que la homeostasis se ve alterada por una respuesta inflamatoria anormal o desregulada. Una serie de factores inflamatorios inician e intervienen en estas afecciones, los cuales incluyen estrés oxidativo no compensado, quimiocinas, citocinas, rotura de barreras hematohisticas, enfermedades autoinmunitarias, desregulación del calcio, incluida la sobrecarga de calcio en las células, disfunciones mitocondriales, factores genéticos que son predisposición genética, polimorfismos o afecciones hereditarias, modificaciones epigenómicas, u otras afecciones que involucran leucocitos, monocitos/macrófagos, microglia, astrocitos o células parenquimatosas que provocan cantidades excesivas de lesiones celulares, proinflamatorias/disruptoras de la homeostasis celular y/u orgánica. Estas enfermedades ocurren en una amplia gama de tejidos y órganos, que incluyen piel, músculos, estómago, intestinos, hígado, riñones, pulmones, ojos, oídos y cerebro. Actualmente, estas enfermedades se tratan con agentes antiinflamatorios como corticoesteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, moduladores del TNF, inhibidores de la COX-2, etc.

La presente invención se refiere a la utilización de efectos beneficiosos que no se conocen con anterioridad de compuestos de ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga omega-3 (VLC-PUFA n3), que contienen cadenas carbonadas de al menos 23 carbonos para favorecer la protección, prevención y el tratamiento de alteraciones

de la superficie ocular, como queratoconjuntivitis seca y afecciones inflamatorias de la superficie ocular.

La divulgación también se refiere a hallazgos que no se conocen con anterioridad de que los VLC-PUFA n3 se convierten de manera endógena en derivados hidroxilados terapéuticamente beneficiosos, conocidos como elovanoides, que presentan bioactividades que no se conocen con anterioridad, funcionan como moduladores beneficiosos de respuestas inflamatorias y favorecen la restauración de la función alterada.

En resumen, la divulgación se refiere a compuestos, composiciones y métodos que involucran ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga omega-3 (VLC-PUFA n3 o VLC-PUFA n-3) y sus derivados hidroxilados (elovanoides), para uso en aplicaciones preventivas, protectoras, restauradoras, terapéuticas o nutricionales (por ejemplo, para favorecer la protección, prevención y el tratamiento de alteraciones de la superficie ocular, como queratoconjuntivitis seca y afecciones inflamatorias de la superficie ocular).

Antes de describir la presente divulgación con mayor detalle, debe entenderse que esta divulgación no se limita a las modalidades particulares descritas y, por consiguiente, puede variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene como único fin describir modalidades particulares, y no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la presente divulgación estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese rango y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese rango indicado, se encuentra incluido en la divulgación. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños pueden incluirse independientemente en los rangos más pequeños y también se encuentran incluidos en la divulgación, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el rango indicado. Cuando el rango indicado incluye uno o ambos límites, los rangos que excluyen uno o ambos de los límites incluidos también se encuentran incluidos en la divulgación.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta divulgación. Si bien también puede usarse

cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento al llevar a la práctica o someter a prueba la presente divulgación, a continuación se describen los métodos y materiales ventajosos.

Todas las publicaciones y patentes citadas en esta memoria descriptiva se incorporan a este documento mediante referencia como si cada publicación o patente individual se indicara específica e individualmente para su incorporación mediante referencia y se incorporan a este documento mediante referencia para divulgar y describir los métodos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones. La cita de cualquier publicación es por su divulgación antes de la fecha de presentación y no debe interpretarse como una admisión de que la presente divulgación no tiene derecho a ser anterior a dicha publicación en virtud de una divulgación anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas podrían ser diferentes de las fechas de publicación reales que deberían confirmarse de manera independiente.

Como resultará evidente para los expertos en la técnica al leer esta divulgación, cada una de las modalidades individuales descritas e ilustradas en este documento tiene componentes y características diferentes que pueden separarse fácilmente de las características de cualquiera de las otras modalidades, o combinarse con ellas, sin apartarse del alcance o espíritu de la presente divulgación. Cualquier método mencionado puede llevarse a cabo en el orden mencionado o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

Las modalidades de la presente divulgación emplearán, a menos que se indique lo contrario, técnicas de medicina, química orgánica, bioquímica, biología molecular, farmacología, toxicología y similares, que se encuentran dentro del estado de la técnica. Dichas técnicas se explican por completo en publicaciones.

Cabe destacar que, como se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares «un», «una» y «el/la» incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a «un soporte» incluye múltiples soportes. En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones que le siguen, se hará referencia a una serie de términos que se definirán con los significados a continuación a menos que sea evidente una intención diferente.

Como se usan en este documento, los siguientes términos tienen los significados atribuidos a ellos a menos que se especifique lo contrario. En esta divulgación, «comprende», «que comprende», «que contiene» y «que tiene» y similares pueden

tener el significado que les atribuye la ley de patentes de EE. UU. y pueden significar «incluye», «que incluye» y similares; «que consiste esencialmente en» o «consiste esencialmente en» o similares, cuando se aplican a métodos y composiciones que abarca la presente divulgación se refieren a composiciones como las descritas en este documento, pero que pueden contener grupos estructurales, componentes de composición o etapas de método adicionales (o análogos o derivados de estos según lo descrito anteriormente). Sin embargo, dichos grupos estructurales, componentes de composición o etapas de método, etc., adicionales no afectan sustancialmente la(s) característica(s) básica(s) y *novedosas* de las composiciones o métodos, en comparación con las de las composiciones o métodos correspondientes descritos en este documento.

Como se usa en este documento, la nomenclatura alquilo, alcoxi, carbonilo, etc. se usa como lo entienden generalmente los expertos en la técnica de la química. Como se usa en esta memoria descriptiva, los grupos alquilo pueden incluir radicales alquilo de cadena lineal, ramificada y cíclica que contienen hasta aproximadamente 20 carbonos, o de 1 a 16 carbonos, y son lineales o ramificados. Los grupos alquilo de este documento incluyen, a modo de ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, isobutilo, n-butilo, *sec*-butilo, *tert*-butilo, isopentilo, neopentilo, *tert*-pentilo e isohexilo.

Como se usa en este documento, alquilos de cadena corta se refiere a cadenas carbonadas que tienen de aproximadamente 1 o aproximadamente 2 carbonos hasta aproximadamente 6 carbonos. Los grupos alquilo adecuados pueden ser saturados o insaturados. Asimismo, un alquilo también puede sustituirse una o más veces en uno o más carbonos con sustituyentes seleccionados de un grupo que consiste en alquilo C1-C15, alilo, alenilo, alquenilo, heterociclo C3-C7, arilo, halo, hidroxilo, amino, ciano, oxo, tio, alcoxi, formilo, carboxi, carboxamido, fosforilo, fosfonato, fosfonamido, sulfonilo, alquilsulfonato, arilsulfonato y sulfonamida. Además, un grupo alquilo puede contener hasta 10 heteroátomos, en determinadas modalidades, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 sustituyentes heteroátomos. Heteroátomos adecuados incluyen nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo.

Como se usa en este documento, «cicloalquilo» se refiere a un sistema de anillos monocíclicos o multicíclicos, en determinadas modalidades de 3 a 10 átomos de carbono, en otras modalidades de 3 a 6 átomos de carbono. Los sistemas de anillos del grupo cicloalquilo pueden estar compuestos por un anillo o dos o más anillos que pueden estar unidos entre sí de una manera fusionada, con puente o espiránica.

Como se usa en este documento, «arilo» se refiere a grupos aromáticos monocíclicos o multicíclicos que contienen de 3 a 16 átomos de carbono. Como se usa en esta memoria descriptiva, los grupos arilo son radicales arilo, que pueden contener hasta 10 heteroátomos, en determinadas modalidades, 1, 2, 3 o 4 heteroátomos. Un grupo arilo también puede sustituirse opcionalmente una o más veces, en determinadas modalidades, de 1 a 3 o 4 veces con un grupo arilo o un grupo alquilo de cadena corta y también puede estar fusionado con otros arilos o cicloalquilos. Grupos arilo adecuados incluyen, por ejemplo, grupos fenilo, naftilo, tolilo, imidazolilo, piridilo, pirrol, tienilo, pirimidilo, tiazolilo y furilo.

Como se usa en esta memoria descriptiva, se define que un anillo tiene hasta 20 átomos que pueden incluir uno o más átomos de nitrógeno, oxígeno, azufre o fósforo, teniendo en cuenta que el anillo puede tener uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo, cloro, yodo, bromo, fluoro, hidroxilo, alcoxi, arilo, carboxi, amino, alquilamino, dialquilamino, acilamino, carboxamido, ciano, oxo, tio, alquiltio, ariltio, aciltio, alquilsulfonato, arilsulfonato, fosforilo, fosfonato, fosfonamido y sulfonilo, y teniendo en cuenta además que el anillo también puede contener uno o más anillos fusionados, incluidos anillos carbocíclicos, heterocíclicos, arilo o heteroarilo.

Como se usa en este documento, las cadenas carbonadas de alqueno y alquino, si no se especifica, contienen de 2 a 20 carbonos, o de 2 a 16 carbonos, y son lineales o ramificadas. Las cadenas carbonadas de alqueno de 2 a 20 carbonos, en determinadas modalidades, contienen de 1 a 8 dobles enlaces, y las cadenas carbonadas de alqueno de 2 a 16 carbonos, en determinadas modalidades, contienen de 1 a 5 dobles enlaces. Las cadenas carbonadas de alquino de 2 a 20 carbonos, en determinadas modalidades, contienen de 1 a 8 triples enlaces, y las cadenas carbonadas de alquino de 2 a 16 carbonos, en determinadas modalidades, contienen de 1 a 5 triples enlaces.

Como se usa en este documento, «heteroarilo» se refiere a un sistema de anillos aromáticos monocíclicos o multicíclicos, en determinadas modalidades, de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 miembros donde uno o más, en una modalidad de 1 a 3, de los átomos en el sistema de anillos es un heteroátomo, es decir, un elemento distinto del carbono, que incluye, a modo de ejemplo, nitrógeno, oxígeno o azufre. El grupo heteroarilo puede fusionarse opcionalmente con un anillo de benceno. Los grupos heteroarilo incluyen, a modo de ejemplo, furilo, imidazolilo, pirrolidinilo, pirimidinilo, tetrazolilo, tienilo, piridilo, pirrolilo, N-metilpirrolilo, quinolinilo e isoquinolinilo.

Como se usa en este documento, «heterociclilo» se refiere a un sistema de anillos no aromáticos monocíclicos o multicíclicos, en una modalidad de 3 a 10 miembros, en otra modalidad de 4 a 7 miembros, en una modalidad adicional de 5 a 6 miembros, donde uno o más, en determinadas modalidades, 1 a 3, de los átomos en el sistema de anillos es un heteroátomo, es decir, un elemento distinto del carbono, que incluye, a modo de ejemplo, nitrógeno, oxígeno o azufre. En modalidades donde el o los heteroátomos son nitrógeno, el nitrógeno se sustituye opcionalmente con alquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo, aralquilo, heteroaralquilo, cicloalquilo, heterociclilo, cicloalquilalquilo, heterociclilalquilo, acilo, guanidino o el nitrógeno puede cuaternizarse para formar un amonio donde los sustituyentes se seleccionan como en el caso anterior.

Como se usa en este documento, «aralquilo» se refiere a un grupo alquilo en el que uno de los átomos de hidrógeno del alquilo es remplazado por un grupo arilo.

Como se usa en este documento, «halo», «halógeno» o «haluro» se refieren a F, Cl, Br o I.

Como se usa en este documento, «haloalquilo» se refiere a un grupo alquilo en el que uno o más de los átomos de hidrógeno son remplazados por halógeno. Dichos grupos incluyen, a modo de ejemplo, clorometilo y trifluorometilo.

Como se usa en este documento, «ariloxi» se refiere a RO-, en el que R es arilo, que incluye arilo de cadena corta, como fenilo.

Como se usa en este documento, «acilo» se refiere a un grupo -COR, que incluye, por ejemplo, alquilcarbonilo, cicloalquilcarbonilo, arilcarbonilo o heteroarilcarbonilos, todos los cuales pueden sustituirse opcionalmente.

Como se usa en este documento, «n-3» o «n3», «n-6» o «n6», etc. se refiere a la nomenclatura habitual de los ácidos grasos poliinsaturados o sus derivados, en donde la posición de un doble enlace (C=C) se encuentra en el átomo de carbono contado desde el extremo de la cadena carbonada (terminal metilo) del ácido graso o derivado de ácido graso. Por ejemplo, «n-3» significa el tercer átomo de carbono desde el extremo de la cadena carbonada del ácido graso o derivado de ácido graso. De manera similar, «n-3» o «n3», «n-6» o «n6», etc. también se refiere a la posición de un sustituyente como un grupo hidroxilo (OH) ubicado en un átomo de carbono del ácido graso o derivado de ácido graso, en donde el número (p. ej., 3, 6, etc.) se cuenta desde el extremo de la cadena carbonada del ácido graso o derivado de ácido graso.

Como se usa en este documento, «E» y «Z» pueden referirse a la nomenclatura habitual de estereoquímica de dobles enlaces carbono-carbono (C=C). Al enlace se le da la designación «E», en donde dos sustituyentes de mayor prioridad se encuentran

en lados opuestos del doble enlace. Al enlace se le da la designación «Z», en donde dos sustituyentes de mayor prioridad se encuentran en el mismo lado del doble enlace. La prioridad de los sustituyentes en el doble enlace se asigna según las reglas de prioridad de Cahn-Ingold-Prelog (CIP). Los números antes de las notaciones «E» y/o «Z» se refieren a la posición del doble enlace, en donde el número se cuenta desde el comienzo del extremo de la cadena carbonada (ácido carboxílico) de la molécula.

Como se usan en este documento, las abreviaturas para cualquier grupo protector y otros compuestos son, a menos que se indique lo contrario, las de uso habitual, abreviaturas reconocidas, o las de la IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (ver, (1972) *Biochem.* 11:942-944).

Como se usa en este documento, en donde se muestra que las estructuras químicas de los compuestos de la divulgación tienen un grupo carboxilo terminal «-COOR», se pretende que la «R» designe un grupo unido mediante enlaces covalentes al carboxilo como un grupo alquilo. Como alternativa, se pretende además que el grupo carboxilo tenga una carga negativa como «-COO⁻» y R es un catión que incluye un catión metálico, un catión amonio y similares.

Como se usa en este documento, «sujeto» es un animal, normalmente un mamífero, incluido un ser humano, como un paciente.

Como se usa en este documento, los «derivados farmacéuticamente aceptables» de un compuesto incluyen sales, ésteres, éteres enólicos, ésteres enólicos, acetales, cetales, ortoésteres, hemiacetales, hemicetales, ácidos, bases, solvatos, hidratos o profármacos de estos. Dichos derivados pueden ser preparados fácilmente por los expertos en esta técnica mediante métodos conocidos para dicha obtención de derivados. Los compuestos producidos pueden administrarse a animales o seres humanos sin efectos tóxicos sustanciales y o bien son farmacéuticamente activos o profármacos.

Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, a modo de ejemplo, sales de amina, como ser, entre otras, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, amoníaco, dietanolamina y otras hidroxialquilaminas, etilendiamina, N-metilglucamina, procaína, N-bencilfenetilamina, 1-*para*-clorobencil-2-pirrolidin-1'-ilmetilbencimidazol, dietilamina y otras alquilaminas, piperazina y *tris*(hidroximetil)aminometano; sales de metales alcalinos, como ser, entre otros, litio, potasio y sodio; sales de metales alcalinotérreos, como ser, entre otros, bario, calcio y magnesio; sales de metales de transición, como ser, entre otros, zinc; y otras sales metálicas, como ser, entre otras, hidrogenofosfato de sodio y fosfato de disodio; y también incluyen, entre otras, sales de

ácidos minerales, como ser, entre otros, clorhidratos y sulfatos; y sales de ácidos orgánicos, como ser, entre otros, acetatos, lactatos, malatos, tartratos, citratos, ascorbatos, succinatos, butiratos, valeratos y fumaratos.

Los ésteres farmacéuticamente aceptables incluyen, a modo de ejemplo, ésteres de alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, aralquilo, heteroaralquilo, cicloalquilo y heterociclilo de grupos ácidos, que incluyen, entre otros, ácidos carboxílicos, ácidos fosfóricos, ácidos fosfínicos, ácidos sulfónicos ácidos, ácidos sulfínicos y ácidos borónicos.

Los éteres enólicos farmacéuticamente aceptables incluyen, a modo de ejemplo, derivados de la fórmula $C=C(OR)$ donde R es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, aralquilo, heteroaralquilo, cicloalquilo o heterociclilo. Los ésteres enólicos farmacéuticamente aceptables incluyen, a modo de ejemplo, derivados de la fórmula $C=C(OC(O)R)$ donde R es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, aralquilo, heteroaralquilo, cicloalquilo o heterociclilo.

Los solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables son complejos de un compuesto con una o más moléculas de agua o disolvente, o de 1 a aproximadamente 100, o de 1 a aproximadamente 10, o de una a aproximadamente 2, 3 o 4, moléculas de agua o disolvente.

«Formulación», como se usa en este documento, puede incluir cualquier colección de componentes de un compuesto, mezcla o solución seleccionados para proporcionar propiedades óptimas para un uso final específico, incluidas las especificaciones del producto y/o las condiciones de servicio. El término formulación incluirá líquidos, semilíquidos, soluciones coloidales, dispersiones, emulsiones, microemulsiones y nanoemulsiones, incluidas emulsiones de aceite en agua y emulsiones de agua en aceite, pastas, polvos y suspensiones. Las formulaciones de la presente invención también pueden incluirse, o envasarse, con otros compuestos no tóxicos, como portadores, excipientes, aglutinantes y materiales de relleno cosméticos, y similares. Específicamente, los portadores, excipientes, aglutinantes y materiales de relleno cosméticos aceptables tenidos en cuenta para su uso al llevar a la práctica la presente invención son aquellos que hacen que los compuestos sean susceptibles de administración oral y/o que proporcionen estabilidad de manera que las formulaciones de la presente invención muestren un período de validez de almacenamiento comercialmente aceptable.

Como se usa en este documento, el término «administrar» se refiere a proporcionarle una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación o composición

farmacéutica a un sujeto, mediante administración intravítreo, intraocular, ocular, subretiniana, intratecal, intravenosa, subcutánea, transcutánea, intracutánea, intracraneal, tópica y tipos similares de administración. La formulación o el compuesto farmacéutico de la presente invención puede administrarse solo, pero puede administrarse con otros compuestos, excipientes, materiales de relleno, aglutinantes, portadores u otros vehículos seleccionados según la vía de administración elegida y las prácticas farmacéuticas habituales. La administración puede ser por medio de portadores o vehículos, como soluciones inyectables, incluidas soluciones acuosas o no acuosas estériles, o soluciones salinas; cremas; lociones; cápsulas; comprimidos; gránulos; píldoras; polvos; suspensiones, emulsiones o microemulsiones; parches; micelas; liposomas; vesículas; implantes, incluidos microimplantes; gotas oftálmicas; otras proteínas y péptidos; polímeros sintéticos; microesferas; nanopartículas; y similares.

Las formulaciones o la composición farmacéutica de la presente invención también pueden incluirse, o envasarse, con otros compuestos no tóxicos, como portadores, excipientes, aglutinantes y materiales de relleno farmacéuticamente aceptables que incluyen, a modo de ejemplo, glucosa, lactosa, goma arábica, gelatina, manitol, goma xantana, goma de algarrobo, galactosa, oligosacáridos y/o polisacáridos, pasta de almidón, trisilicato de magnesio, talco, almidón de maíz, fragmentos de almidón, queratina, sílice coloidal, almidón de patata, urea, dextran, dextrinas y similares. Específicamente, los portadores, excipientes, aglutinantes y materiales de relleno farmacéuticamente aceptables tenidos en cuenta para su uso al llevar a la práctica la presente invención son aquellos que hacen que los compuestos de la invención sean susceptibles de administración intravítrea, administración intraocular, administración ocular, administración subretiniana, administración intratecal, administración intravenosa, administración subcutánea, administración transcutánea, administración intracutánea, administración intracraneal, administración tópica y similares. Además, el material de envasado puede ser biológicamente inerte o carecer de bioactividad, como polímeros plásticos, silicona, etc. Y puede ser procesado internamente por el sujeto sin que se vea afectada la eficacia de la composición/formulación envasada y/o administrada con él.

Se pueden calibrar diferentes formas de la formulación de la presente invención para que se adapte tanto a diferentes individuos como a las diferentes necesidades de un solo individuo. La implementación de este concepto es complicada y la investigación necesaria es compleja. Sin embargo, la presente formulación no necesita contrarrestar

todas las causas en cada individuo. Más bien, al contrarrestar las causas necesarias, la presente formulación restaurará la función normal del cuerpo y del cerebro. Entonces el propio cuerpo y el propio cerebro corregirán las deficiencias restantes. No es posible que ningún fármaco corrija cada una de las causas de la EA, pero la presente formulación maximizará la posibilidad.

El término «cantidad terapéuticamente eficaz», como se usa en este documento, se refiere a la cantidad de una modalidad de la composición o composición farmacéutica administrada que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad o afección tratada, y/o a la cantidad que evitará, en cierta medida, uno o más de los síntomas de la afección o enfermedad que el sujeto tratado tiene o está en riesgo de presentar. Como se usa indistintamente en este documento, «sujeto», «individuo» o «paciente» se refiere a un vertebrado, con preferencia un mamífero, con mayor preferencia un ser humano. Los mamíferos incluyen, a modo de ejemplo, móridos, simios, seres humanos, animales de granja, animales deportivos y animales de compañía. El término «animal de compañía» incluye un perro, gato, cobaya, ratón, rata, conejo, hurón y similares. El término animal de granja incluye un caballo, oveja, cabra, pollo, cerdo, vaca, burro, llama, alpaca, pavo y similares.

Un «excipiente farmacéuticamente aceptable», «diluyente farmacéuticamente aceptable», «portador farmacéuticamente aceptable» o «adyuvante farmacéuticamente aceptable» puede ser un excipiente, diluyente, portador y/o adyuvante útiles para preparar una composición farmacéutica que son en términos generales seguros, no son tóxicos y no son indeseables biológicamente ni de otro modo, e incluyen un excipiente, diluyente, portador y adyuvante que son aceptables para uso veterinario y/o uso farmacéutico en seres humanos. «Un excipiente, diluyente, portador y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable» como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones incluye uno o más de dichos excipientes, diluyentes, portadores y adyuvantes.

Como se usa en este documento, una «composición farmacéutica» o una «formulación farmacéutica» puede abarcar una composición o composición farmacéutica adecuada para su administración a un sujeto, como un mamífero, especialmente un ser humano y que se refiere a la combinación de un agente o agentes activos, o de un ingrediente con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, lo que hace que la composición sea adecuada para uso diagnóstico, terapéutico o preventivo *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. En una «composición farmacéutica» es estéril, y preferentemente libre de contaminantes que sean capaces de provocar una respuesta

indeseable en el sujeto (p. ej., el compuesto o compuestos en la composición farmacéutica son de calidad farmacéutica). Las composiciones farmacéuticas pueden diseñarse para su administración a sujetos o pacientes que las necesiten a través de una serie de vías de administración diferentes que incluyen administración oral, intravenosa, yugal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, intratraqueal, intramuscular, subcutánea, mediante dispositivos de endoprótesis liberadoras, dispositivos de catéteres liberadores, globos intravasculares, inhalada y similares.

El término «administración» se refiere a introducir una composición de la presente divulgación en un sujeto. Una vía de administración ventajosa de la composición es la administración tópica. Sin embargo, se puede utilizar cualquier vía de administración, como ser oral, intravenosa, subcutánea, peritoneal, intraarterial, inhalada, vaginal, rectal, nasal, introducción en el líquido cefalorraquídeo, intravascular ya sea en venas o arterias, o instilación en compartimentos corporales.

Como se usa en este documento, «tratamiento» y «tratar» se refieren al manejo y atención de un sujeto con el fin de combatir una afección, enfermedad o trastorno, de cualquier manera en la que se vea una mejoría o de lo contrario una modificación beneficiosa de uno o más de los síntomas de una enfermedad o trastorno. Se pretende que el término incluya el espectro completo de tratamientos para una afección determinada que padece el paciente, como la administración del compuesto activo con el fin de: mitigar o aliviar síntomas o complicaciones; retrasar la evolución de la afección, enfermedad o trastorno; curar o eliminar la afección, enfermedad o trastorno; y/o prevenir la afección, enfermedad o trastorno, en donde debe entenderse que «prevenir» o «prevención» se refieren al manejo y atención de un paciente con el fin de impedir la aparición de la afección, enfermedad o trastorno, e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir o reducir el riesgo de aparición de síntomas o complicaciones.

El paciente a tratar es preferentemente un mamífero, en particular un ser humano. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de las composiciones de este documento, como el uso para tratar una enfermedad proporcionado en este documento.

El término «componente nutricional», como se usa en este documento, se refiere a como proteína, un carbohidrato, vitaminas, minerales y otros nutrientes beneficiosos que incluyen ingredientes funcionales de la divulgación, es decir, ingredientes destinados a producirle beneficios específicos a una persona que consume el alimento. El carbohidrato puede ser, a modo de ejemplo, glucosa, sacarosa, fructosa, dextrosa,

tagatosa, lactosa, maltosa, galactosa, xilosa, xilitol, dextrosa, polidextrosa, ciclodextrinas, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, fructooligosacárido, maltodextrinas, almidones, pectinas, gomas, carragenano, inulina, compuestos a base de celulosa, alditoles, sorbitol, manitol, maltitol, xilitol, lactitol, isomalta, eritritol, pectinas, gomas, carragenano, inulina, dextrinas hidrogenadas indigestas, hidrolizados de almidón hidrogenado, maltodextrinas altamente ramificadas, almidón y celulosa.

Los expertos en la técnica de la formulación de alimentos procesados conocen, o pueden determinar fácilmente, fuentes disponibles en el mercado de proteínas nutricionales, carbohidratos y similares, y sus especificaciones.

Las composiciones de la divulgación que incluyen componentes nutricionales pueden ser preparaciones alimenticias que pueden ser, a modo de ejemplo, composiciones «del tamaño de un bocadillo» o «del tamaño de un bocado», es decir, más pequeñas de lo que normalmente se consideraría una barra alimenticia. Por ejemplo, la barra alimenticia puede tener marcas o perforaciones para permitir que el consumidor parta porciones más pequeñas para comer, o la «barra» alimenticia pueden ser trozos pequeños, en lugar de un producto largo con forma de barra. Los trozos más pequeños se pueden revestir o recubrir individualmente. Se pueden envasar individualmente o en grupos.

El alimento puede incluir material sólido que no se muele hasta obtener una masa homogénea como, a modo de ejemplo. El alimento puede estar revestido o recubierto, a modo de ejemplo, con chocolate, incluido chocolate negro, claro, con leche o blanco, algarroba, yogur, otros dulces, frutos secos o granos. El revestimiento puede ser un revestimiento confitado compuesto o un revestimiento no confitado (p. ej., sin azúcar). El revestimiento puede ser liso o puede contener partículas o trozos sólidos.

Discusión

Las enfermedades inflamatorias, degenerativas, neurodegenerativas, traumáticas, dermatológicas y cardiovasculares relacionadas y no relacionadas con la edad incluyen una gran cantidad de enfermedades que afectan a una gran cantidad de personas en todo el mundo. En la mayoría de los casos, estas enfermedades y afecciones y trastornos relacionados son difíciles de tratar, conducen a un deterioro de la calidad de vida y/o a una disminución de la esperanza de vida, y continúan siendo una de las principales necesidades médicas por resolver.

Las enfermedades y afecciones inflamatorias, degenerativas o neurodegenerativas que pueden aliviarse o eliminarse mediante las composiciones de la divulgación incluyen, a modo de ejemplo, trastornos agudos y crónicos en los que la

homeostasis se ve alterada por una respuesta inflamatoria anormal o desregulada. Una serie de factores inflamatorios inician e intervienen en estas afecciones, los cuales incluyen estrés oxidativo no compensado, quimiocinas, citocinas, rotura de barreras hematohistóicas, enfermedades autoinmunitarias, desregulación del calcio, incluida la sobrecarga de calcio en las células, disfunciones mitocondriales, factores genéticos que son predisposición genética, polimorfismos o afecciones hereditarias, u otras afecciones que involucran leucocitos, monocitos/macrófagos, microglia, astrocitos o células parenquimatosas que provocan cantidades excesivas de lesiones celulares, proinflamatorias/disruptoras de la homeostasis celular y/u orgánica. Estas enfermedades ocurren en una amplia gama de tejidos y órganos, que incluyen piel, músculos, estómago, intestinos, hígado, riñones, pulmones, ojos, oídos y cerebro. Actualmente, estas enfermedades se tratan con agentes antiinflamatorios como corticoesteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, moduladores del TNF, inhibidores de la COX-2, etc.

Las enfermedades degenerativas incluyen afecciones que implican la pérdida progresiva de células y tejidos vitales que dan como resultado un deterioro progresivo de la función, como pérdida de cartílago en las rodillas, articulaciones de la cadera u otras articulaciones como en la artrosis. Otras enfermedades degenerativas involucran perturbaciones de la homeostasis celular e intercelular e incluyen cardiopatías, aterosclerosis, diabetes, enfermedad intestinal, osteoporosis, prostatitis, artritis reumatoide, etc.

Las enfermedades neurodegenerativas incluyen algunas de las principales encefalopatías, retinopatías, enfermedades de la médula espinal y de los nervios periféricos, por lo que una muerte progresiva de la organización celular conduce a un deterioro de la función. Esto se debe a trastornos inmunitarios o inflamatorios y/o a afecciones hereditarias o al envejecimiento. Estas incluyen esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinopatías degenerativas como degeneración macular relacionada con la edad, enfermedades oculares hereditarias como retinosis pigmentaria, glaucoma, etc.

Las enfermedades y afecciones inflamatorias o degenerativas oftálmicas normalmente afectan la córnea, el nervio óptico, la red trabecular y la retina. Sin una prevención o tratamiento eficaces, pueden provocar enfermedades oculares que ocasionan ceguera, como glaucoma, cataratas, retinopatía diabética y degeneración macular relacionada con la edad (AMD). Por ejemplo, la presente divulgación proporciona compuestos, composiciones y métodos que pueden favorecer la protección,

prevención y el tratamiento de alteraciones de la superficie ocular, como queratoconjuntivitis seca y afecciones inflamatorias de la superficie ocular. La queratoconjuntivitis seca es una afección que ocurre cuando el ojo o los ojos no tienen suficiente lubricación, como cuando las lágrimas no pueden proporcionar una lubricación adecuada de los ojos. La queratoconjuntivitis seca provoca incomodidad, como prurito o ardor. Las personas que tienen queratoconjuntivitis seca pueden experimentar complicaciones como infecciones oculares, daño de la superficie ocular o disminución en la calidad de vida. Los aspectos de la invención se refieren a composiciones y métodos para tratar o prevenir afecciones oculares, como queratoconjuntivitis seca o afecciones inflamatorias.

Las retinopatías degenerativas son las principales causas de ceguera que afectan a una gran cantidad de personas. La degeneración de la retina es el deterioro de la retina causado por la muerte progresiva e inevitable de las células fotorreceptoras de la retina. Ejemplos de retinopatías degenerativas comunes incluyen retinosis pigmentaria, degeneración macular relacionada con la edad y enfermedad de Stargardt. La retinosis pigmentaria afecta entre 50 000 y 100 000 personas solo en Estados Unidos, y la degeneración macular es la principal causa de pérdida de la visión para las personas de 55 años o más en Estados Unidos, y afecta a más de 10 millones de personas. No existen tratamientos eficaces para estas y otras retinopatías degenerativas.

Para las retinopatías degenerativas, se desconocen los mecanismos moleculares en detalle involucrados en la pérdida progresiva de células fotorreceptoras, y los tratamientos disponibles en la actualidad no pueden tratar de manera eficaz estas enfermedades importantes y prevenir la pérdida de la visión. Lo que se necesita es un método para la prevención y el tratamiento de las retinopatías degenerativas que garantice la supervivencia de las células fotorreceptoras de la retina.

Las enfermedades y afecciones inflamatorias o degenerativas sistémicas pueden afectar órganos vitales como el corazón, los músculos, el estómago, los intestinos, el hígado, los riñones y los pulmones, y pueden dar lugar a enfermedades inflamatorias crónicas relacionadas con la edad, como artritis reumatoide, la aterosclerosis y lupus.

Las enfermedades y afecciones inflamatorias, degenerativas o neurodegenerativas relacionadas con el cerebro, como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, ataque cerebrovascular isquémico,

traumatismo craneoencefálico, epilepsia, esclerosis lateral amiotrófica, a menudo causan envejecimiento prematuro, disfunciones cognitivas y la muerte.

Las dermatopatías inflamatorias o degenerativas a menudo son el resultado de daños en la piel por exposición al sol u otros factores, que incluyen inflamación de la piel (dermatitis o eccema), dermatitis atópica (eccema atópico), deshidratación de la piel o proliferación celular anormal de la piel que da como resultado exceso de descamación. Los daños en la piel por exposición al sol u otros factores están asociados a numerosas enfermedades y afecciones, como eccema, psoriasis, dermatitis atópica o neurodermatitis, y puede ser el resultado de la exposición a luz ultravioleta y otros tipos de dermatitis de contacto. Además, el prurito resultante de determinadas enfermedades y afecciones sistémicas provoca picazón en la piel debido a diversos estímulos inflamatorios y de otros tipos, y provoca la necesidad de rascarse, lo que puede provocar un mayor daño en la piel o alteraciones en el aspecto de la piel.

A pesar de los grandes avances, la comprensión de la fisiopatología de las enfermedades y afecciones inflamatorias, neuroinflamatorias, degenerativas o neurodegenerativas que a menudo conducen a daños orgánicos, enfermedades crónicas y envejecimiento acelerado, continúa siendo escasa.

Por lo tanto, la protección de los órganos, la prevención de enfermedades y afecciones relacionadas con la edad y la restauración de la salud en general continúan siendo una de las principales necesidades médicas por resolver. También existe un gran vacío en la protección eficaz de los tejidos de la piel frente a dermatopatías inflamatorias, neuroinflamatorias, hiperproliferativas o deshidratantes. En particular, no se comprende claramente la fisiopatología de los daños en la piel, las alteraciones en el aspecto de la piel y el envejecimiento de la piel.

Los tratamientos disponibles en la actualidad no pueden tratar de manera eficaz estas enfermedades importantes ni ralentizar el deterioro progresivo de las funciones vitales que estas producen. Lo que se necesita es un método que garantice la supervivencia de las células esenciales que experimentan estrés oxidativo u otras alteraciones homeostáticas. Por lo tanto, existe un gran vacío terapéutico en el manejo de enfermedades inflamatorias, neuroinflamatorias, degenerativas y neurodegenerativas.

La divulgación abarca modalidades de compuestos, composiciones y métodos para la prevención y el tratamiento de enfermedades inflamatorias y degenerativas, incluidas enfermedades neurodegenerativas y retinopatías degenerativas. Se tienen como base nuevos hallazgos sobre la función protectora clave de determinados ácidos

grasos poliinsaturados de cadena muy larga omega-3 u omega-6 (VLC-PUFA n3 o n6) y sus derivados hidroxilados relacionados.

Las investigaciones han demostrado que determinados ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) tienen una función importante en la inflamación y en las afecciones relacionadas. Estos incluyen los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (n3) y omega-6 (n6) que contienen de 18 a 22 carbonos que incluyen: ácido araquidónico (ARA, C20:4n6, es decir, 20 carbonos, 4 dobles enlaces, omega-6), ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5n3, 20 carbonos, 5 dobles enlaces, omega-3), ácido docosapentaenoico (DPA, C22:5n3, 22 carbonos, 5 dobles enlaces, omega-3) y ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6n3, 22 carbonos, 6 dobles enlaces, omega-3).

Los LC-PUFA se convierten mediante enzimas del tipo lipoxigenasa en derivados de PUFA hidroxilados biológicamente activos que funcionan como mediadores de lípidos biológicamente activos que tienen funciones importantes en la inflamación y en las afecciones relacionadas. Entre ellos, los más importantes son los derivados hidroxilados generados en determinadas células relacionadas con la inflamación mediante la acción de una enzima lipoxigenasa (LO o LOX) (p. ej., 15-LO, 12-LO), y dan como resultado la formación de derivados de PUFA monohidroxilados, dihidroxilados o trihidroxilados con acciones potentes que incluyen acciones antiinflamatorias, que contribuyen a la resolución, neuroprotectoras o protectoras de tejidos, entre otras. Por ejemplo, se demostró que la neuroprotectina D1 (NPD1), un derivado dihidroxi de DHA formado en las células mediante la acción enzimática de la 15-lipoxigenasa (15-LO) tiene una estructura estereoquímica definida *R/S* y *Z/E* (ácido 10*R*,17*S*- dihidroxidocosa-4*Z*,7*Z*,11*E*, 13*E*,15*Z*,19*Z*-hexaenoico) y un perfil biológico único que incluye bioactividad estereoselectiva antiinflamatoria, restauradora de la homeostasis, que contribuye a la resolución potente. Se ha demostrado que la NPD1 modula la señalización neuroinflamatoria y la proteostasis, y favorece la regeneración nerviosa, la neuroprotección y la supervivencia celular.

Otros tipos importantes de ácidos grasos son los ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga n3 y n6 (VLC-PUFA n3, VLC-PUFA n6) que se producen en células que contienen enzimas elongasas que alargan los LC-PUFA n3 y n6 hasta VLC-PUFA n3 y n6 que contienen de 24 a 42 carbonos (C24-C42). El más importante de ellos parece ser el VLC-PUFA de 28-38 carbonos (C28-C38). Tipos representativos de VLC-PUFA incluyen C32:6n3 (32 carbonos, 6 dobles enlaces, omega-3), C34:6n3, C32:5n3 y C34:5n3. Estos VLC-PUFA se derivan biogénicamente a través de la acción de

enzimas elongasas, particularmente ELOVL4 (alargamiento de los ácidos grasos de cadena muy larga 4). Los VLC-PUFA también se acilan en lípidos complejos que incluyen esfingolípidos y fosfolípidos, particularmente en determinadas especies moleculares de fosfatidilcolina.

La función biosintética del ELOVL4 y las funciones biológicas de los VLC-PUFA han sido objeto de diversas investigaciones recientes que indican funciones en la retina, el cerebro, los testículos y la piel. Se cree que estos VLC-PUFA desempeñan funciones en la organización de las membranas y cada vez se reconoce más su importancia para la salud.

Se ha demostrado la importancia de los VLC-PUFA en la retina, una parte integral del sistema nervioso central, así como en el cerebro. Por ejemplo, la distrofia macular autosómica dominante similar a Stargardt (STGD3), una enfermedad degenerativa retiniana de inicio juvenil es causada por mutaciones en el exón 6 del gen ELOVL4 que conducen a una proteína ELOVL4 truncada (una enzima elongasa clave) sin una señal de retención/recuperación en el retículo endoplásmico (ER), lo que da como resultado una fuerte disminución de la biosíntesis de los VLC-PUFA. También se producen bajas concentraciones de VLC-PUFA en la retina y relaciones n3/n6 anormalmente bajas en los ojos de donantes con degeneración macular relacionada con la edad (AMD) en comparación con donantes de ojos de control de la misma edad. Las mutaciones recesivas en ELOVL4 muestran características clínicas de ictiosis, convulsiones, retraso mental y tetraplejia espástica que se asemeja al síndrome de Sjogren-Larsson (SLS) con un fenotipo neurológico grave que implica la importancia de la síntesis de VLC-PUFA para el sistema nervioso central y el desarrollo cutáneo.

Se descubrió que los VLC-PUFA se incorporan a los fosfolípidos de la membrana externa del fotorreceptor y se demostró que tienen funciones importantes en la longevidad de los fotorreceptores y en su función sináptica y conectividad neuronal. Por lo tanto, los derivados bioactivos a base de VLC-PUFA, que son capaces de prevenir la apoptosis de las células fotorreceptoras, pueden proporcionar beneficios terapéuticos para diversos tipos de retinopatías degenerativas, incluida la distrofia macular similar a Stargardt (STGD3), y la retinosquiasis juvenil ligada al cromosoma X (XLRS) una retinopatía degenerativa hereditaria de inicio temprano causada por mutaciones en el gen RS1, que es la principal causa de degeneración macular juvenil en hombres. Esta afección implica una disfunción sináptica significativa de los fotorreceptores para la que no existe un tratamiento disponible.

Los compuestos, composiciones y métodos que abarcan las modalidades de la divulgación implican el uso de VLC-PUFA n3 para la inducción de señales de supervivencia en el cerebro y en la retina, particularmente en las células del epitelio pigmentario de la retina y en los fotorreceptores.

Rutas de biosíntesis para VLC-PUFA n3: La biosíntesis de VLC-PUFA n3 comienza a partir de PUFA de cadena corta que contienen solo un número par de carbonos en su cadena carbonada, como el ácido docosahexaenoico (DHA) que contiene 22 carbonos y 6 seis enlaces C=C alternos (C22:6n3) y ácido docosapentaenoico (DPA) que contiene 22 carbonos y 5 enlaces C=C alternos (C22:5n3). Para la biosíntesis de los VLC-PUFA n3 es necesaria la disponibilidad de DHA u otros PUFA de cadena más corta como sustratos, y la presencia y acciones de determinadas enzimas elongasas, p. ej., ELOVL4. Según se resume en las Figs. 1 y 2, estos ácidos grasos de cadena larga omega-3 de 22 carbonos (LC-PUFA n3) son sustratos de las enzimas elongasas, como ELOVL4, que le añade un grupo CH₂CH₂ de 2 carbonos a la vez al extremo carboxílico, por lo que se forman VLC-PUFA n3 que contienen cadenas carbonadas con al menos 24 carbonos de hasta al menos 42 carbonos.

El ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6n3, **1**) se incorpora en la posición 2 de la especie molecular de fosfatidilcolina (**3**) y se convierte mediante enzimas elongasas en VLC-PUFA n3 de cadena más larga. El alargamiento mediante la enzima elongasa ELOVL4 (alargamiento de los ácidos grasos de cadena muy larga 4) conduce a la formación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga omega-3 (VLC-PUFA n3, **2**), que incluyen C32:6n3 y C34:6n3 que a continuación se incorporan en la posición 1 de la especie molecular fosfatidilcolina, **3**. Sin pretender seguir una teoría, la presencia de DHA en la posición 2 y de VLC-PUFA n3 en la posición 1 ofrecen acciones citoprotectoras y neuroprotectoras redundantes, complementarias y sinérgicas que amplifican la supervivencia de neuronas y otros tipos de células clave cuando son puestas a prueba con afecciones patológicas.

La lipoxigenación de VLC-PUFA n3, **3** conduce a la formación de derivados de VLC-PUFA n3 hidroxilados enzimáticamente, denominados elovanoides, que incluyen compuestos monohidroxi (p. ej., ELV-27S y ELV-29S, **4**), y derivados dihidroxi, p. ej., ELV-N32 y ELV-N34, **5**. El elovanoide ELV-N32 es el derivado 20*R*,27*S*-dihidroxi 32:6 (elovanoide de 32 carbonos, 6 dobles enlaces con un patrón de 20(*R*),27(*S*)-dihidroxi tipo neuroprotectina). El elovanoide ELV-N34 es el derivado 22*R*,29*S*-dihidroxi 34:6 (elovanoide de 34 carbonos, 6 dobles enlaces con un patrón de 22(*R*),29(*S*)-dihidroxi).

La Fig. 2 ilustra la administración de ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6n3) a los fotorreceptores, la renovación de la membrana del segmento externo de los fotorreceptores y la síntesis de elovanoides. El DHA o el precursor C18:3n3 se obtienen mediante la dieta, al igual que el propio DHA (Fig. 1). La circulación sistémica (principalmente el sistema porta) los lleva al hígado. Una vez dentro del hígado, los hepatocitos incorporan el DHA al DHA-fosfolípido (DHA-PL), que a continuación es transportado como lipoproteínas a los coriocapilares, a la unidad neurovascular y a los capilares de otros tejidos.

El DHA atraviesa la membrana de Bruch desde los coriocapilares (Fig. 2) y es absorbido por las células del epitelio pigmentario de la retina (RPE) que recubren la parte posterior de la retina para que se envíe al segmento interno de los fotorreceptores. Esta ruta de administración dirigida del hígado a la retina se denomina circuito largo del DHA.

A continuación, el DHA pasa a través de la matriz interfotorreceptora (IPM) y hacia el segmento interno de los fotorreceptores, donde se incorpora a los fosfolípidos para los segmentos externos de los fotorreceptores, la membrana celular y los orgánulos. La mayoría se utiliza en la biogénesis de la membrana de los discos (segmentos externos). A medida que se sintetizan nuevos discos ricos en DHA en la base del segmento externo de los fotorreceptores, los discos antiguos son empujados apicalmente hacia las células del RPE. Las células del RPE fagocitan las puntas de los fotorreceptores todos los días, y eliminan los discos más antiguos. Los fagosomas resultantes se degradan dentro de las células del RPE y el DHA es reciclado de nuevo hacia los segmentos internos de los fotorreceptores para una nueva biogénesis de la membrana de los discos. Este reciclado local se denomina circuito corto 22:6.

Los elovanoides se forman a partir de ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga omega-3 (VLC-PUFA n3) biosintetizados por ELOVL4 (alargamiento de los ácidos grasos de cadena muy larga 4) en los segmentos internos de los fotorreceptores. Por lo tanto, se utiliza una especie molecular de fosfatidilcolina en el segmento interno que contiene VLC-FA omega-3 en C1 (se representa C34:6n3) y DHA (C22:6n3) en C2 para la biogénesis de la membrana de los fotorreceptores. A este fosfolípido se lo ha asociado estrechamente a la rodopsina. Una vez que los discos son fagocitados en las células del RPE como un proceso fisiológico diario, ante alteraciones homeostáticas, una fosfolipasa A1 (PLA1) escinde la cadena de acilo en sn-1, libera C34:6n3 y conduce a la formación de elovanoides (p. ej., elovanoide-34, ELV-N34). Los ácidos grasos VLC

omega-3 que no se utilizan para la síntesis de elovanoides se reciclan a través del circuito corto.

Por lo tanto, por razones de biosíntesis, los VLC-PUFA n3 de origen natural y derivados biogénicamente contienen solo un número par de carbonos, que van desde al menos 24 carbonos hasta al menos 42 carbonos (es decir, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 carbonos). Por lo tanto, los VLC-PUFA n3 que contienen solo un número impar de carbonos que van desde al menos 23 hasta al menos 41 carbonos (es decir, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 carbonos) no son de origen natural, pero pueden sintetizarse y fabricarse mediante el uso de métodos y estrategias de química sintética.

Síntesis total estereocontrolada y caracterización estructural de elovanoides ELV-N32 y ELV-N34 en la retina y en el cerebro: Según se resume en las Figs. 3 y 4, el ELV-N32 (27S- y el ELV-N34 se sintetizaron a partir de tres intermedios clave (**1**, **2** y **3**), cada uno de los cuales se preparó en forma estereoquímicamente pura. La estereoquímica de los intermedios **2** y **3** se definió previamente mediante el uso de productos de partida de epóxidos enantioméricamente puros. Los acoplamientos iterativos de los intermedios **1**, **2** y **3** dieron lugar al ELV-N32 y al ELV-N34 (**4**) que se aislaron como ésteres metílicos (Me) o sales de sodio (Na). Se emparejaron materiales sintéticos ELV-N32 y ELV-N34 con elovanoides endógenos con el mismo número de carbonos en su cadena carbonada, obtenidos a partir de células cultivadas del epitelio pigmentario de la retina (RPE) humana (Fig. 3) y cultivos de células neuronales (Fig. 4).

Detección experimental y caracterización de los elovanoides: La evidencia experimental documenta la formación biosintética de los elovanoides, que son derivados monohidroxi y dihidroxi de VLC-PUFA n3 con estructuras moleculares que son análogas al 17-hidroxi-DHA derivado de DHA derivado de DHA y al compuesto dihidroxi NPD1 (ácido 10*R*,17*S*-dihidroxidocosa-4*Z*,7*Z*,11*E*,13*E*,15*Z*,19*Z*-hexaenoico). Los elovanoides son derivados hidroxilados generados enzimáticamente de VLC-PUFA n3 de 32 carbonos (ELV-N32) y 34 carbonos (ELV-N34) que se identificaron por primera vez en cultivos de células primarias del epitelio pigmentario de la retina (RPE) humana (Figs. 3A-3K) y en cultivos de células neuronales (Figs. 4A-4K).

La divulgación proporciona compuestos que tienen cadenas carbonadas relacionadas con VLC-PUFA n3 que además de tener 6 o 5 enlaces C=C, también contienen uno, dos o más grupos hidroxilo. Sin pretender seguir una teoría, compuestos de este tipo pueden ser responsables de las acciones protectoras y neuroprotectoras de VLC-PUFA n3, buscamos identificar su existencia en células del epitelio pigmentario de la retina humana en cultivo, con ácidos grasos VLC-PUFA 32:6n3 y 34:6n3 añadidos.

Nuestros resultados indicaron derivados elovanoides monohidroxi y dihidroxi tanto a partir de ácidos grasos VLC-PUFA 32:6n3 como 34:6n3. Las estructuras de estos elovanoides (ELV-N32, ELV-N34) se compararon con patrones preparados en forma estereoquímica pura mediante síntesis orgánica total estereocontrolada (Figs. 5A y 5B).

Uso beneficioso de VLC-PUFA n3 y elovanoides en enfermedades y afecciones oftálmicas: Las enfermedades y afecciones inflamatorias o degenerativas oftálmicas normalmente afectan la córnea, el nervio óptico, la red trabecular y la retina. Sin una prevención o tratamiento eficaces, pueden provocar enfermedades oculares que ocasionan ceguera, como glaucoma, cataratas, retinopatía diabética y degeneración macular relacionada con la edad (AMD). Existe cada vez más evidencia de que las mutaciones en ELOVL4 y/o una presencia reducida de VLC-PUFA n3 en las células y tejidos de la retina están asociadas a enfermedades degenerativas, neurodegenerativas y retinopatías degenerativas, que están relacionadas con un entorno inflamatorio excesivo y persistente. Por lo tanto, se evaluaron las estructuras, propiedades y efectos de los VLC-PUFA n3 en células y tejidos de la retina, donde es sabido que tienen funciones dominantes.

Los experimentos se realizaron con células del epitelio pigmentario de la retina (RPE) humana que son células posmitóticas derivadas del neuroectodermo de la retina, una parte integral del sistema nervioso central. Estas células están ampliamente dotadas de múltiples mecanismos para protegerse a sí mismas de lesiones y para proteger a otras células, particularmente la supervivencia de los fotorreceptores. Son el fagocito más activo del cuerpo humano, fundamental para la salud de los fotorreceptores y la visión, y tienen la capacidad de secretar neurotrofinas y otras sustancias beneficiosas.

Las funciones beneficiosas de los VLC-PUFA n3 en retinopatías degenerativas, como la distrofia macular autosómica dominante similar a Stargardt (STGD3) y la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) tienen el siguiente respaldo: (a) los VLC-PUFA n3 se biosintetizan en la retina y es sabido que tienen funciones dominantes en la retina; (b) se descubrieron y caracterizaron estructuralmente los elovanoides ELV-N32 y ELV-N34 en células primarias del epitelio pigmentario de la retina (RPE) humana en cultivo (Figs. 1, 6A y 6B); (c) la ELOVL4 es una enzima clave involucrada en la conversión de DHA (C22:6) en VLC-PUFA n3; (d) determinadas mutaciones en la enzima elongasa ELVOL4 conducen a retinopatías degenerativas como STGD3 y AMD; (e) la ablación genética de la proteína que es necesaria para capturar DHA en las células de la retina que contienen productos de ELOVL4 da como

resultado concentraciones drásticamente reducidas de VLC-PUFA y, como consecuencia, degeneración de la retina; (f) el estrés oxidativo no compensado (UOS) en las células del RPE está asociado a las primeras etapas de retinopatías degenerativas; (g) los VLC-PUFA n3 C32:6n3 y C34:6n3 le proporcionan citoprotección a células del RPE humana expuestas a UOS (como se muestra en las Figs. 7A-8C), que no se pueden modificar con un inhibidor de lipoxigenasa (Figs. 9A-9C); (h) los elovanoides ELV-N32 y ELV-N34 le proporcionan citoprotección a células del RPE humana sometidas a UOS mediante el aumento regulado de proteínas antiapoptóticas (Figs. 10A-10G) y al favorecer la supervivencia de las células fotorreceptoras (Figs. 11A-11D); (i) los elovanoides ELV-N32 y ELV-N34 favorecen la integridad de las células fotorreceptoras en la degeneración retiniana de inicio tardío (L-ORD) (Figs. 12A y 12B).

Según se muestra en las Figs. 14A-14C, los elovanoides (ELV) contrarrestan la evolución de la senescencia de las células del epitelio pigmentario de la retina causada por el péptido A β . El A β 42, un producto final de la ruta amiloidogénica, es un componente de las drusas en la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y de las placas seniles en la enfermedad de Alzheimer (AD). Para imitar el efecto del OA β *in vivo*, se utilizaron ratones de 6 meses de edad y se les administraron inyecciones subretinianas solo con OA β , con OA β +ELV y solo con ELV. Los ratones sin inyección se utilizaron como control negativo mientras que los ratones inyectados con PBS se utilizaron como simulación. El volumen de inyección fue de 2 μ l que contenían PBS, 10 μ M de OA β , 10 μ M de OA β + 200 ng de ELV-32, 200 ng de ELV-32 solo, 10 μ M de OA β + 200 ng de ELV-34 o 200 ng de ELV-34 solo. El día 3 después de la inyección, se aisló el ARNm del ocular y se analizó la expresión génica mediante q-PCR. Después, en el día 7, los ratones se sometieron a análisis de tomografía de coherencia óptica (OCT) y a continuación los ojos se enuclearon y procesaron para histología, tinción completa del RPE y detección por inmunoelectrotransferencia (*Western blot* - WB). La OCT y la histología revelan que en la degeneración retiniana causada por OA β , el grosor de la retina era más delgado en el grupo inyectado con OA β en comparación con los controles así como los grupos de tratamiento con ELV. La tinción completa con ZO-1 reveló que la unión estrecha también se vio alterada por el OA β . Curiosamente, la coinyección de ELV y OA β mostró que los ELV fueron capaces de restaurar la morfología y homeostasis de la capa del RPE. Asimismo, en el análisis WB, la concentración de proteína p16INK4a, un marcador de senescencia, tuvo un aumento regulado en el grupo OA β pero se suprimió en los grupos de control y de tratamiento combinado con los ELV. Finalmente, el análisis de expresión génica mostró que los ELV

redujeron la concentración tanto de marcadores de senescencia como de AMD, que fueron desencadenados por la inyección de OA β , al tiempo que provocaron la expresión de genes funcionales del RPE, que tuvieron un descenso regulado en el grupo inyectado con OA β . Estos datos demostraron que los ELV-32 y ELV-34 protegen el RPE y la retina de la senescencia causada por OA β con un descenso regulado de la senescencia, la AMD y la expresión génica asociada a la inflamación, y al preservar la expresión de genes funcionales del RPE, lo que da como resultado una estructura retiniana restaurada y homeostasis sostenida.

Compuestos elovanoides (ELV): 1. Éster metílico acetilénico ELV C32:6; 2. Sal de sodio similar a NPD1 ELV C32:6; 3. Éster metílico acetilénico ELV C34:6; 4. Éster metílico similar a NPD1 ELV C32:6; 5. Éster metílico similar a NPD1 ELV C34:6.

Hay más de 100 genes involucrados en el proceso autofágico. Los siguientes genes se encuentran elevados en la enfermedad AMD:

ATG3 (relacionado con la autofagia 3) Este gen codifica una enzima conjugadora similar a la ubiquitina y es un componente de los sistemas similares a los de ubiquitinación involucrados en la autofagia, el proceso de degradación, renovación y reciclado de los componentes citoplásmicos en células eucariotas. Es sabido que esta proteína participa en la regulación de la autofagia durante la muerte celular.

ATG5 (relacionado con la autofagia 5) La proteína codificada por este gen, en combinación con la proteína de la autofagia 12, funciona como una enzima activadora similar a la E1 en un sistema de conjugación similar al de la ubiquitina. La proteína codificada participa en varios procesos celulares, incluidos la formación de vesículas autofágicas, el control de calidad mitocondrial después del daño oxidativo, la regulación negativa de la respuesta inmunitaria antiviral innata, el desarrollo y la proliferación de linfocitos, la presentación del antígeno MHC II, la diferenciación de adipocitos y la apoptosis.

ATG7 (relacionado con la autofagia 7) Este gen codifica una enzima activadora similar a la E1 que es esencial para la autofagia y el transporte de citoplasmas a las vacuolas. También se cree que la proteína codificada modula las vías del ciclo celular dependiente de p53 durante el estrés metabólico prolongado. Se ha asociado a múltiples funciones, incluidas el transporte de membranas axonales, la homeostasis axonal, la mitofagia, la diferenciación adiposa y el mantenimiento de células madre hematopoyéticas.

BECLIN1 (Beclina 1) Este gen codifica una proteína que regula la autofagia, un proceso catabólico de degradación causado por la inanición. La proteína codificada es

un componente del complejo fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) que interviene en procesos de transporte de vesículas. Se cree que esta proteína participa en múltiples procesos celulares, incluida la neurodegeneración y la apoptosis.

Las células senescentes tienen varias características distintivas, como tamaño celular aumentado, actividad enzimática inducida de la hidrolasa lisosomal β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β -GAL). (2). Además de estas características, también se produce la activación de las vías de señalización de la senescencia, que incluyen p16INK4a, p21CIP1, p27KIP y p53. (3)

p16INK4a (también conocido como inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 2A, inhibidor A de cinasa dependiente de ciclina 4 o varios otros sinónimos), es codificado por el gen CDKN2A. La p16 tiene una función importante en la regulación del ciclo celular al desacelerar el avance de las células de la fase G1 a la fase S.

p21Cip1 (también conocido como p21Waf1, inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1 o proteína 1 que interactúa con CDK) es un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina (CKI) que es capaz de inhibir todos los complejos ciclina/CDK. Esta proteína es codificada por el gen CDKN1A. La p21 representa un objetivo principal de la actividad de la p53 y, por lo tanto, está asociada a la vinculación del daño del ADN con la detención del ciclo celular.

p27Kip1 (también conocido como inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1B) es un inhibidor de enzimas. Esta proteína es codificada por el gen CDKN1B. Codifica una proteína que pertenece a la familia Cip/Kip de proteínas inhibidoras de cinasa dependiente de ciclina (Cdk). La proteína codificada se une a los complejos ciclina E-CDK2 o ciclina D-CDK4 y previene su activación y, por lo tanto, controla el avance del ciclo celular en G1. A menudo se la denomina proteína inhibidora del ciclo celular porque su función principal es detener o ralentizar el ciclo de división celular.

p53 (también conocida como proteína tumoral p53, supresora de tumores p53) también es un inhibidor del ciclo celular. Esta proteína es codificada por el TP53 (seres humanos) y el Trp53 (ratones). Múltiples factores de estrés pueden activar directa o indirectamente la p53 a través de las cinasas. La consecuencia es la inhibición de todas las ciclinas y provocar la detención celular.

Los datos respaldan el uso terapéutico o preventivo de VLC-PUFA n3, o sus elovanoides (p. ej., ELV-N32, ELV-N34), en los ojos, incluido el tratamiento de retinopatías degenerativas y otras enfermedades y afecciones oftálmicas, que incluyen glaucoma, cataratas, retinopatía diabética, distrofia macular similar a Stargardt (STGD3) y degeneración macular relacionada con la edad (AMD).

Uso beneficioso de VLC-PUFA n3 y elovanoides en encefalopatías y afecciones cerebrales: Las vías de los VLC-PUFA y elovanoides se encuentran activas en el sistema nervioso central (CNS), incluido el cerebro y las células neuronales.

Cuando se les aplica ELV-N32 (formas Na o Me) o ELV-N34 (formas Na o Me) a células neuronales mixtas de la corteza cerebral o a células del hipocampo en cultivo, pueden superar los efectos dañinos del estrés oxidativo no compensado, de la excitotoxicidad neuronal por NMDA o de la OGD. La mayoría de los ataques cerebrovasculares son de naturaleza isquémica y la privación de oxígeno y glucosa da lugar a una cadena de eventos que involucran daño mitocondrial, que en última instancia da lugar a la muerte neuronal. Por lo tanto, el modelo de OGD *in vitro* brinda una oportunidad para dilucidar los eventos celulares y las presuntas vías de señalización neuroprotectoras subyacentes en las que participan los ELV. Tanto el ELV-N32 como el ELV-N34 provocan neuroprotección y superan la citotoxicidad neuronal. Cuando se aplicó en una dosis de 250 nM después de 2 h de fase de reoxigenación después de 90 min de agresión por OGD, el precursor de los ELV VLC-PUFA omega-3 (C32:6n3) de 32 carbonos fue capaz de proporcionarle neuroprotección a las neuronas de la corteza cerebral. En conclusión, los elovanoides generados de manera endógena (ELV-N32 o ELV-N34) atenuaron la lesión neuronal causada por varios factores de estrés como NMDA, estrés oxidativo no compensado u OGD en neuronas de la corteza cerebral y del hipocampo en cultivo. Estos nuevos lípidos bioactivos pertenecen a una nueva clase de mediadores de lípidos, denominados elovanoides (ELV), que se derivan de especies moleculares de fosfolípidos que tienen dos PUFA en las posiciones C1 y C2.

Todos los tratamientos con ELV, administrados 1 h después de 2 h del ataque cerebrovascular isquémico experimental, mejoraron la recuperación neurológica durante el período de supervivencia de 7 días. La rápida formación de edema cerebral después de una isquemia focal es una de las principales causas de morbilidad y muerte después de un ataque cerebrovascular. La máxima protección se detectó en la corteza (el área de penumbra) y también en el área subcortical. La histopatología reveló infartos más pequeños en áreas corticales y subcorticales con menos daño pancelular, áreas más densas de neuronas eosinófilas y encogidas a lo largo del margen del infarto, todo lo cual fue detectado en ratas tratadas con elovanoides.

La isquemia cerebral inicia una compleja cadena de eventos celulares, moleculares y metabólicos que dan lugar a daño cerebral irreversible. Las neuronas muertas y el tejido lesionado son eliminados por macrófagos y/o microglia residente

activada que invaden el tejido lesionado del torrente sanguíneo. Los astrocitos supervivientes y la microglia activada en la penumbra pueden facilitar la restauración de la integridad neuronal al producir factores de crecimiento, citocinas y moléculas de la matriz extracelular que participan en los mecanismos de reparación. Los resultados demuestran que el tratamiento con ELV aumentó la cantidad de neuronas positivas para NeuN, astrocitos reactivos positivos para GFAP y densidad de vasos sanguíneos positivos para SMI-71 en la corteza. La integridad de los vasos sanguíneos facilita la neurogénesis y la sinaptogénesis, lo que a su vez contribuye a mejorar la recuperación funcional.

Después de la isquemia cerebral, la integridad de la BBB se ve comprometida, lo que permite la entrada descontrolada de moléculas al parénquima cerebral que empeora el daño causado por la isquemia. En los pacientes, una pérdida de la integridad de la BBB se asocia a un peor resultado del ataque cerebrovascular. Se determinó la alteración isquémica de la BBB mediante infiltración de IgG endógena en el parénquima cerebral. El tratamiento con ELV-N34-Na y ELV-N34-Me atenuó la alteración de la BBB causada por isquemia cerebral focal.

Los ELV identificados recientemente protegieron a las neuronas que experimentaban privación de oxígeno y glucosa o excitotoxicidad causada por el receptor de NMDA. Además, los ELV atenuaron los volúmenes de infarto, rescataron el núcleo isquémico y la penumbra, atenuaron el daño de la BBB y favorecieron la supervivencia celular acompañada de recuperación neurológica/conductual. Sin pretender seguir una teoría, la nueva terapia con ELV puede tratar el ataque cerebrovascular isquémico focal y otras afecciones que involucran alteraciones inflamatorias/homeostáticas.

Las funciones beneficiosas del ELOVL4 y del VLC-PUFA n3 en el CNS se proporcionan en este documento: (a) el ELOVL4 se expresa en el CNS, incluidas las células neuronales, y participa en la conversión de DHA (C22:6) en VLC-PUFA n3; (b) en un modelo *in vitro* de privación de oxígeno y glucosa (OGD) en neuronas corticales primarias, los VLC-PUFA n3 son liberados por neuronas corticales primarias en respuesta a la OGD y se convierten enzimáticamente en elovanoides monohidroxi 27(S)-hidroxi-32:6n3 (Fig. 13B) y 29(S)-hidroxi-34:6n3 (Fig. 13C). Sin embargo, en medios de control, donde las neuronas no están expuestas a OGD, las concentraciones de VLC-PUFA n3 (p. ej., C32:6n3 y C34:6n3) y elovanoides monohidroxi son insignificantes (Figs. 13B y 13C).

Según se muestra en las Figs. 13A-13D, los VLC-PUFA n3 (p. ej., C32:6n3 y C34:6n3) son liberados de manera endógena por neuronas corticales primarias de embriones de rata SD en respuesta a la privación de oxígeno-glucosa (OGD); y se convierten enzimáticamente en elovanoides, que incluyen 29(S)-hidroxi-34:6n3 y 27(S)-hidroxi-32:6n3. En medios de control donde las neuronas no están expuestas a OGD, las concentraciones de VLC-PUFA (p. ej., C32:6n3 y C34:6n3) y elovanoides son insignificantes. Se estableció un modelo de OGD *in vitro* y se cultivaron neuronas corticales primarias mixtas de embriones de rata SD. El DIV 12, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubaron con medio Neurobasal sin glucosa (Gibco) durante 30 min. Después de eso, las células se colocaron en una cámara incubadora modular (Billups-Rothenberg Inc.) y se incubaron en una cámara anaeróbica (N₂ 95 % y CO₂ 5 %) para la OGD durante 90 min a 37 °C. Después de 90 min de exposición a OGD, las células se devolvieron al medio original [medio Neurobasal (Gibco) que contenía suplementos B27 (Gibco) al 2 % y N-2 (Gibco) al 2 %, junto con 0,5 mM de glutamina y Pen Strep (50 U/ml) (Gibco)] y se mantuvieron en una cámara normóxica (37 °C, CO₂ 5 %) durante 12 h. Para las condiciones normóxicas (control), las neuronas se lavaron con PBS pero se mantuvieron en un medio regular [medio Neurobasal (Gibco) que contenía suplementos B27 (Gibco) al 2 % y N-2 (Gibco) al 2 %, junto con 0,5 mM de glutamina y Pen Strep (50 U/ml) (Gibco)] durante el transcurso de 120 min cuando las otras células se sometieron a estrés por OGD. A continuación, las células de control se sometieron a un cambio de medio regular posterior para coincidir con los tiempos de las células sometidas a estrés por OGD.

Después de 12 h, tanto las placas de control como las de OGD se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) helada, y las células se rasparon y recolectaron en metanol para análisis LC-MS/MS. Los ácidos grasos se extrajeron mediante un método de extracción de lípidos líquido-líquido del medio de cultivo celular recolectado. Los extractos se depositaron en un espectrómetro de masas en tándem de cromatografía líquida para su análisis. Analizamos ácidos grasos, derivados de ácidos grasos monohidroxi (27-S-hidroxi 32:6 y 29-S-hidroxi 34:6), ELV-N32 (ácido graso 20,27 dihidroxi 32:6n3) y ELV-N34 (ácido graso 22,29 dihidroxi 34:6n3). Las muestras se normalizaron al patrón interno (AA-d8) para su comparación.

En teoría, la OGD desencadena la liberación de elovanoides monohidroxi y, en menor medida, de ELV-N32 y ELV-N34, que protegerían las neuronas corticales primarias. Estos datos suponen una función neuroprotectora de los VLC-PUFA n3 y elovanoides.

Los elovanoides ELV-N32 y ELV-N34 provocan la protección de: (a) neuronas de la corteza cerebral expuestas a OGD (Figs. 18A-18I) o a toxicidad por NMDA (Figs. 15A-15L y Fig. 19A-19H); (b) cultivos neuronales mixtos de la corteza cerebral y del hipocampo expuestos a estrés oxidativo no compensado (UOS), privación de oxígeno y glucosa (OGD) o excitotoxicidad por NMDA (Figs. 16A-16I), donde se evaluó la supervivencia celular (Fig. 17).

Los elovanoides ELV-N32 y ELV-N34 mejoran la puntuación neurológica/conductual, protegen la penumbra y reducen los volúmenes de lesiones según RMN después de un ataque cerebrovascular isquémico (Figs. 20A-2D).

Los elovanoides ELV-N32 y ELV-N34 atenúan el daño celular neuronal y en astrocitos causado por ataque cerebrovascular isquémico experimental (Fig. 21A-21C).

Los elovanoides ELV-N32 y ELV-N34 disminuyen la disrupción de la unidad neurovascular (NVU) y reducen el infarto cerebral después de un ataque cerebrovascular isquémico (Fig. 22A-22D).

Los elovanoides ELV-N32 y ELV-N34 proporcionan neuroprotección y mejoran el déficit neurológico después de un traumatismo craneoencefálico (TBI) (Figs. 23A-23C).

En conjunto, los datos indican usos terapéuticos o preventivos de VLC-PUFA n3 y de los elovanoides (p. ej., ELV-N32, ELV-N34) en el cerebro, lo que incluye el tratamiento de enfermedades y afecciones inflamatorias, degenerativas o neurodegenerativas relacionadas con el cerebro, como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, ataque cerebrovascular isquémico, traumatismo craneoencefálico, epilepsia y esclerosis lateral amiotrófica.

Uso de VLC-PUFA n3 y elovanoides en enfermedades y afecciones sistémicas y/o relacionadas con la edad: Las enfermedades sistémicas que surgen a raíz de afecciones inflamatorias, autoinmunitarias, degenerativas, neurodegenerativas, relacionadas con el estrés, relacionadas con la edad o traumáticas pueden afectar órganos vitales como el corazón, los músculos, el estómago, los intestinos, el hígado, los riñones y los pulmones, y pueden dar lugar a enfermedades inflamatorias crónicas relacionadas con la edad, como artritis reumatoide, enfermedad cardiovascular, enfermedad cerebrovascular, aterosclerosis, lupus y otras enfermedades y afecciones relacionadas con la edad. Dadas sus funciones beneficiosas únicas en la protección de la función de células y órganos clave que previenen enfermedades y afecciones crónicas, es esperable que los compuestos de VLC-PUFA n3 y/o elovanoides

proporcionados sean eficaces para el tratamiento de una amplia gama de estas enfermedades y afecciones crónicas.

Funciones beneficiosas de VLC-PUFA n3 y eicosanoides en dermatopatías y afecciones de la piel: Las dermatopatías inflamatorias o degenerativas a menudo son el resultado de daños en la piel por exposición al sol u otros factores, que incluyen inflamación de la piel (dermatitis o eccema), dermatitis atópica (eccema atópico), deshidratación de la piel o proliferación celular anormal de la piel que da como resultado exceso de descamación. Los daños en la piel por exposición al sol u otros factores están asociados a numerosas enfermedades y afecciones, como eccema, psoriasis, dermatitis atópica o neurodermatitis, y puede ser el resultado de la exposición a luz ultravioleta y otros tipos de dermatitis de contacto. Además, el prurito resultante de determinadas enfermedades y afecciones sistémicas provoca picazón en la piel debido a diversos estímulos inflamatorios y de otros tipos, y provoca la necesidad de rascarse, lo que puede provocar un mayor daño en la piel o alteraciones en el aspecto de la piel.

Teniendo en cuenta la importancia general de la salud de la piel, la función de la piel y el aspecto de la piel, se ha puesto gran empeño en el desarrollo de métodos para la protección de la piel y la salud general de la piel. La mayoría de los tratamientos actuales implican la administración dérmica de corticoesteroides o el uso de aceites y lociones que contienen vitaminas, minerales o ingredientes a base de hierbas, que a menudo no pueden prevenir o tratar de manera eficaz muchos tipos de daños en la piel y también tienen efectos secundarios como debilitamiento de la piel y pérdida de masa muscular. Si bien dichas preparaciones pueden ofrecer cierta protección, existe una necesidad sin resolver de desarrollar compuestos, composiciones y métodos que protejan la piel dañada, prevengan los daños en la piel, restauren la salud de la piel, mejoren el aspecto de la piel y retrasen el envejecimiento de la piel de manera eficaz.

Aunque los compuestos proporcionados tienen grandes efectos protectores, neuroprotectores, restauradores y otros efectos beneficiosos para la piel y otros tejidos, se biosintetizan localmente en cantidades limitadas. Con el tiempo, y como consecuencia de los daños y del envejecimiento de la piel, la administración local de los compuestos proporcionados sería insuficiente para proporcionarles la protección necesaria a los tejidos dañados.

Por lo tanto, al proporcionar una composición de los compuestos proporcionados de manera que pueda ser absorbida directa y localmente por la piel, los compuestos y composiciones proporcionados representarían beneficios significativos para la piel afectada por daños o envejecimiento, lo que daría como resultado la restauración de la

salud de la piel, la mejora estética del aspecto de la piel y el retraso del envejecimiento de la piel.

Al suprimir el daño de los tejidos de la piel relacionado con el envejecimiento y al prevenir el daño neuronal y restaurar la función neuronal, los compuestos, composiciones y métodos proporcionados pueden proteger la piel de daños, mejorar la salud y el aspecto de la piel y retrasar el envejecimiento de la piel. Dadas sus funciones beneficiosas únicas en la protección de la función de células y órganos clave, incluida la piel, es esperable que los compuestos de VLC-PUFA n3 y/o elovanoides proporcionados sean eficaces para el tratamiento de una amplia gama de dermatopatías y afecciones de la piel, incluidas dermatopatías y afecciones de la piel inflamatorias, autoinmunitarias, degenerativas o neurodegenerativas relacionadas con la piel.

Analizados en conjunto, los datos y análisis anteriores constituyen la base para la presente divulgación en cuanto a que los compuestos, las composiciones dermatológicas o cosméticas y los métodos de uso de los compuestos proporcionados en los tejidos de la piel son capaces de proporcionar protección, prevención y tratamiento de la piel dañada por inflamación, deshidratación, envejecimiento u otras causas.

Funciones beneficiosas de VLC-PUFA n3 como opciones terapéuticas: Los conceptos y datos descritos en este documento respaldan el uso beneficioso de los compuestos de VLC-PUFA n3 y/o elovanoides proporcionados como opciones terapéuticas para la prevención y el tratamiento de retinopatías degenerativas, así como de enfermedades relacionadas con el cerebro, el CNS y otras necesidades terapéuticas sin resolver relacionadas con enfermedades y afecciones inflamatorias o degenerativas.

Origen de los compuestos de la divulgación: Los compuestos proporcionados no se aislaron a partir de tejidos de origen natural, sino a partir del resultado de un experimento artificial que combina una célula humana y un VLC-PUFA n3 sintetizado químicamente. Las estructuras generales de nuestros compuestos elovanoides sintéticos se emparejaron mediante HPLC y espectrometría de masas con compuestos biosintetizados en células del epitelio pigmentario de la retina humana o detectados en cultivos de células neuronales. Sin embargo, se desconoce actualmente la presencia natural de los elovanoides monohidroxilados y dihidroxilados proporcionados con estereoquímica específicamente definida. Además, los compuestos proporcionados no se obtienen de fuentes naturales, sino que se preparan mediante la adaptación de métodos sintéticos estereocontrolados conocidos en la técnica, partiendo de materiales disponibles en el mercado. Los métodos de preparación proporcionados se diseñaron

para adecuarse a las propiedades hidrófobas únicas de los VLC-PUFA n3, que difieren significativamente de los compuestos que tienen un número total de carbonos de 22 carbonos o menos.

La presente divulgación abarca compuestos que tienen estructuras estereoquímicamente puras y se sintetizan y modifican químicamente para que tengan características y propiedades estructurales adicionales que les permitan ejercer actividad farmacológica. Los compuestos proporcionados son derivados farmacéuticamente aceptables modificados químicamente en forma de sales o ésteres carboxílicos que mejoran su estabilidad química y biológica y permiten su uso en aplicaciones terapéuticas que implican diversas formas de administración de fármacos.

La divulgación también proporciona composiciones farmacológicamente eficaces de los compuestos proporcionados que mejoran su capacidad para ser administrados a un sujeto de manera que puedan llegar a las células y tejidos diana.

Uso beneficioso general de VLC-PUFA n3 y elovanoides: La presente divulgación proporciona compuestos y composiciones para la prevención y el tratamiento de una amplia gama de enfermedades sistémicas inflamatorias, degenerativas y neurodegenerativas, que incluyen dermatopatías, enfermedades oftálmicas, encefalopatías, incluido el neurotrauma.

Los compuestos y composiciones proporcionados por esta divulgación son capaces de restaurar la homeostasis e inducir señales de supervivencia celular en determinadas células que experimentan estrés oxidativo no compensado u otras alteraciones homeostáticas.

La divulgación también proporciona métodos de uso de los compuestos y composiciones proporcionados que contienen un derivado hidroxilado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga omega-3, como los ácidos carboxílicos libres o sus sales farmacéuticamente aceptables, o como sus correspondientes ésteres u otros derivados de profármacos. Los compuestos proporcionados se pueden preparar fácilmente mediante la adaptación de métodos conocidos en la técnica, partiendo de materiales disponibles en el mercado.

La administración de una composición farmacéutica que contiene un compuesto proporcionado y un portador farmacéuticamente aceptable restaura el equilibrio homeostático y favorece la supervivencia de determinadas células que son esenciales para mantener la función normal. Los compuestos, composiciones y métodos proporcionados pueden utilizarse para el tratamiento preventivo y terapéutico de enfermedades inflamatorias, degenerativas y neurodegenerativas.

Esta divulgación se orienta a los pasos fundamentales del inicio y la evolución temprana de estas afecciones al imitar la biología específica de las respuestas intrínsecas de células/órganos para lograr potencia, selectividad, ausencia de efectos secundarios y bioactividad sostenida.

Uso de VLC-PUFA para reducir la expresión de VEGF

Los aspectos de la invención se refieren a métodos para reducir la expresión y/o la actividad del VEGF en un sujeto, como ser en un tejido de un sujeto.

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (identificador del gen de GENBANK: 7422) es un potente factor angiogénico y se describió inicialmente como un factor de crecimiento esencial para las células vasculares endoteliales.

El VEGF es producido por muchos tipos de células, incluidos macrófagos, plaquetas, queratinocitos y células mesangiales renales. Las actividades del VEGF no se limitan al sistema vascular; el VEGF participa en funciones fisiológicas normales, como la osificación, la hematopoyesis, la cicatrización de heridas y el desarrollo.

La familia de los VEGF comprende, en los mamíferos, cinco miembros: VEGF-A, factor de crecimiento placentario (PGF), VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D. La actividad del VEGF-A, como su nombre lo indica, se ha estudiado principalmente en células del endotelio vascular, aunque tiene efectos en muchos otros tipos de células (p. ej., estimulación de la migración de monocitos/macrófagos, neuronas, células epiteliales renales). *In vitro*, se ha demostrado que el VEGF-A estimula la mitogénesis de las células endoteliales y la migración celular. El VEGF-A también es un vasodilatador y aumenta la permeabilidad microvascular y originalmente se denominó factor de permeabilidad vascular.

Uso de VLC-PUFA para reducir la angiogénesis

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporcionan métodos para inhibir o reducir la angiogénesis en trastornos que tienen una patología que requiere angiogénesis. Un subconjunto de estos trastornos son las afecciones no cancerosas, incluidas las afecciones oculares. En algunas modalidades, los métodos se refieren al uso de al menos una composición de ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga omega-3 descrita en este documento para disminuir la angiogénesis patológica.

«Angiogénesis» se refiere en términos generales al proceso de desarrollo de nuevos vasos sanguíneos. El proceso implica la proliferación, migración e infiltración en los tejidos de células endoteliales de capilares a partir de vasos sanguíneos

preexistentes. La angiogénesis es importante en los procesos fisiológicos normales, que incluyen, por ejemplo, el crecimiento folicular, el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas y en procesos patológicos. La modulación de la angiogénesis se refiere tanto a un aumento como a una disminución en el desarrollo de los vasos sanguíneos.

El término «vasculogénesis» se refiere a la formación de nuevos vasos sanguíneos cuando no hay vasos preexistentes. La formación de vasos sanguíneos se produce mediante un proceso *de novo* en el que las células progenitoras endoteliales y/o las células progenitoras mesenquimatosas migran, se ensamblan y se diferencian en respuesta a señales locales (como factores de crecimiento y matrices extracelulares) para formar nuevos vasos sanguíneos.

Como se usa en este documento, «neovascularización» se refiere a la formación de redes vasculares funcionales que pueden estar perfundidas por la sangre o componentes de la sangre. La neovascularización incluye la angiogénesis, angiogénesis por gemación, angiogénesis por intususcepción, angiogénesis por brote, angiogénesis terapéutica y vasculogénesis.

La angiogénesis es la formación de nuevos capilares sanguíneos que dan lugar a la neovascularización. La angiogénesis es un proceso complejo que incluye una serie de pasos secuenciales que incluyen la degradación de la membrana basal vascular y matrices intersticiales por células endoteliales, migración de células endoteliales, proliferación de células endoteliales y formación de asas capilares por células endoteliales. Si bien la angiogénesis es un proceso normal para el desarrollo o mantenimiento de los vasos sanguíneos, surgen procesos patológicos (es decir, enfermedades relacionadas con la angiogénesis) donde el crecimiento de los vasos sanguíneos es realmente dañino. Dichas patologías incluyen psoriasis y artritis. La evolución de la angiogénesis ocurre en varias fases que incluyen: elaboración de la señal angiogénica; disolución de la membrana basal de los vasos sanguíneos; proliferación de células endoteliales; migración de células endoteliales; y formación y diferenciación de túbulos y asas capilares. Cada una de estas fases puede ser una diana para la intervención farmacológica. La terapia antiangiogénica permitiría la modulación en dichas enfermedades asociadas a la angiogénesis que tienen una vascularización excesiva.

La angiogénesis también está asociada a otras enfermedades importantes del tejido ocular, que incluyen retinopatías diabéticas, las vitreorretinopatías proliferativas y retinopatía del prematuro. Cualquier crecimiento anormal de vasos sanguíneos en el ojo puede dispersar y bloquear la luz incidente antes de que llegue a la retina. La

neovascularización puede ocurrir en casi cualquier lugar del ojo y puede alterar significativamente la función del tejido ocular. Algunas de las enfermedades neovasculares oculares más peligrosas son las que afectan a la retina. Por ejemplo, muchos pacientes diabéticos presentan una retinopatía que se caracteriza por la formación de nuevos vasos sanguíneos permeables en la superficie anterior de la retina y en el vítreo, lo que provoca una vitreorretinopatía proliferativa. Un subconjunto de pacientes con degeneración macular relacionada con la edad presenta neovascularización subretiniana que conduce a su posterior ceguera.

El proceso fundamental de la formación y el crecimiento de los vasos endoteliales ocurre durante el desarrollo fetal, el ciclo endometrial femenino, la cicatrización de heridas, la inflamación y el injerto de tejidos. En el ojo, la neovascularización (proliferación *de novo* del endotelio y de los vasos sanguíneos) de las estructuras oculares durante una enfermedad o lesión puede alterar el equilibrio fisiológico ocular y provocar pérdida de la visión y/o ceguera. Si bien surge de un origen embrionario diferente, el endotelio corneal también puede experimentar una transdiferenciación anormal y puede causar alteraciones de la visión y ceguera. Ejemplos de alteración visual causada por disfunción, proliferación y neovascularización endotelial ocular incluyen las retinopatías que son el resultado de una complicación a raíz de prematuridad gestacional, diabetes o degeneración macular relacionada con la edad y los síndromes endoteliales iridocorneales (ICE) que afectan la córnea y el iris. Por lo tanto, el endotelio ocular debe estar equipado con mecanismos innatos para inhibir el exceso de proliferación endotelial, angiogénesis y transdiferenciación en regiones altamente especializadas pero que relativamente «carecen de vasos sanguíneos» como la retina y la córnea.

Varias enfermedades que involucran neovascularización proliferativa afectan a la retina y pueden causar alteración visual y/o ceguera. El desarrollo gradual normal de una red de vasos sanguíneos de la retina se ve interrumpido en la retinopatía del prematuro (ROP), que es el resultado de una proliferación o neovascularización anormal de los vasos sanguíneos de la retina en bebés prematuros. En el vítreo primario hiperplásico (PHPV), los vasos sanguíneos vítreos que habitualmente retrocede al final de la gestación no lo hacen. En el ROP, los vasos sanguíneos de la retina que habitualmente crecen en las capas de la retina de manera equilibrada en el tiempo, hiperproliferan en parches densos que pueden dar lugar a una variedad de anomalías retinianas. Estos defectos incluyen cicatrización, desprendimiento de retina y posterior pérdida de la visión en los casos que no presentan regresión espontánea.

Los vasos vítreos anormales, que forman una red entre la retina y el cristalino, pueden contener pericitos subendoteliales que pueden contraerse y desprender la retina. Un tratamiento eficaz para el ROP implica la ablación de la retina periférica en un intento por limitar físicamente la hiperproliferación vascular que causa las secuelas que provocan posterior pérdida de la visión y ceguera. Este tratamiento puede ayudar a prevenir la ceguera en pacientes con ROP. Sin embargo, la ablación de la retina para el ROP en sí deja a la mayoría de los pacientes con ROP con una agudeza visual de menos de 20/40.

La patología ocular asociada a la diabetes mellitus varía desde la retinopatía (DRO) y la neovascularización del iris hasta el glaucoma como complicación terminal de la disfunción de la cámara anterior. La DRO es el resultado de una complicación doble de oclusión vascular trombótica retiniana inicial seguida de neovascularización retiniana proliferativa como resultado de la hipoxia causada por la oclusión vascular. Las consecuencias fisiopatológicas de la DRO incluyen edema macular, isquemia y degeneración, desprendimiento de retina, hemorragia vítrea y anomalías del nervio óptico. Un tratamiento eficaz para la DRO es la terapia de ablación que utiliza láseres para fotocoagular las áreas proliferadas de neovascularización. Sin embargo, la terapia con láser acarrea complicaciones que incluyen oclusión de la vena retiniana, pérdida de agudeza visual, hemorragia vítrea y, en ocasiones, fracasa por completo. Es probable que una variedad de factores angiogénicos y otras citocinas contribuyan a la neovascularización en la DRO. La alta concentración de glucosa en suero característica de la diabetes puede contribuir por sí sola a la neovascularización retiniana en pacientes diabéticos, ya que se ha demostrado que la glucosa alta eleva la producción de VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) a partir de células musculares lisas vasculares. Tanto el VEGF como el VEGF-R1 y el VEGF-R2 tienen un aumento regulado en las regiones vasculares y perivasculares de la retina en ratas diabéticas. En muestras de DRO examinadas en etapas antes de los picos de neovascularización proliferativa, se encuentra que el VEGF se expresa en neurogliocitos retinianos, células del epitelio pigmentario de la retina e incluso en células vasculares endoteliales retinianas. Esta producción temprana de VEGF puede contribuir a la neovascularización proliferativa posterior que da lugar a secuelas patológicas en las etapas posteriores de la DRO. La DRO está asociada a un microambiente retiniano local altamente anormal que promueve la neovascularización retiniana.

La degeneración macular (MDG) es la principal causa de ceguera en personas mayores de 60 años. La formación de una membrana fibrovascular coroidea en las

retinas de pacientes con degeneración macular contribuye a la retinopatía y al desprendimiento de retina. Se han encontrado presentes citocinas inflamatorias y factores de crecimiento angiogénicos, incluidos el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF), bFGF, TGF- β 1 y VEGF, tanto en el epitelio pigmentario de la retina como en las membranas fibrovasculares asociadas a la degeneración macular (26, 27). Se cree que las altas concentraciones de VEGF y otras citocinas angiogénicas dan lugar a un aumento de la neovascularización que contribuye a un ciclo de retroalimentación positiva de crecimiento fibrovascular, displasia retiniana, cicatrización y posterior desprendimiento de retina. La neovascularización retiniana suele tratarse con múltiples quemaduras con láser en la retina para eliminar los vasos sanguíneos patológicos. Los pacientes con enfermedades neovasculares de la cámara anterior (p. ej., neovascularización corneal, rubeosis del iris) se tratan con glucocorticoides oculares tópicos potentes. Estas terapias solo son parcialmente eficaces y generalmente solo ralentizan la neovascularización y la evolución de la enfermedad en general. Además, pueden causar efectos secundarios graves si se usan durante un período de tiempo relativamente largo.

Una córnea transparente normal es esencial para proporcionar una superficie anterior refractiva adecuada, y mantener la carencia de vasos sanguíneos corneal es una característica vital de la fisiología corneal. La enfermedad de la córnea es la tercera causa más común de ceguera en todo el mundo y la neovascularización corneal está presente en la mayoría de los pacientes afectados. Los resultados de un estudio demostraron que se puede observar angiogénesis en el 19,9 % de los botones corneales humanos extirpados durante el trasplante de córnea. Se estima que se produce neovascularización corneal en 1,4 millones de personas por año, de las cuales el 12 % experimenta posterior pérdida de la visión. Con referencia a la neovascularización corneal, ver, por ejemplo, Feizi, Sepehr, Amir A. Azari y Sharareh Safapour. "Therapeutic approaches for corneal neovascularization." *Eye and Vision* 4.1 (2017): 28, que se incorpora a este documento en su totalidad mediante referencia.

Los vasos sanguíneos anormales, de proliferación reciente en las córneas, brotan de estructuras vasculares pericorneales preexistentes. La neovascularización corneal, que es más una respuesta inespecífica a diferentes lesiones clínicas que un diagnóstico, ocurre en una amplia variedad de patologías de la córnea, que incluyen enfermedades congénitas, hipoxia relacionada con lentes de contacto, trastornos inflamatorios, quemaduras químicas, deficiencia de células madre del limbo, alergia, traumatismo, queratitis infecciosa, enfermedades autoinmunitarias y rechazo del injerto

de córnea. Estas patologías dan lugar a un desequilibrio entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos que pueden dar como resultado la proliferación y migración de células vasculares endoteliales hacia el estroma corneal. La neovascularización es una complicación frecuente de la infección corneal, y la prevalencia de queratitis infecciosa refleja una idea general del grado de neovascularización corneal que se produce en todo el mundo. Aproximadamente, el 15 % de los casos de ceguera en el mundo (6 millones de personas) son causados por infecciones por clamidia y 146 millones de pacientes tienen una infección activa. La infección por oncocercosis es otra causa importante de ceguera causada por la neovascularización corneal, y se informa que ha provocado la ceguera aproximadamente 270 000 pacientes, con 120 millones de personas en todo el mundo en riesgo [6]. Se estima que la queratitis herpética afecta a 500 000 pacientes en los EE. UU. La neovascularización corneal también es una característica del uso de lentes de contacto, particularmente del uso prolongado de lentes blandos de hidrogel, y se estima que un 1,3 % de 9 millones de usuarios de lentes de contacto tienen nuevos vasos corneales. La neovascularización es parte de la reparación de daños químicos extensos en la córnea. La prevalencia de neovascularización causada por todo tipo de productos químicos (quitaesmaltes, tintes, ácidos y álcalis) es de aproximadamente 37 000 pacientes en EE. UU.

La neovascularización corneal puede dar lugar a una disminución de la agudeza visual debido a edema, inflamación persistente, depósito de proteínas y lípidos intraestromales y cicatrización. Además, se ha informado de una fuerte asociación entre la vascularización de la córnea receptora y el rechazo del injerto de córnea con aumento del riesgo a medida que más áreas se ven afectadas por los vasos. La formación de vasos corneales también está asociada a la linfangiogénesis corneal, que permite la salida de antígenos y células que presentan antígenos a los ganglios linfáticos regionales. Existe una mayor probabilidad de que los vasos linfáticos estén presentes en córneas muy vascularizadas en comparación con córneas levemente vascularizadas [14]. Los vasos linfáticos corneales en los lechos corneales vascularizados del receptor adyacentes al tejido trasplantado pueden favorecer el rechazo del injerto al potenciar el transporte de antígenos del injerto a los ganglios linfáticos regionales.

La carencia de vasos sanguíneos en la córnea, también llamada privilegio angiogénico corneal, es el resultado de un equilibrio entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos presentes de forma natural. Este privilegio angiogénico es un proceso activo. Las vías moleculares centrales que prevalecen en los procesos de neovascularización corneal parecen ser compartidas entre diversas situaciones e

incluyen un desequilibrio entre agentes proangiogénicos y antiangiogénicos, lo que da lugar a un exceso de estímulos proangiogénicos.

Los mediadores químicos angiogénicos consisten en factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), metaloproteasa de la matriz (MMP), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF) e interleucina-1 (IL-1). La denominada familia de los VEGF incluye VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y factor de crecimiento placentario en mamíferos. El VEGF-A es el miembro más importante de la familia de los VEGF y es secretado por una amplia variedad de células heterogéneas, como macrófagos, linfocitos T, fibroblastos, pericitos, astrocitos, células del epitelio pigmentario de la retina y células corneales (epitelio, queratocitos, y endotelio). Los macrófagos, estimulados por inflamación o lesión, también pueden secretar VEGF-C y VEGF-D en el estroma corneal. El VEGF-A propaga su efecto al interactuar con los receptores de tirosina cinasas; VEGFR-1 y VEGFR-2. El VEGFR-1 es un receptor de tirosina cinasa transmembranario, mientras que el VEGFR-2 es un receptor de señalización principal para VEGF que provoca la proliferación y migración de células vasculares endoteliales. La linfangiogénesis puede ser estimulada por VEGF-C y VEGF-D a través de la interacción con VEGFR-3.

El VEGF no es la única molécula biológica que tiene las funciones de hemangiogénesis y linfangiogénesis. Otros factores asociados a la neovascularización corneal son los PDGF que participan en la remodelación de tejidos, el crecimiento y la división celular y la angiogénesis. Se ha demostrado que las interacciones de ligandos, como PDGF-A y PDGF-B, con sus correspondientes receptores (PDGFR-a y PDGFR-b), están asociadas a la neovascularización corneal. El bFGF favorece la angiogénesis corneal mediante sus efectos en la producción de VEGF-A, VEGF-C y VEGF-D. La MMP14 interactúa con el VEGFR1 y su actividad enzimática es esencial para la angiogénesis causada por VEGFA. La IL-1 es una molécula proinflamatoria producida por diferentes células, incluidos fibroblastos, macrófagos y neutrófilos, e induce la expresión de moléculas de adhesión, quimiocinas y factores de crecimiento que dan lugar a la neovascularización.

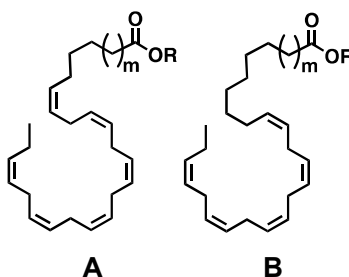
Las composiciones y métodos descritos en este documento son útiles para la prevención y el tratamiento de cualquier neovascularización ocular. Ejemplos no limitativos de estas incluyen neovascularización asociada a enfermedades de la córnea (como enfermedades congénitas, hipoxia relacionada con lentes de contacto, trastornos inflamatorios, quemaduras químicas, deficiencia de células madre del limbo, alergia, traumatismo, queratitis infecciosa, enfermedades autoinmunitarias y rechazo del injerto

de córnea), neovascularización corneal, retinopatías (retinopatía diabética, glaucoma crónico, desprendimiento de retina, retinopatía drepanocítica y neovascularización subretiniana por degeneración macular senil); rubeosis del iris; vitreorretinopatía proliferativa; enfermedades inflamatorias; uveítis crónica; neoplasias (retinoblastoma, pseudoglioma y melanoma); iridociclitis heterocrómica de Fuchs; glaucoma neovascular; neovascularización corneal (hipoplasia del iris inflamatoria, por trasplante y del desarrollo); neovascularización después de una vitrectomía y extracción del cristalino combinadas; enfermedades vasculares (isquemia de la retina, insuficiencia vascular coroidea, trombosis coroidea e isquemia de la arteria carótida); neovascularización del nervio óptico; y neovascularización debido a la penetración del ojo o lesión ocular por contusión. En algunas modalidades, los métodos se refieren al uso de al menos una composición de ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga omega-3 descrita en este documento para disminuir la angiogénesis patológica en trastornos oculares que dan lugar a hipervascularización.

Compuestos

En este documento se describen compuestos a base de ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga omega-3 y sus derivados hidroxilados, denominados «elovanoides».

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga omega-3 tienen las estructuras de **A** o **B**, o sus derivados:



donde: **A** contiene un total de 23 a 42 átomos de carbono en la cadena carbonada, y con 6 dobles enlaces alternos carbono-carbono en *cis* que comienzan en las posiciones n-3, n-6, n-9, n-12, n-15 y n-18, y en donde **B** contiene un total de 23 a 42 átomos de carbono en la cadena carbonada, y con 5 dobles enlaces alternos carbono-carbono en *cis* que comienzan en las posiciones n-3, n-6, n-9, n-12 y n-15. R puede ser hidrógeno, metilo, etilo, alquilo o un catión como un catión amonio, un catión iminio o un catión metálico que incluye, a modo de ejemplo, catión sodio, potasio, magnesio, zinc o calcio, y en donde m es un número de 0 a 19.

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga omega-3 de la divulgación pueden tener un grupo carboxilo terminal «-COOR» en donde se pretende que la «R» designe un grupo unido mediante enlaces covalentes al carboxilo como un grupo alquilo. Como alternativa, se pretende además que el grupo carboxilo tenga una carga negativa como «-COO⁻» y R es un catión que incluye un catión metálico, un catión amonio y similares.

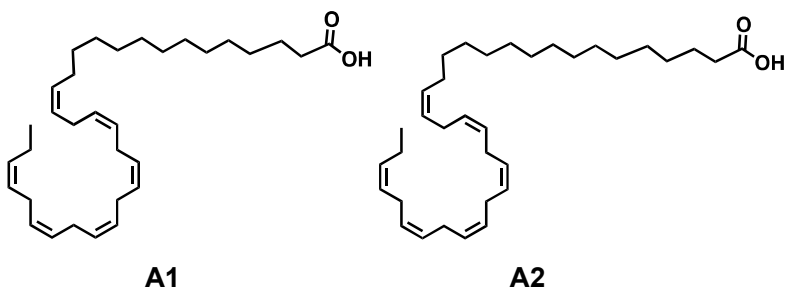
En algunos ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga omega-3, m es un número seleccionado de un grupo que consiste en de 0 a 15. Por lo tanto, m puede ser un número seleccionado entre 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15 donde el componente ácido graso contiene un total de 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36 o 38 átomos de carbono en su cadena carbonada. En otros ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga omega-3, m es un número seleccionado de un grupo que consiste en 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14, donde el componente ácido graso contiene un total de 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35 o 37 átomos de carbono en su cadena carbonada. En algunos ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga omega-3, m es un número seleccionado de un grupo que consiste en de 5 a 15, donde el componente ácido graso contiene un total de 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 o 38 átomos de carbono en su cadena carbonada. En algunos ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga omega-3, m es un número seleccionado de un grupo que consiste en de 9 a 11, donde el componente ácido graso contiene un total de 32 o 34 átomos de carbono en su cadena carbonada.

En algunas modalidades, el ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga omega-3 es un ácido carboxílico, es decir, R es hidrógeno. En otras modalidades, el ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga omega-3 es un éster carboxílico, en donde R es metilo, etilo o alquilo. Cuando el ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga omega-3 es un éster carboxílico, R puede ser, a modo de ejemplo, metilo o etilo. En algunas modalidades, el ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga omega-3 es un éster carboxílico, en donde R es metilo.

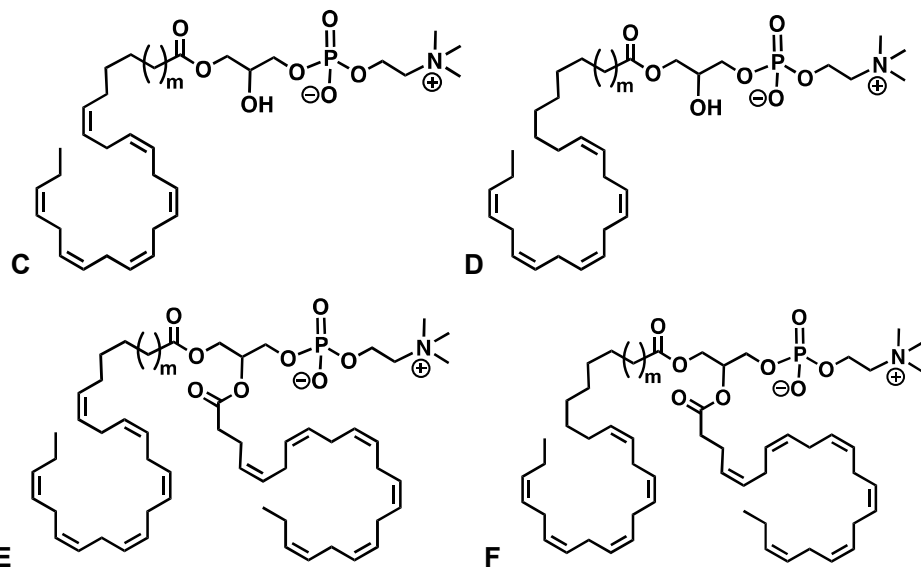
En algunas modalidades, el ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga omega-3 puede ser una sal de carboxilato, en donde R es un catión amonio, un catión iminio o un catión metálico seleccionado de un grupo que consiste en un catión sodio, potasio, magnesio, zinc o calcio. En algunas modalidades ventajosas, R es catión amonio o catión iminio. R puede ser un catión sodio o un catión potasio. En algunas modalidades, R es un catión sodio.

El ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga omega-3 o derivado de la divulgación puede tener 32 o 34 carbonos en su cadena carbonada y 6 dobles enlaces

alternos en *cis* que comienzan en la posición n-3, y tienen la fórmula **A1** (ácido 14Z,17Z,20Z,23Z,26Z,29Z)-dotriaconta-14,17,20,23,26,29-hexaenoico) o fórmula **A2** (ácido 16Z,19Z,22Z,25Z,28Z,31Z)-tetratriaconta-16,19,22,25,28,31-hexaenoico):



En algunas modalidades de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga omega-3, el derivado carboxilo es parte de un fosfolípido derivado de glicerol, que se puede preparar fácilmente a partir de la forma de ácido carboxílico del VLC-PUFA n3 de estructura **A** o **B**, mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, y se puede representar por las estructuras **C**, **D**, **E** o **F**:

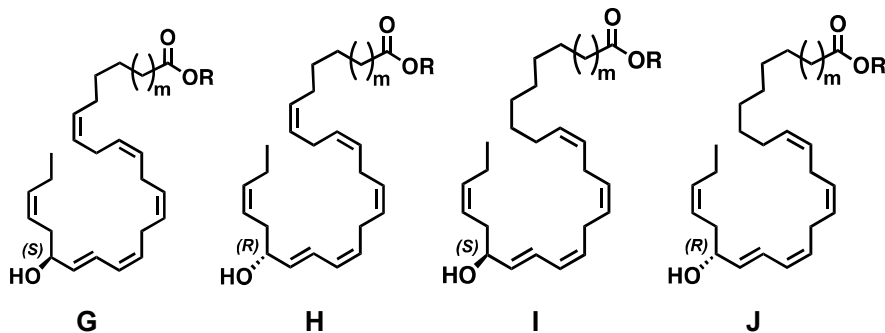


donde: **C** o **E** contiene un total de 23 a 42 átomos de carbono en la cadena carbonada, y con 6 dobles enlaces alternos carbono-carbono en *cis* que comienzan en las posiciones n-3, n-6, n-9, n-12, n-15 y n-18, y en donde **D** o **F** contiene un total de 23 a 42 átomos de carbono en la cadena carbonada, y con 5 dobles enlaces alternos carbono-carbono en *cis* que comienzan en las posiciones n-3, n-6, n-9, n-12 y n-15. En modalidades ventajosas, m es un número seleccionado de un grupo que consiste en de 0 a 15. En otras modalidades, m es un número seleccionado entre 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15 donde el componente ácido graso contiene un total de 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36 o 38

átomos de carbono en su cadena carbonada. En modalidades ventajosas adicionales, *m* es un número seleccionado de un grupo que consiste en 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14, donde el componente ácido graso contiene un total de 23, 25, 27, 19, 31, 33, 35 o 37 átomos de carbono en su cadena carbonada.

En algunas modalidades, *m* es un número seleccionado de un grupo que consiste en de 5 a 15, donde el componente ácido graso contiene un total de 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 o 38 átomos de carbono en su cadena carbonada. En algunas modalidades, *m* es un número seleccionado de un grupo que consiste en 5, 7, 9, 11, 13 o 15, donde el componente ácido graso contiene un total de 28, 30, 32, 34, 36 o 38 átomos de carbono en su cadena carbonada. En otras modalidades, *m* es un número seleccionado de un grupo que consiste en 4, 6, 8, 10, 12, o 14, donde el componente ácido graso contiene un total de 27, 29, 31, 33, 35 o 37 átomos de carbono en su cadena carbonada. En modalidades ventajosas, *m* es un número seleccionado de un grupo que consiste en de 9 a 11, donde el componente ácido graso contiene un total de 32 o 34 átomos de carbono en su cadena carbonada.

Los elovanoides monohidroxilados de la divulgación pueden tener las estructuras de **G**, **H**, **I** o **J**:



en donde los compuestos **G** y **H** tienen un total de 23 a 42 átomos de carbono en la cadena carbonada, con 5 dobles enlaces carbono-carbono en *cis* que comienzan en las posiciones n-3, n-9, n-12, n-15 y n-18 y un doble enlace carbono-carbono en *trans* que comienza en las posiciones n-7; y en donde los compuestos **I** y **J** tienen un total de 23 a 42 átomos de carbono en la cadena carbonada, y con 4 dobles enlaces carbono-carbono en *cis* que comienzan en las posiciones n-3, n-9, n-12 y n-15, y un doble enlace carbono-carbono en *trans* que comienza en las posiciones n-7; en donde R es hidrógeno, metilo, etilo, alquilo o un catión seleccionado de un grupo que consiste en: catión amonio, catión iminio o un catión metálico seleccionado de un grupo que consiste en un catión sodio, potasio, magnesio, zinc o calcio, y en donde *m* es un número seleccionado de un grupo que consiste en de 0 a 19; en donde los compuestos **G** y **H**

pueden existir como una mezcla equimolar; en donde los compuestos **I** y **J** pueden existir como una mezcla equimolar; en donde los compuestos **G** y **H** proporcionados son predominantemente un enantiómero con una quiralidad (*S*) o (*R*) definida en el carbono que tiene el grupo hidroxilo; y en donde los compuestos **G** y **H** son predominantemente un enantiómero con una quiralidad (*S*) o (*R*) definida en el carbono que tiene el grupo hidroxilo.

Como se usa en este documento y en otras estructuras de la presente divulgación, se muestra que los compuestos de la divulgación tienen un grupo carboxilo terminal «-COOR», se pretende que la «R» designe un grupo unido mediante enlaces covalentes al carboxilo como un grupo alquilo. Como alternativa, se pretende además que el grupo carboxilo tenga una carga negativa como «-COO⁻» y R es un catión que incluye un catión metálico, un catión amonio y similares.

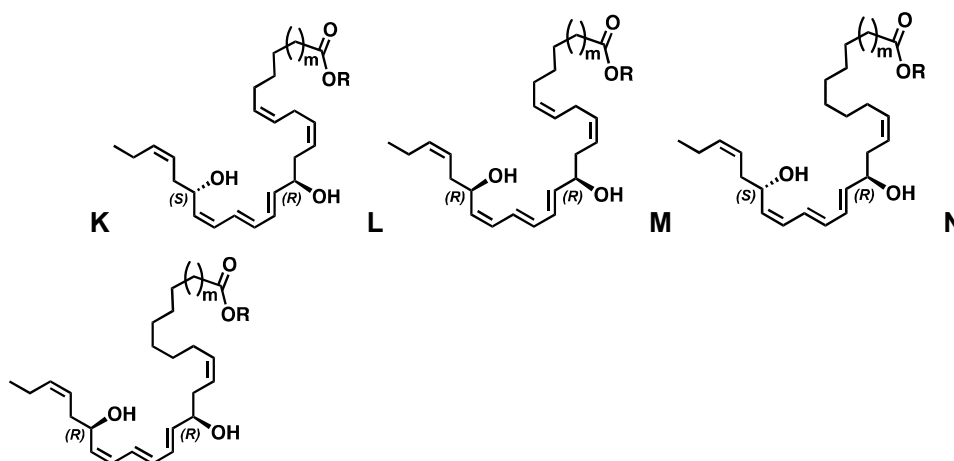
En algunas modalidades de los elovanoides monohidroxilados de la divulgación, m es un número seleccionado de un grupo que consiste en de 0 a 15. En otras modalidades ventajosas, m es un número seleccionado entre 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15 donde el componente ácido graso contiene un total de 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36 o 38 átomos de carbono en su cadena carbonada. En otras modalidades, m es un número seleccionado de un grupo que consiste en 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14, donde el componente ácido graso contiene un total de 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35 o 37 átomos de carbono en su cadena carbonada.

En algunas modalidades, m es un número seleccionado de un grupo que consiste en de 5 a 15, donde el componente ácido graso contiene un total de 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 o 38 átomos de carbono en su cadena carbonada. En algunas modalidades, m es un número seleccionado de un grupo que consiste en 5, 7, 9, 11, 13 o 15, donde el componente ácido graso contiene un total de 28, 30, 32, 34, 36 o 38 átomos de carbono en su cadena carbonada. En otras modalidades, m es un número seleccionado de un grupo que consiste en 4, 6, 8, 10, 12, o 14, donde el componente ácido graso contiene un total de 27, 29, 31, 33, 35 o 37 átomos de carbono en su cadena carbonada. En modalidades ventajosas, m es un número seleccionado de un grupo que consiste en de 9 a 11, donde el componente ácido graso contiene un total de 32 o 34 átomos de carbono en su cadena carbonada.

En algunas modalidades, los elovanoides monohidroxilados de la divulgación son un ácido carboxílico, es decir, R es hidrógeno. En otras modalidades, el compuesto es un éster carboxílico, en donde R es metilo, etilo o alquilo. En modalidades ventajosas, el compuesto es un éster carboxílico, en donde R es metilo o etilo. En modalidades

ventajosas, el compuesto es un éster carboxílico, en donde R es metilo. En otras modalidades ventajosas, el compuesto es una sal de carboxilato, en donde R es un catión amonio, un catión iminio o un catión metálico seleccionado de un grupo que consiste en un catión sodio, potasio, magnesio, zinc o calcio. En algunas modalidades ventajosas, R es catión amonio o catión iminio. En otras modalidades ventajosas, R es un catión sodio o un catión potasio. En modalidades ventajosas, R es un catión sodio.

Los elovanoides dihidroxilados de la divulgación pueden tener las estructuras **K**, **L**, **M** o **N**:



en donde los compuestos **K** y **L** tienen un total de 23 a 42 átomos de carbono en la cadena carbonada, con 4 dobles enlaces carbono-carbono en *cis* que comienzan en las posiciones n-3, n-7, n-15 y n-18, y 2 enlaces carbono-carbono en *trans* que comienzan en las posiciones n-9, n-11; y en donde los compuestos **M** y **N** tienen un total de 23 a 42 átomos de carbono en la cadena carbonada, con 3 dobles enlaces carbono-carbono en *cis* que comienzan en las posiciones n-3, n-7, n-12 y n-15, y 2 enlaces carbono-carbono en *trans* que comienzan en las posiciones n-9, n-11; en donde R es hidrógeno, metilo, etilo, alquilo o un catión seleccionado de un grupo que consiste en: catión amonio, catión iminio o un catión metálico seleccionado de un grupo que consiste en un catión sodio, potasio, magnesio, zinc o calcio, y en donde **m** es un número seleccionado de un grupo que consiste en de 0 a 19; en donde los compuestos **K** y **L** pueden existir como una mezcla equimolar; en donde los compuestos **M** y **N** pueden existir como una mezcla equimolar; en donde los compuestos **K** y **L** son predominantemente un enantiómero con una quiralidad (S) o (R) definida en el carbono que tiene el grupo hidroxilo; y en donde los compuestos **M** y **N** proporcionados son predominantemente un enantiómero con una quiralidad (S) o (R) definida en el carbono que tiene el grupo hidroxilo.

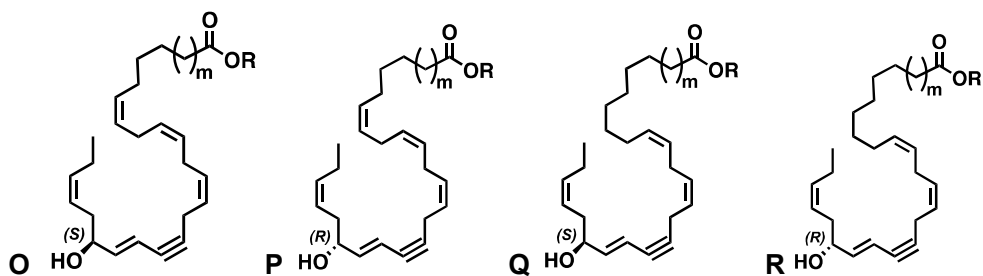
Como se usa en este documento y en otras estructuras de la presente divulgación, se muestra que los compuestos de la divulgación tienen un grupo carboxilo terminal «-COOR», se pretende que la «R» designe un grupo unido mediante enlaces covalentes al carboxilo como un grupo alquilo. Como alternativa, se pretende además que el grupo carboxilo tenga una carga negativa como «-COO⁻» y R es un catión que incluye un catión metálico, un catión amonio y similares.

En algunas modalidades de los elovanoides dihidroxilados de la divulgación, **m** es un número seleccionado de un grupo que consiste en de 5 a 15, donde el componente ácido graso contiene un total de 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 o 38 átomos de carbono en su cadena carbonada. En modalidades ventajosas, **m** es un número seleccionado de un grupo que consiste en 5, 7, 9, 11, 13 o 15, donde el componente ácido graso contiene un total de 28, 30, 32, 34, 36 o 38 átomos de carbono en su cadena carbonada. En otras modalidades, **m** es un número seleccionado de un grupo que consiste en 4, 6, 8, 10, 12, o 14, donde el componente ácido graso contiene un total de 27, 29, 31, 33, 35 o 37 átomos de carbono en su cadena carbonada. En modalidades ventajosas, **m** es un número seleccionado de un grupo que consiste en de 9 a 11, donde el componente ácido graso contiene un total de 32 o 34 átomos de carbono en su cadena carbonada.

Algunos elovanoides dihidroxilados de la divulgación son ácido carboxílico, es decir, R es hidrógeno. En otras modalidades, el elovanoide dihidroxilado de la divulgación es un éster carboxílico, en donde R es metilo, etilo o alquilo. En modalidades ventajosas, el compuesto es un éster carboxílico, en donde R es metilo o etilo. En modalidades ventajosas, el compuesto es un éster carboxílico, en donde R es metilo.

En otras modalidades, el elovanoide dihidroxilado de la divulgación es una sal de carboxilato, en donde R es un catión amonio, un catión iminio o un catión metálico seleccionado de un grupo que consiste en un catión sodio, potasio, magnesio, zinc o calcio. En algunas modalidades ventajosas, R es catión amonio o catión iminio. En otras modalidades ventajosas, R es un catión sodio o un catión potasio. En modalidades ventajosas, R es un catión sodio.

Los elovanoides alquinilo monohidroxilados de la divulgación pueden tener las estructuras de **O**, **P**, **Q** o **R**:



en donde los compuestos **O** y **P** tienen un total de 23 a 42 átomos de carbono en la cadena carbonada, con 4 dobles enlaces carbono-carbono en *cis* que comienzan en las posiciones n-3, n-12, n-15 y n-18, un enlace carbono-carbono en *trans* que comienza en la posición n-7, y un triple enlace carbono-carbono que comienza en la posición n-9; y en donde los compuestos **I** y **J** tienen un total de 23 a 42 átomos de carbono en la cadena carbonada, con 3 dobles enlaces carbono-carbono en *cis* que comienzan en las posiciones n-3, n-12 y n-15, un enlace carbono-carbono en *trans* que comienza en la posición n-7, y un triple enlace carbono-carbono que comienza en la posición n-9; en donde R es hidrógeno, metilo, etilo, alquilo o un catión seleccionado de un grupo que consiste en: catión amonio, catión iminio o un catión metálico seleccionado de un grupo que consiste en un catión sodio, potasio, magnesio, zinc o calcio, y en donde **m** es un número seleccionado de un grupo que consiste en de 0 a 19; en donde los compuestos **O** y **P** pueden existir como una mezcla equimolar; en donde los compuestos **Q** y **R** pueden existir como una mezcla equimolar; en donde los compuestos **O** y **P** proporcionados son predominantemente un enantiómero con una quiralidad (S) o (R) definida en el carbono que tiene el grupo hidroxilo; y en donde los compuestos **O** y **P** proporcionados son predominantemente un enantiómero con una quiralidad (S) o (R) definida en el carbono que tiene el grupo hidroxilo.

Como se usa en este documento y en otras estructuras de la presente invención, se muestra que los elovanoides alquilino monohidroxilados de la divulgación tienen un grupo carboxilo terminal «-COOR», se pretende que la «R» designe un grupo unido mediante enlaces covalentes al carboxilo como un grupo alquilo. Como alternativa, se pretende además que el grupo carboxilo tenga una carga negativa como «-COO⁻» y R es un catión que incluye un catión metálico, un catión amonio y similares.

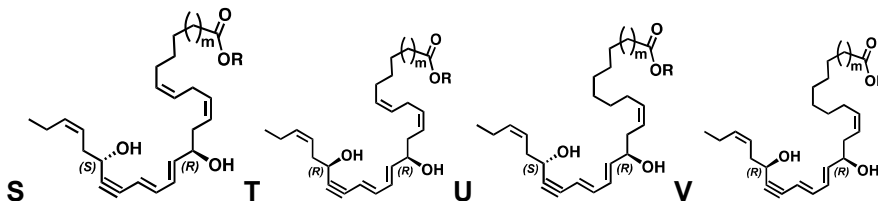
En algunas modalidades, m es un número seleccionado de un grupo que consiste en de 0 a 15. En otras modalidades, m es un número seleccionado entre 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15 donde el componente ácido graso contiene un total de 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36 o 38 átomos de carbono en su cadena carbonada.

En modalidades adicionales, m es un número seleccionado de un grupo que consiste en 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14, donde el componente ácido graso contiene un total de 23, 25, 27, 19, 31, 33, 35 o 37 átomos de carbono en su cadena carbonada. En algunas modalidades, m es un número seleccionado de un grupo que consiste en de 5 a 15, donde el componente ácido graso contiene un total de 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 o 38 átomos de carbono en su cadena carbonada. En modalidades, m es un número seleccionado de un grupo que consiste en 5, 7, 9, 11, 13 o 15, donde el componente ácido graso contiene un total de 28, 30, 32, 34, 36 o 38 átomos de carbono en su cadena carbonada. En otras modalidades, m es un número seleccionado de un grupo que consiste en 4, 6, 8, 10, 12, o 14, donde el componente ácido graso contiene un total de 27, 29, 31, 33, 35 o 37 átomos de carbono en su cadena carbonada. En algunas modalidades, m es un número seleccionado de un grupo que consiste en de 9 a 11, donde el componente ácido graso contiene un total de 32 o 34 átomos de carbono en su cadena carbonada.

En algunas modalidades, los elovanoides alquinilo monohidroxilados de la divulgación son ácidos carboxílicos, es decir, R es hidrógeno. En otras modalidades, los elovanoides alquinilo monohidroxilados de la divulgación son ésteres carboxílicos, en donde R es metilo, etilo o alquilo. En modalidades, los elovanoides alquinilo monohidroxilados de la divulgación son ésteres carboxílicos, en donde R es metilo o etilo.

En algunas modalidades R es metilo. En otras modalidades, los elovanoides alquinilo monohidroxilados de la divulgación pueden ser una sal de carboxilato, en donde R es un catión amonio, un catión iminio o un catión metálico seleccionado de un grupo que consiste en un catión sodio, potasio, magnesio, zinc o calcio. En algunas modalidades, R es catión amonio o catión iminio. En otras modalidades, R es un catión sodio o un catión potasio. En modalidades, R es un catión sodio.

Los elovanoides alquinilo dihidroxilados pueden tener las estructuras de **S**, **T**, **U** o **V**:



en donde los compuestos **S** y **T** tienen un total de 23 a 42 átomos de carbono en la cadena carbonada, con 3 dobles enlaces carbono-carbono en *cis* que comienzan en

las posiciones n-3, n-12, n-15 y n-18, con 2 dobles enlaces carbono-carbono en *trans* que comienzan en las posiciones n-9 y n-11, y un triple enlace carbono-carbono que comienza en la posición n-7; y en donde los compuestos **U** y **V** tienen un total de 23 a 42 átomos de carbono en la cadena carbonada, y con 2 dobles enlaces carbono-carbono en *cis* que comienzan en las posiciones n-3 y n-15, con 2 dobles enlaces carbono-carbono en *trans* que comienzan en las posiciones n-9 y n-11, y un triple enlace carbono-carbono que comienza en la posición n-7; en donde R es hidrógeno, metilo, etilo, alquilo o un catión seleccionado de un grupo que consiste en: catión amonio, catión iminio o un catión metálico seleccionado de un grupo que consiste en un catión sodio, potasio, magnesio, zinc o calcio, y en donde **m** es un número seleccionado de un grupo que consiste en de 0 a 19; en donde los compuestos **S** y **T** pueden existir como una mezcla equimolar; en donde los compuestos **U** y **V** pueden existir como una mezcla equimolar.

En algunas modalidades, los compuestos **S** y **T** proporcionados son predominantemente un enantiómero con una quiralidad (*S*) o (*R*) definida en el carbono que tiene el grupo hidroxilo; y en donde los compuestos **U** y **V** proporcionados son predominantemente un enantiómero con una quiralidad (*S*) o (*R*) definida en el carbono que tiene el grupo hidroxilo.

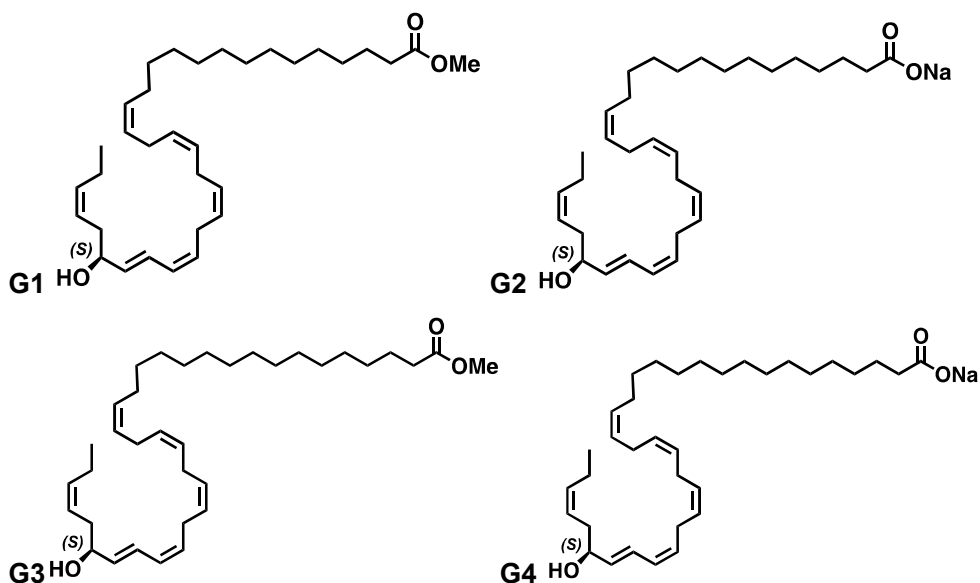
Como se usa en este documento y en otras estructuras de la presente invención, se muestra que los compuestos de la invención tienen un grupo carboxilo terminal «-COOR», se pretende que la «R» designe un grupo unido mediante enlaces covalentes al carboxilo como un grupo alquilo. Como alternativa, se pretende además que el grupo carboxilo tenga una carga negativa como «-COO⁻» y R es un catión que incluye un catión metálico, un catión amonio y similares.

En algunas modalidades, **m** es un número seleccionado de un grupo que consiste en de 5 a 15, donde el componente ácido graso contiene un total de 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 o 38 átomos de carbono en su cadena carbonada. En modalidades, **m** es un número seleccionado de un grupo que consiste en 5, 7, 9, 11, 13 o 15, donde el componente ácido graso contiene un total de 28, 30, 32, 34, 36 o 38 átomos de carbono en su cadena carbonada. En otras modalidades, **m** es un número seleccionado de un grupo que consiste en 4, 6, 8, 10, 12, o 14, donde el componente ácido graso contiene un total de 27, 29, 31, 33, 35 o 37 átomos de carbono en su cadena carbonada. En modalidades, **m** es un número seleccionado de un grupo que consiste en de 9 a 11, donde el componente ácido graso contiene un total de 32 o 34 átomos de carbono en su cadena carbonada.

En algunas modalidades, el compuesto proporcionado es un ácido carboxílico, es decir, R es hidrógeno.

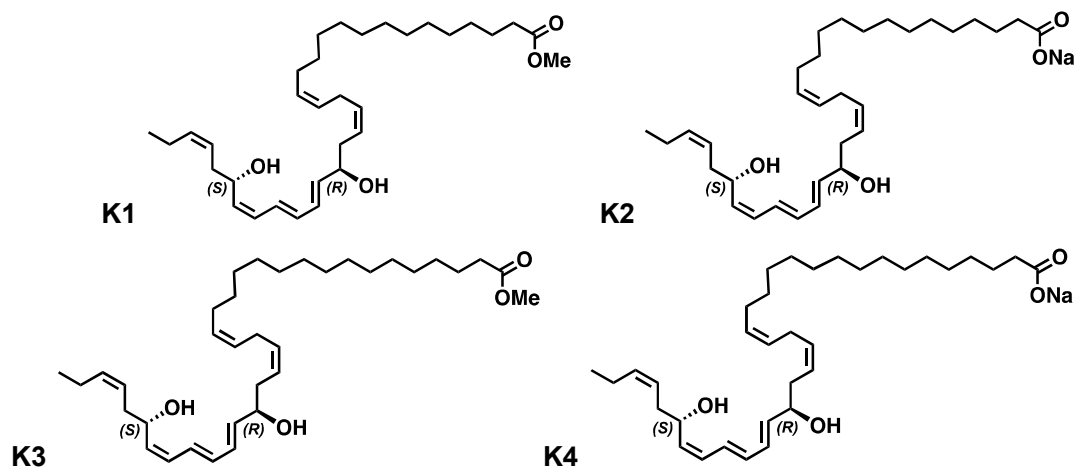
En otras modalidades, el compuesto proporcionado es un éster carboxílico, en donde R es metilo, etilo o alquilo. En modalidades, el compuesto proporcionado es un éster carboxílico, en donde R es cadena metílica, etílica o alquílica. En modalidades, el compuesto proporcionado es un éster carboxílico, en donde R es metilo. En otras modalidades, el compuesto proporcionado es una sal de carboxilato, en donde R es un catión amonio, un catión iminio o un catión metálico seleccionado de un grupo que consiste en un catión sodio, potasio, magnesio, zinc o calcio. En algunas modalidades, R es catión amonio o catión iminio. En otras modalidades, R es un catión sodio o un catión potasio. En modalidades, R es un catión sodio.

En modalidades ventajosas, la presente divulgación proporciona un éster metílico monohidroxilado de 32 carbonos de fórmula **G1**, que tiene el nombre: (S,14Z,17Z,20Z,23Z,25E,29Z)-27-hidroxidotriaconta-14,17,20,23,25,29-hexaenoato de metilo; una sal de sodio monohidroxilada de 32 carbonos de fórmula **G2**, que tiene el nombre: (S,14Z,17Z,20Z,23Z,25E,29Z)-27-hidroxidotriaconta-14,17,20,23,25,29-hexaenoato de sodio; un éster metílico monohidroxilado de 34 carbonos de fórmula **G3**, que tiene el nombre: (S,16Z,19Z,22Z,25Z,27E,31Z)-29-hidroxitetraatriaconta-16,19,22,25,27,31-hexaenoato de metilo; o una sal de sodio monohidroxilada de 34 carbonos de fórmula **G4**, que tiene el nombre (S,16Z,19Z,22Z,25Z,27E,31Z)-29-hidroxitetraatriaconta-16,19,22,25,27,31-hexaenoato de sodio:

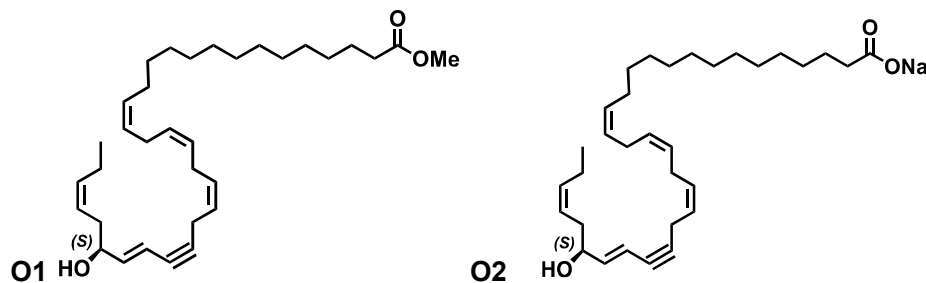


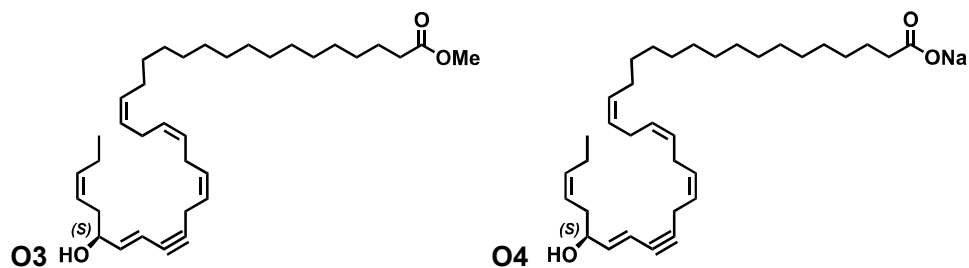
En otras modalidades ventajosas, la presente divulgación proporciona un éster metílico dihidroxilado de 32 carbonos de fórmula **K1**, que tiene el nombre:

(14Z,17Z,20R,21E,23E,25Z,27S,29Z)-20,27-dihidroxitriaconta-14,17,21,23,25,29-hexaenoato de metilo; una sal de sodio dihidroxilada de 32 carbonos de fórmula **K2**, que tiene el nombre: (14Z,17Z,20R,21E,23E,25Z,27S,29Z)-20,27-dihidroxitriaconta-14,17,21,23,25,29-hexaenoato de sodio; o un éster metílico dihidroxilado de 34 carbonos de fórmula **K3**, que tiene el nombre: (16Z,19Z,22R,23E,25E,27Z,29S,31Z)-22,29-dihidroxitetratriaconta-16,19,23,25,27,31-hexaenoato de metilo; o una sal de sodio dihidroxilada de 34 carbonos de fórmula **K4**, que tiene el nombre: (16Z,19Z,22R,23E,25E,27Z,29S,31Z)-22,29-dihidroxitetratriaconta-16,19,23,25,27,31-hexaenoato de sodio:

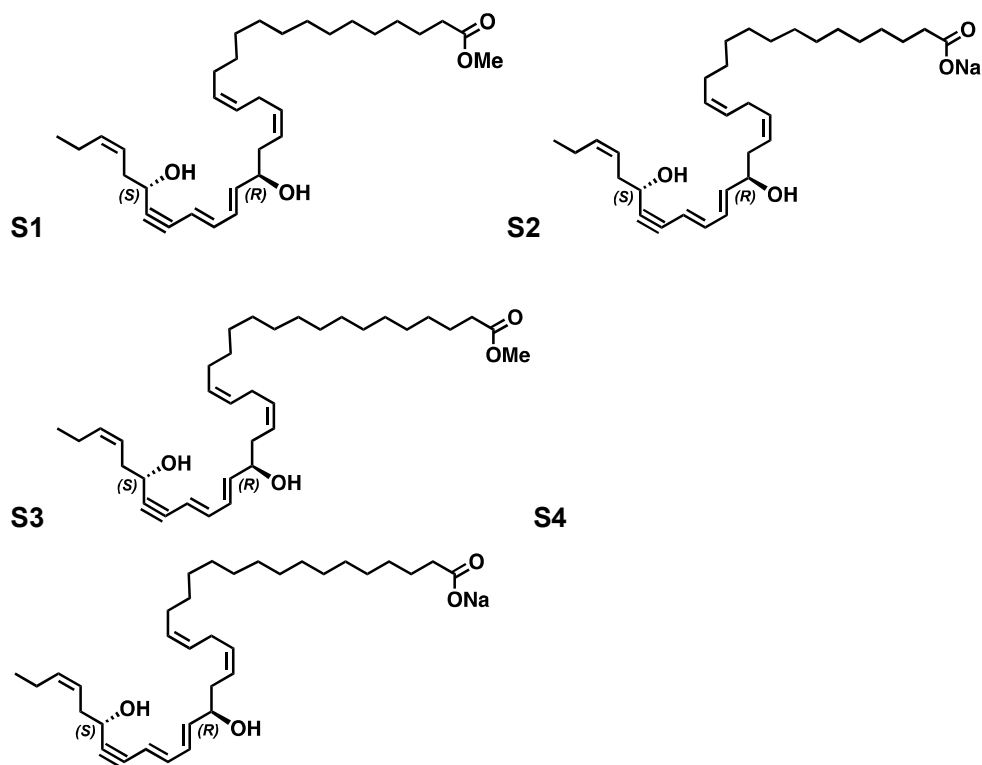


En otras modalidades, la presente invención proporciona un éster metílico alquinilo monohidroxilado de 32 carbonos de fórmula **O1**, que tiene el nombre: (S,14Z,17Z,20Z,25E,29Z)-27-hidroxitriaconta-14,17,20,25,29-pentan-23-oato de metilo; una sal de sodio alquinilo monohidroxilada de 32 carbonos de fórmula **O2**, que tiene el nombre: (S,17Z,20Z,25E,29Z)-27-hidroxitriaconta-17,20,25,29-tetran-23-oato de sodio; un éster metílico alquinilo monohidroxilado de 34 carbonos de fórmula **O3**, que tiene el nombre: (S,16Z,19Z,22Z,27E,31Z)-29-hidroxitetratriaconta-16,19,22,27,31-pentan-25-oato de metilo; una sal de sodio alquinilo monohidroxilada de 34 carbonos de fórmula **O4**, que tiene el nombre: (S,16Z,19Z,22Z,27E,31Z)-29-hidroxitetratriaconta-16,19,22,27,31-pentan-25-oato de sodio:





En otras modalidades ventajosas, la presente invención proporciona un éster metílico alquinilo dihidroxilado de 32 carbonos de fórmula **S1**, que tiene el nombre: (14Z,17Z,20R,21E,23E,27S,29Z)-20,27-dihidroxitriaconta-14,17,21,23,29-pentan-25-oato de metilo; una sal de sodio alquinilo dihidroxilada de 32 carbonos de fórmula **S2**, que tiene el nombre: (14Z,17Z,20R,21E,23E,27S,29Z)-20,27-dihidroxitriaconta-14,17,21,23,29-pentan-25-oato de sodio; o un éster metílico alquinilo dihidroxilado de 34 carbonos de fórmula **S3**, que tiene el nombre: (16Z,19Z,22R,23E,25E,29S,31Z)-22,29-dihidroxitetratriaconta-16,19,23,25,31-pentan-27-oato de metilo; o una sal de sodio alquinilo dihidroxilada de 34 carbonos de fórmula **S4**, que tiene el nombre: (16Z,19Z,22R,23E,25E,29S,31Z)-22,29-dihidroxitetratriaconta-16,19,23,25,31-pentan-27-oato de sodio.



Métodos de preparación y fabricación de los compuestos proporcionados: Los compuestos proporcionados de la divulgación se pueden preparar fácilmente mediante la adaptación de métodos conocidos en la técnica, partiendo de materiales disponibles en el mercado según se resume en los Esquemas 1-5 que se muestran en las Figs. 24-28.

El Esquema 1 (Fig. 24) muestra el abordaje detallado para la síntesis total estereocontrolada de compuestos de tipo **O**, en donde n es 9, y la cadena de ácido graso contiene un total de 32 átomos de carbono, y el grupo R es metilo o un catión sodio. En particular, el Esquema 1 muestra la síntesis de los compuestos ELV-N32-Me y ELV-N32-Na, partiendo con pentadec-14-anoato de metilo (**S1**). Partiendo de heptadec-16-anoato (**T1**), este proceso proporciona los compuestos ELV-N34-Me y ELV-N34-Na. Los precursores alquinilo de ELV-N32-Me y ELV-N32-Na, a saber **13a**, **13b**, **15a** y **15b** también se encuentran entre los compuestos **X** y **Z** proporcionados en esta divulgación. El Esquema 1 proporciona los reactivos y las condiciones para las preparaciones de los compuestos proporcionados, con las condiciones de reacción típicas para este tipo de reacciones.

El Esquema 2 (Fig. 25) describe la síntesis total de los elovanoides dihidroxilados **K** y **L** y sus precursores alquinos **S** y **T**, partiendo con los intermedios **2**, **5** y **7** que también se utilizaron en el Esquema 1. La conversión del epóxido **4** protegido (R) en intermedio **15**, y el acoplamiento de **7** y **15** seguido de la conversión en intermedio **17** se puede realizar de acuerdo con procedimientos publicados (Tetrahedron Lett. 2012;53(14):1695-8).

El acoplamiento cruzado catalítico entre los intermedios **2** o **17** o entre los intermedios **5** o **17**, seguido de desprotección, da lugar a la formación de compuestos alquinilo **S** y **T**, que a continuación se reducen selectivamente para formar elovanoides dihidroxilados **K** y **L**. La hidrólisis y la acidificación proporcionan los ácidos carboxílicos correspondientes, que pueden convertirse en sales de carboxilato con la adición de cantidades equivalentes de la base correspondiente. Los elovanoides dihidroxilados de tipo **K**, **L**, **S** y **T** con al menos 23 carbonos y hasta 42 carbonos en su cadena carbonada pueden prepararse de manera similar con una variación en el número de carbonos en el producto de partida alquino **7**.

El Esquema 3 (Fig. 26) describe la síntesis total de elovanoides dihidroxilados con cinco dobles enlaces insaturados de tipo **M** y **N**, así como sus precursores alquinos **U** y **V**, con los mismos intermedios alquinilo **2** y **5**, que también se utilizaron en el Esquema 1. (Tetrahedron Lett. 2012;53(14):1695-8).

La síntesis del intermedio común **22** comienza con el ácido carboxílico **18**, que se convierte en ortoéster **19**, mediante metodologías conocidas (Tetrahedron Lett. 1983, 24 (50), 5571-4). La reacción del alquino con litio con el epóxido **1** proporciona el intermedio **21**, que se convierte en el intermedio yoduro **22**, de manera similar a la conversión de **16** en **17**. El acoplamiento cruzado catalítico entre los intermedios **2** o **5** con **22**, seguido de desprotección, da lugar a la formación de elovanoides dihidroxi alquinilo **U** y **V**, que a continuación se reducen selectivamente para formar elovanoides dihidroxilados **M** y **N**.

La hidrólisis y la acidificación proporcionan los ácidos carboxílicos correspondientes, que pueden convertirse en sales de carboxilato con la adición de cantidades equivalentes de la base correspondiente. Los elovanoides dihidroxilados de tipo **M**, **N**, **U** y **V** con al menos 23 carbonos y hasta 42 carbonos en su cadena carbonada pueden prepararse de manera similar con una variación en el número de carbonos en el ácido carboxílico alquino **18**.

El Esquema 4 (Fig. 27) muestra la síntesis total estereocontrolada de elovanoides dihidroxilados de 32 carbonos, partiendo con el éster metílico alquino **23**, el intermedio **15** y el intermedio alquino **2**. En particular, este esquema muestra la síntesis total del compuesto elovanoide alquinilo ELV-N32-Me-acetilénico de 32 carbonos, y su conversión en el éster metílico elovanoide ELV-N32-Me, el ácido carboxílico elovanoide ELV-N32-H, y la sal de sodio elovanoide ELV-N32-Na.

El Esquema 5 (Fig. 28) muestra la síntesis total estereocontrolada de elovanoides dihidroxilados de 34 carbonos, partiendo con el éster metílico alquino **30** y con la misma secuencia de reacciones que en el Esquema 4.

En particular, este esquema muestra la síntesis total del compuesto elovanoide alquinilo ELV-N34-Me-acetilénico de 34 carbonos, y su conversión en el éster metílico elovanoide ELV-N34-Me, el ácido carboxílico elovanoide ELV-N34-H, y el sal de sodio elovanoide ELV-N34-Na.

La química presentada en los Esquemas 1-5 (Figs. 24-28) también puede adaptarse fácilmente para la síntesis total de elovanoides monohidroxilados y dihidroxilados adicionales, que tienen al menos 23 carbonos y hasta 42 carbonos en su cadena carbonada.

Composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades: En otras modalidades, la presente divulgación proporciona formulaciones de composiciones farmacéuticas que contienen cantidades terapéuticamente eficaces de uno o más de los

compuestos proporcionados en este documento o sales de estos en un portador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones proporcionadas contienen uno o más compuestos proporcionados en este documento o sales de estos, y un excipiente, diluyente, portador y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Los compuestos se formulan preferentemente en preparaciones farmacéuticas adecuadas como soluciones, suspensiones, comprimidos, comprimidos dispersables, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida o elixires, para administración oral, yugal, intranasal, vaginal, rectal, ocular, liberación sostenida desde depósitos o nanodispositivos o dendrímeros intravítreos implantados, incluidos en colágeno u otros materiales en la superficie ocular, o en soluciones o suspensiones estériles para administración parenteral, preparación de parches dérmicos así como de parches transdérmicos e inhaladores de polvo seco. Las formulaciones proporcionadas pueden estar en forma de gotas, como gotas oftálmicas, y la formulación farmacéutica puede contener además antioxidantes y/o agentes conocidos para el tratamiento de enfermedades oculares. Normalmente, los compuestos descritos anteriormente se formulan en composiciones farmacéuticas mediante el uso de técnicas y procedimientos conocidos en la técnica (ver, p. ej., Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, cuarta edición 1985, 126).

Las modalidades ventajosas de la divulgación proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen diversas formas de los compuestos proporcionados, como los ácidos carboxílicos libres o sus sales farmacéuticamente aceptables, o como sus correspondientes ésteres o sus derivados de fosfolípidos. En otras modalidades ventajosas, la divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que contienen uno o más elovanoides que contienen uno o dos grupos hidroxilo en posiciones ubicadas entre n-3 y n-18 de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga, como los ácidos carboxílicos libres o sus sales farmacéuticamente aceptables, o como sus correspondientes ésteres.

En una modalidad ventajosa adicional, la divulgación proporciona una composición farmacéutica para la conservación y protección de la piel en todas las edades y para el tratamiento de una dermatopatía o un trastorno de la piel. En algunas modalidades, la dermatopatía o el trastorno de la piel implica inflamación de la piel, hiperproliferación de la piel o deshidratación de la piel.

En modalidades, la divulgación proporciona una composición para el tratamiento de dermatopatías o trastornos de la piel seleccionados de un grupo que consiste en:

dermatitis, eccema, dermatitis atópica, neurodermatitis, dermatitis de fotocontacto, eccema xerótico, eccema seborreico, dishidrosis, eccema discoide, eccema venoso, dermatitis herpetiforme, neurodermatitis y autoeccematización, inflamación de la piel causada por radiación o psoriasis.

En las composiciones proporcionadas, las concentraciones eficaces de uno o más compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables se mezclan con un portador o vehículo farmacéutico adecuado. Los compuestos pueden derivarse como las correspondientes sales, ésteres, éteres o ésteres enólicos, ácidos, bases, solvatos, hidratos o profármacos antes de la formulación, según lo descrito anteriormente. Las concentraciones de los compuestos en las composiciones son eficaces para el suministro de una cantidad, tras su administración, que trata, previene o atenúa uno o más de los síntomas de una enfermedad, trastorno o afección.

Según lo descrito en este documento, las composiciones pueden prepararse fácilmente mediante la adaptación de métodos conocidos en la técnica. Las composiciones pueden ser un componente de una formulación farmacéutica. La formulación farmacéutica puede contener además agentes conocidos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias o degenerativas, incluidas las enfermedades neurodegenerativas. Las composiciones proporcionadas pueden servir como precursores profármacos de los ácidos grasos y pueden convertirse en ácidos grasos libres tras su localización en el lugar de la enfermedad.

La presente divulgación también proporciona una composición o composiciones o una composición o composiciones farmacéuticas envasadas para la prevención, restauración o uso en el tratamiento de la enfermedad o afección. Otras composiciones o composiciones farmacéuticas envasadas proporcionadas por la presente divulgación incluyen además indicaciones que incluyen al menos una de: instrucciones de uso de la composición para tratar la enfermedad o afección. El kit puede incluir además tampones y reactivos adecuados conocidos en la técnica para administrarles diversas combinaciones de los componentes enumerados anteriormente al receptor.

Formulaciones farmacéuticas: Las modalidades de la presente divulgación incluyen una composición o composición farmacéutica identificada en este documento y pueden formularse con uno o más excipientes, diluyentes, portadores, antioxidantes naturales o sintéticos y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Además, las modalidades de la presente divulgación incluyen una composición o composición farmacéutica formulada con una o más sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables. En particular, la composición o composición farmacéutica puede formularse

con uno o más excipientes, diluyentes, portadores y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables para proporcionar una modalidad de una composición de la presente divulgación.

Se conoce una amplia variedad de excipientes farmacéuticamente aceptables en la técnica. Se han descrito ampliamente excipientes farmacéuticamente aceptables en una variedad de publicaciones, que incluyen, por ejemplo, A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," 20^{ma}. edición, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H.C. Ansel et al., eds., 7^{ma}. ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; and Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A.H. Kibbe et al., eds., 3^{era}. ed. Amer. Pharmaceutical Assoc. Los excipientes farmacéuticamente aceptables, como vehículos, adyuvantes, portadores o diluyentes, son de fácil obtención para el público. Además, las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, como agentes reguladores y tamponadores del pH, agentes reguladores de la tonicidad, estabilizadores, agentes humectantes y similares, son de fácil obtención para el público.

En una modalidad de la presente divulgación, se le puede administrar la composición o composición farmacéutica al sujeto por cualquier medio capaz de producir el efecto deseado. Por lo tanto, la composición o composición farmacéutica puede incorporarse en una variedad de formulaciones para su administración terapéutica. Por ejemplo, la composición o composición farmacéutica puede formularse en composiciones farmacéuticas mediante la combinación con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables adecuados, y puede formularse en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, soluciones, supositorios u óvulos, inyecciones, inhaladores y aerosoles.

Los vehículos excipientes adecuados para la composición o composición farmacéutica son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares, y combinaciones de estos. Además, si se desea, el vehículo puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares como agentes humectantes o emulsionantes, antioxidantes o agentes tamponadores del pH. Los métodos para preparar dichas presentaciones son conocidos para los expertos en la técnica, o les resultarán evidentes con esta divulgación. Ver, p. ej., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 17^{ma}. edición, 1985. La composición o formulación que se administre contendrá, en cualquier caso, una cantidad

de la composición o composición farmacéutica suficiente para lograr el estado deseado en el sujeto tratado.

Las composiciones de la presente divulgación pueden incluir aquellas que comprenden una matriz de liberación sostenida o de liberación controlada. Además, las modalidades de la presente divulgación pueden utilizarse junto con otros tratamientos que utilicen formulaciones de liberación sostenida. Como se usa en este documento, una matriz de liberación sostenida es una matriz hecha de materiales, generalmente polímeros, que son degradables por hidrólisis enzimática o ácida o por disolución. Una vez insertada en el cuerpo, las enzimas y los líquidos corporales actúan sobre la matriz. Es deseable la elección de una matriz de liberación sostenida de materiales biocompatibles como liposomas, polilactidas (ácido poliláctico), poliglicólido (polímero de ácido glicólico), polilactida co-glicólido (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhídridos, poli(orto)ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, sulfato de condroitina, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, poliaminoácidos, aminoácidos como fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, polivinilpropileno, polivinilpirrolidona y silicona. Las matrices biodegradables ilustrativas incluyen una matriz de polilactida, una matriz de poliglicólido y una matriz de polilactida co-glicólido (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico). En otra modalidad, la composición farmacéutica de la presente divulgación (así como composiciones combinadas) puede administrarse en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, la composición o composición farmacéutica puede administrarse mediante el uso de infusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas u otras formas de administración. En una modalidad, se puede usar una bomba (Sefton (1987). CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al. (1980). Surgery 88:507; Saudek et al. (1989). N. Engl. J. Med. 321:574). En otra modalidad, se utilizan materiales poliméricos. En incluso otra modalidad, se coloca un sistema de liberación controlada cerca de la diana terapéutica, por lo que solo se necesita una fracción de la dosis sistémica. En incluso otra modalidad, se coloca un sistema de liberación controlada cerca de la diana terapéutica, por lo que solo se necesita una fracción de la sistémica. Otros sistemas de liberación controlada se describen en el artículo de Langer (1990). Science 249:1527-1533.

En otra modalidad, las composiciones de la presente divulgación (así como composiciones combinadas por separado o juntas) incluyen aquellas formadas por impregnación de la composición o composición farmacéutica descrita en este documento en materiales absorbentes, como suturas, vendajes y gasas, o que recubren

la superficie de materiales en fase sólida, como grapas, cremalleras quirúrgicas y catéteres para administrar las composiciones. Otros sistemas de administración de este tipo resultarán evidentes de inmediato para los expertos en la técnica a la vista de la presente divulgación.

En otra modalidad, las composiciones o composiciones farmacéuticas de la presente divulgación (así como composiciones combinadas por separado o juntas) pueden ser parte de una formulación de liberación retardada. Las formulaciones de liberación retardada pueden prepararse según lo descrito en referencias normalizadas como "Pharmaceutical dosage form tablets", eds. Liberman et. al. (Nueva York, Marcel Dekker, Inc., 1989), "Remington-The science and practice of pharmacy", 20^{ma} ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000, y "Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems", 6^{ta} edición, Ansel et al., (Media, PA: Williams and Wilkins, 1995). Estas referencias proporcionan información sobre excipientes, materiales, equipos y procesos para preparar comprimidos y cápsulas y formulaciones de liberación retardada de comprimidos, cápsulas y gránulos. Estas referencias proporcionan información sobre portadores, materiales, equipos y procesos para preparar comprimidos y cápsulas y formulaciones de liberación retardada de comprimidos, cápsulas y gránulos.

Las modalidades de la composición o composición farmacéutica se le pueden administrar a un sujeto en una o más dosis. Los expertos notarán fácilmente que las dosis pueden variar en función de la composición o composición farmacéutica específica administrada, la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a los efectos secundarios. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente dosis ventajosas de un compuesto específico de múltiples maneras.

En una modalidad, se administran múltiples dosis de la composición o composición farmacéutica. La frecuencia de administración de la composición o composición farmacéutica puede variar en función de una variedad de factores, p. ej., la gravedad de los síntomas y similares. Por ejemplo, en una modalidad, la composición o composición farmacéutica puede administrarse una vez por mes, dos veces por mes, tres veces por mes, cada dos semanas (qow), una vez por semana (qw), dos veces por semana (biw), tres veces por semana (tiw), cuatro veces por semana, cinco veces por semana, seis veces por semana, cada dos días (qod), a diario (qd), dos veces por día (qid), tres veces por día (tid) o cuatro veces por día. Según lo descrito anteriormente, en una modalidad, la composición o composición farmacéutica se administra de 1 a 4 veces por día durante un período de tiempo de 1 a 10 días.

La duración de la administración de la composición o el análogo de la composición farmacéutica, p. ej., el período de tiempo durante el cual se administra la composición o composición farmacéutica, puede variar en función de cualquiera de una variedad de factores, p. ej., la respuesta del paciente, etc. Por ejemplo, la composición o composición farmacéutica combinada o por separado, puede administrarse durante un período de tiempo de aproximadamente un día a una semana, aproximadamente un día a dos semanas.

La cantidad de composiciones y composiciones farmacéuticas de la presente divulgación que pueden ser eficaces para tratar la afección o enfermedad puede determinarse mediante técnicas clínicas normalizadas. Además, se pueden emplear opcionalmente pruebas *in vitro* o *in vivo* como ayuda para identificar los intervalos de dosis óptimos. La dosis precisa empleada también puede depender de la vía de administración y puede decidirse según el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente.

Vías de administración: Las modalidades de la presente divulgación proporcionan métodos y composiciones para la administración de agente(s) activo(s) a un sujeto (p. ej., un ser humano) mediante el uso de cualquier método y vía disponible adecuados para la administración de fármacos, incluidos métodos *in vivo* y *ex vivo*, así como vías de administración sistémicas y localizadas. Las vías de administración incluyen vías de administración intranasal, intramuscular, intratraqueal, subcutánea, intradérmica, intravítrea, aplicación tópica, intravenosa, rectal, nasal, oral y otras vías de administración entérica y parenteral. Las vías de administración pueden combinarse, si se desea, o adaptarse según el agente y/o el efecto deseado. Se puede administrar un agente activo en una sola dosis o en múltiples dosis.

El VLC-PUFA n-3 y sus derivados biogénicos se forman en las células y no son un componente de la dieta de seres humanos. Las vías de administración ventajosas de los nuevos compuestos proporcionados en este documento incluirán la administración oral y parenteral, incluso en la superficie ocular, inyección intravítrea y subretiniana en el ojo para evitar la absorción intestinal, la barrera intestinal-hepática y hemato-ocular. Las formulaciones proporcionadas pueden administrarse en forma de gotas, como gotas oftálmicas, o cualquier otro método habitual para el tratamiento de enfermedades oculares.

Las vías de administración parenterales distintas de la administración por inhalación incluyen, a modo de ejemplo, las vías tópica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, intraorbital, intracapsular, intrarraquídea, intraesternal e intravenosa, es

decir, cualquier vía de administración distinta de por tubo digestivo. La administración parenteral puede realizarse para afectar la administración sistémica o local de la composición. Cuando se desea la administración sistémica, la administración normalmente implica la administración tópica o mucosa invasiva o absorbida sistémicamente de preparaciones farmacéuticas. En una modalidad, la composición o composición farmacéutica también se le puede administrar al sujeto mediante administración entérica. Las vías de administración entéricas incluyen, a modo de ejemplo, administración oral y rectal (p. ej., mediante un supositorio).

Los métodos de administración de la composición o composición farmacéutica a través de la piel o la mucosa incluyen, a modo de ejemplo, aplicación tópica de una preparación farmacéutica adecuada, transmisión transdérmica, inyección y administración epidérmica. Para la transmisión transdérmica, los promotores de la absorción o la iontoforesis son métodos adecuados. La transmisión por iontoforesis puede lograrse mediante el uso de «parches» disponibles en el mercado que administran su producto de manera continua mediante pulsos eléctricos a través de la piel intacta durante períodos de varios días o más.

Los compuestos y composiciones proporcionados por esta divulgación son capaces de restaurar la homeostasis e inducir señales de supervivencia en determinadas células que experimentan estrés oxidativo u otras alteraciones homeostáticas. La divulgación también proporciona métodos de uso de los compuestos y composiciones proporcionados que contienen un derivado hidroxilado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larg, como los ácidos carboxílicos libres o sus sales farmacéuticamente aceptables, o como sus correspondientes ésteres u otros derivados de profármacos. Los compuestos proporcionados se pueden preparar fácilmente mediante la adaptación de métodos conocidos en la técnica, partiendo de materiales disponibles en el mercado.

La bioactividad de los compuestos proporcionados, ejemplificados por los derivados elovanoides ELV-N32-Me, ELV-N32-Na, ELV-N34-Me y ELV-N34-Na, se atribuye a su capacidad para llegar a las células humanas diana y ejercer sus acciones biológicas ya sea mediante el ingreso a la célula y/o la acción en un receptor unido a la membrana. De manera alternativa, los compuestos proporcionados pueden actuar mediante receptores intracelulares (p. ej., la membrana nuclear) y, por lo tanto, funcionarían específicamente al afectar los eventos de señalización clave. La administración de una composición farmacéutica, que contiene un compuesto proporcionado y un portador farmacéuticamente aceptable, restaura el equilibrio

homeostático y favorece la supervivencia de determinadas células que son esenciales para mantener la función normal. Los compuestos, composiciones y métodos proporcionados pueden utilizarse para el tratamiento preventivo y terapéutico de enfermedades inflamatorias, degenerativas y neurodegenerativas. Esta divulgación se orienta a los pasos fundamentales del inicio y la evolución temprana de estas afecciones al imitar la biología específica de las respuestas intrínsecas de células/órganos para lograr potencia, selectividad, ausencia de efectos secundarios y bioactividad sostenida.

Por consiguiente, un aspecto de la divulgación abarca modalidades de una composición que comprende al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga que tiene al menos 23 átomos de carbono en su cadena carbonada.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable y formulada para la administración de una cantidad del al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga eficaz para reducir un proceso patológico de un tejido de un sujeto receptor o la aparición de un proceso patológico de un tejido de un sujeto receptor.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el proceso patológico puede ser el envejecimiento o la inflamación de un tejido del sujeto receptor.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede formularse para administración tópica del al menos un tejido de ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga a la piel de un sujeto receptor.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el proceso patológico puede ser de un tejido nervioso del sujeto receptor.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender además al menos un componente nutricional, y la composición puede formularse para la administración oral o parenteral del al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga a un sujeto receptor.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga puede tener de aproximadamente 26 a aproximadamente 42 átomos de carbono en su cadena carbonada.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga puede tener 32 o 34 átomos de carbono en su cadena carbonada.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga puede tener en su cadena carbonada cinco o seis dobles enlaces con geometría *cis*.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga es ácido 14Z,17Z,20Z,23Z,26Z,29Z)-dotriaconta-14,17,20,23,26,29-hexaenoico o ácido (16Z,19Z,22Z,25Z,28Z,31Z)-tetratriaconta-16,19,22,25,28,31-hexaenoico.

Otro aspecto de la divulgación abarca modalidades de una composición que comprende al menos un elovanoide que tiene al menos 23 átomos de carbono en su cadena carbonada.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable y puede formularse para la administración de una cantidad del al menos un elovanoide eficaz para reducir un proceso patológico de un tejido de un sujeto receptor o para retrasar al menos un efecto del envejecimiento en un tejido de un sujeto receptor.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el proceso patológico puede ser el envejecimiento o la inflamación de un tejido del sujeto receptor.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede formularse para administración tópica del al menos un elovanoide a la piel de un sujeto receptor.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el proceso patológico puede ser de un tejido nervioso del sujeto receptor.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender además al menos un componente nutricional, y la composición puede formularse para la administración oral o parenteral del al menos un elovanoide a un sujeto receptor.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el al menos un elovanoide puede seleccionarse del grupo que consiste en: un elovanoide monohidroxilado, un elovanoide dihidroxilado, un elovanoide alquinilo monohidroxilado y un elovanoide alquinilo dihidroxilado, o cualquier combinación de estos.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el al menos un elovanoide puede ser una combinación de elovanoides, en donde la combinación se selecciona del grupo que consiste en: un elovanoide monohidroxilado y un elovanoide dihidroxilado; un elovanoide monohidroxilado y un elovanoide alquinilo monohidroxilado; un elovanoide monohidroxilado y un elovanoide alquinilo dihidroxilado; un elovanoide dihidroxilado y un elovanoide alquinilo monohidroxilado; un elovanoide dihidroxilado y un elovanoide alquinilo dihidroxilado; un elovanoide monohidroxilado, un elovanoide dihidroxilado y un elovanoide alquinilo monohidroxilado; un elovanoide monohidroxilado,

un elovanoide dihidroxilado y un elovanoide alquinilo dihidroxilado; y un elovanoide monohidroxilado, un elovanoide dihidroxilado y un elovanoide alquinilo monohidroxilado un elovanoide alquinilo dihidroxilado, en donde cada elovanoide es independientemente una mezcla racémica, un enantiómero aislado o una combinación de enantiómeros en donde la cantidad de un enantiómero mayor que la cantidad de otro enantiómero; y en donde cada elovanoide dihidroxilado es independientemente una mezcla diastereomérica, un diastereómero aislado o una combinación de diastereómeros en donde la cantidad de un diastereómero es mayor que la cantidad de otro diastereómero.

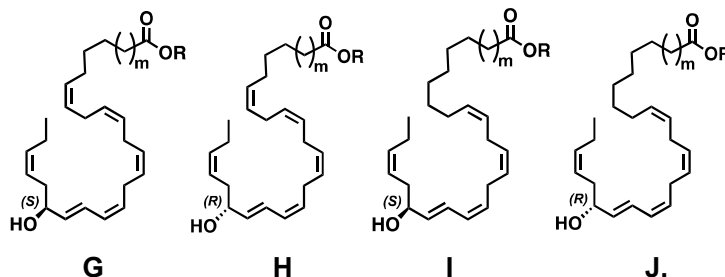
En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender además al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga que tiene al menos 23 átomos de carbono en su cadena carbonada.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga puede tener de aproximadamente 26 a aproximadamente 42 átomos de carbono en su cadena carbonada.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga puede tener en su cadena carbonada cinco o seis dobles enlaces con geometría *cis*.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga puede ser ácido 14Z,17Z,20Z,23Z,26Z,29Z)-dotriaconta-14,17,20,23,26,29-hexaenoico o ácido (16Z,19Z,22Z,25Z,28Z,31Z)-tetratriaconta-16,19,22,25,28,31-hexaenoico.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el elovanoide monohidroxilado puede seleccionarse del grupo que consiste en las fórmulas **G**, **H**, **I** o **J**:



en donde: n puede ser de 0 a 19 y -CO-OR puede ser un grupo de ácido carboxílico, o una sal o un éster de este, y en donde: si -CO-OR puede ser un grupo de ácido carboxílico y el compuesto **G**, **H**, **I** o **J** puede ser una sal de este, el catión de la sal puede ser un catión farmacéuticamente aceptable, y si -CO-OR puede ser un éster, R puede ser un grupo alquilo.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el catión farmacéuticamente aceptable puede ser un catión amonio, un catión iminio o un catión metálico.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el catión metálico puede ser un catión sodio, potasio, magnesio, zinc o calcio.

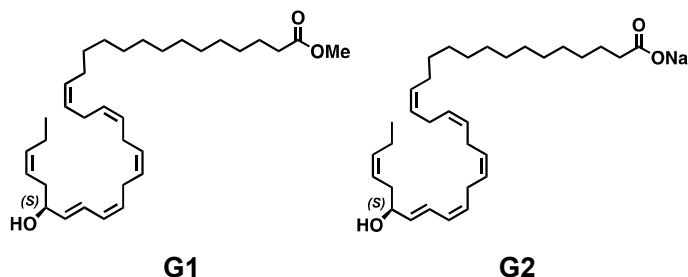
En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender cantidades equimolares de los enantiómeros **G** y **H** en donde los enantiómeros tienen quiralidad (*S*) o (*R*) en el carbono que tiene el grupo hidroxilo.

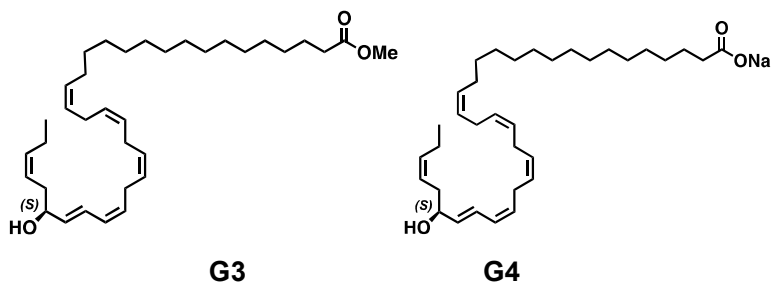
En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender cantidades de los enantiómeros **I** y **J** en donde los enantiómeros tienen quiralidad (*S*) o (*R*) en el carbono que tiene el grupo hidroxilo.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender uno de los enantiómeros de **G** o **H** en una cantidad que supera la cantidad del otro enantiómero de **G** o **H**.

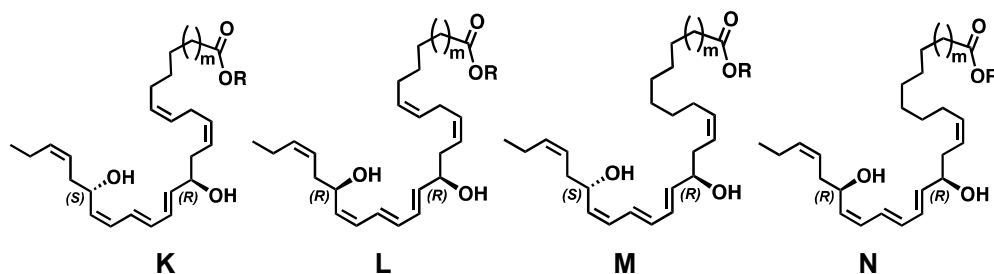
En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender uno de los enantiómeros de **I** o **J** en una cantidad que supera la cantidad del otro enantiómero de **I** o **J**.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el elovanoide monohidroxilado puede seleccionarse de un grupo que consiste en: (*S*,14*Z*,17*Z*,20*Z*,23*Z*,25*E*,29*Z*)-27-hidroxidotriaconta-14,17,20,23,25,29-hexaenoato de metilo (**G1**), (*S*,14*Z*,17*Z*,20*Z*,23*Z*,25*E*,29*Z*)-27-hidroxidotriaconta-14,17,20,23,25,29-hexaenoato de sodio (**G2**), (*S*,16*Z*,19*Z*,22*Z*,25*Z*,27*E*,31*Z*)-29-hidroxitetratríaconta-16,19,22,25,27,31-hexaenoato de metilo (**G3**); y (*S*,16*Z*,19*Z*,22*Z*,25*Z*,27*E*,31*Z*)-29-hidroxitetratríaconta-16,19,22,25,27,31-hexaenoato de sodio (**G4**) que tienen las fórmulas, respectivamente:





En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el elovanoide dihidroxilado puede seleccionarse del grupo que consiste en las fórmulas **K**, **L**, **M** y **N**:



en donde: m puede ser de 0 a 19 y -CO-OR puede ser un grupo de ácido carboxílico, o una sal o un éster de este,

y en donde: si -CO-OR puede ser un grupo de ácido carboxílico y el compuesto **K**, **L**, **M** o **N** puede ser una sal de este, el catión de la sal puede ser un catión farmacéuticamente aceptable, y si -CO-OR puede ser un éster, R puede ser un grupo alquilo.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el catión farmacéuticamente aceptable puede ser un catión amonio, un catión iminio o un catión metálico.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el catión metálico puede ser un catión sodio, potasio, magnesio, zinc o calcio.

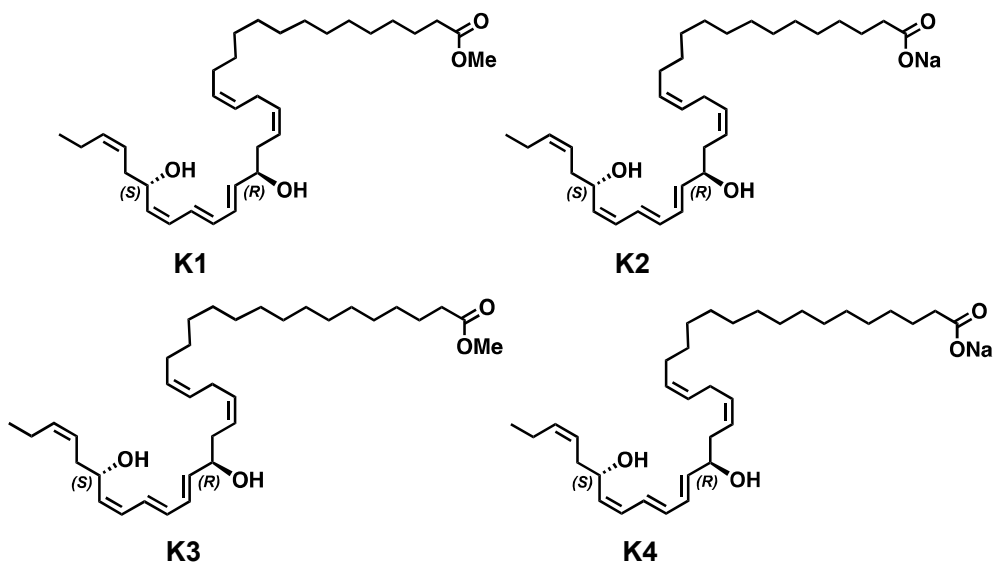
En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender cantidades equimolares de los diastereómeros **K** y **L** en donde los diastereómeros tienen o bien quiralidad (S) o (R) en la posición n-6, y quiralidad (R) en la posición n-13.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender cantidades equimolares de los diastereómeros **M** y **N** en donde los diastereómeros tienen o bien quiralidad (S) o (R) en la posición n-6, y quiralidad (R) en la posición n-13.

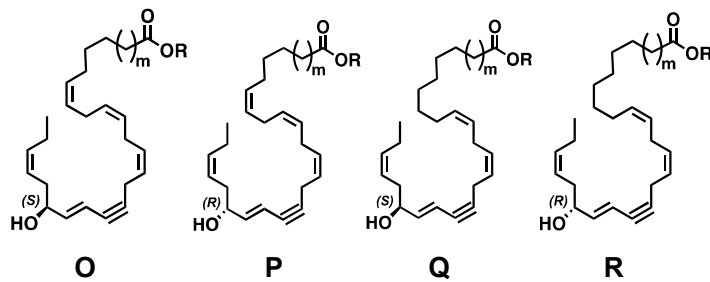
En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender uno de los diastereoisómeros de **K** o **L** en una cantidad que supera la cantidad del otro diastereómero de **K** o **L**.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender uno de los diastereoisómeros de **M** o **N** en una cantidad que supera la cantidad del otro diastereómero de **M** o **N**.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el elovanoide dihidroxilado puede seleccionarse de un grupo que consiste en: (14Z,17Z,20R,21E,23E,25Z,27S,29Z)-20,27-dihidroxitriaconta-14,17,21,23,25,29-hexaenoato de metilo (**K1**), (14Z,17Z,20R,21E,23E,25Z,27S,29Z)-20,27-dihidroxitriaconta-14,17,21,23,25,29-hexaenoato de sodio (**K2**), (16Z,19Z,22R,23E,25E,27Z,29S,31Z)-22,29-dihidroxitetraatriaconta-16,19,23,25,27,31-hexaenoato de metilo (**K3**), y (16Z,19Z,22R,23E,25E,27Z,29S,31Z)-22,29-dihidroxitetraatriaconta-16,19,23,25,27,31-hexaenoato de sodio (**K4**) que tienen las fórmulas, respectivamente:



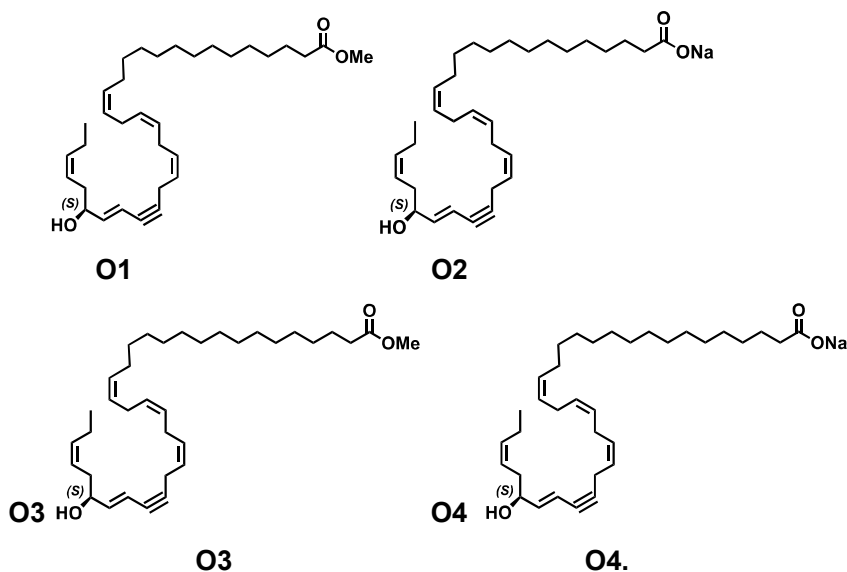
En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el elovanoide alquinilo monohidroxilado puede seleccionarse del grupo que consiste en las fórmulas **O**, **P**, **Q** o **R**:



en donde: m puede ser de 0 a 19 y -CO-OR puede ser un grupo de ácido carboxílico, o una sal o un éster de este, y en donde: si -CO-OR puede ser un grupo de ácido

carboxílico y el compuesto **O**, **P**, **Q** o **R** puede ser una sal de este, el catión de la sal puede ser un catión farmacéuticamente aceptable, y si -CO-OR puede ser un éster, R puede ser un grupo alquilo, y en donde: cada uno de los compuestos **O** y **P** tiene un total de 23 a 42 átomos de carbono en la cadena carbonada, con 4 dobles enlaces carbono-carbono en *cis* ubicados en las posiciones que comienzan en n-3, n-12, n-15 y n-18; con un doble enlace carbono-carbono en *trans* en la posición que comienza en n-7, y un triple enlace carbono-carbono que comienza en la posición n-9; y cada uno de los compuestos **Q** y **R** tiene un total de 23 a 42 átomos de carbono en la cadena carbonada, con 3 dobles enlaces carbono-carbono en *cis* que comienzan en las posiciones n-3, n-12 y n-15, con un doble enlace carbono-carbono en *trans* en la posición que comienza en n-7, y un triple enlace carbono-carbono que comienza en la posición n-9.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el elovanoide alquinilo monohidroxilado puede seleccionarse del grupo que consiste en: (S,14Z,17Z,20Z,25E,29Z)-27-hidroxitriaconta-14,17,20,25,29-pentan-23-oato de metilo (**O1**); (S,17Z,20Z,25E,29Z)-27-hidroxitriaconta-17,20,25,29-tetran-23-oato de sodio (**O2**); (S,16Z,19Z,22Z,27E,31Z)-29-hidroxitetratriaconta-16,19,22,27,31-pentan-25-oato de metilo (**O3**); y (S,16Z,19Z,22Z,27E,31Z)-29-hidroxitetratriaconta-16,19,22,27,31-pentan-25-oato de sodio (**O4**) y que tienen las fórmulas, respectivamente:



En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el catión farmacéuticamente aceptable puede ser un catión amonio, un catión iminio o un catión metálico.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el catión metálico puede ser un catión sodio, potasio, magnesio, zinc o calcio.

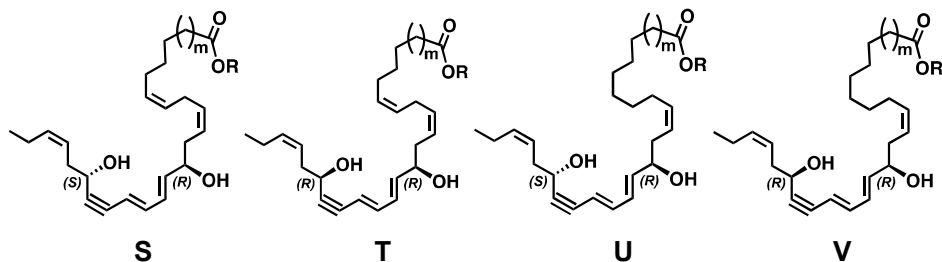
En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender cantidades equimolares de los enantiómeros **O** y **P** en donde los enantiómeros tienen quiralidad (*S*) o (*R*) en el carbono que tiene el grupo hidroxilo.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender cantidades equimolares de los enantiómeros **Q** y **R** en donde los enantiómeros tienen quiralidad (*S*) o (*R*) en el carbono que tiene el grupo hidroxilo.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender uno de los enantiómeros de **O** o **P** en una cantidad que supera la cantidad del otro enantiómero de **O** o **P**.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender uno de los enantiómeros de **Q** o **R** en una cantidad que supera la cantidad del otro enantiómero de **Q** o **R**.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el elovanoide puede ser un elovanoide alquilino dihidroxilado seleccionado del grupo que consiste en las fórmulas **S**, **T**, **U** o **V**:



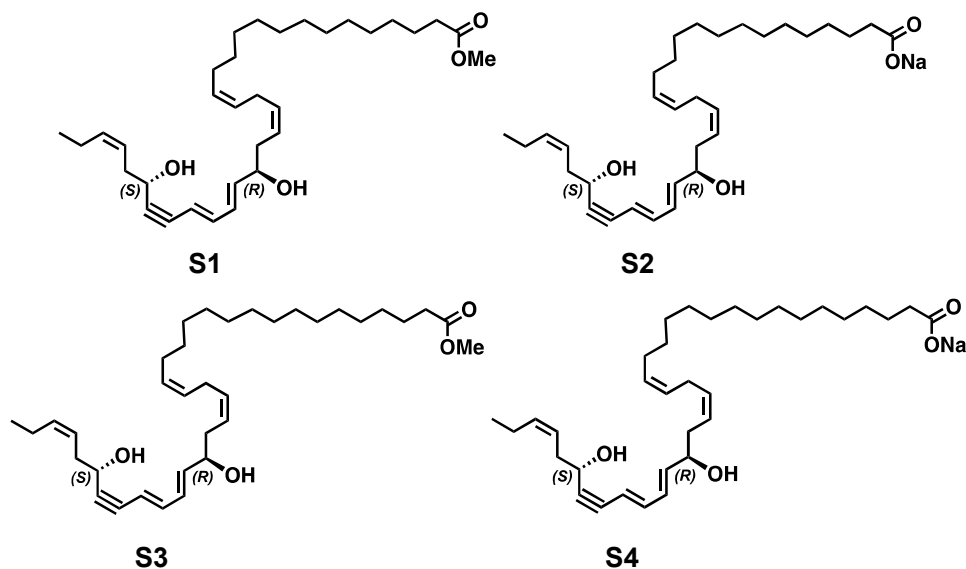
en donde: m puede ser de 0 a 19 y -CO-OR puede ser un grupo de ácido carboxílico, o una sal o un éster de este, y en donde: si -CO-OR puede ser un grupo de ácido carboxílico y el compuesto **S**, **T**, **U** o **V** puede ser una sal de este, el catión de la sal puede ser un catión farmacéuticamente aceptable, y si -CO-OR puede ser un éster, R puede ser un grupo alquilo, y en donde: cada uno de los compuestos **S** y **T** tiene un total de 23 a 42 átomos de carbono en la cadena carbonada, con 3 dobles enlaces carbono-carbono en *cis* que comienzan en las posiciones n-3, n-15 y n-18; 2 dobles enlaces carbono-carbono en *trans* que comienzan en las posiciones n-9 y n-11; y un triple enlace carbono-carbono que comienza en la posición n-7; y cada uno de los compuestos **U** y **V** tiene un total de 23 a 42 átomos de carbono en la cadena carbonada, con 2 dobles enlaces carbono-carbono en *cis* que comienzan en las posiciones n-3 y n-15; 2 dobles

enlaces carbono-carbono en *trans* que comienzan en las posiciones n-9 y n-11; y un triple enlace carbono-carbono que comienza en la posición n-7.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el catión farmacéuticamente aceptable es un catión amonio, un catión iminio o un catión metálico.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el catión metálico es un catión sodio, potasio, magnesio, zinc o calcio.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, el elovanoide alquinilo monohidroxilado puede seleccionarse del grupo que consiste en: (14Z,17Z,20R,21E,23E,27S,29Z)-20,27-dihidroxitriaconta-14,17,21,23,29-pentan-25-oato de metilo (**S1**); (14Z,17Z,20R,21E,23E,27S,29Z)-20,27-dihidroxitriaconta-14,17,21,23,29-pentan-25-oato de sodio (**S2**); (16Z,19Z,22R,23E,25E,29S,31Z)-22,29-dihidroxitetratríaconta-16,19,23,25,31-pentan-27-oato de metilo (**S3**); y (16Z,19Z,22R,23E,25E,29S,31Z)-22,29-dihidroxitetratríaconta-16,19,23,25,31-pentan-27-oato de sodio (**S4**), y que tienen la fórmula, respectivamente:



En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender cantidades equimolares de los diastereómeros **S** y **T** en donde los diastereómeros tienen quiralidad (S) o (R) en los carbonos que tienen los grupos hidroxilo.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender cantidades equimolares de los diastereómeros **U** y **V** en donde los diastereómeros tienen o bien quiralidad (S) o (R) en la posición n-6, y quiralidad (R) en la posición n-13.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender uno de los diastereómeros de **S** o **T** en una cantidad que supera la cantidad del otro diastereómero de **S** o **T**.

En algunas modalidades de este aspecto de la divulgación, la composición puede comprender uno de los diastereómeros de **U** o **V** en una cantidad que supera la cantidad del otro diastereómero de **U** o **V**.

Otras composiciones, compuestos, métodos, características y ventajas de la presente divulgación serán o resultarán evidentes para un experto en la técnica tras el análisis de los siguientes dibujos, descripción detallada y ejemplos. Se pretende que todas las composiciones, compuestos, métodos, características y ventajas adicionales queden incluidas en esta descripción y se encuentren dentro del alcance de la presente divulgación.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Cultivos primarios de neuronas corticales: Se sembraron cultivos primarios de neuronas corticales y del hipocampo de embriones de 18 días (E18) tomados de ratas Sprague-Dawley (SD) de dos meses con fecha de gestación conocida (Charles River Lab., Wilmington, MA). En resumen, se sacrificaron ratas SD con fecha de gestación conocida y se recolectaron los embriones en condiciones estériles. Los cerebros embrionarios se disecaron con fórceps en hielo y se colocaron en una placa de Petri que contenía solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) (GIBCO) helada. Las meninges se eliminaron con un microscopio de disección y los tejidos corticales se cortaron en pequeños trozos con microtijeras con resortes. Estos tejidos se transfirieron a tubos de 15 ml que contenían tripsina-EDTA (0,025 % en HBSS) y desoxirribonucleasa I. Los tubos se incubaron en una cámara a 37 °C durante 15 min y se agitaron cada 5 min. Después de detener la tripsinización con 5 ml de FBS al 10 %, estos tejidos se trituraron 15 veces con una pipeta Pasteur pulida al fuego. Los grupos de células se dejaron reposar durante 2 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 15 ml. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de tamaño de los poros de 70 µm (tamiz celular Corning) y se centrifugó durante 5 min a 1000 rpm. A continuación, se procedió a la resuspensión de las células en medio Neurobasal (GIBCO) que contenía suplementos B27 (GIBCO) al 2 % y N₂ (GIBCO) al 2 %, junto con 0,5 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina/estreptomicina.

Las células se contaron con un hemocitómetro de Neubauer. 1×10^6 células se sembraron en una placa de cultivo celular de 12 pocillos recubierta con poli-D-lisina (CORNING) y se cultivaron en una incubadora (37 °C, CO₂ 5 %). El medio de cultivo se reemplazó por primera vez después de 24 h, a continuación la mitad del medio se reemplazó con medio nuevo cada tres días. Como resultado, se obtuvo aproximadamente un 90 % de pureza neuronal según se determinó mediante tinción para β -tubulina de clase III, GFAP y Hoechst 33258. Las células se mantuvieron en cultivo durante aproximadamente 2 semanas hasta que se expusieron a estrés oxidativo no compensado, OGD o excitotoxicidad por NMDA.

Ejemplo 2

Anticuerpos: Se utilizaron los siguientes anticuerpos: β -catenina (catálogo n.º sc-7963, lote n.º K0812) Santa Cruz Biotechnology: (concentración utilizada 1:50); ZO-1 (catálogo n.º 187430, lote n.º 1633993A) Life Technologies: (concentración utilizada 1:100); MITF (catálogo n.º ab59232, lote n.º GR52475-3) ABCAM: (concentración utilizada 1:250); RPE65 (catálogo n.º ab78036, lote 3GR254004-1), ABCAM: (concentración utilizada 1:250).

Ejemplo 3

Cultivos de células del RPE humana: Se sembraron en placas células primarias del epitelio pigmentario de la retina (RPE) humana, preparadas a partir de ojos de donantes sin patología ocular, y se transformaron después del pase ocho. Las células se cultivaron en matraces T75 en medio MEM que contenía FBS al 10 %, NCS, MEM-NEAA al 5 % (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), 1x penicilina/estreptomicina y 10 ng/ml de FGF a 37 °C con CO₂ al 5 %, con 99 % de humedad relativa durante 24-48 h seguido de una incubación de 24 h con 10 μ M de mezcla de ácidos grasos libres 32:6 y 34:6.

Las Figs. 6A y 6B representan la inmunotinción de células primarias del RPE humana mediante el uso de marcadores específicos ZO-1 (zona occludens-1), RPE65, MITF (factor de transcripción asociado a microftalmia) y β -catenina, así como microscopía óptica que muestra la morfología de las células primarias del RPE humana en diferentes pases en cultivo. Las células ARPE-19 se cultivaron y mantuvieron en matraces T-75mm en medio DMEM F-12 que contenía FBS al 10 % y se incubaron a 37 °C con un suministro constante de CO₂ 5%. Las células con una confluencia del 75-

80 % (crecimiento de 72 h en DMEM/F12 + FBS al 10 %) en placas de 6 pocillos se privaron de suero durante 8 h antes de la exposición.

Ejemplo 4

Exposición de células del RPE a UOS y VLC-PUFA: Para experimentos de pruebas de viabilidad celular, las células del hRPE se trataron simultáneamente con NPD1 (200 nM), ácidos grasos 32-6, 34-6 (3 μ M de cada uno) o 32-6 y 34-6 simultáneamente. El medio de hRPE se complementó con 3 μ M de 32-6 y 34-6 durante todo el experimento. El inhibidor de 15 lox-1 (10 μ M) se añadió a las células 1 hora antes de la inducción de OS y se mantuvo durante todo el experimento. Las células se fijaron con PFA al 4 % y se tiñeron con Hoescht.

Las células ARPE19 con una confluencia del 75-80 % (crecimiento de 72 h en DMEM/F12 + FBS al 10 %) en placas de 6 pocillos se privaron de suero durante 8 h antes de la exposición. Las células privadas de suero se trataron con TNF- α (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (10 ng/ml) and H₂O₂ (600 μ M) para inducir estrés oxidativo y se pusieron a prueba con concentraciones en aumento (50-500 nM) de VLC-PUFA (C32:6n3 y C34:6n3) simultáneamente con estrés oxidativo durante 16 h (apoptosis) y 6 h (*Western-blot*) antes de la detección de apoptosis y la recolección para análisis de proteínas. En algunos experimentos, se añadió DHA con una concentración de 100 nM e inhibidor de 15-LOX-1 PD146176 con una concentración de 1 μ M para tratar las células del RPE sometidas a estrés. Se hicieron extractos celulares y se ajustaron las concentraciones de proteína mediante el reactivo de proteína Bio-Rad (Hercules, CA) y se utilizaron para el análisis de detección por inmunoelectrotransferencia (*Western-blot*).

Ejemplo 5

Análisis de proteínas: Las proteínas de la familia Bcl-2, SIRT1 y proinhibitina (tipo 1), y las proteínas Iduna se analizaron mediante análisis de detección por inmunoelectrotransferencia (*Western-blot*). En resumen, 20-25 μ g equivalentes de cada extracto celular se sometieron a electroforesis en un gel al 4-12 % (Promega) a 125 V durante 2 h. Las proteínas se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa mediante un aparato de transferencia I-blot. Las membranas se sometieron a tratamiento con anticuerpos primarios específicos para Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bid, Bim, SIRT1 y proinhibitina (tipo 1) (Santa Cruz Biotechnology) y anticuerpo Iduna (Neuro-Mab Lab, UCLA, Los Ángeles, CA.) durante la noche a 4 °C y se sondaron durante 45 min con anticuerpo secundario, anticuerpo caprino contra las inmunoglobulinas murinas:peroxidasa de

rábano picante, y anticuerpo antibiotina conjugado con peroxidasa de rábano picante, y a continuación se evaluaron las proteínas mediante el uso de un kit ECL (Amersham).

Ejemplo 6

Evaluación de inmunocitoquímica y apoptosis celular: Las pruebas de inmunocitoquímica se realizaron en cámaras de portaobjetos de 8 pocillos. En resumen, las células se fijaron en paraformaldehído (FA) al 4 % durante 20 minutos, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1 % en PBS. Los epítomos inespecíficos se bloquearon en albúmina de suero bovino (BSA) al 10 % en 1 x PBS durante 1 h a temperatura ambiente. La inmunotinción se realizó mediante la incubación del anticuerpo primario durante la noche a 4 °C. Las muestras se tiñeron durante 2 h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor 555 diluidos 1 en 250 (MeridianLife Science Inc., Memphis, TN, EE. UU.), y los núcleos se tiñeron con Hoechst (2 µM de Hoechst 33258). Las fotografías se tomaron con un microscopio confocal Zeiss LSM 510 y un microscopio de deconvolución Zeiss Axioplan-2.

Para evaluar la muerte celular, las células del hRPE y ARPE-19 se fijaron con metanol durante 15 min, se lavaron con 1x PBS y a continuación se depositaron con 2 µM de Hoechst, se disolvieron en una solución de Locke (Promega) y se incubaron durante otros 15 min antes de obtener la imagen. A continuación, se observaron las células con un microscopio confocal Zeiss LSM 510 con fluorescencia UV. Se capturaron las imágenes y se evaluó la apoptosis celular mediante el uso de un método automatizado sin sesgos.

Ejemplo 7

LC-MS/MS de elovanoides ELV-N32 y ELV-N34 en células del RPE: Se cultivaron células del RPE humanas (células ABC p#19) en matraces T75 durante 24-48 h seguido de una incubación de 24 h con 10 µM de mezcla de ácidos grasos 32:6 y 34:6 libres. Las células fueron incubadas con 1 mM H₂O₂ durante 24 h inmediatamente después de una privación de suero de 24 h. Los ácidos grasos se extrajeron mediante el método de extracción de lípidos líquido-líquido del medio de cultivo celular recolectado seguido de un análisis de espectrometría de masas. Los extractos se depositaron en un espectrómetro de masas en tándem de cromatografía líquida (LC-MS/MS) para su análisis. Se analizaron ácidos grasos, derivados de ácidos grasos monohidroxi (ácido graso 27-hidroxi C32:6n3 y ácido graso 29-hidroxi 34:6n3) y ELV-N32 (ácido graso

20,27-dihidroxi C32:6n3) y ELV-N34 (ácido graso 22,29-dihidroxi C34:6n3). El ELV-N32 y el ELV-N34 y sus derivados marcados con deuterio ELV-N32-d2 y ELV-N34-d2 se prepararon mediante síntesis química estereocontrolada y se usaron para emparejar con derivados generados por células.

Ejemplo 8

Estrés fotooxidativo: Los ratones C57/Bl6 genéticamente intactos y los ratones con genes inactivados para AdipoR1 se alojaron en una habitación con temperatura controlada a 21-23 °C con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h:12 h. Para el estrés oxidativo inducido por la luz, los ratones fueron expuestos durante 1 h de luz brillante (un conjunto de 8 luces de bombillas fluorescentes circulares de 22 W de 25,4 cm (10 pulgadas); Cool White, FTC8T9/CW; Electric, Fairfield, CT; 18 klux; 270 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}$). Después de la exposición a la luz, los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical y se enuclearon los ojos. Se descartaron la córnea, el iris y el cristalino y se separó la retina del resto del ocular. A continuación, estos tejidos se congelaron instantáneamente. Se reunieron las retinas de animales del mismo genotipo. Las muestras se procesaron para extracción de lípidos y análisis lipídico por LC-MS/MS.

Ejemplo 9

Privación de oxígeno y glucosa (OGD), excitotoxicidad por NMDA o exposición a estrés oxidativo no compensado (UOS): Se estableció un modelo *in vitro* de privación de oxígeno y glucosa (OGD). Se cultivaron neuronas corticales primarias de embriones de rata SD. El día 12 *in vitro* (DIV), las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato y se incubaron en medio Neurobasal sin glucosa (GIBCO) durante 30 min. A continuación, las células se colocaron en una cámara incubadora modular y se incubaron en una cámara anaeróbica (N_2 95 %, CO_2 5 %) a 37 °C durante 90 min para OGD.

Después de 90 min de exposición a OGD, las células se devolvieron al medio original (medio Neurobasal (GIBCO) que contenía suplementos B27 (GIBCO) al 2 % y N_2 (GIBCO) al 2 %, junto con 0,5 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina/estreptomicina) y se colocaron en una cámara normóxica (37 °C, CO_2 5 %) durante 2 h. A continuación, el medio se cambió por un medio que contenía ELV-N32 o ELV-N34 [500 nM] y se mantuvo en una cámara normóxica (37 °C, CO_2 5 %) durante 12 h, después de lo cual se tomaron muestras de las células y se probó la viabilidad celular mediante el uso de diferentes métodos según lo descrito anteriormente (25-28).

Las células neuronales mixtas de la corteza cerebral o las células del hipocampo en cultivo se expusieron a NMDA o estrés oxidativo no compensado (UOS) durante 12 h mediante la adición de una concentración de NMDA (25 μ M, 50 μ M o 100 μ M) o mediante la adición de TNF α (10 ng/mL) y H₂O₂ (50 μ M, 100 μ M o 200 μ M). Se probó la viabilidad celular y la neuroprotección en presencia de ELV-N32, ELV-N34, 32:6 o 34:6 después de 12 h.

Ejemplo 10

Tinción con Hoechst y análisis de imágenes sin sesgos: Las células se lavaron con 1x solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) que no contenía calcio ni magnesio (GIBCO) y se fijaron durante 10 min con paraformaldehído (PFA) al 4 % helado seguido de 15 min de incubación en metanol al 100 %. Las células se lavaron con 1x solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4 (GIBCO) y se incubaron en PBS que contenía 20 μ M de Hoechst 33258 (Molecular Probes) durante 20 min. A continuación, las células se lavaron 3 veces con 1x PBS y se almacenaron en 1x PBS a 4 °C hasta que se obtuvieron imágenes para microscopía.

Se adquirió un mosaico de cuadros de 4 x 4 del centro de cada pocillo mediante el uso de un microscopio confocal láser Zeiss 510 Meta y el software LSM 510 Meta. Las imágenes se importaron al software de análisis de imágenes ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) y se procesaron por lotes mediante el uso de macros personalizados. Se aplicó un umbral automático de Otsu a cada imagen de núcleos teñidos con Hoechst y se registró el área de cada objeto detectado. Objetos con áreas <10 μ m² fueron excluidos del análisis. Para estimar el porcentaje de núcleos no picnóticos, se eligió un límite de tamaño por encima del cual se suponía que los objetos no eran picnóticos. El límite de tamaño para la picnosis se eligió en función de las formas de las distribuciones de tamaño nuclear de diversas poblaciones de células. Los resultados se exportaron a Microsoft Excel y se analizaron.

Ejemplo 11

Ensayo de calceína AM-yoduro de propidio live/dead y ensayo MTT bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-de difeniltetrazolio: Se preparó una solución de 10 mL mediante la combinación de ambos componentes del kit de citotoxicidad live/dead (Invitrogen) con 20 μ L de componente A (calceína-AM) y 20 μ L de componente B (yoduro de propidio). En cada pocillo de una placa de cultivo celular de 12 pocillos, se agregaron 50 μ L de esta solución y las células se incubaron en una cámara normóxica

(37 °C, CO₂ 5 %) durante 1-2 h. A continuación, se obtuvieron imágenes de las células con un microscopio confocal láser Olympus Fluoview. Las imágenes se importaron al software de análisis de imágenes ImageJ de NIH y se separaron los canales verde y rojo. Mediante el uso del contador de células, se contaron las imágenes para determinar la cantidad de células vivas (verde) y de núcleos muertos (rojo). Los resultados se exportaron a Microsoft Excel y se analizaron.

El ensayo MTT se basa en la escisión de la sal de tetrazolio amarilla MTT en cristales de formazán púrpura mediante células metabólicamente activas. El ensayo se realizó para determinar la viabilidad de las neuronas corticales primarias en cada grupo de tratamiento. En resumen, se añadió bromuro de metiltiazolildifeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich) (5 mg/ml y 100 µL por pocillo) a las células en placas de 12 pocillos y se incubaron en una cámara normóxica (37 °C, CO₂ 5 %) durante 2 h. A continuación, el producto de reducción de formazán azul generado, debido a la acción de la succinato deshidrogenasa en células vivas sobre el colorante, se disolvió en 1 mL de alcohol isopropílico, se transfirió a pocillos triplicados en una placa de 96 pocillos y se leyó su absorbancia a 490 nm mediante el uso de un lector de microplacas Molecular Probes Spectramax. Los resultados se expresaron como porcentaje de supervivencia celular.

Ejemplo 12

Oclusión de la arteria cerebral media e implantación de la cánula en el ventrículo lateral derecho: Se sometieron ratas macho Sprague-Dawley (Charles River Lab., Wilmington, MA) que pesaban 280-340 g a ayuno durante la noche pero se les permitió el libre acceso a agua. Se inyectó sulfato de atropina (0,5 mg/kg, ip) 10 min antes de la anestesia. La anestesia se indujo con isoflurano al 3 % en una mezcla de óxido nitroso al 70 % y oxígeno al 30 %. Todas las ratas fueron intubadas oralmente y ventiladas mecánicamente. Durante la ventilación, los animales se paralizaron con bromuro de pancuronio (0,6 mg/kg, ip). Los catéteres se implantaron en la arteria y vena femoral derecha para la toma de muestras de sangre y la infusión del fármaco. Se realizaron análisis en serie de gasometría arterial, glucosa en plasma, presión arterial y frecuencia cardíaca antes y durante el procedimiento quirúrgico. Se realizó un seguimiento riguroso de las temperaturas rectal (controlador de temperatura CMA/150, CMA/Microdialysis AB, Estocolmo, Suecia) y craneal (músculo temporal; Omega Engineering, Stamford, CT) antes, durante y después de la MCAo. La temperatura rectal y el peso corporal se controlaron diariamente hasta el sacrificio.

Las ratas se sometieron a 2 h de oclusión de la arteria cerebral media (MCAo) derecha mediante un filamento intraluminal. En resumen, se expuso la bifurcación de la arteria carótida primitiva (CCA) derecha mediante una incisión en la línea media del cuello y se aislaron, ligaron y diseccionaron las ramas de la arteria occipital de la arteria carótida externa. Después de un aislamiento cuidadoso de la arteria carótida interna (ICA), se empujó un monofilamento 3-0 recubierto con poli-L-lisina a través de la ICA hasta la MCA hasta que se sintió una leve resistencia. La incisión del cuello se cerró con una sutura de seda y luego se dejó que los animales se recuperaran. Después de 2 h de MCAo, las ratas se volvieron a anestesiarse con la misma combinación anestésica. Se volvieron a insertar las sondas de temperatura y se retiraron cuidadosamente las suturas intraluminales. Los animales tuvieron libre acceso a alimentos y agua durante 7 días.

Treinta minutos después de retirar las suturas, se implantó una cánula de infusión cerebral en el ventrículo lateral derecho para la administración del tratamiento en cada rata. Las ratas se anestesiaron con isoflurano al 3 % y se fijaron a un aparato estereotáxico con el cráneo nivelado entre bregma y lambda. Se implantó una cánula de acero inoxidable estéril (de 5 mm de largo) en el ventrículo lateral con las coordenadas estereotáxicas (0,2 mm caudal a bregma, 2 mm lateral a la línea media y 5 mm por debajo de la duramadre). Las cánulas se retiraron después de que se completó el tratamiento.

Ejemplo 13

Tratamiento: Se disolvieron elovanoides (ELV) como sales de sodio (Na) o ésteres metílicos (Me) en líquido cefalorraquídeo (CSF) artificial y se administraron en el ventrículo lateral derecho 1 hora después de 2 h de MCAo. Se utilizaron los siguientes ELV: ELV-N32-Na, ELV-N32-Me, ELV-N34-Na y ELV-N34-Me (5 µg/50 µl) o CSF (50 µl). Todos los tratamientos fueron administrados por un investigador que desconocía los grupos de tratamiento.

Ejemplo 14

Pruebas neurológicas/conductuales: Las pruebas conductuales fueron realizadas por un observador que desconocía los grupos de tratamiento a los 60 min (durante la MCAo) y después en los días 1, 2, 3 y 7 después de la MCAo. La batería consistió en dos pruebas que se han utilizado previamente para evaluar diversos aspectos de la función neurológica: (1) la prueba del reflejo postural, para examinar la postura del tren superior mientras el animal está suspendido por la cola; y (2) la prueba

de colocación de las extremidades anteriores, para examinar la integración sensitivomotora en las respuestas de colocación de las extremidades anteriores a estímulos visuales, táctiles y propioceptivos. La función neurológica se calificó en una escala de 0 a 12 (puntuación normal = 0, puntuación máxima = 12). Las ratas que no demostraron un déficit contralateral de calificación alta (puntuación, 10-11) a los 60 min durante la MCAo fueron excluidas de estudios adicionales.

Ejemplo 15

Adquisición y análisis de imágenes mediante resonancia magnética (MRI) de la lesión total, los volúmenes de núcleo y penumbra: Se realizó una MRI de alta resolución *ex vivo* en cerebros fijados con paraformaldehído al 4 % el día 7 con un instrumento de calibre horizontal Bruker Advance 11.7T de 8,9 cm equipado con una bobina receptora de 89 mm (ID) (Bruker Biospin, Billerica, MA). Se recolectaron imágenes ponderadas en T2 (T2WI), imágenes ponderadas por difusión (DWI), volúmenes 3D y mapas de coeficientes de difusión aparente (ADC). Los mapas de T2 y ADC se calcularon a partir de T2WI y DWI, respectivamente. Se utilizó la división jerárquica de regiones (HRS) para identificar automáticamente los volúmenes de núcleo y penumbra (lesión total = núcleo + penumbra) de la relajación T2 y la movilidad del agua (ADC). La determinación de tejido de la penumbra mediante HRS se confirmó mediante el uso de sustracciones de PWI/DWI en cada nivel del cerebro. La penumbra se define como la diferencia entre PWI y ADC anormal (desajuste de difusión-perfusión) (elevación o reducción de 2 STD en comparación con los tejidos normales).

Ejemplo 16

Histopatología e inmunohistoquímica: Después de 7 días después de la MCAo, las ratas se volvieron a anestesiarse con isoflurano al 3 %, óxido nitroso al 70 % y un equilibrio de oxígeno, y se perfundieron transcárdialmente con solución salina al 0,9 % seguida de paraformaldehído al 4 %. Los cerebros se extrajeron y se incluyeron en una matriz de gelatina mediante la tecnología MultiBrain.RTM (NeuroScience Associates, Knoxville, TN). Para cuantificar el volumen de infarto, las secciones histológicas se digitalizaron (software de imágenes MCID core; InterFocus Imaging Ltd., Cambridge, Inglaterra) en nueve niveles coronales normalizados (niveles de bregma: + 5,2, + 2,7, + 1,2, - 0,3, - 1,3, - 1,8, - 3,8, - 5,0 y - 7,3 mm) con una cámara CCD (QICAM Fast 1394, QIMAGING, British Columbia, Canadá) (30). Se obtuvieron imágenes de secciones cerebrales en un microscopio motorizado BX61VS (Olympus, Japón) con un

objetivo de 10x. Un investigador que desconocía los grupos experimentales delineó la zona del infarto cortical y subcortical, así como los hemisferios izquierdo y derecho de cada sección. El volumen de infarto se calculó como el producto integrado del área de la sección transversal y la distancia entre las secciones, y se corrigió para tener en cuenta la inflamación del cerebro.

El edema cerebral se determinó mediante las diferencias de los hemisferios ipsilateral y contralateral. Se realizaron procedimientos inmunohistoquímicos en las secciones adyacentes para identificar elementos vasculares y neuronales específicos en el núcleo isquémico y en la penumbra. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: barrera hematoencefálica de rata (SMI-71, BioLegend, San Diego, CA) como marcador vascular; proteína ácida fibrilar glial (GFAP, Agilent Tech. Santa Clara, CA) para marcar astrocitos reactivos; y proteína nuclear neuronal específica (NeuN, Chemicon/Millipore, Billerica, MA) y anticuerpo biotinilado contra las inmunoglobulinas de rata (IgG) (BioLegend, San Diego, CA) para detectar la degradación de la BBB. Se contó la cantidad de células positivas y vasos inmunopositivos en la corteza y el cuerpo estriado a nivel de la lesión central (nivel de bregma -0,3 mm). Los datos se expresaron como cantidades de células y vasos positivos por campo microscópico de alta potencia (aumento x40).

Las imágenes de las secciones se obtuvieron mediante microscopio láser confocal (LSM510, Carl Zeiss MicroImaging, Irvine, CA) siguiendo protocolos experimentales específicos. Las imágenes se adquirieron con una dimensión de 212,3 μm x 212,3 μm con el software Zen (Carl Zeiss MicroImaging). El análisis de imágenes se realizó mediante el software ImageJ. Los análisis fueron realizados por un investigador que desconocía las condiciones experimentales. La intensidad de la tinción para IgG se calculó y promedió en los mismos grados evaluados para el daño isquémico según lo descrito anteriormente (23, 31). Para calcular la intensidad de la tinción para IgG, las imágenes se convirtieron a escala de grises y se registraron y compararon los valores de gris promedio. El software ImageJ le asigna píxeles negros al valor numérico de «0» y píxeles blancos al valor numérico de «1». A las gradaciones de gris se les asignan los valores numéricos intermedios, que aumentan con la claridad de los píxeles y disminuyen con la oscuridad de los píxeles. Por consiguiente, los valores de intensidad de IgG se expresaron como el recíproco del gris promedio para mayor claridad gráfica. Se tomaron imágenes de todas las secciones al mismo tiempo con la misma configuración y sin ajuste de brillo o contraste. La intensidad de la tinción para IgG se

midió en todo el hemisferio contralateral e ipsilateral, así como en la corteza y el cuerpo estriado.

Análisis estadístico: Para cultivos celulares: Todos los resultados se expresaron como medias $\pm$ SEM. Los datos de todos los experimentos se evaluaron con ANOVA (análisis de la varianza) unidireccional seguido, *a posteriori*, de la prueba de comparaciones múltiples de Sidak. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Graphpad Prism versión 7.02. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

Para ataque cerebrovascular isquémico: Los valores se presentan como medias $\pm$ SEM. Se utilizó ANOVA con medidas repetidas seguido de pruebas de Bonferroni para corregir comparaciones múltiples, para comparaciones intergrupales de puntuaciones neuroconductuales a lo largo del tiempo y áreas de infarto en los niveles coronales. Se utilizaron pruebas de la *t* de Student bilaterales para comparaciones de dos grupos. Las diferencias en $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas.

Ejemplo 17

Estructura y estereoquímica de ELV-N32 y ELV-N34 en cultivos neuronales mixtos: Las estructuras completas y la estereoquímica de los nuevos elovanoides ELV-N32 y ELV-N34 se establecieron mediante una comparación directa con compuestos preparados mediante síntesis orgánica total estereocontrolada mediante la adaptación de nuestras metodologías registradas anteriormente para la síntesis total de NPD1. La validación adicional de estas designaciones estructurales se estableció mediante la síntesis de derivados marcados con deuterio para el análisis de espectrometría de masas en tándem de cromatografía líquida (LC-MS/MS).

El ELV-N32 y el ELV-N34 se prepararon mediante síntesis química total estereocontrolada (Fig. 4A). La disponibilidad de estos ELV sintéticos con estructuras y estereoquímica completamente definidas nos permitió determinar la configuración *R/S* completa, así como la geometría *Z/E* de los dobles enlaces en estos ELV derivados de cultivos de células neuronales mixtas. También se generaron ELV sintéticos marcados con deuterio estereoquímicamente puros, y al emparejarlos con moléculas producidas de manera endógena mediante LC-MS/MS, lo que confirmó su estructura y estereoquímica.

Tanto los ELV como sus precursores se detectaron en células sometidas a estrés por OGD. (Figs. 4B-4K) transiciones MRM m/z 499 $\rightarrow$ 93 y 499 $\rightarrow$ 401 se utilizaron para la detección de ELV-N32 (Fig. 4B), y transiciones m/z 527 $\rightarrow$ 93 y 527

-> 429 para la detección de ELV-N34 (Fig. 4C). Para sus correspondientes precursores monohidroxi, se utilizaron m/z 483 -> 385 para 27-hidroxi-C32:6n3 (Fig. 4B), y m/z 511 -> 413 para 29-hidroxi-C34:6n3 (Fig. 4C). Para una mayor identificación, se realizó una fragmentación completa en los ELV y se encontraron buenas coincidencias con los patrones producidos sintéticamente. Ambos ELV tenían máximos de UV en 275 nm que son coherentes con una estructura de trieno conjugado (Fig. 4D y 4F).

Después de emparejar los ELV sintéticos con los ELV biogénicos derivados de células neuronales mixtas en cultivo, se estableció la estructura y la estereoquímica completa del ELV-N32 y del ELV-N34. Las estructuras del ELV-N32 (elovanoide tipo neuroprotectina, derivado de un ácido graso poliinsaturado omega-3 de 32 carbonos) y del ELV-N34 (elovanoide tipo neuroprotectina, derivado de un ácido graso poliinsaturado omega-3 de 34 carbonos) se determinaron de la siguiente manera: ELV-N32: ácido (14Z,17Z,20R,21E,23E,25Z,27S,29Z)-20,27-dihidroxido-triaconta-14,17,21,23,25,29-hexaenoico (Fig. 1E); ELV-N34: ácido (16Z,19Z,22R,23E,25E,27Z,29S,31Z)-22,29-dihidroxitetra-triaconta-16,19,23,25,27,31-hexaenoico (Fig. 4G).

Ejemplo 18

Neuroprotección mediante ELV para estrés oxidativo no compensado, privación de oxígeno/glucosa o excitotoxicidad por NMDA: Con una concentración de 200 nM, la sal de sodio ELV-N32-Na o el éster metílico ELV-N32-Me provocaron neuroprotección en células neuronales mixtas de la corteza cerebral en cultivo expuestas durante 12 h a estrés oxidativo no compensado, que fue inducido por la adición de 10 ng/mL de factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y H₂O₂ (50 μ M, 100 μ M o 200 μ M). Hubo un aumento en función de la dosis de núcleos apoptóticos que fue contrarrestado por ELV-N32-Na o ELV-N32-Me (Fig. 16B).

Para determinar la bioactividad neuroprotectora del ELV-N32 o del ELV-N34 contra la muerte de células neuronales causada por OGD, se expusieron células neuronales mixtas de la corteza cerebral en cultivo o neuronas del hipocampo en cultivo a OGD durante 90 min. Después de 2 h de reoxigenación, se agregó ELV-N32 o ELV-N34 con una concentración de 200 nM, 500 nM o 1 μ M, y a continuación se evaluó la viabilidad celular mediante recuento de núcleos positivos para Hoechst, recuento de células positivas para calceína o ensayos MTT. Con todas las diferentes condiciones y concentraciones, se encontró que ELV-N32-Na, ELV-N32-Me, ELV-N34-Na o ELV-N34-Me provocaban neuroprotección en comparación con las células expuestas a OGD solas (Figs. 15F-15H, 15K y 15L; Figs. 16D-16G y 16I). Además,

los resultados también mostraron que el precursor 34:6 podía provocar neuroprotección con una concentración tan baja como 250 nM cuando se añadía después de la exposición a OGD (Fig. 1H complementaria).

Asimismo, la exposición a NMDA con concentraciones de 25 μ M, 50 μ M o 100 μ M durante 12 h causó la muerte neuronal en células neuronales mixtas de la corteza cerebral y de neuronas del hipocampo en cultivo (Figs. 15C-15E y 15-15,J; Figs. 16A, 16C y 16H), que se compensó al añadir ELV-N32 (Na o Me) o ELV-N34 (Na o Me) con una concentración de 200 nM o 500 nM, cuando se añadieron simultáneamente junto con NMDA. Hubo un aumento en función de la dosis de núcleos apoptóticos cuando las células se expusieron a NMDA con concentraciones de 25 μ M, 50 μ M o 100 μ M, que se compensó en presencia de ELV-N32-Na o ELV-N32-Me. Para un experimento, se probó si había sinergia mediante la adición de ELV-N32 (Na o Me) con una concentración de 200 nM junto con NPD1 con una concentración de 100 nM. Tanto el ELV-N32-Na como el ELV-N32-Me mostraron sinergia en la neuroprotección contra la excitotoxicidad por NMDA con 100 μ M durante 12 h (Fig. 16A). Pero el ELV-N32-Me añadido a la NPD1 era más potente que el ELV-N32-Na y la NPD1 juntos. También encontramos que la excitotoxicidad por NMDA puede resolverse mediante la adición de antagonista no competitivo del receptor NMDA maleato MK801 (dizocilpina, 10 μ M). La adición de MK801 y NPD1 juntos al ELV-N32-Na o ELV-N32-Me mejoró la neuroprotección provocada por el ELV-N32-Na o el ELV-N32-Me solos. Además, el precursor 34:6 con una concentración de 500 nM atenúa la excitotoxicidad causada por el receptor de NMDA (Fig. 16H).

Ejemplo 19

Los ELV indujeron una mejora neurológica sostenida y protección después de un ataque cerebrovascular isquémico: El ataque cerebrovascular isquémico focal provoca un deterioro de las funciones sensitivomotoras y cognitivas donde un 70-80 % de los pacientes presenta hemiparesia inmediatamente después del ataque cerebrovascular. Se administraron ELV a través de cánulas de infusión implantadas de manera estereotáxica en el ventrículo lateral derecho 1 h después de 2 h de oclusión de la arteria cerebral media (MCAo). Los déficits funcionales en roedores después de la MCAo se asemejan a los déficits sensitivomotores, y dado que el objetivo final de cualquier terapia de ataque cerebrovascular es la restauración de las funciones neurológicas/conductuales, se utilizaron dos pruebas de la batería

sensitivomotora para detectar déficits neurológicos después de un ataque isquémico experimental.

Todos los animales tratados con ELV mejoraron considerablemente las puntuaciones neurológicas de manera sostenida hasta el período de supervivencia de 7 días en comparación con el grupo de líquido cefalorraquídeo (CSF) (Fig. 20A). Las ratas tratadas con CSF continuaron presentando alteraciones graves durante este período. Las imágenes ponderadas en T2 (T2WI) revelaron grandes lesiones y se observaron hiperintensidades en T2 en el núcleo isquémico y en la penumbra de ratas tratadas con CSF, compatibles con la formación de edema (Figs. 20B y 20C). Por el contrario, los volúmenes del núcleo isquémico y de la penumbra (calculados a partir de T2WI) se redujeron significativamente con todos los tratamientos con ELV (Fig. 4B). Los volúmenes totales de lesión se redujeron significativamente con ELV-N32-Na, ELV-N32-Me, ELV-N34-Na y ELV-N34-Me en comparación con el grupo tratado con CSF (en un 60 %, 56 %, 99 % y 91 %, respectivamente) (Fig. 20B). Los volúmenes de lesión tridimensionales (3D) se calcularon a partir de T2WI el día 7 después de la MCAo (Fig. 20D). El volumen de lesión se redujo drásticamente con el tratamiento con elovanoide y se localizó principalmente solo en las áreas subcorticales del cerebro (Fig. 20D).

Ejemplo 20

Daño celular atenuado por ELV, integridad de los vasos sanguíneos y alteración de la BBB: las neuronas, los astrocitos y los vasos sanguíneos implicados en el infarto cerebral se examinaron mediante inmunohistoquímica el día 7. Las ratas tratadas con CSF presentaron grandes lesiones que implicaban regiones corticales y subcorticales, caracterizadas por pérdida de elementos neuronales, gliales y vasculares (Figs. 21A y 21B).

Por el contrario, las ratas tratadas con ELV mostraron menos infarto con un mayor número de células positivas para NeuN, GFAP y vasos positivos para SMI-71 en la corteza en comparación con el grupo tratado con CSF. Los recuentos celulares de NeuN, SMI-71 y GFAP (regiones delineadas en el diagrama de la Fig. 21C) demostraron que todos los tratamientos con ELV aumentaron las neuronas positivas para NeuN y los astrocitos reactivos positivos para GFAP y protegieron la integridad de los vasos sanguíneos (Fig. 21C). Como resultado de casi todos los tratamientos con ELV (excepto ELV-N32-Na), la densidad de los vasos sanguíneos (SMI-71) aumentó dentro de los tejidos de la penumbra, con formación paralela de tejido

cicatricial rico en GFAP más denso. Por lo tanto, la mejora de la densidad de los vasos sanguíneos probablemente facilita la neurogénesis y la sinaptogénesis, lo que a su vez contribuye a una mejor reparación y, en última instancia, a una mejor recuperación funcional.

La alteración isquémica de la barrera hematoencefálica (BBB) se determinó inicialmente mediante infiltración de IgG endógena en el parénquima cerebral (Figs. 22A y 22B). Se observó intensidad de tinción para IgG en el hemisferio ipsilateral después de la MCAo (Fig. 22A). La intensidad de la tinción a los 7 días fue similar entre los grupos tratados con CSF, ELV-N32-Na y ELV-N32-Me. Por el contrario, el tratamiento con ELV-N34-Na y ELV-N34-Me mostró significativamente menos tinción para IgG en la corteza; la tinción se localizó principalmente en el núcleo del infarto (subcorteza). Además, la inmunorreactividad para IgG de todo el hemisferio (total) se redujo (Fig. 22B) (todos los animales sobrevivieron sin complicaciones). Los cerebros de ratas tratadas con CSF presentaban una lesión pannecrótica que afectaba tanto a las regiones cortical como subcortical del hemisferio derecho (Fig. 22C). Por el contrario, el tamaño del infarto en las ratas tratadas con los compuestos ELV mostró un daño de menor extensión, principalmente en el área subcortical. La protección mediada por ELV fue extensa en la corteza frontal-parietal (el tejido se recuperó en un 57-96 %) y en la subcorteza (73-75 %) en comparación con el grupo tratado con CSF (Fig. 22D). El volumen total de infarto, corregido para la inflamación del cerebro, se redujo drásticamente en todos los grupos tratados con ELV en un 55-91 % (Fig. 22D).

Ejemplo 21

Células del RPE, estructura y estereoquímica de los ELV: Las estructuras completas y la estereoquímica de los nuevos elovanoides ELV-N32 y ELV-N34 de 32 y 34 carbonos se establecieron mediante una comparación directa con compuestos preparados mediante síntesis orgánica total estereocontrolada mediante la adaptación de metodologías registradas anteriormente para la síntesis total del mediador de lípidos derivado de DHA neuroprotectina D1 (NPD1; ácido 10*R*,17*S*)-dihidroxidocosa-4*Z*,7*Z*,11*E*,13*E*,15*Z*,19*Z*-hexaenoico). La validación adicional de estas designaciones estructurales se estableció mediante la síntesis de derivados marcados con deuterio (ELV-N32-d2 y ELV-N34-d2) para el análisis de espectrometría de masas en tándem de cromatografía líquida (LC-MS/MS). El ELV-N32 y el ELV-N34 se prepararon mediante síntesis química total estereocontrolada (Fig. 3A). La disponibilidad de materiales sintéticos con estructuras y estereoquímica completamente definidas nos permitió

determinar la configuración *R/S* completa, así como la geometría *Z/E* de los dobles enlaces en estos ELV derivados de células primarias del RPE humana. Las imágenes confocales de inmunotinción de células primarias del RPE humana mediante el uso de marcadores específicos ZO-1 (Zona occludens-1), RPE65, MITF (factor de transcripción asociado a microoftalmia) y β -catenina se representan en las Figs. 6A y 6B, así como morfología de la microscopía óptica en diferentes pases en cultivo.

En resumen, estas células se cultivaron durante 24-48 h seguido de una incubación de 24 h con 10 μ M de 32:6,n6 más 34:6,n6 libre. A continuación, las células se incubaron con 1 mM de H₂O₂ durante 24 h después de una privación de suero de 24 h. Se recogieron los medios de incubación y se extrajeron los lípidos y se depositaron en un espectrómetro de masas en tándem de cromatografía líquida (LC-MS/MS) para su análisis. También se generaron ELV sintéticos marcados con deuterio estereoquímicamente puros, y al emparejarlos con moléculas producidas de manera endógena mediante LC-MS/MS, lo que confirmó su estructura y estereoquímica. Después del emparejamiento con elovanoides derivados de medios de cultivo de células primarias del RPE humana, se confirmó que las estructuras completas del ELV-N32 (a partir de un ácido graso poliinsaturado omega-3 de 32C) y del ELV-N34 (a partir de un ácido graso poliinsaturado omega-3 de 34C) son las siguientes: ELV-N32: ácido (14Z,17Z,20R,21E,23E,25Z,27S,29Z)-20,27-dihidroxido-triaconta-14,17,21,23,25,29-hexaenoico; ELV-N34: ácido (16Z,19Z,22R,23E,25E,27Z,29S,31Z)-22,29-dihidroxitetra-triaconta-16,19,23,25,27,31-hexaenoico.

Tanto los ELV como sus precursores VLC-PUFA se detectaron en células del RPE sometidas a UOS (Figs. 3B-3K). Se utilizaron transiciones MRM *m/z* 499 $\rightarrow$ 93 y 499 $\rightarrow$ 401 para ELV-N32, y transiciones *m/z* 527 $\rightarrow$ 93 y 527 $\rightarrow$ 429 para ELV-N34 para su detección. Para los precursores correspondientes, se utilizaron *m/z* 483 $\rightarrow$ 385 para 27-hidroxi-32:6n3, y *m/z* 511 $\rightarrow$ 413 para 29-hidroxil-34:6n3. Para una mayor identificación, se realizó una fragmentación completa en los ELV y se encontraron buenas coincidencias con los patrones.

Ejemplo 22

Los ELV N32 y N34 provocan una potente citoprotección: Se muestra que el 32:6n3 o el 34:6n3 libres provocan protección contra el UOS en células ARPE-19 (Figs. 7A y 7B), y que un inhibidor de lipoxigenasa bloquea este efecto (Fig. 10C). Para probar la eficacia de los VLC-PUFA 32:6n3 y 34:6n3 para modular la homeostasis y los índices de supervivencia de las células del RPE humana, se incubaron células del RPE humana

sometidas a UOS con VLC-PUFA (3 μ M de cada uno) y NPD1 (200 nM) 16 h. La adición de H₂O₂ (800 μ M) causó la apoptosis (50 % de muerte celular). Tanto el 32:6n3 como el 34:6n3 evitaron con éxito la muerte celular (4 % y 18 %, respectivamente); la NPD1 redujo la apoptosis a un 11 % (Fig. 7K y 7L).

La estimulación del estrés oxidativo inicia la oxigenación enzimática del DHA a través de la activación de la 15-lipoxigenasa-1 (15-LOX-1), lo que da lugar a la biosíntesis de NPD1¹¹. La NPD1 es un mediador de lípidos de respuesta al estrés derivado del DHA y mejora la señalización de supervivencia en las células del RPE que se enfrentan al estrés oxidativo al promover la modulación de la actividad y el contenido de las proteínas directamente implicadas en la decisión del destino celular.

Las células del hRPE, anteriormente privadas de suero durante 12 h, se incubaron con el inhibidor de la 15-lipoxigenasa-1 (15-LOX-1) (PD146176) (10 μ M durante 1 h), a continuación se bañaron con 600 μ M de H₂O₂/TNF- α junto con una mezcla de 32:6n3 y 34:6n3 (3 μ M de cada uno) durante 16 h. El inhibidor de 15-LOX-1 sensibiliza a las células; por lo tanto, se utilizó una menor concentración de H₂O₂ que en el experimento de citoprotección. La adición de H₂O₂/TNF- α provocó la apoptosis de células del RPE y el tratamiento con una mezcla de 32:6n3 y 34:6n3 evitó con éxito la muerte celular (Fig. 7I), lo que indica que la 15-LOX-1 no está involucrada en este mecanismo de protección de células de ácidos grasos libres que utiliza células primarias del RPE humana.

Ejemplo 23

Los VLC-PUFA 32:6n3 y 34:6n3 mejoran la expresión de proteínas antiapoptóticas y prosupervivencia: En las Figs. 7A-7K, el 32:6n3 y el 34:6n3 tienen un aumento regulado de la expresión de Bcl2 y Bcl-xL prosupervivencia (Figs. 7E y 7F) y tuvieron un descenso regulado de las proteínas proapoptóticas Bax, Bim y Bid (Figs. 7G-7I). Además, los efectos prohomeostáticos de 32:6n3 y 34:6n3 s son en función de la concentración (Fig. 7J). La expresión de sirtuina-1 (SIRT1) se incrementó en presencia del inhibidor de 15-LOX-1 (Fig. 7C), mientras que el efecto del inhibidor en la expresión de Iduna no se vio afectado (Fig. 7D).

Ejemplo 24

Los ELV N32 y N34 atenúan la apoptosis en el RPE: Se probó si los ELV son capaces de inhibir la apoptosis causada por UOS en células del RPE. Como se muestra en la Fig. 10C, el ELV-N32-Na y el ELV-N34-Na imitan la atenuación de la apoptosis por

UOS en células del RPE con una concentración de 200 nM. Curiosamente, dos inhibidores de 15-LOX-1 diferentes (inhibidor de 15-LOX-1 o PD146176) con concentraciones de 1 μ M pudieron compensar la inhibición de la apoptosis por ELV en células del RPE que experimentan UOS (Fig. 10C). La muerte celular apoptótica por UOS se vio atenuada por el ELV-N32-Na o el ELV-N34-Me en células del RPE en función de la concentración (50-500 nM); la inhibición más alta fue con 500 nM (para las formas tanto de sal de sodio como de éster metílico) y la más baja fue con 50 nM (Fig. 10G).

Ejemplo 25

Los ELV provocan un aumento regulado de las proteínas prohomeostáticas y antiapoptóticas: Se investigó si los ELV mejoran la expresión de proteínas prosupervivencia y prohomeostáticas en células del RPE sometidas a UOS. La Fig. 10Aa muestra que el ELV-N32-Na y el ELV-N34-Na provocan un aumento regulado de la sirtuína1 (SIRT1) en células del RPE sometidas a UOS en función de la dosis (100-200 nM) y que el ELV-N32-Na es más potente que el ELV-N34-Na en el aumento regulado de SIRT1. El ELV-N32-Na y el ELV-N34-Na mejoraron la expresión de I κ B en células del RPE sometidas a UOS con concentraciones de 200 nM (Fig. 10B). El PD-146176, un inhibidor de 15-LOX-1, bloqueó estos efectos con una concentración de 1 μ M en células ARPE-19 sometidas a UOS. La prohibitina (tipo 1), una proteína de supervivencia celular, tuvo un aumento regulado tanto por ELV-N32 como por ELV-N34 (formas de sal de sodio y de éster metílico) en función de la concentración (100-200 nM) en células del RPE sometidas a UOS (Fig. 10H). En la Fig. 10D se muestra que el ELV-N32-Na o el ELV-N34-Na potenciaron la abundancia de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL. Por otro lado, los proapoptóticos Bax, Bim y Bid disminuyen con el ELV-N32 o el ELV-N34 (sales de sodio o ésteres metílicos) (Figs. 10D-10F). Es interesante destacar que si bien Bcl-2 y Bcl-xL tienen un aumento regulado (Fig. 10D), Bax, Bim y Bid tienen un descenso regulado ya sea por las sales de sodio o los ésteres metílicos (Figs. 10D-10F).

Ejemplo 26

El AdipoR1 regula la absorción de DHA y la formación de ELV: Las células del RPE mantienen la integridad funcional del PRC y su muerte está implicada en la aparición de varias formas de degeneraciones retinianas (Fig. 11D). Una de las funciones de la célula del RPE es recuperar el DHA durante la renovación del PRC y

devolverlo a través de la matriz interfotorreceptora al segmento interno del PRC para la biogénesis de la membrana del disco del nuevo segmento externo³⁷. Recientemente, se descubrió que el receptor de adiponectina 1 (AdipoR1) es necesario para la disponibilidad de DHA para las células fotorreceptoras²⁸ y que una sola mutación de aminoácidos puede causar retinosis pigmentaria autosómica dominante³⁸. La ablación genética de este receptor da lugar a la degeneración del PRC y al cese de la síntesis de VLC-PUFA en la retina. El tamaño de la mezcla de C32:6n3 y de 34:6n3 libre en las retinas de ratones con genes inactivados (KO) para AdipoR1 (rojo) se reduce drásticamente en comparación con los WT (azul). Además, el ELV-N32 y el ELV-N34 en KO (rojo) fueron indetectables. El monohidroxi 32:6n3 y el monohidroxi C34:6n3, los derivados estables de los precursores hidroperoxi de ELV-N32 y de ELV-N34 respectivamente, carecen de una señal detectable en KO (rojo), a diferencia de los genéticamente intactos (azul) (Figs. 11B y 11C).

Ejemplo 27

Los ELV protegen las células del RPE, que mantienen la integridad del PRC: El alargamiento de DHA en el segmento interno de los fotorreceptores por ELOVL4 da lugar a la biosíntesis de VLC-PUFA y su inserción en la posición C1 de la fosfatidilcolina dentro de las membranas del disco del PRC. Sin embargo, en condiciones de estrés, estos VLC-PUFA son escindidos por PLA1 para la síntesis de VLC-PUFA monohidroxi y dihidroxi (ELV) (Fig. 11A). El estrés oxidativo causado por la luz en las retinas de ratón desencadena la producción de VLC-PUFA libres, 32:6n3 y 34:6n3, y sus derivados monohidroxi y dihidroxi (Fig. 11A). En ratones KO para AdipoR1, no se encuentran cantidades detectables de estas moléculas (Fig. 5b, c, curvas rojas). Por lo tanto, la falta del precursor de DHA de los VLC-PUFA da como resultado la degeneración retiniana (Fig. 11D), precedida por un notable descenso regulado de las especies moleculares de VLC-PUFA omega-3 libres y la biosíntesis de ELV.

REFERENCIAS

1. Mukherjee, P.K., Marcheselli, V.L., Serhan, C.N. & Bazan, N.G. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 8491-8496 (2004)

2. Bazan, N.G. Homeostatic regulation of photoreceptor cell integrity: significance of the potent mediator neuroprotectin D1 biosynthesized from docosahexaenoic acid: The Proctor Lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 4866-4881 (2007)
3. Bazan N.G. (2009). Cellular and molecular events mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 signaling in photoreceptor cell survival and brain protection. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 81, 205–211.
4. Bazan, N.G. Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer's disease. *J. Lipid Res.* 50 Suppl., S400-S405 (2009)
5. Bazan NG, Eady TN, Khoutorova L, Atkins KD, Hong S, Lu Y, Zhang C, Jun B, Obenaus A, Fredman G, Zhu M, Winkler JW, Petasis NA, Serhan CN, Belayev L. Novel aspirin-triggered neuroprotectin D1 attenuates cerebral ischemic injury after experimental stroke. *Exp Neurol.* 2012;236(1):122-30
6. Serhan, C. N. & Petasis, N. A. Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem. Rev.* 111, 5922-5943, (2011).
7. Lagali, et. al. *et al.* Evolutionarily conserved ELOVL4 gene expression in the vertebrate retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 2841-50 (2003)
8. Agabaga, M.P. *et al.* Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 105, 12843-12848 (2008)
9. Agabaga, M.P. *et al.* Retinal very long-chain PUFAs: new insights from studies on ELOVL4 protein. *J. Lipid Res.* 51, 1624-1642 (2010)
10. Monroig, O. *et al.* Expression and role of Elovl4 elongases in biosynthesis of very long-chain fatty acids during zebrafish *Danio rerio* early development. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1801, 1145-1154 (2010)
11. Cameron, D.J. *et al.* Essential role of Elovl4 in very long chain fatty acid synthesis, skin permeability barrier function, and neonatal survival. *Int. J. Biol. Sci.* 3, 111-119 (2007)
12. Agbaga, M.P. Different mutations in ELOVL4 affect very long chain fatty acid biosynthesis to cause variable neurological disorders in humans. *Adv. Exp. Med. Biol.* 854, 129-135 (2016)
13. Aldahmesh, M.A. *et al.* Recessive mutations in ELOVL4 cause ichthyosis, intellectual disability, and spastic quadriplegia. *Am. J. Hum. Genet.* 89, 745-750 (2011)

14. Aveladano MI. Phospholipid species containing long and very long polyenoic fatty acids remain with rhodopsin after hexane extraction of photoreceptor membranes. *Biochemistry*. **27**, 1229–1239 (1988).
15. Rice, D. *et al.* Adiponectin receptor 1 conserves docosahexaenoic acid and promotes photoreceptor cell survival. *Nat. Commun.* **6**, 6228 (2015)
16. Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Lu Y, Siegelman J, Baer T, Yang R, Colgan SP, Petasis NA. Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: Assignments of dihydroxy-containing docosatrienes. *J Immunol.* **176**(3):1848-5 (2006).
17. Petasis NA, Yang R, Winkler JW, Zhu M, Uddin J, Bazan NG, Serhan CN. Stereocontrolled total synthesis of Neuroprotectin D1/Protectin D1 and its aspirin-triggered stereoisomer. *Tetrahedron Lett.* **53**(14):1695-8, (2012).
18. Calandria, J.M. *et al.* Selective survival rescue in 15-lipoxygenase-1-deficient retinal pigment epithelial cells by the novel docosahexaenoic acid-derived mediator, neuroprotectin D1. *J. Biol. Chem.* **284**, 17877-17882 (2009)
19. Bazan, N.G. The docosanoid neuroprotectin D1 induces homeostatic regulation of neuroinflammation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **88**, 127-129 (2013)
20. Bazan, N.G. Cell survival matters: docosahexaenoic acid signaling, neuroprotection and photoreceptors. *Trends Neurosci.* **29**, 263-271 (2006)
21. Bazan, N.G., Calandria, J.M. & Serhan, C.N. Rescue and repair during photoreceptor cell renewal mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1. *J. Lipid Res.* **51**, 2018-2031 (2010)
22. Mukherjee, P.K., Chawla, A., Loayza, M.S., Bazan, N.G. Docosanoids are multifunctional regulators of neural cell integrity and fate: significance in aging and disease. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **77**, 233-238 (2007)
23. Mukherjee, P.K., Chawla, A., Loayza, M.S., Bazan, N.G. Docosanoids are multifunctional regulators of neural cell integrity and fate: significance in aging and disease. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **77**, 233-238 (2007)
24. Li, L. *et al.* Prohibitin gene delivery promotes functional recovery in rats with spinal cord injury, *Neuroscience.* **286**, 27-36 (2015)
25. Sripathi, S. R. *et al.* Prohibitin as the molecular binding switch in the retinal pigment epithelium. *Protein J.* **35**, 1-16 (2016)
26. Sripathi, S. R. *et al.* Altered cytoskeleton as a mitochondrial decay signature in the retinal pigment epithelium. *Protein J.* **35**, 179-192 (2016)

27. Nijtmans, L. G. *et al.* Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *EMBO J.* **19**, 2444-2451 (2000)
28. Roberts, S. B. & Rosenberg, I. Nutrition and aging: changes in the regulation of energy metabolism with aging. *Physiol. Rev.* **86**, 651–667 (2006)
29. Balaban, R. S., Nemoto, S. & Finkel, T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* **120**, 483-495 (2005)
30. Back, J.W. *et al.* A structure for the yeast prohibitin complex: structure prediction and evidence from chemical crosslinking and mass spectrometry. *Protein Sci.* **11**, 2471-2478 (2002)
31. Bligh, E.G. & Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917 (1959)
32. D.T. Stark, N.G. Bazan. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors differentially modulate neuronal cyclooxygenase-2 function, lipid peroxidation, and neuroprotection. *J. Neurosci.* **31**, 13710-13721 (2011)
33. Harkewicz R, Du H, Tong Z, Alkuraya H, Bedell M, Sun W, Wang X, Hsu Y-H, Esteve-Rudd J, Hughes G, Su Z, Zhang M, Lopes VS, Molday RS, Williams DS, Dennis EA, Zhang K. Essential Role of ELOVL4 Protein in Very Long Chain Fatty Acid Synthesis and Retinal Function. *J Biol Chem.* 2012;287(14):11469-80.
34. Corey EJ, Raju N. A new synthetic route to bridged carboxylic ortho esters. *Tetrahedron Lett.* 1983;24(50):5571-4.
35. Durand S, Parrain J-L, Santelli M. Construction of (Z,Z) skipped 1,4-dienes. Application to the synthesis of polyunsaturated fatty acids and derivatives. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1.* 2000(3):253-73.
36. E. H. Lo, T. Dalkara, M. A. Moskowitz, Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 399-415 (2003). pmid: 12728267; doi: 10.1038/nrn1106
37. K. Eltzschig, T. Eckle, Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med.* **17**, 1391-1401 (2011). pmid: 22064429; doi: 10.1038/nm.2507
38. L. Belayev, O.F. Alonso, R. Busto, W. Zhao, M.D. Ginsberg, Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke.* **27**, 1616-1622 (1996). pmid: 8784138
39. S.H. Shi, Z.F. Qi, Y.M. Luo, X.M. Ji, K.J. Liu, Normobaric oxygen treatment in acute ischemic stroke: a clinical perspective. *Med. Gas. Res.* **6**, 147-153 (2016). pmid: 27867482; doi: 10.4103/2045-9912.191360

40. Jun B, Mukherjee PK, Asatryan A, Kautzmann M-A, Heap J, Gordon WC, Bhattacharjee S, Yang R, Petasis NA, Bazan NG. Elovanooids are novel cell-specific lipid mediators necessary for neuroprotective signaling for photoreceptor cell integrity. *Scientific Reports*. 2017;7(5279):1-14
41. Bhattacharjee S, Jun B, Belayev L, Heap J, Kautzmann M-A, Obenaus A, Menghani H, Marcell SJ, Khoutorova L, Yang R, Petasis NA, Bazan NG. Elovanooids are a novel class of homeostatic lipid mediators that protect neural cell integrity upon injury. *Science Advances*. 2017;3(9):1-13

Ejemplo 28

Pueden utilizarse polímeros bioadhesivos como polímeros adhesivos MUCO en la administración de fármacos para mantener la liberación de los compuestos. Además, se pueden utilizar gotas, como ser gotas oftálmicas, para la administración de fármacos. Con las gotas, la frecuencia de aplicación se puede aumentar porque da como resultado un suministro máximo, mientras que con el adhesivo MUCO, se puede lograr una liberación sostenida del polímero y la cantidad administrada también es mucho más controlable. Se incluyen además nuevos resultados que muestran que la expresión de VEGF aumenta en el modelo de lesión y que el tratamiento con elovanooides reduce drásticamente dicha expresión de VEGF. Esto es destacable porque el VEGF potencia la neovascularización en varias patologías del segmento anterior del ojo. Este crecimiento patológico de los vasos es una de las principales consecuencias en varias enfermedades. También se incluyen datos inmunohistoquímicos de marcadores inflamatorios en células específicas.

Nuestros datos demuestran que la aplicación tópica de elovanooides 32 o 34 atenúa notablemente las respuestas inflamatorias en la córnea. Se utilizó un modelo de lesión experimental de una quemadura alcalina en ratones. El mecanismo de funcionamiento implica la actividad de bioactividad antiinflamatoria de los elovanooides 32 y 34 para contener la elevación de proteínas proinflamatorias en las lágrimas de ratón, así como el aumento de células inflamatorias en la córnea después de una lesión. En este experimento, se seleccionaron los marcadores F4/80 (para macrófagos y células dendríticas), CD11b (para muchas células proinflamatorias) y Ly6G (para neutrófilos). A los 5 y 7 días después de la lesión por álcalis, se detectó una gran cantidad de células inflamatorias en el área corneal lesionada. Sin pretender seguir una teoría, estos resultados pueden estar asociados a la elevación de IL-1 β en las lágrimas de ratón en el grupo tratado con vehículo. En los grupos de animales que recibieron el

tratamiento tópico con los compuestos 32 y 34, se encontró una reducción significativa de la infiltración de células inmunitarias en el día 5 y 7 después de la lesión de manera consistente. La resolución eficaz de la inflamación de un ratón tardó 14 días, mientras que los grupos tratados con 32-N y 34-N mostraron un efecto de resolución inflamatoria mejor y más rápido en el día 5 y lo mantuvieron hasta 14 días después de la lesión y el tratamiento. Pudimos demostrar que los elovanoides 32 y 34 aceleraron el cierre de la herida más rápido que los grupos tratados con vehículo, que los compuestos 32 y 34 suprimieron la infiltración de células inmunitarias y que la infiltración de células inmunitarias se suprime mediante la administración tópica de gotas oftálmicas de compuestos 32 y 34.

La encuesta de National Eye C.A.R.E. reveló recientemente que el 76 % de los proveedores de atención oftalmológica (ECP) registraron un aumento en los síntomas de la queratoconjuntivitis seca en pacientes de 18 a 34 años; el 89 % de los ECP también informó que la queratoconjuntivitis seca se está volviendo más común debido a los estilos de vida actuales de uso de múltiples pantallas. Para 2030, se espera que más de 3 millones de hombres en EE. UU. tengan queratoconjuntivitis seca. A pesar de su creciente prevalencia, la queratoconjuntivitis seca sigue siendo un trastorno progresivo y subdiagnosticado que puede dejar a los afectados con una irritación constante y pérdida de la visión. Incluso los casos menos graves pueden hacer que el uso de lentes de contacto no sea satisfactorio, disminuir el rendimiento laboral, evitar que los afectados conduzcan de noche y disfruten de actividades al aire libre, disminuir la satisfacción quirúrgica y disminuir la calidad de vida en general. La solución a este problema es crear nuevas opciones terapéuticas y tecnologías que ayuden a proporcionarles a los médicos las herramientas adecuadas para lograr diagnósticos más eficaces y formas de tratar a sus pacientes.

En la parte anterior del ojo, el tejido transparente que carece de vasos sanguíneos, la córnea, es la superficie refractiva del ojo. Al inicio de las alteraciones (lesión), leucocitos y macrófagos se infiltran en la córnea; además, la abundancia de citocinas, como los factores inflamatorios IL-1 β , IL-6 y el factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGF-A), se elevan.

El manejo clínico de la inflamación de la superficie ocular es importante porque el uso de medicamentos incorrectos puede ser ineficaz o dañino, lo que afecta, como consecuencia, la vista. A pesar del hecho de que actualmente tenemos potentes fármacos antiinflamatorios tópicos, la inflamación de la superficie ocular, y principalmente las complicaciones (p. ej., el glaucoma) son una preocupación. La

inflamación es una respuesta protectora que tiene como objetivo contrarrestar las consecuencias de los estímulos dañinos en lugar de un proceso dañino.

La mayoría de los tratamientos tópicos actuales implican el uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), corticosteroides y/o, más recientemente, membranas amnióticas. Los AINE están indicados principalmente para el tratamiento de la inflamación posoperatoria y su uso prolongado provoca irritación, queratopatía superficial, queratólisis marginal e incluso retraso en la cicatrización de heridas. Los corticosteroides bloquean la reacción del ácido araquidónico al inhibir la fosfolipasa A2 y dianas adicionales e incluyen cortisona, prednisona, dexametasona e hidrocortisona. Están indicados para tratar la inflamación del segmento anterior (conjuntiva, córnea, iris y cuerpo ciliar). Las complicaciones se asocian a hipertensión ocular y glaucoma causado por esteroides, formación de cataratas, infección secundaria y retraso en la cicatrización de heridas.

Hace más de veinte años, la tinción de la córnea, la prueba de Schirmer, las lágrimas artificiales, los tapones lagrimales y las compresas calientes eran formas comunes de diagnosticar y tratar la queratoconjuntivitis seca. A estas tecnologías anteriores a 1990 les siguieron la emulsión de ciclosporina oftálmica (2003), el sistema de osmolaridad de TearLab (2009), el Keratograph 5M (2012), LipiView/LipiFlow (2012) e InflammDry (2013). Más recientemente, entre 2016 y 2017, se desarrollaron la solución oftálmica Lifitegrast, la emulsión de ciclosporina oftálmica MultiDose, LipiScan y TrueTear. El abordaje más reciente para la inflamación ocular implica el uso de una membrana amniótica aplicada a la superficie ocular para tratar las lesiones. El amnios humano está compuesto de colágenos, proteoglucanos, fibronectina y laminina, y ácido hialurónico que suprimen la activación de los linfocitos T y favorecen la curación regenerativa de la córnea.

Las complicaciones relacionadas con la inflamación, como dolor, deficiencia visual, cicatrización anormal de heridas, etc., se abordarán para validar la aplicación de 32-N y 34-N.