

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 859 753**

51 Int. Cl.:

A61P 9/10 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/06 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2012** **PCT/US2012/034835**
87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012** **WO12148929**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2012** **E 12777440 (4)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2020** **EP 2701698**

54 Título: **Trastornos que implican la oxidación de PUFA**

30 Prioridad:

26.04.2011 US 201161479306 P
26.04.2011 US 201161479311 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
04.10.2021

73 Titular/es:

RETROTOPE, INC. (100.0%)
12133 Foothill Lane
Los Altos Hills, CA 94022-3319, US

72 Inventor/es:

SHCHEPINOV, MIKHAIL, SERGEEVICH

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 859 753 T3

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

DESCRIPCIÓN

Trastornos que implican la oxidación de PUFA

5 **Antecedentes****Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

10 La presente solicitud reivindica los derechos de prioridad de la Solicitud Provisional de EE.UU. N.º 61/479.306, presentada el 26 de abril de 2011, y la Solicitud Provisional de EE.UU. N.º 61/479.311, presentada el 26 de abril de 2011.

Campo

15 Ácidos grasos poliinsaturados isotópicamente modificados ("PUFA") y otros PUFA modificados para el tratamiento de determinadas enfermedades, particularmente trastornos hepáticos, lipidemias y factores de riesgo relacionados con el corazón.

Descripción de la técnica relacionada

20 El daño oxidativo está implicado en una amplia diversidad de enfermedades tales como enfermedades mitocondriales, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades musculares neurodegenerativas, enfermedades retinales, trastornos del procesamiento de energía, enfermedades renales, enfermedades hepáticas, lipidemias, enfermedades cardíacas, inflamación y trastornos genéticos. Específicamente, tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, enfermedades del hígado graso, incluyendo las variedades alcohólicas y no alcohólicas, esteatohepatitis, cirrosis y carcinoma hepatocelular.

30 Aunque el número de enfermedades asociadas al estrés oxidativo es numeroso y diverso, está bien establecido que el estrés oxidativo está provocado por alteraciones del estado redox normal dentro de las células. Un desequilibrio entre la producción rutinaria y la destoxificación de especies reactivas de oxígeno ("ROS") tales como los peróxidos y los radicales libres puede provocar daños oxidativos en las estructuras y la maquinaria celulares. En condiciones normales, una fuente potencialmente importante de ROS en organismos aerobios es la fuga de oxígeno activado de las mitocondrias durante la respiración oxidativa normal. Adicionalmente, se sabe que los macrófagos y las reacciones enzimáticas también contribuyen a la generación de ROS dentro de las células. Debido a que las células y sus orgánulos internos están unidos a la membrana lipídica, las ROS pueden entrar fácilmente en contacto con los componentes de la membrana y provocar la oxidación de lípidos. En última instancia, dicho daño oxidativo puede transmitirse a otras biomoléculas dentro de la célula, tales como el ADN y las proteínas, por contacto directo e indirecto con oxígeno activado, constituyentes de membrana oxidados u otros componentes celulares oxidados. Por lo tanto, uno puede imaginar fácilmente cómo el daño oxidativo puede propagarse a través de una célula dando la movilidad de los constituyentes internos y la interconexión de las rutas celulares.

45 Los ácidos grasos formadores de lípidos son bien conocidos como uno de los componentes principales de las células vivas. Como tales, participan en numerosas rutas metabólicas y juegan un papel importante en una diversidad de patologías. Los ácidos grasos poliinsaturados ("PUFA") son una subclase importante de ácidos grasos. Un nutriente esencial es un componente alimenticio que directamente o a través de conversión, cumple una función biológica esencial y el cual no se produce de forma endógena o en cantidades suficientemente grandes para cubrir las necesidades. Para animales homeotermos, los dos PUFA rigurosamente esenciales son los ácidos linoleico (ácido *cis*, *cis*-9,12-octadecadienoico; ácido (9Z,12Z)-9,12-octadecadienoico; "LA"; 18:2;n-6) y alfa-linolénico (ácido *cis*, *cis*, *cis*-9,12,15-octadecatrienoico; ácido (9Z,12Z,15Z)-9,12,15-octadecatrienoico; "ALA"; 18:3;n-3), anteriormente conocido como vitamina F (Cunnane SC. *Progress in Lipid Research* **2003**; 42:544-568). El LA, mediante una desaturación enzimática adicional y elongación, se convierte en PUFA n-6 superiores tales como ácido araquidónico (AA; 20:4;n-6); mientras que el ALA da lugar a una serie n-3 superior, incluyendo, pero no limitado a, ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5;(n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6;n-3) (Goyens PL. et al. *Am. J. Clin. Nutr.* **2006**; 84:44-53). Debido a la naturaleza esencial de determinados PUFA o precursores de PUFA, hay muchos casos conocidos de su deficiencia y estos a menudo están relacionados con afecciones médicas. Adicionalmente, muchos suplementos de PUFA están disponibles sin receta, con eficiencia probada contra ciertas dolencias (Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º: 7.271.315 y la Patente de EE.UU. N.º: 7.381.558).

60 Los PUFA dotan a las membranas mitocondriales de la fluidez apropiada necesaria para un rendimiento óptimo de fosforilación oxidativa. Los PUFA también juegan un papel importante en el inicio y la propagación del estrés oxidativo. Los PUFA reaccionan con las ROS a través de una reacción en cadena que amplifica un evento original (Sun M, Salomon RG, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**; 126:5699-5708). Sin embargo, se sabe que la formación no enzimática de altos niveles de hidroperóxidos de lípidos da lugar a varios cambios perjudiciales. De hecho, la Coenzima Q10 se ha relacionado con una toxicidad de PUFA aumentada a través de la peroxidación de PUFA y la toxicidad de los productos resultantes (Do TQ et al, *PNAS USA* **1996**; 93:7534-7539). Tales productos oxidados afectan negativamente la fluidez y la permeabilidad de sus membranas; conducen a la oxidación de las proteínas de la membrana; y pueden convertirse

en un gran número de compuestos de carbonilo altamente reactivos. Estos últimos incluyen especies reactivas tales como acroleína, dialdehído malónico, glioxal, metilglioxal, etc. (Negre-Salvayre A, et al. *Brit. J. Pharmacol.* **2008**; 153:6-20). Pero los productos más destacados de la oxidación de PUFA son aldehídos alfa, beta-insaturados tales como 4-hidroxinon-2-enal (4-HNE; formado a partir de n-6 PUFA como LA o AA), 4-hidroxihex-2-enal (4-HHE; formado a partir de n-3 PUFA como ALA o DHA) y los cetoaldehídos correspondientes (Esterbauer H, et al. *Free Rad. Biol. Med.* **1991**; 77:81-128; Long EK, Picklo MJ. *Free Rad. Biol. Med.* **2010**; 49:1-8). Estos carbonilos reactivos reticulan (bio)moléculas a través de la adición de Michael o las rutas de formación de bases de Schiff y se han implicado en una gran cantidad de procesos patológicos (tales como aquellos presentados anteriormente), afecciones relacionadas con la edad y el estrés oxidativo, y envejecimiento. De forma importante, en algunos casos, los PUFA parecen oxidarse en sitios específicos porque los grupos metileno de los sistemas 1,4-dieno (la posición bis-alílica) son sustancialmente menos estables a ROS y a enzimas tales como ciclogenasas y lipoxigenasas, que los metilenos alílicos.

Ahora los presentes inventores han descubierto que los PUFA resistentes a la oxidación, los miméticos de PUFA, los profármacos de PUFA y/o los PUFA resistentes a oxidación y miméticos de PUFA que contienen grasas son útiles para mitigar los trastornos hepáticos.

Sumario

La presente invención proporciona una sustancia poliinsaturada para su uso en el tratamiento o inhibición de la progresión de la enfermedad del hígado graso alcohólico, esteatosis hepática no alcohólica, esteatohepatitis, cirrosis, carcinoma hepatocelular, ictericia obstructiva, colestiasis o una enfermedad del tracto biliar en un paciente con trastorno hepático, o lipidemia, trastornos de la liporegulación, lipotoxicidad, cardiopatía isquémica, hipertensión, fibrilación auricular, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad de las arterias coronarias o aterosclerosis en un paciente con lipidemia o factores de riesgo relacionados con el corazón, en donde el poliinsaturado comprende un ácido graso o éster de ácido graso que está isotópicamente modificado con deuterio en una o más posiciones, en donde la sustancia poliinsaturada se incorpora al cuerpo del paciente después de la administración.

En algunas realizaciones, la sustancia poliinsaturada es un elemento nutricional. En otras realizaciones, el elemento nutricional es un triglicérido, un diglicérido y un monoglicérido que comprende un ácido graso o un éster de ácido graso. En algunas realizaciones, el ácido graso o éster de ácido graso está isotópicamente modificado en una o más posiciones bis-alílicas. En otras realizaciones, la estabilización comprende al menos un átomo de deuterio en una posición bis-alílica. En algunas realizaciones, la estabilización comprende al menos dos átomos de deuterio en una o más posiciones bis-alílicas. En otras realizaciones, la estabilización utiliza una cantidad de isótopos que está por encima del nivel de abundancia de origen natural. En algunas realizaciones, la estabilización utiliza una cantidad de isótopos que está significativamente por encima del nivel de abundancia de origen natural del isótopo.

En algunas realizaciones la cantidad de ácido graso o éster de ácido graso isotópicamente modificado comprende entre aproximadamente el 5 % y el 75 %, o entre aproximadamente el 10 % y el 30 %, o aproximadamente el 20 % o más de la cantidad total de ácido graso o éster de ácido graso modificados administrada o ingerida por el paciente. En algunas realizaciones, una célula o tejido del paciente mantiene una concentración suficiente del ácido graso o éster de ácido graso modificados isotópicamente para prevenir la autooxidación del ácido graso o éster de ácido graso poliinsaturado de origen natural. En algunas realizaciones, el átomo de deuterio está presente a un nivel significativamente por encima del nivel de abundancia de origen natural del deuterio.

En algunas realizaciones, la sustancia poliinsaturada es un ácido graso omega-3 y/o un ácido graso omega-6. En otras realizaciones, la sustancia poliinsaturada se selecciona del grupo que consiste en ácido 11,11-D2-linolénico, ácido 14,14-D2-linolénico, ácido 11,11,14,14-D4-linolénico, ácido 11,11-D2-linoleico, ácido 11-D-linolénico, ácido 14-D-linolénico, ácido 11,14-D2-linolénico y ácido 11-D-linoleico. En otras realizaciones, la sustancia poliinsaturada se modifica además isotópicamente en una posición pro-bis-alílica. En algunas realizaciones, la sustancia poliinsaturada es ácido alfa linolénico, ácido linoleico, ácido gamma linolénico, ácido dihomogamma linolénico, ácido araquidónico y/o ácido docosatetraenoico. En algunas realizaciones, la sustancia poliinsaturada se incorpora a la membrana mitocondrial. En otras realizaciones, el profármaco de ácido graso es un éster. En algunas realizaciones, el éster es un triglicérido, diglicérido o monoglicérido. En algunas realizaciones, el ácido graso o éster de ácido graso isotópicamente modificados es un ácido linoleico, ácido linolénico o éster de los mismos. En algunas realizaciones, el ácido graso o éster de ácido graso isotópicamente modificados es ácido araquidónico o éster del mismo. En algunas realizaciones, el ácido graso o éster de ácido graso isotópicamente modificados es ácido docosatetraenoico o éster del mismo. En algunas realizaciones, el ácido graso o éster de ácido graso isotópicamente modificados es ácido eicosapentaenoico o éster del mismo.

Algunas realizaciones comprenden además la coadministración de un antioxidante. En algunas realizaciones, el antioxidante es la Coenzima Q, idebenona, mitoquinona o mitoquinol. En otras realizaciones, el antioxidante es un antioxidante dirigido a las mitocondrias. En algunas realizaciones, el antioxidante es una vitamina, mimético de vitamina o profármaco vitamínico. En otras realizaciones, el antioxidante es una vitamina E, mimético de la vitamina E, profármaco de vitamina E, vitamina C, mimético de la vitamina C y/o profármaco de la vitamina C.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A y 1B. (1A) Oxidación de PUFA dirigida por ROS; (1B) formación de compuestos de carbonilo tóxicos.

Figuras 2A y 2B. Análisis de RMN ^1H y ^{13}C de PUFA deuterados descritos en los Ejemplos 1-4.

Figura 3. La sensibilidad de los mutantes nulos de *coq* al tratamiento con ácido linolénico se anula mediante el refuerzo de isótopos. Se prepararon mutantes nulos de levadura *coq3*, *coq7* y *coq9* en el fondo genético de levadura (TS) W303. Las cepas de levadura se cultivaron en medio YPD (extracto de levadura Bacto al 1 %, 2 % de peptona Bacto, 2 % de dextrosa) y se recolectan mientras están en la fase de crecimiento logarítmico ($\text{DO}_{600\text{ nm}} = 0,1-1,0$). Las células se lavaron dos veces con agua estéril y se resuspendieron en tampón de fosfato (fosfato sódico 0,10 M, pH 6,2, 0,2 % de dextrosa) a una $\text{DO}_{600\text{ nm}} = 0,2$. Se retiraron las muestras y se sembraron en placa en medio de placa YPD diluciones en serie 1:5 empezando en 0,20 DO/ml, para proporcionar un control sin tratamiento de tiempo cero (mostrado en el panel superior izquierdo). Los ácidos grasos designados se añadieron a una concentración final de 200 μM a 20 ml de levadura en tampón fosfato. A las 2 h, 4 h y 16 h se retiraron muestras, se prepararon diluciones en serie 1:5 y se colocaron en medio de placa YPD. Se tomaron fotografías después de 2 días de crecimiento a 30 °C. Este panel es representativo de dos ensayos independientes, realizados en diferentes días.

Figura 4. Los mutantes de *coq* de levadura tratados con ácido D4-linolénico reforzado con isótopos son resistentes a la muerte celular mediada por PUFA. El ensayo sensible a los ácidos grasos se realizó como se describe en la Figura 3, excepto que se retiraron alícuotas de 100 μl a las 1, 2 y 4 h y, después de la dilución, se extendieron sobre placas YPD. Se tomaron fotografías después de 2 a 2,5 días y se contó el número de colonias. Las cepas de levadura incluyen Tipo silvestre (círculos), *atp2* (triángulos) o *coq3* (cuadrados); Los tratamientos con ácidos grasos incluyen oleico C18:1 (línea continua), linolénico, 08:3, n-3 (línea discontinua) u 11,11,14,14-D4-linolénico, C18:3, n-3, (línea de puntos).

Figura 5. Separación y detección de patrones de éster metílico de ácido graso (FAME) por GC-EM. Los FAME se prepararon como se describe (Moss CW, Lambert MA, Merwin WH. *Appl. Microbiol.* **1974**; 1, 80-85) y las cantidades indicadas de ácidos grasos libres y 200 μg de 07:0 (un patrón interno) se sometieron a metilación y extracción. Los análisis de las muestras se realizaron en un GC-EM Agilent 6890-6975 con una columna de cera DB (0,25 mm X 30 m X 0,25 m de espesor de película) (Agilent, catálogo 122-7031).

Figura 6. Captación de ácidos grasos suministrados exógenamente por la levadura. Se recogieron levaduras TS (W303) en fase logarítmica y se incubaron en presencia de 200 μM del ácido graso designado durante 0 o 4 h. Las células de levadura se recolectaron, se lavaron dos veces con agua estéril y después se sometieron a metanólisis alcalina y saponificación y extracción de lípidos como se describe (Moss CW, Lambert MA, Merwin WH. *Appl. Microbiol.* **1974**; 1, 80-85; (Shaw, 1953 Shaw, W. H. C.; Jefferies, J. P. Determination of ergosterol in yeast. *Anal Chem* 25:1130; 1.953). Cada ácido graso designado se da como μg por $\text{DO}_{600\text{ nm}}$ de levadura, y se corrigió para la recuperación del patrón interno C17:0.

Figura 7. La cinética del consumo de O_2 acompañó a la oxidación de LA 0,71 M (gráficos 1 y 2) y D2-LA 0,71 M (gráfico 3) en clorobenceno iniciada por AMVN 40 mM a 37 °C. Gráfico 2 - Se añadió HPMC 0,23 mM a LA 0,71 M.

Figura 8. Dependencia de la velocidad de oxidación de la mezcla de LA y D2-LA en solución de clorobenceno de la composición de la mezcla. Condiciones: $[\text{LA}] + [11,11\text{-d}_2\text{-LA}] = 0,775\text{ M}$; $[\text{AMVN}] = 0,0217\text{ M}$; 37 °C. $R_{\text{IN}} = (1,10 \pm 0,08) \times 10^{-7}\text{ M/s}$.

Figura 9. El refuerzo de isótopos en la posición bis-alílica de los ácidos grasos poliinsaturados atenúa la autooxidación de los lípidos. Las levaduras de tipo silvestre, Q-less *coq3*, o los mutantes nulos *cor1* deficientes respiratorios se incubaron en presencia de 200 μM de LA y D2-LA en diferentes proporciones de PUFA. Se colocaron diluciones en serie (1:5) a partir de 0,2 DO/ml en medio de placa sólida YPD. En la parte superior izquierda se muestra un control sin tratamiento de tiempo cero. Crecimiento a 30 °C.

Figura 10. El refuerzo de isótopos en la posición bis-alílica de los ácidos grasos poliinsaturados atenúa la autooxidación de los lípidos. Las levaduras de tipo silvestre, Q-less *coq3*, o los mutantes nulos *cor1* deficientes respiratorios se incubaron en presencia de 200 μM de LA y D4-LA en diferentes proporciones de PUFA. Se colocaron diluciones en serie (1:5) a partir de 0,2 DO/ml en medio de placa sólida YPD. Crecimiento a 30 °C.

Figura 11. Cromatogramas de los extractos de levadura sometidos a análisis GC-EM. Las diferentes trazas representan las incubaciones de 0 y 4 h, respectivamente. El área máxima de cada FAME (C18:1, C18:3 y D4-linolénico) se dividió por el área máxima del patrón C17:0, cuantificado con una curva de calibración. El 16:0 y 16:1 endógeno cambia muy poco, mientras que los ácidos grasos añadidos de forma exógena aumentaron significativamente.

Figura 12. Supervivencia de células MVEC tratadas con H- y D-PUFA después de intoxicación aguda por paraquat. Para todos los tipos celulares probados, D-PUFA tuvo efectos protectores en comparación con los controles, similar a aquellos mostrados para las células MVEC.

Figura 13. Estudios de dosificación en animales de D2-LA/D4-ALA 1:1 que indican enriquecimiento tisular con deuterio.

- 5 **Figura 14.** Estudios de dosificación en animales de D2-LA/D4-ALA 1:1 comparando cualquier cambio en la distribución de la grasa.

Figura 15. Estudios de dosificación en animales de D2-LA/ALA 1:1 que indican enriquecimiento tisular con deuterio.

- 10 **Figura 16.** Perfil de grasa hepática control después de un estudio de dosificación en animales de 90 días.

Figura 17. Estudios de dosificación en animales de D2-LA/D4-ALA 1:1 que indican perfil de grasa hepática y enriquecimiento con deuterio.

- 15 **Figura 18.** Perfil de grasa hepática después de un estudio de dosificación en animales de 90 días con D2-LA.

Figura 19. Estudios de dosificación en animales de D2-LA/D4-ALA 1:1 que indican perfil de grasa cerebral y enriquecimiento con deuterio.

- 20 **Figura 20.** Estudios de dosificación en animales de D2-LA/ALA 1:1 que indican perfil de grasa cerebral y enriquecimiento con deuterio.

Figura 21. Perfil de grasa cerebral control después de un estudio de dosificación en animales de 90 días.

- 25 **Descripción detallada de la realización preferida**

Como se usa en el presente documento, las abreviaturas se definen como sigue:

α Lnn	Ácido alfa-linolénico
4-HHE o HHE	4-Hidroxihex-2-enal
4-HNE o NHE	4-Hidroxinon-2-enal
AA	Ácido araquidónico
ACE	Enzima convertidora de angiotensina
AFLD	Esteatosis hepática alcohólica
ALA	Ácido alfa-linolénico
AMVN	2,2'-Azobis(2,4-dimetilvaleronitrilo)
CAD	Arteriopatía coronaria
CHF	Insuficiencia cardíaca crónica
D	Deuterado
D1	Mono-deuterado
D2	Di-deuterado
D2-LA	Ácido linoleico di-deuterado
D3	Tri-deuterado
D4	Tetra-deuterado
D5	Penta-deuterado
D6	Hexadeuterado
DHA	Ácido docosahexaenoico (22:6; n-3)
EPA	Ácido eicosapentaenoico (20:5; n-3)
dI	Decilitro
DMF	Dimetilformamida
EtOH	Etanol
FAME	Éster metílico de ácido graso
FLD	Esteatosis hepática
FRAP	Capacidad reductora férrica del plasma
HPMC	6-Hidroxi-2,2,5,7,8-pentametilbenzocromano
H-PUFA	Ácido graso poliinsaturado no deuterado
IP	Intraperitoneal
IR	Infrarrojo
KIE	Efecto isotópico cinético
LA	Ácido linoleico
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LYH	Hipertrofia ventricular izquierda

MDA	Malondialdehído
mg	Miligramo
MI	Infarto de miocardio
MPTP	1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MVEC	Célula endotelial microvascular
NAFLD	Esteatosis hepática no alcohólica
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica
PPAR	Receptor activado por proliferador de peroxisoma
PQ	Paraquat
PUFA	Ácido o ácidos grasos poliinsaturados
R _{IN}	Tasa de iniciación
ROS	Especies reactivas de oxígeno
R _{ox}	Tasa de oxidación
RPE	Epitelio pigmentario retinal
SNOMED	Nomenclatura sistematizada de medicina
SOD	Superóxido dismutasa
TDMS	Sistema de gestión de datos de toxicología
TH	Tirosina hidroxilasa
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía en capa fina
V-SMOW	Agua oceánica media promedio de Viena
TS	Tipo silvestre
YPD	Medio que contiene 1 % de extracto de levadura Bacto, 2 % de peptona Bacto, 2 % de dextrosa

Trastornos hepáticos que implican PUFA

- 5 El metabolismo anormal de los lípidos juega un papel importante en la patogenia de muchos trastornos hepáticos. La esteatosis hepática (FLD), ya sea alcohólica (AFLD) o no alcohólica (NAFLD) consiste en esteatosis hepática (hígado graso) y esteatohepatitis (inflamación progresiva, o hepatitis, del hígado). La FLD a menudo progresa hacia el desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular. El espectro indistinguible de características histológicas tanto de AFLD como de NAFLD sugiere una convergencia de mecanismos patogénicos que permite la progresión de la
- 10 esteatohepatitis hacia cirrosis y cáncer de hígado. El consumo excesivo de energía y la combustión reducida de energía parecen ser eventos críticos que culminan en un almacenamiento excesivo de lípidos en el hígado. La combustión de energía en el hígado está controlada por los sistemas de oxidación de ácidos grasos peroxisomales y mitocondriales regulados por el receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR) y el sistema de oxidación microsomal. PPAR, un receptor para los proliferadores de peroxisomas, funciona como un sensor de ácidos grasos
- 15 (sensor de lípidos) y la detección de PPAR ineficaz puede reducir la quema de energía y provocar esteatosis hepática y esteatohepatitis. (Reddy JK et al, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2006**;290:G852-858).

- El procesamiento de PUFA está disminuido en pacientes obesos con NAFLD, en asociación con la resistencia subyacente a la insulina y el estrés oxidativo, que da lugar a un metabolismo lipídico alterado que favorece la infiltración
- 20 grasa (Araya J et al, *Obesity* **2010**;18: 1460-1463). Se sabe que el exceso de ácidos grasos saturados inhibe la actividad de las desaturasas. Esto da lugar a una proporción elevada de ácidos linoleico y linolénico propensos a la peroxidación (Puri P et al, *Hepatology* **2007**;46:1081-1090).

- La acumulación de lípidos dentro de los hepatocitos inicia el desarrollo de esteatohepatitis no alcohólica (NASH). La principal anomalía metabólica que da lugar a la acumulación de lípidos (esteatosis) puede deberse a la resistencia a la insulina y alteraciones en la captación, síntesis, degradación o rutas secretoras del metabolismo de los lípidos
- 25 hepáticos. El hígado esteatótico puede ser vulnerable a lesiones adicionales cuando es desafiado por agresiones adicionales. La progresión de esteatosis sencilla, no complicada a esteatohepatitis a fibrosis avanzada resulta de dos factores, el primero (principalmente resistencia a la insulina) que da lugar a la acumulación de grasa dentro de los hepatocitos, y el segundo (principalmente especies reactivas de oxígeno) que da lugar a la peroxidación de lípidos, la
- 30 producción de citocinas y la inducción de ligando Fas. El estrés oxidativo y la peroxidación lipídica son factores clave en el desarrollo y progresión de la esteatosis a estadios más avanzados del daño hepático (Angulo P. et al. *J. Gastroent. Hepat.* **2002**; 17:S186-190).

- El estrés oxidativo aumentado en la grasa acumulada es un importante mecanismo patogénico de los trastornos hepáticos y el síndrome metabólico en general (Furukawa S et al, *J Clin Invest* **2004**;114:1752-1761). El desequilibrio de las relaciones de PUFA, en combinación con un estrés oxidativo aumentado característico de los trastornos hepáticos, da lugar a niveles elevados de compuestos carbonílicos reactivos tales como MDA, HNE y HHE (Poli G. *British Med. Bull.* **1993**;49:604-620). Se sabe que están implicados en numerosas rutas perjudiciales, incluyendo, pero
- 40 no limitado a, componentes celulares irreversiblemente dañinos, activación de la apoptosis, etc.

El estrés oxidativo está implicado en la patogenia de NAFLD. La medición de los parámetros relacionados con el estrés

oxidativo hepático y plasmático sugiere que el contenido de carbonilo de la proteína hepática aumenta más de 4 veces en pacientes con esteatosis, mientras que el contenido de glutatión, la actividad de la SOD y la capacidad reductora férrica del plasma (FRAP) disminuyen sustancialmente. Se encontró que el estrés oxidativo se desarrolla en el hígado de pacientes con NAFLD con esteatosis y se exacerba aún más en pacientes con esteatohepatitis. A la oxidación sustancial de las proteínas le sigue la proteólisis de las proteínas modificadas, lo que puede explicar la coexistencia de una capacidad antioxidante disminuida y oxidación de proteínas en el hígado de pacientes con esteatohepatitis (Videla LA et al, *Clinical Sci* **2004**;106:261-268).

Los pacientes con hepatitis crónica, ictericia obstructiva, colelitiasis y afecciones relacionadas también tienen niveles elevados de peróxidos de lípidos hepáticos, mientras que se encontró que los niveles plasmáticos de lípidos oxidados no eran diferentes entre los grupos de pacientes y de control (Tsai LY et al, *Clinica Chimica Acta* **1993**;215:41-50).

Las enfermedades del tracto biliar también se caracterizan por un mayor estrés oxidativo y peroxidación de lípidos (Feher J et al, *Scandinavian J Gastroenter.* **1998**;228:38-46).

Algunos aspectos de esta invención surgen de: (1) una comprensión de que aunque los PUFA esenciales son vitales para el funcionamiento adecuado de las membranas lipídicas y, en particular, de las membranas mitocondriales, su inconveniente inherente, es decir, la propensión a oxidarse por ROS con resultado perjudicial, está implicado en trastornos hepáticos tales como esteatosis hepática alcohólica, esteatosis hepática no alcohólica, esteatohepatitis, cirrosis, carcinoma hepatocelular, ictericia obstructiva, colelitiasis y enfermedades del tracto biliar; (2) los antioxidantes no pueden prevenir la peroxidación de PUFA debido a la naturaleza estocástica del proceso y la estabilidad de los productos de peroxidación de PUFA (carbonilos reactivos) al tratamiento antioxidante y (3) el daño dirigido por ROS de los sitios propensos a la oxidación dentro de los PUFA puede superarse usando un enfoque que los hace menos susceptibles a tales oxidaciones, sin comprometer ninguna de sus propiedades físicas beneficiosas. Algunos aspectos de esta invención describen el uso del efecto isotópico para lograr esto, solo en los sitios de PUFA esenciales y precursores de PUFA que son más importantes para la oxidación, mientras que otros aspectos contemplan otros sitios además de los que más importan para la oxidación.

Las realizaciones marcadas isotópicamente deberían tener efectos mínimos o inexistentes sobre procesos biológicos importantes. Por ejemplo, la abundancia natural de isótopos presentes en los sustratos biológicos implica que niveles bajos de compuestos marcados isotópicamente deberían tener efectos insignificantes en los procesos biológicos. Adicionalmente, los átomos de hidrógeno se incorporan a sustratos biológicos del agua, y se sabe que el consumo de D₂O, o agua pesada, no representa una amenaza para la salud de los seres humanos. Véase, por ejemplo, "Physiological effect of heavy water". *Elements and isotopes: formation, transformation, distribution*. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. (2003) pp. 111-112 (que indica que una persona de 70 kg podría beber 4,8 litros de agua pesada sin consecuencias graves). Por otra parte, muchos compuestos marcados isotópicamente están aprobados por la Food & Drug Administration de EE.UU. con fines de diagnóstico y tratamiento.

Los expertos en la materia apreciarán que puede lograrse el mismo efecto protegiendo las posiciones propensas a la oxidación dentro de los PUFA utilizando otros enfoques químicos. Ciertos miméticos de PUFA, aunque poseen similitud estructural con los PUFA naturales, serán no obstante estables a la oxidación dirigida por ROS debido al refuerzo estructural.

Lipidemias y riesgos cardíacos relacionados

El estrés oxidativo se produce por un desequilibrio entre la producción de ROS y los mecanismos de defensa antioxidantes endógenos. Curiosamente, el estrés oxidativo y el metabolismo lipídico anormal juegan un papel importante en la patogénesis de muchas lipidemias y trastornos cardíacos.

Las lipidemias (lipemias; hiperlipidemias; hipolipidemias) son afecciones que se manifiestan por niveles anormales de lipoproteínas plasmáticas y colesterol, provocadas por factores primarios (genéticos, tales como la enfermedad de Tángier y del ojo de pez) o secundarios (tales como el tabaquismo). Los niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL) o hipoalfalipoproteinemia (HA), incluyen una diversidad de afecciones en las cuales se reducen las concentraciones de lipoproteínas o HDL. De hecho, las directrices de la American Heart Association para los niveles de colesterol HDL en ayunas y el riesgo de enfermedad cardíaca indican que los hombres con menos de 40 mg/dl (menos de 50 mg/dl para las mujeres) de HDL tienen un mayor riesgo de enfermedad cardíaca, mientras que 40-59 mg/dl se considera un nivel medio de HDL y más de 60 mg/dl de HDL se considera un nivel de colesterol HDL alto y óptimo para la protección contra enfermedades cardíacas. Adicionalmente, la American Heart Association recomienda un colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad) de menos de 100 mg/dl como óptimo, 100-129 mg/dl como cerca o por encima del óptimo, 130-159 mg/dl como límite alto, 160-189 mg/dl como alto y 190 mg/dl y por encima como muy alto. En general, se acepta que reducir el nivel de colesterol LDL también reduce el riesgo de ataque cardíaco y accidente cerebrovascular.

Se piensa que un nivel bajo de colesterol HDL acelera el desarrollo de la aterosclerosis debido a la alteración del transporte inverso del colesterol y la ausencia de otros efectos protectores del HDL, tales como la oxidación disminuida de otras lipoproteínas. En consecuencia, las lipidemias se asocian a un estrés oxidativo elevado y a un nivel elevado

de productos de peroxidación lipídica (Yang RL et al, J Clin Biochem Nutr 2008; 43:154-158) que activan numerosas rutas perjudiciales (Spiteller G. Exp. Gerontol. 2001;136:1425-1457).

Otros trastornos de la liporegulación incluyen lipodistrofias generalizadas, mutaciones de leptina y genes receptores de leptina y obesidad inducida por la dieta. La lipotoxicidad de las células pancreáticas, el miocardio y el músculo esquelético dan lugar, respectivamente, a la diabetes tipo 2, cardiomiopatía y resistencia a la insulina. En los seres humanos, estas anomalías se denominan comúnmente síndrome metabólico. Los productos de carbonilo reactivos de la peroxidación lipídica pueden afectar a las dianas vulnerables de manera diferente. Por ejemplo, se demostró que la lipotoxicidad en las células pancreáticas está modulada principalmente por conjugados de un producto de peroxidación omega-3, HHE (Furakawa F et al, Pancreas 2001;22:1900-1905). Cuando los lípidos se acumulan en exceso en los tejidos no adiposos durante la sobremutrición, los ácidos grasos entran en rutas perjudiciales tales como la producción de carbonilo reactivo, que provoca la apoptosis de células cargadas de lípidos tales como los cardiomiocitos. Actualmente existe evidencia sustancial de que las complicaciones de la obesidad humana pueden reflejar lipotoxicidad (Unger RH Ann Rev Med 2002;53:319-336).

La insuficiencia cardíaca crónica (CHF) provoca una morbilidad y mortalidad sustanciales a pesar de los importantes avances terapéuticos, tal como el uso de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y β -bloqueantes. Las principales causas de CHF en la actualidad son la cardiopatía isquémica (IHD) y la hipertensión. Un proceso fundamental en la progresión a CHF (especialmente en pacientes con infarto de miocardio [MI] previo) es una serie de alteraciones en la estructura y función cardíacas conocidas como remodelado cardíaco, que implica cambios significativos en la expresión génica y la función de las proteínas, tanto en la matriz extracelular como en los cardiomiocitos. El estrés oxidativo se ha relacionado desde hace mucho tiempo con la CHF clínica y experimental. De hecho, la peroxidación lipídica juega un papel importante en la patogénesis del daño isquémico y en la conversión del daño reversible en daño irreversible a través de la destrucción de la membrana de los cardiomiocitos provocada por la tríada lipídica (Meerson FZ et al Basic Res Cardiol 1982;77:465-485). Apoyando aún más el papel de la peroxidación lipídica, los marcadores de estrés oxidativo están elevados en los pacientes con CHF y se han correlacionado con la disfunción miocárdica y la gravedad general de la insuficiencia cardíaca. Los mecanismos a través de los cuales el estrés oxidativo miocárdico podría afectar la función cardíaca incluyen, pero no se limitan a, daño oxidativo a las proteínas y membranas celulares, de este modo, induciendo disfunción celular o muerte por apoptosis y necrosis (Grieve DJ et al, Eur. Heart J. 2003;24:2161-2163).

Por otra parte, la cardiopatía isquémica se caracteriza por niveles aumentados de productos de peroxidación de PUFA, tales como MDA en plasma (Bevan RJ et al Free Rad Biol Med 2003;35:517-527). Aparte de la generación de productos tóxicos de peroxidación lipídica que contienen carbonilo reactivo incluyendo, pero no limitado a, MDA, acroleína, HNE y HHE, el daño de lípidos iniciado por ROS también da lugar a la isomerización trans de algunos dobles enlaces cis en PUFA. Este proceso también se inicia por un ataque ROS en sitios bis-alílicos, en particular, pero no limitado a, radicales tiilo basados en azufre. Los compuestos resultantes tienen un efecto perjudicial sobre las propiedades de la membrana, cambiando la fluidez de la membrana y haciéndola con fugas e inestables (Chatgililoglu C et al Acc Chem Res. 2005;38:441-448). En la cardiopatía isquémica aguda este mecanismo puede desempeñar un papel importante debido a la formación de peróxido de hidrógeno, dando lugar a la peroxidación de lípidos y la oxidación del grupo sulfhidrilo que generan defectos de la membrana y dan como resultado una sobrecarga de calcio intracelular y disfunción contráctil cardíaca en el miocardio aturdido (Dhalla NS et al Can J Cardiol 1999; 15:587-593).

La fibrilación auricular, una irregularidad en los latidos del corazón, está relacionada con el estrés oxidativo y el agrandamiento de la aurícula izquierda del corazón. Tal agrandamiento da lugar a la fibrilación auricular. La hipertrofia ventricular izquierda (LVH) es una fase común de daño cardíaco que da lugar a insuficiencia, principalmente debido a la pérdida de mitocondrias a través del daño oxidativo de la lesión por reperfusión, envejecimiento, etc. Las ROS juegan un papel importante en la génesis y progresión de la enfermedad de las arterias coronarias (CAD) con la consiguiente isquemia y necrosis del miocardio, una de las principales causas de insuficiencia cardíaca en todo el mundo. La peroxidación lipídica aumenta en CAD, como lo muestran las mediciones de MDA en los niveles plasmáticos libres y totales de MDA. Por otra parte, los valores de MDA libre pueden ayudar a discriminar entre angina estable inestable y crónica (Cavalca V et al, Clin Chem 2001; 47:887-892).

Se cree que la actividad de ROS en la pared del vaso contribuye a la formación de LDL oxidadas, un contribuyente importante a la patogénesis de la aterosclerosis. De hecho, se sugirió que la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDF) ricas en PUFA es un factor de riesgo importante para la aterosclerosis y la hipertensión asociada a la aterosclerosis. El HNE y otros productos de carbonilo reactivos de la oxidación de FDF provocan daño oxidativo adicional y están implicados en muchas rutas posteriores que incluyen, pero no limitado a, modular la expresión de genes antioxidantes (Siow RC et al Redox Rep 2007; 12:11-15) y aumentar la formación de células espumosas de macrófagos (Yun MR et al Free Rad Biol Med 2008; 45:177-183). Por otra parte, la angiotensina II (Ang-II) está implicada en la oxidación de PUFA, potenciando la peroxidación lipídica de los macrófagos tanto *in vivo* como *in vitro* (Keidar S. Life Sci. 1998; 63:1-11). A pesar de la importancia del estrés oxidativo en la etiología de la aterosclerosis, el éxito de las terapias antioxidantes destinadas a reducir la peroxidación de lípidos ha sido limitado hasta ahora (Stocker R et al Physiol Rev 2004; 84:1381-1478).

La hipertrofia cardíaca puede ser compensatoria y adaptativa o un precursor desadaptativo de la insuficiencia cardíaca.

Cada vez hay más evidencia que implica la señalización de ROS en la génesis de la hipertrofia cardíaca. La lipotoxicidad miocárdica se refiere a la acumulación de lípidos intramiocárdicos concomitante con disfunción contráctil, a menudo asociada a la muerte de miocitos. Recientemente se demostró que la acumulación de lípidos y la peroxidación es una característica significativa de la insuficiencia cardíaca clínica (Unger RH *Ann Rev Med* 2002; 53:319-336). La acumulación de lípidos se produce cuando hay un desequilibrio entre la captación de lípidos y la β -oxidación, una circunstancia que puede producirse a través de una diversidad de mecanismos. La acumulación de lípidos induce un aumento de PPAR α , un receptor nuclear que altera la expresión génica en respuesta a los lípidos. PPAR α aumenta la oxidación de ácidos grasos y el aumento de la expresión de PPAR α se ha asociado al desarrollo de disfunción cardíaca, incluyendo miocardiopatía diabética. Aunque el mecanismo por el cual esto se produce sigue sin estar claro, la β -oxidación de ácidos grasos genera ROS y productos de peroxidación de lípidos carbonílicos. Los datos sugieren que los productos de peroxidación de los lípidos de carbonilo y las ROS desempeñan un papel en la patogénesis de las miocardiopatías y la lipotoxicidad asociadas a PPAR α (Giordano FJ, *J Clin Invest* 2005; 115:500-508).

Algunos aspectos de esta invención surgen de: (1) una comprensión de que aunque los PUFA esenciales son vitales para el funcionamiento adecuado de las membranas lipídicas y, en particular, de las membranas mitocondriales, su inconveniente inherente, es decir, la propensión a oxidarse por ROS con resultado perjudicial, está implicada en lipidemias y riesgos relacionados con el corazón; (2) los antioxidantes no pueden prevenir la peroxidación de PUFA debido a la naturaleza estocástica del proceso y la estabilidad de los productos de peroxidación de PUFA (carbonilos reactivos) al tratamiento antioxidante y (3) el daño dirigido por ROS de los sitios propensos a la oxidación dentro de los PUFA puede superarse usando un enfoque que los hace menos susceptibles a tales oxidaciones, sin comprometer ninguna de sus propiedades físicas beneficiosas. Algunos aspectos de esta invención describen el uso del efecto isotópico para lograr esto, solo en los sitios de PUFA esenciales y precursores de PUFA que son más importantes para la oxidación, mientras que otros aspectos contemplan otros sitios además de los que más importan para la oxidación.

Las realizaciones marcadas isotópicamente deberían tener efectos mínimos o inexistentes sobre procesos biológicos importantes. Por ejemplo, la abundancia natural de isótopos presentes en los sustratos biológicos implica que niveles bajos de compuestos marcados isotópicamente deberían tener efectos insignificantes en los procesos biológicos. Adicionalmente, los átomos de hidrógeno se incorporan a sustratos biológicos del agua, y se sabe que el consumo de D₂O, o agua pesada, no representa una amenaza para la salud de los seres humanos. Véase, por ejemplo, "Physiological effect of heavy water". *Elements and isotopes: formation, transformation, distribution*. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. (2003) pp. 111-112 (que indica que una persona de 70 kg podría beber 4,8 litros de agua pesada sin consecuencias graves). Por otra parte, muchos compuestos marcados isotópicamente están aprobados por la Food & Drug Administration de EE.UU. con fines de diagnóstico y tratamiento.

Los expertos en la materia apreciarán que puede lograrse el mismo efecto protegiendo las posiciones propensas a la oxidación dentro de los PUFA utilizando otros enfoques químicos. Ciertos miméticos de PUFA, aunque poseen similitud estructural con los PUFA naturales, serán no obstante estables a la oxidación dirigida por ROS debido al refuerzo estructural.

Composiciones:

De acuerdo con la presente divulgación, un ácido graso poliinsaturado isotópicamente modificado o un mimético se refiere a un compuesto que tiene una similitud estructural con un PUFA de origen natural que se estabiliza químicamente o por refuerzo con uno o más isótopos, por ejemplo ¹³C y/o deuterio. Generalmente, si se usa deuterio para el refuerzo, pueden reforzarse uno o ambos hidrógenos en un grupo metileno.

Algunos aspectos de esta invención proporcionan compuestos que son análogos de PUFA esenciales con una, varias o todas las posiciones bis-alílicas sustituidas con isótopos pesados. En algunas realizaciones, los grupos CH₂, que se convertirán en la posición bis-alílica en un PUFA tras la conversión enzimática, se sustituyen con uno o dos isótopos pesados. Dichos compuestos son útiles para la prevención o el tratamiento de enfermedades en las cuales la oxidación de PUFA es un factor o puede contribuir a la progresión de la enfermedad.

La posición bis-alílica generalmente se refiere a la posición del ácido graso poliinsaturado o mimético del mismo que corresponde a los grupos metileno de los sistemas 1,4-dieno. La posición pro-bis-alílica se refiere al grupo metileno que se convierte en la posición bis-alílica tras la desaturación enzimática.

En algunas realizaciones, la identidad química de los PUFA, es decir, la estructura química sin tener en cuenta las sustituciones de isótopos o las sustituciones que imitan las sustituciones de isótopos, permanece igual tras la ingestión. Por ejemplo, la identidad química de los PUFA esenciales, esto es, los PUFA que los mamíferos tales como los humanos generalmente no sintetizan, puede permanecer idéntica tras la ingestión. En algunos casos, sin embargo, los PUFA pueden además extenderse/desaturarse en mamíferos, cambiando de esta manera su identidad química tras la ingestión. De forma similar con los miméticos, la identidad química puede permanecer sin cambios o puede estar sujeta a una extensión/desaturación similar. En algunas realizaciones, los PUFA que están extendidos y opcionalmente desaturados, tras la ingestión y el metabolismo adicional pueden denominarse homólogos superiores.

En la presente divulgación, el nivel de abundancia de origen natural se refiere al nivel de isótopos, por ejemplo ^{13}C y/o deuterio que pueden incorporarse a los PUFA que serían relativos a la abundancia natural del isótopo en la naturaleza. Por ejemplo, ^{13}C tiene una abundancia natural de aproximadamente el 1 % de átomos de ^{13}C en átomos de carbono

5 totales. Por lo tanto, el porcentaje relativo de carbono que tiene una abundancia mayor que la natural de ^{13}C en los PUFA puede tener un nivel de abundancia superior al natural de aproximadamente el 1 % de sus átomos de carbono

10 En la presente divulgación, el porcentaje de átomos de carbono totales reforzados con ^{13}C es al menos el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 100 % de ^{13}C con respecto a uno o más átomos de carbono en cada molécula de PUFA.

Respecto al hidrógeno, en algunas realizaciones, el deuterio tiene una abundancia natural de aproximadamente el

15 0,0156 % de todo el hidrógeno natural en los océanos de la Tierra. Por lo tanto, un PUFA que tiene más que la abundancia natural de deuterio puede tener más que este nivel o más que el nivel de abundancia natural de aproximadamente el 0,0156 % de sus átomos de hidrógeno reforzados con deuterio, tal como el 0,02 %, pero preferentemente de aproximadamente el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 65 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 100 % de deuterio con

20 respecto a uno o más átomos de carbono en cada molécula de PUFA. En otras realizaciones, el porcentaje de átomos de hidrógeno totales reforzados con deuterio es al menos el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 65 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 100 %.

En algunos aspectos, una composición de PUFA contiene tanto PUFA modificados isotópicamente como PUFA no

25 modificados isotópicamente. La pureza isotópica es una comparación entre a) el número relativo de moléculas de PUFA modificados isotópicamente y b) las moléculas totales tanto de PUFA modificados isotópicamente como de PUFA sin átomos pesados. En algunas realizaciones, la pureza isotópica se refiere a los PUFA que por lo demás son iguales excepto por los átomos pesados.

En algunas realizaciones, la pureza isotópica se refiere al porcentaje de moléculas de unos PUFA modificados isotópicamente en la composición en relación con el número total de moléculas de los PUFA modificados isotópicamente más los PUFA sin átomos pesados. Por ejemplo, la pureza isotópica puede ser aproximadamente el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 65 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 100 % de las moléculas de PUFA modificados isotópicamente en

35 relación con el número total de moléculas tanto de PUFA modificados isotópicamente como de PUFA sin átomos pesados. En otras realizaciones, la pureza isotópica es al menos el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 65 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 100 %. En algunas realizaciones, la pureza isotópica de los PUFA puede ser de aproximadamente el 10 %-100 %, el 10 %-95 %, el 10 %-90 %, el 10 %-85 %, el 10 %-80 %, el 10 %-75 %, el 10 %-70 %, el 10 %-65 %, el 10 %-60 %, el 10 %-55 %, el 10 %-50 %, el 10 %-45 %, el 10 %-40 %, el 10 %-35 %, el 10 %-30 %, el 10 %-25 % o el 10 %-20 % del número total de moléculas de los PUFA en la composición. En otras realizaciones, la pureza isotópica de los PUFA puede ser de aproximadamente el 15 %-100 %, el 15 %-95 %, el 15 %-90 %, el 15 %-85 %, el 15 %-80 %, el 15 %-75 %, el 15 %-70 %, el 15 %-65 %, el 15 %-60 %, el 15 %-55 %, el 15 %-50 %, el 15 %-45 %, el 15 %-40 %, el 15 %-35 %, el 15 %-30 %, el 15 %-25 % o el 15 %-20 % del número total de moléculas de los PUFA en la composición. En

45 algunas realizaciones, la pureza isotópica de los PUFA puede ser de aproximadamente el 20 %-100 %, el 20 %-95 %, el 20 %-90 %, el 20 %-85 %, el 20 %-80 %, el 20 %-75 %, el 20 %-70 %, el 20 %-65 %, el 20 %-60 %, el 20 %-55 %, el 20 %-50 %, el 20 %-45 %, el 20 %-40 %, el 20 %-35 %, el 20 %-30 % o el 20 %-25 % del número total de moléculas de los PUFA en la composición. Dos moléculas de un PUFA modificado isotópicamente de un total de 100 moléculas de PUFA modificados isotópicamente más los PUFA sin átomos pesados tendrán un 2 % de pureza isotópica,

50 independientemente del número de átomos pesados que contengan las dos moléculas modificadas isotópicamente.

En algunos aspectos, una molécula de PUFA isotópicamente modificada puede contener un átomo de deuterio, tal como cuando uno de los dos hidrógenos en un grupo metileno se reemplaza por deuterio y por lo tanto puede denominarse PUFA "D1". De manera similar, una molécula de PUFA isotópicamente modificada puede contener dos

55 átomos de deuterio, tal como cuando los dos hidrógenos en un grupo metileno se reemplazan ambos por deuterio y por lo tanto puede denominarse PUFA "D2". De manera similar, una molécula de PUFA isotópicamente modificada puede contener tres átomos de deuterio y puede denominarse PUFA "D3". De manera similar, una molécula de PUFA isotópicamente modificada puede contener cuatro átomos de deuterio y puede denominarse PUFA "D4". En algunas realizaciones, una molécula de PUFA isotópicamente modificada puede contener cinco átomos de deuterio o seis

60 átomos de deuterio y puede denominarse PUFA "D5" o "D6", respectivamente.

El número de átomos pesados en una molécula, o la carga isotópica, puede variar. Por ejemplo, una molécula con una carga isotópica relativamente baja puede contener aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de deuterio. Una molécula con una carga isotópica moderada puede contener aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19

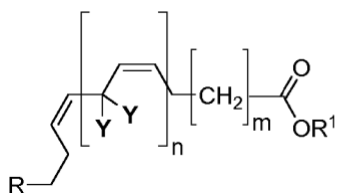
65 o 20 átomos de deuterio. En una molécula con una carga muy alta, todo hidrógeno puede estar reemplazado por un deuterio. Por lo tanto, la carga isotópica se refiere al porcentaje de átomos pesados en cada molécula de PUFA. Por

ejemplo, la carga isotópica puede ser aproximadamente el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 65 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 100 % del número del mismo tipo de átomos en comparación con un PUFA sin átomos pesados del mismo tipo (por ejemplo, el hidrógeno sería del "mismo tipo" que el deuterio). En algunas realizaciones, la carga isotópica es al menos el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 65 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 100 %. Se espera que los efectos secundarios no deseados se reduzcan cuando hay una alta pureza isotópica en una composición de PUFA pero una baja carga isotópica en una molécula dada. Por ejemplo, las rutas metabólicas probablemente se verán menos afectadas por el uso de una composición de PUFA con alta pureza isotópica pero baja carga isotópica.

Uno apreciará fácilmente que cuando uno de los dos hidrógenos de un grupo metileno se reemplaza con un átomo de deuterio, el compuesto resultante puede poseer un estereocentro. En algunas realizaciones, puede ser deseable usar compuestos racémicos. En otras realizaciones, puede ser deseable usar compuestos enantioméricamente puros. En algunas realizaciones, puede ser deseable usar mezclas de compuestos que tengan excesos enantioméricos y/o excesos diastereoméricos de aproximadamente el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 65 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 100 %. En otras realizaciones, los excesos enantioméricos y/o diastereoméricos son al menos el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 65 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 100 %. En algunas realizaciones, puede ser preferible utilizar enantiómeros y/o diastereómeros estereoquímicamente puros de las realizaciones tal como cuando el contacto con moléculas quirales se dirige para atenuar el daño oxidativo. Sin embargo, en muchas circunstancias, las moléculas no quirales se dirigen para atenuar el daño oxidativo. En tales circunstancias, pueden utilizarse realizaciones sin preocuparse por su pureza estereoquímica. Por otra parte, en algunas realizaciones, pueden usarse mezclas de enantiómeros y diastereómeros incluso cuando los compuestos se dirigen a moléculas quirales para atenuar el daño oxidativo.

En algunos aspectos, los PUFA modificados isotópicamente imparten una cantidad de átomos pesados en un tejido particular. Por lo tanto, en algunos aspectos, la cantidad de moléculas pesadas será un porcentaje particular del mismo tipo de moléculas en un tejido. Por ejemplo, el número de moléculas pesadas puede ser aproximadamente el 1 %-100 % de la cantidad total del mismo tipo de moléculas. En algunos aspectos, el 10-50 % de las moléculas se sustituyen por el mismo tipo de moléculas pesadas.

En algunas realizaciones, un compuesto con la misma estructura de enlace químico que un PUFA esencial pero con una composición isotópica diferente en posiciones particulares tendrá propiedades químicas significativa y útilmente diferentes del compuesto sin sustituir. Las posiciones particulares con respecto a la oxidación, incluida la oxidación por ROS, comprenden posiciones bis-alílicas de ácidos grasos poliinsaturados esenciales y sus derivados, como se muestra en la **Figura 1**. Los PUFA esenciales reforzados isotópicamente en las posiciones bis-alílicas que se muestran a continuación serán más estables a la oxidación. Por consiguiente, algunos aspectos de la invención proporcionan métodos particulares de uso de compuestos de Fórmula (1) o sales de los mismos, mientras que los sitios pueden reforzarse aún más con carbono 13. R^1 = alquilo, H o catión; $m = 1-10$; $n = 1-5$, en donde en cada posición bis-alílica, uno o ambos átomos de Y son átomos de deuterio, por ejemplo,

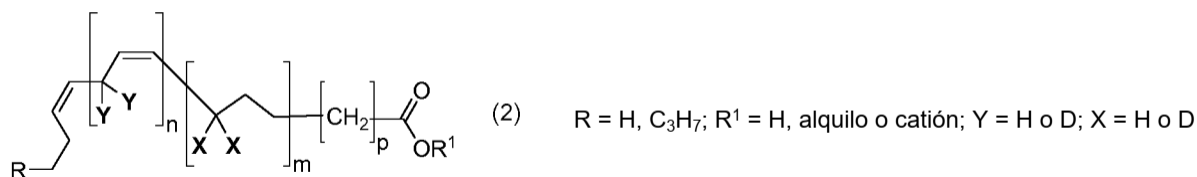


(1)

 $R = H, C_3H_7$; $R^1 = H$, alquilo o catión; $Y = H$ o D

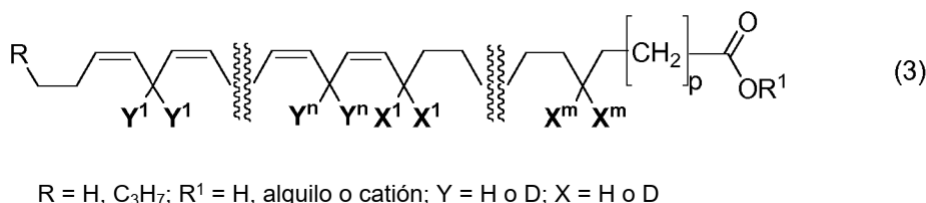
ácido 11,11-dideutero-cis,cis-9,12-octadecadienoico (ácido 11,11-dideutero-(9Z,12Z)-9,12-octadecadienoico; D2-LA); y ácido 11,11,14,14-tetradeutero-cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoico (ácido 11,11,14,14-tetradeutero-(9Z,12Z,15Z)-9,12,15-octadecatrienoico; D4-ALA). De acuerdo con la presente divulgación, dichas posiciones, además de la deuteración, pueden reforzarse aún más con carbono 13, cada una en niveles de abundancia de isótopos por encima del nivel de abundancia natural. Todos los demás enlaces carbono-hidrógeno en la molécula de PUFA pueden contener opcionalmente deuterio y/o carbono 13 en, o por encima, del nivel de abundancia natural.

Los PUFA esenciales se convierten bioquímicamente en homólogos superiores por desaturación y alargamiento. Por lo tanto, algunos sitios que no son bis-alílicos en los PUFA precursores se volverán bis-alílicos tras la transformación bioquímica. Tales sitios se vuelven sensibles a la oxidación, incluida la oxidación por ROS. En una realización adicional, tales sitios pro-bis-alílicos, además de los sitios bis-alílicos existentes, se refuerzan mediante sustitución de isótopos como se muestra a continuación. Por consiguiente, este aspecto de la invención proporciona el uso de compuestos de Fórmula (2) o una sal de los mismos, en donde en cada posición bis-alílica y en cada posición pro-bis-alílica, uno o más de los átomos de X o Y pueden ser átomos de deuterio. R_1 = alquilo, catión o H; $m = 1-10$; $n = 1-5$; $p = 1-10$.



Dichas posiciones, además de la deuteración, pueden reforzarse aún más con carbono 13, cada una en niveles de abundancia de isótopos por encima del nivel de abundancia natural. Todos los demás enlaces carbono-hidrógeno en la molécula de PUFA pueden opcionalmente deuterio y/o carbono 13 en, o por encima, del nivel de abundancia natural.

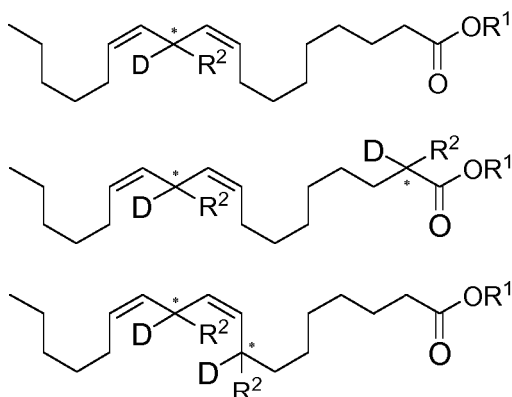
La oxidación de PUFA en diferentes sitios bis-alílicos da lugar a diferentes conjuntos de productos de oxidación. Por ejemplo, 4-HNE se forma a partir de n-6 PUFA, mientras que el 4-HNE se forma a partir de n-3 PUFA (Negre-Salvayre A, et al. *Brit. J. Pharmacol.* **2008**; 153:6-20). Los productos de dicha oxidación poseen diferentes propiedades reguladoras, tóxicas, de señalización, etc. Por lo tanto, es deseable controlar la extensión relativa de tales oxidaciones. Por consiguiente, algunos aspectos de la invención prevén el uso de compuestos de fórmula (3), o una sal de los mismos, reforzados diferencialmente con isótopos estables pesados en posiciones bis-alílicas o pro-bis-alílicas seleccionadas, para controlar el rendimiento relativo de oxidación en diferentes sitios, como se muestra a continuación, de modo que cualquiera de Y^1-Y^n y/o X^1-X^m en las posiciones bis-alílica o pro-bis-alílica de los PUFA pueden contener átomos de deuterio. R1 = alquilo, catión o H; m = 1-10; n = 1-6; p = 1-10

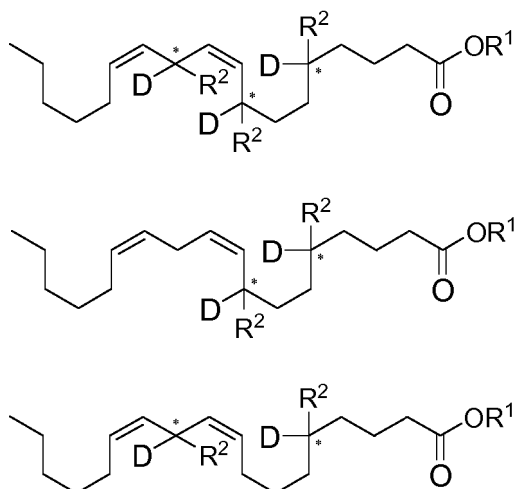


Dichas posiciones, además de la deuteración, pueden reforzarse aún más con carbono 13. Todos los demás enlaces carbono-hidrógeno de la molécula de PUFA pueden contener deuterio en el nivel de abundancia natural o por encima del mismo. Se apreciará que las líneas de rotura en la estructura mostrada anteriormente representan un PUFA con un número variable de dobles enlaces, un número variable de carbonos totales y una combinación variable de sitios bis-alílicos y pro-bis-alílicos reforzados con isótopos.

Las estructuras exactas de los compuestos ilustrados anteriormente se muestran a continuación que proporcionan ácidos grasos poliinsaturados esenciales n-3 (omega-3) y n-6 (omega-6) reforzados con isótopos, y los PUFA fabricados a partir de ellos bioquímicamente por desaturación/elongación. Cualquiera de estos compuestos puede usarse para retardar la oxidación. En los siguientes compuestos, los PUFA se refuerzan isotópicamente en sitios sensibles a la oxidación y/o sitios que pueden volverse sensibles a la oxidación tras la desaturación/elongación bioquímica. R¹ puede ser H, alquilo o catión; R² puede ser H o D; * representa ¹²C o ¹³C.

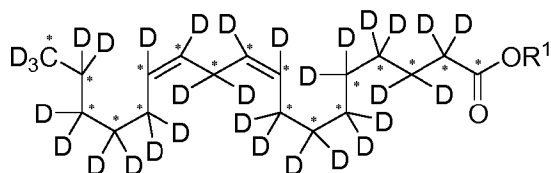
Los ácidos D-linoleicos incluyen:





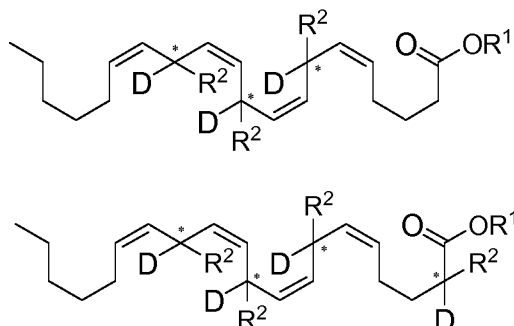
5

El ácido linoleico per-deuterado que se muestra a continuación puede producirse mediante métodos microbiológicos, por ejemplo mediante cultivo en medios que contienen deuterio y/o carbono 13.



10

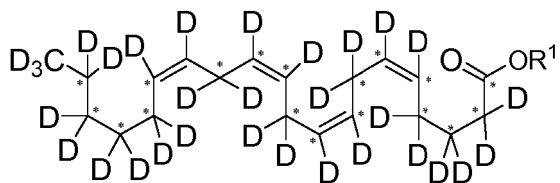
Los ácidos D-araquidónicos incluyen:



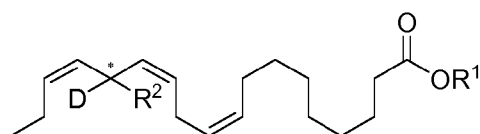
15

El ácido araquidónico per-deuterado que se muestra a continuación puede producirse mediante métodos microbiológicos, tales como cultivo en medios que contienen deuterio y/o carbono 13.

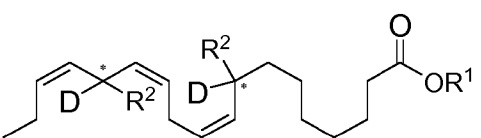
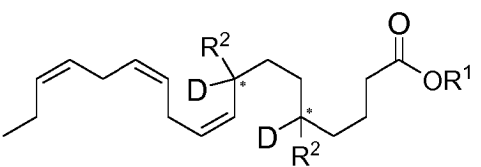
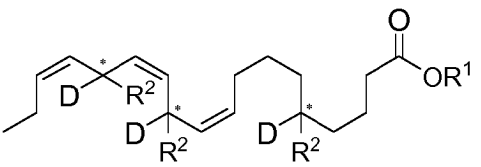
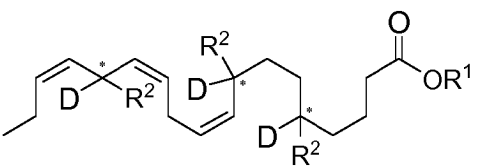
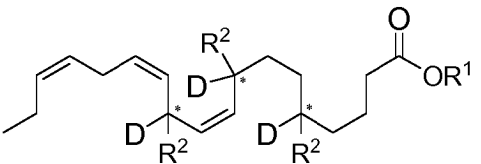
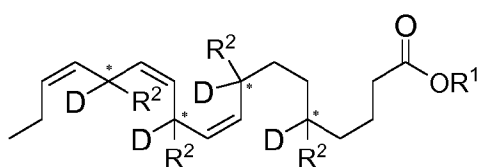
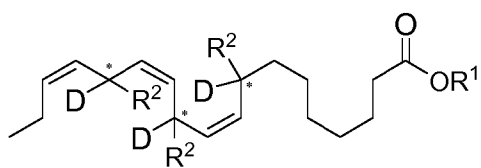
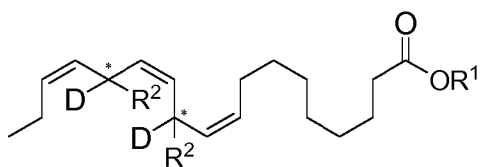
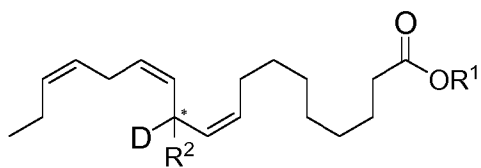
20

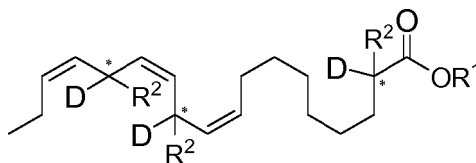


Los ácidos D-linolénicos incluyen:

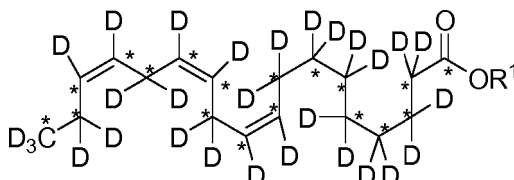


25





El ácido linolénico per-deuterado que se muestra a continuación puede producirse mediante métodos microbiológicos, como el cultivo en medios que contienen deuterio y/o carbono 13.



En algunos aspectos de la invención, se puede utilizar cualquier PUFA, esencial o no, que pueda ser absorbido por la dieta y usado en el cuerpo. En el caso de los PUFA o precursores esenciales o no esenciales, los materiales estabilizados suplementados pueden competir con otra absorción dietética y biofabricación para reducir las concentraciones disponibles de especies causantes de enfermedades.

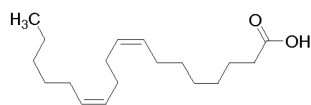
En algunos aspectos de la invención, los PUFA reforzados isotópicamente en posiciones sensibles a la oxidación como se describe por medio de las estructuras anteriores son isótopos pesados enriquecidos en dichas posiciones en comparación con la abundancia natural del isótopo apropiado, deuterio y/o carbono 13.

En algunas realizaciones, los compuestos desvelados están enriquecidos hasta un 99 % de pureza de isótopos o más. En algunas realizaciones, el enriquecimiento de isótopos pesados en dichas posiciones está entre 50 % y 99 % de deuterio y/o carbono 13.

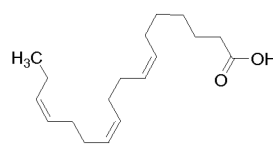
En algunas realizaciones, los ácidos grasos modificados, cuando se dosifican a través de la dieta como fármacos o suplementos, pueden dosificarse como profármacos, incluidos, entre otros, ésteres no tóxicos y farmacéuticamente adecuados del ácido graso o mimético original, tales como un éster etílico o éster glicerílico. Este éster ayuda a la tolerancia del fármaco en el intestino, ayuda a la digestión y se basa en los altos niveles de esterasas en los intestinos para desesterificar los profármacos de éster en la forma ácida activa del fármaco que se adsorbe. Por tanto, en algunas realizaciones, la invención abarca los ésteres profármacos de los ácidos grasos modificados del presente documento. Ejemplos de este tipo de medicamento en el mercado, la nutrición y la literatura de ensayos clínicos, incluido Lovaza de Glaxo (mezclas de ésteres de ácidos grasos omega 3, EPA, DHA y ácido alfa-linolénico), Omacor de Abbott (ácido graso omega-3 ésteres) y la mayoría de los suplementos de aceite de pescado (ésteres de DHA y EPA). En algunos aspectos, la incorporación de los profármacos de éster en tejidos o células se refiere a la incorporación del PUFA original modificado, ya que se utilizaría como constituyente corporal.

En algunas realizaciones, las composiciones estabilizadas imitan los ácidos grasos naturales sin cambiar su composición elemental. Por ejemplo, el sustituyente puede retener la capa de valencia química. Algunas realizaciones incluyen ácidos grasos naturales, miméticos y sus profármacos de éster, que se modifican químicamente para ser eficaces en la prevención de mecanismos específicos de enfermedades, pero se modifican de una manera (como la sustitución isotópica) que no cambia la composición elemental del material. Por ejemplo, el deuterio es una forma del mismo elemento hidrógeno. En algunos aspectos, estos compuestos mantienen la composición elemental y se estabilizan frente a la oxidación. Algunos compuestos que se estabilizan contra la oxidación se estabilizan en loci sensibles a la oxidación. Algunos compuestos se estabilizan contra la oxidación mediante la sustitución de isótopos pesados, Después en enlaces de hidrógeno de carbono bis-alílico, etc.

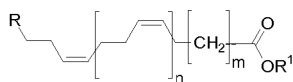
En una realización adicional, los sitios bis-alílicos propensos a la oxidación de los PUFA se pueden proteger contra la abstracción de hidrógeno separando aún más los dobles enlaces que activan el hidrógeno bis-alílico, eliminando así las posiciones bis-alílicas mientras se retiene cierta fluidez de los PUFA como se muestra a continuación. Estos miméticos de PUFA no tienen posiciones bis-alílicas.



Ácido octadeca-8,12-dienoico

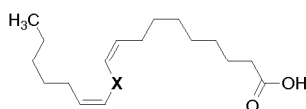


Ácido octadeca-7,11,14-trienoico

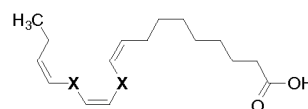


R = H, C₃H₇; R¹ = H; alquilo; n = 1-4; m = 1-12

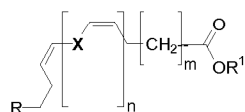
5 En una realización adicional, los sitios bis-alílicos propensos a la oxidación de los PUFA pueden protegerse contra la abstracción de hidrógeno usando heteroátomos con valencia II, eliminando así los hidrógenos bis-alílicos como se muestra a continuación. Estos miméticos de PUFA tampoco tienen hidrógenos bis-alílicos.



X = S: Ácido 10-hept-1-enilsulfanil-dec-9-enoico
X = O: Ácido 10-hept-1-eniloxi-dec-9-enoico

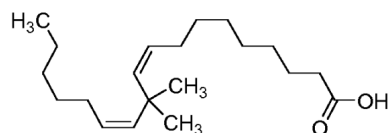


X = S: Ácido 10-(2-but-1-enilsulfanil-vinilsulfanil)-dec-9-enoico
X = O: Ácido 10-(2-but-1-eniloxi-viniloxi)-dec-9-enoico

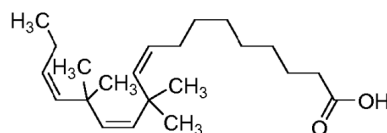


R = H, C₃H₇; R¹ = H; alquilo; X = O; S; n = 1-5; m = 1-12

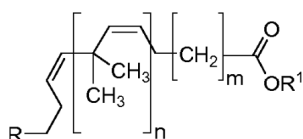
10 En una realización adicional, los miméticos de PUFA, es decir, compuestos estructuralmente similares a los PUFA naturales pero que no pueden oxidarse debido a las diferencias estructurales, pueden emplearse para los fines mencionados anteriormente. Los sitios bis-alílicos de PUFA propensos a la oxidación pueden protegerse contra la abstracción de hidrógeno mediante di-metilación o halogenación como se muestra a continuación. Los átomos de hidrógeno de los grupos metilo pueden ser opcionalmente halógenos, tales como flúor o deuterio. Estos miméticos de PUFA están dimetilados en sitios bis-alílicos.



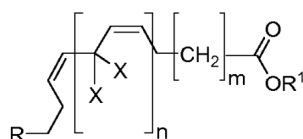
Ácido 11,11-dimetil-octadeca-9,12-dienoico



Ácido 11,11,14,14-tetametil-octadeca-9,12,15-trienoico

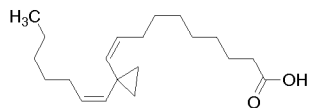


R = H, C₃H₇; R¹ = H; alquilo; n = 1-5; m = 1-12

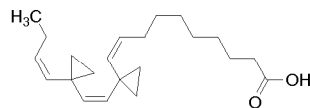


R = H, C₃H₇; R¹ = H; alquilo; n = 1-5; m = 1-12; X = F, Cl, Br o I

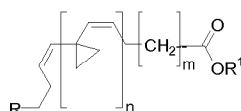
En una realización adicional, los sitios bis-alílicos de PUFA propensos a la oxidación pueden protegerse contra la abstracción de hidrógeno mediante alquilación como se muestra a continuación. Estos miméticos de PUFA se dialquilan en sitios bis-alílicos.



Ácido 10-(1-(hept-1-enil-ciclopropil)-dec-9-enoico

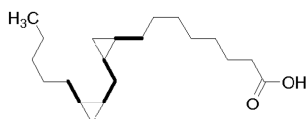


Ácido 10-{1-[2-(1-but-1-enil-ciclopropil)-vinil]-ciclopropil}-dec-9-enoico

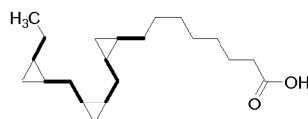


5 R = H, C₃H₇; R¹ = H; alquilo; n = 1-5; m = 1-12

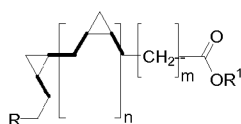
En una realización adicional, se pueden usar grupos ciclopropilo en lugar de dobles enlaces, dando así a los ácidos cierta fluidez mientras se eliminan los sitios bis-alílicos como se muestra a continuación. Estos miméticos de PUFA tienen grupos ciclopropilo en lugar de dobles enlaces.



Ácido 8-[2-(2-pentil-ciclopropilmetil)-ciclopropil]-octanoico

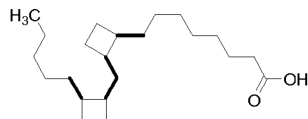


Ácido 8-[2-[2-(2-etil-ciclopropilmetil)-ciclopropilmetil]-ciclopropil]-octanoico

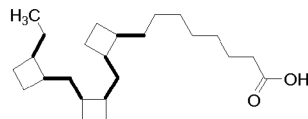


R = H, C₃H₇; R¹ = H; alquilo; n = 1-5; m = 1-12

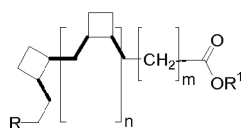
En una realización adicional, se pueden usar grupos ciclobutilo sustituidos en 1,2 en la conformación apropiada en lugar de dobles enlaces, dando así a los ácidos cierta fluidez mientras se eliminan los sitios bis-alílicos como se muestra a continuación. Estos miméticos de PUFA tienen grupos 1,2-ciclobutilo en lugar de dobles enlaces.



Ácido 8-[2-(2-pentil-ciclobutilmetil)-ciclobutil]-octanoico



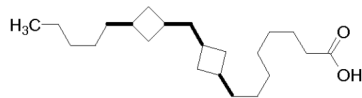
Ácido 8-[2-[2-(2-etil-ciclobutilmetil)-ciclobutilmetil]-ciclobutil]-octanoico



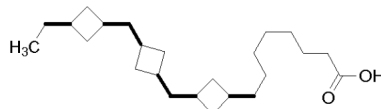
R = H, C₃H₇; R¹ = H; alquilo; n = 1-5; m = 1-12

En una modificación de la realización anterior de miméticos con grupos 1,2-ciclobutilo en lugar de dobles enlaces, se pueden usar grupos ciclobutilos 1,3-sustituidos en la conformación apropiada en lugar de dobles enlaces, dando así a los ácidos cierta fluidez mientras se eliminan los bis- sitios alílicos. Los siguientes miméticos de PUFA tienen grupos

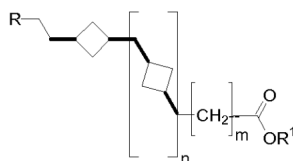
1,3-ciclobutilo en lugar de dobles enlaces.



Ácido 8-[3-(3-pentil-ciclobutilmetil)-ciclobutil]-octanoico



Ácido 8-[3-(3-(3-etil-ciclobutilmetil)-ciclobutilmetil)-ciclobutil]-octanoico



R = H, C₃H₇; R¹ = H; alquilo; n = 1-5; m = 1-12

- 5 Es un principio bien conocido en química médica que ciertos grupos funcionales son isostéricos y/o bioisostéricos con ciertos otros grupos funcionales. Los bioisómeros son sustituyentes o grupos con propiedades físicas o químicas similares que producen propiedades biológicas muy similares a las de un compuesto químico. Por ejemplo, isómeros y/o bioisómeros bien conocidos para hidrógeno incluyen halógenos tales como flúor; isómeros y/o bioisómeros de alquenos incluyen alquinos, anillos de fenilo, anillos de ciclopropilo, anillos de ciclobutilo, anillo de ciclopentilo, anillos de ciclohexilo, tioethers y similares; isómeros y/o bioisómeros de carbonilos incluyen sulfóxidos, sulfonas, tiocarbonilos y similares; isómeros y/o bioisómeros de ésteres incluyen amidas, ésteres del ácido sulfónico, sulfonamidas, ésteres del ácido sulfínico, sulfínamidas y similares. En consecuencia, los miméticos de PUFA también incluyen compuestos que tienen grupos funcionales isostéricos y/o bioisostéricos.
- 10
- 15 Se contempla que puede ser útil formular PUFA y/o miméticos de PUFA como profármaco para su uso en la invención. Un profármaco es una sustancia farmacológica que por sí misma puede tener actividad biológica, pero tras su administración, el profármaco se metaboliza en una forma que también ejerce actividad biológica. Se conocen muchos tipos diferentes de profármacos y se pueden clasificar en dos tipos principales en función de sus sitios celulares de metabolismo. Los profármacos de tipo I son aquellos que se metabolizan intracelularmente, mientras que los de tipo
- 20 II son aquellos que se metabolizan extracelularmente. Es bien sabido que los ácidos carboxílicos pueden convertirse en ésteres y varios otros grupos funcionales para mejorar la farmacocinética, tales como la absorción, distribución, metabolismo y excreción. Los ésteres son una forma profármaco bien conocida de ácidos carboxílicos formados por la condensación de un alcohol (o su equivalente químico) con un ácido carboxílico (o su equivalente químico). En algunas realizaciones, los alcoholes (o sus equivalentes químicos) para su incorporación en profármacos de PUFA
- 25 incluyen alcoholes o productos químicos farmacéuticamente aceptables que tras el metabolismo producen alcoholes farmacéuticamente aceptables. Tales alcoholes incluyen, pero sin limitación, propilenglicol, etanol, isopropanol, 2-(2-etoxietoxi)etanol (Transcutol®, Gattefosse, Westwood, N.J. 07675), alcohol bencílico, glicerol, polietilenglicol 200, polietilenglicol 300 o polietilenglicol 400; derivados del aceite de ricino de polioxietileno (por ejemplo, polioxietilengliceroltriricinoleato o aceite de ricino polioxil 35 (Cremophor®EL, BASF Corp.), oxiestearato de polioxietilenglicerol (Cremophor®RH 40 (aceite de ricino hidrogenado de polietilenglicol 40) o Cremophor®RH 60 (aceite de ricino hidrogenado de polietilenglicol 60), BASF Corp.)); glicéridos poliglicolizados saturados (por ejemplo, Gelucire® 35/10, Gelucire® 44/14, Gelucire® 46/07, Gelucire® 50/13 o Gelucire® 53/10, disponibles de Gattefosse, Westwood, N.J. 07675); éteres de alquilo de polioxietileno (por ejemplo, cetomacrogol 1000); estearatos de polioxietileno (por ejemplo, estearato de PEG-6, PEG-8 estearato, polioxil 40 estearato NF, polioxietil 50 estearato NF,
- 35 PEG-12 estearato, PEG-20 estearato, PEG-100 estearato, PEG-12 diestearato, PEG-32 diestearato o PEG-150 distearato); oleato de etilo, palmitato de isopropilo, miristato de isopropilo; dimetil isosorbida; N-metilpirrolidinona; parafin; colesterol; lecitina; bases de supositorio; ceras farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, cera de camauba, cera amarilla, cera blanca, cera microcristalina o cera emulsionante); fluidos de silicio farmacéuticamente aceptables; ésteres de ácidos grasos de sorbitán (incluido el laurato de sorbitán, oleato de sorbitán, palmitato de sorbitán o estearato de sorbitán); grasas saturadas farmacéuticamente aceptables o aceites saturados farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, aceite de ricino hidrogenado (gliceril-tris-12-hidroxiestearato), cera de ésteres cetílicos (una mezcla de ésteres saturados principalmente C14-C18 de ácidos grasos saturados C14-C18 que tienen un intervalo de fusión de aproximadamente 43 °-47 °C) o monoestearato de glicerilo).
- 40
- 45 En algunas realizaciones, el profármaco de ácido graso está representado por el éster P—B, en donde el radical P es un PUFA y el radical B es una molécula biológicamente aceptable. Por lo tanto, la escisión del éster P—B proporciona un PUFA y una molécula biológicamente aceptable. Tal escisión puede ser inducida por ácidos, bases, agentes oxidantes y/o agentes reductores. Ejemplos de moléculas biológicamente aceptables incluyen, pero sin limitación,

materiales nutricionales, péptidos, aminoácidos, proteínas, carbohidratos (incluyendo monosacáridos, disacáridos, polisacáridos, glicosaminoglicano y oligosacáridos), nucleótidos, nucleósidos, lípidos (incluyendo mono-, di- y triglicéridos sustituidos, glicéridos fosfolípidos, esfingolípidos y esteroides).

5 En algunas realizaciones, los alcoholes (o su equivalente químico) para su incorporación en profármacos de PUFA incluyen alcoholes con 1 a 50 átomos de carbono ("alcoholes C₁₋₅₀"), alcoholes C₁₋₄₅, alcoholes C₁₋₄₀, alcoholes C₁₋₃₅,
10 alcoholes C₁₋₃₀, alcoholes C₁₋₂₅, alcoholes C₁₋₂₀, alcoholes C₁₋₁₅, alcoholes C₁₋₁₀, alcoholes C₁₋₆ (siempre que aparezca en el presente documento, un intervalo numérico como "1-50" se refiere a cada número entero en el intervalo dado; por ejemplo, "de 1 a 50 átomos de carbono" significa que el grupo alquilo puede consistir en 1 átomo de carbono, 2
15 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc., hasta, e incluido, 50 átomos de carbono, aunque la presente definición también cubre la aparición del término "alquilo" cuando no se designa ningún intervalo numérico. Tales alcoholes pueden estar ramificados, sin ramificar, saturados, insaturados, poliinsaturados y/o incluyen uno o más heteroátomos, tales como nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, boro, silicio, flúor, cloro, bromo o yodo. Alcoholes ejemplares incluyen metilo, etilo, propilo, iso-propilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, *terc*-butilo, pentilo, hexilo, perfluorometilo, perclorometilo,
20 perfluoro-*terc*-butilo, percloro-*terc*-butilo, y alcoholes bencilicos tales como éter alcoholes tales como polietilenglicoles. En algunas realizaciones, el alcohol contiene una especie cargada. Tales especies pueden ser aniónicas o catiónicas. En algunas realizaciones, la especie es un átomo de fósforo cargado positivamente. En otras realizaciones, el átomo de fósforo cargado positivamente es un catión de fosfonio. En otras realizaciones, la especie cargada es un catión de amonio primario, secundario, terciario o cuaternario.

20 En algunas realizaciones, los alcoholes (o su equivalente químico) para su incorporación en profármacos de PUFA incluyen polialcoholes, tales como dioles, trioles, tetraoles, pentaoles, etc. Ejemplos de polialcoholes incluyen etilenglicol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, polietilenglicol, metilpropanodiol, etoxidiglicol, hexilenglicol, dipropilenglicol glicerol y carbohidratos. Los ésteres formados a partir de polialcoholes y PUFA pueden ser monoésteres, diésteres,
25 triésteres, etc. En algunas realizaciones, los polialcoholes esterificados múltiples se esterifican con los mismos PUFA. En otras realizaciones, los polialcoholes esterificados múltiples se esterifican con diferentes PUFA. En algunas realizaciones, los diferentes PUFA se estabilizan de la misma manera. En otras realizaciones, los diferentes PUFA se estabilizan de diferentes maneras (como la sustitución de deuterio en un PUFA y la sustitución de ¹³C en otro PUFA). En algunas realizaciones, uno o más PUFA es un ácido graso omega 3 y uno o más PUFA es un ácido graso omega
30 6.

También se contempla que puede ser útil formular PUFA y/o ésteres de PUFA como sales para usar en la invención. Por ejemplo, es bien conocido el uso de la formación de sal como medio para adaptar las propiedades de los compuestos farmacéuticos. Véase Stahl et al., Handbook of pharmaceutical salts: Properties, selection and use (2002)
35 Weinheim/Zurich: Wiley-VCH/VHCA; Gould, Salt selection for basic drugs, Int. J. Pharm. (1986), 33:201-217. La formación de sal puede usarse para aumentar o disminuir la solubilidad, mejorar la estabilidad o la toxicidad y reducir la higroscopicidad de un medicamento.

40 La formulación de PUFA y/o ésteres de PUFA como sales incluye, pero no se limita a, el uso de agentes formadores de sales inorgánicas básicas, agentes formadores de sales orgánicas básicas y agentes formadores de sales que contienen grupos funcionales tanto ácidos como básicos. Varias bases inorgánicas útiles para formar sales incluyen, pero sin limitación, sales de metales alcalinos, tales como sales de litio, sodio, potasio, rubidio, cesio y francio, y sales de metales alcalinotérreos, tales como berilio, magnesio, calcio, estroncio, bario y radio, y metales, tales como aluminio. Estas bases inorgánicas pueden incluir además contraiones, tales como carbonatos, hidrogenocarbonatos,
45 sulfatos, hidrogenosulfatos, sulfitos, hidrogenosulfitos, fosfatos, hidrogenofosfatos, dihidrogenofosfatos, fosfitos, hidrogenofosfitos, hidróxidos, óxidos, sulfuros, alcóxidos, tales como metóxido, etóxido y t-butoxido, y similares. Varias bases orgánicas útiles para formar sales incluyen, pero sin limitación, aminoácidos, aminoácidos básicos, tales como arginina, lisina, ornitina y similares, amoniaco, alquilaminas, tales como metilamina, etilamina, dimetilamina, dietilamina, trimetilamina, trietilamina y similares, aminas heterocíclicas, tales como piridina, picolina y similares,
50 alcanolaminas, tales como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina y similares, dietilaminoetanol, dimetilaminoetanol, N-metilglucamina, dicitlohexilamina, N,N'-dibenciletilendiamina, etilendiamina, piperazina, colina, trolamina, imidazol, diolamina, betaína, trometamina, meglumina, cloroprocaína, procaína y similares.

Las formulaciones de sal de PUFA y / o ésteres de PUFA incluyen, pero sin limitación, sales inorgánicas básicas, sales
55 orgánicas básicas y/o compuestos orgánicos farmacéuticamente aceptables que tienen grupos funcionales tanto ácidos como básicos. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica e incluyen muchas de las bases orgánicas e inorgánicas mencionadas anteriormente. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen además sales y agentes formadores de sal que se encuentran en medicamentos aprobados por la Food and Drug Administration y agencias reguladoras extranjeras. Los cationes orgánicos farmacéuticamente aceptables para la
60 incorporación incluyen, pero sin limitación, benzetamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina, procaína, benetamina, clemizol, dietilamina, piperazina y trometamina. Los cationes metálicos farmacéuticamente aceptables para la incorporación incluyen, pero sin limitación, aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, cinc, bario y bismuto. Los agentes formadores de sal adicionales incluyen, pero sin limitación, arginina, betaína, carnitina, dietilamina, L-glutamina, 2-(4-imidazolil)etilamina, isobutanolamina, lisina, N-metilpiperazina, morfina y teobromo.

65 Además, existen varias listas de contraiones aprobados farmacéuticamente. Véase Bighley et al., Salt forms of drugs

and absorption. 1996 In: Swarbrick J. et al. eds. Encyclopaedia of pharmaceutical technology, Vol. 13 Nueva York: Marcel Dekker, Inc. pág. 453-499; Gould, P. L., Int. J. Pharm. 1986, 33, 201-217; Berge, J. Pharm. Sci. 1977, 66, 1-19; Heinrich Stahl P., Wermuch C.G. (editores), Handbook of Pharmaceutical Salts, IUPAC, 2002; Stahl et al., Handbook of pharmaceutical salts: Properties, selection and use (2002) Weinheim/Zurich: Wiley-VCH/VHCA, todos los

5 cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

Puede que no sea necesario sustituir todos los PUFA no modificados isotópicamente, como los PUFA no deuterados, por los PUFA modificados isotópicamente, como los PUFA deuterados. En algunas realizaciones, es preferible tener suficientes PUFA modificados isotópicamente, tales como D-PUFA, en la membrana para evitar que los PUFA no

10 modificados, tales como H-PUFA, mantengan una reacción en cadena de autooxidación. Durante la autooxidación, cuando un PUFA se oxida y hay un PUFA no oxidado en las proximidades, el PUFA no oxidado puede oxidarse por el PUFA oxidado. Esto también puede denominarse autooxidación. En algunos casos, si hay una concentración baja, por ejemplo, H-PUFA "diluidos" en la membrana con D-PUFA, este ciclo de oxidación puede romperse debido a la distancia que separa los H-PUFA. En algunas realizaciones, la concentración de PUFA modificados isotópicamente

15 está presente en una cantidad suficiente para mantener la reacción en cadena de autooxidación. Para romper la reacción en cadena de autooxidación, por ejemplo, 1-60 %, 5-50 % o 15-35 % de las moléculas totales del mismo tipo están en la membrana. Esto puede medirse mediante IRMS (espectrometría de masas de relación de isótopos).

Otro aspecto de la invención proporciona una composición dietética, complementaria o farmacéutica de los

20 compuestos activos. En algunas realizaciones, la composición dietética, complementaria o farmacéutica puede comprender una sal del compuesto activo.

Varias bases inorgánicas útiles para formar sales incluyen, pero sin limitación, sales de metales alcalinos, tales como sales de litio, sodio, potasio, rubidio, cesio y francio, y sales de metales alcalinotérreos, tales como berilio, magnesio,

25 calcio, estroncio, bario y radio, y metales, tales como aluminio. Estas bases inorgánicas pueden incluir además contraiones, tales como carbonatos, hidrogenocarbonatos, sulfatos, hidrogenosulfatos, sulfitos, hidrogenosulfitos, fosfatos, hidrogenofosfatos, dihidrogenofosfatos, fosfitos, hidrogenofosfitos, hidróxidos, óxidos, sulfuros, alcóxidos, tales como metóxido, etóxido y t-butoxido, y similares.

Varias bases orgánicas útiles para formar sales incluyen, pero sin limitación, aminoácidos; aminoácidos básicos, tales como arginina, lisina, ornitina y similares; amoniaco; hidróxido de amonio; alquilaminas, tales como metilamina, etilamina, dimetilamina, dietilamina, trimetilamina, trietilamina y similares; aminas heterocíclicas, tales como piridina, picolina y similares; alcanolaminas, tales como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina y similares,

30 dietilaminoetanol, dimetilaminoetanol; N-metilglucamina; dicitclohexilamina; N,N'-dibenciletildiamina; sales de etilendiamina; piperazina; colina; trolamina; imidazol; diolamina; betaína; trometamina; meglumina; cloroprocaina; procaina; y similares.

35

Las sales de compuestos activos pueden incluir, pero sin limitación, sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica e incluyen muchos de los agentes formadores de sal

40 enumerados anteriormente. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen además sales y agentes formadores de sal del tipo presente en medicamentos aprobados por la Food and Drug Administration y agencias reguladoras extranjeras.

Los cationes orgánicos farmacéuticamente aceptables para su incorporación en una sal de un compuesto activo

45 incluyen, pero sin limitación, benzetina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina, procaina, benetamina, clemizol, dietilamina, piperazina y trometamina.

Los cationes metálicos farmacéuticamente aceptables para su incorporación en una sal de un compuesto activo

50 incluyen, pero sin limitación, aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, cinc, bario y bismuto.

Los agentes formadores de sal adicionales que tienen utilidad potencial como sales formadoras incluyen, pero sin limitación, ácido aminoacético, N-acetil-L-asparagina, N-acetilcistina, arginina, betaína, carnitina, L-glutamina, 2-(4-imidazolil)etilamina, isobutanolamina, lisina, N-metilpiperazina y morfina.

Además, existen varias listas de contraiones aprobados farmacéuticamente. Véase Bighley et al., Salt forms of drugs and absorption. 1996 In: Swarbrick J. et al. eds. Encyclopaedia of pharmaceutical technology, Vol. 13 Nueva York: Marcel Dekker, Inc. pág. 453-499; Gould, P. L., Int. J. Pharm. 1986, 33, 201-217; Berge, J. Pharm. Sci. 1977, 66, 1-19; Heinrich Stahl P., Wermuch C.G. (editores), Handbook of Pharmaceutical Salts, IUPAC, 2002; Stahl et al., Handbook of pharmaceutical salts: Properties, selection and use (2002) Weinheim/Zurich: Wiley-VCH/VHCA, todos los

55

60

Coadministración

En algunas realizaciones, los compuestos desvelados en el presente documento se administran en combinación. Por

65

ejemplo, en algunas realizaciones, se administran juntos dos, tres, cuatro y/o cinco o más compuestos estabilizados. En algunas realizaciones, los compuestos estabilizados se administran en cantidades aproximadamente similares. En

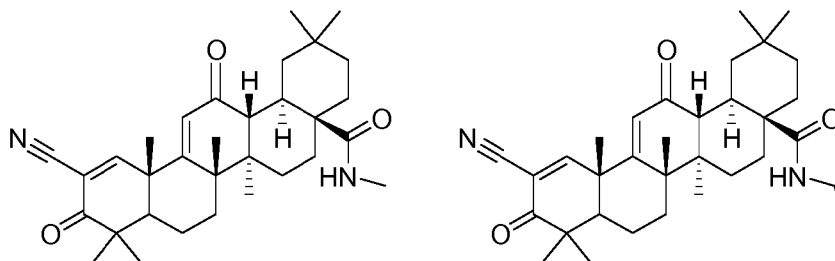
otras realizaciones, los compuestos estabilizados se administran en diferentes cantidades. Por ejemplo, uno cualquiera de dos o más compuestos en una mezcla puede representar alrededor del 1 % a aproximadamente el 99 % de una mezcla, aproximadamente del 5 % a aproximadamente el 95 % de una mezcla, aproximadamente del 10 % a aproximadamente el 90 % de una mezcla, aproximadamente del 15 % a aproximadamente el 85 % de una mezcla, aproximadamente del 20 % a aproximadamente el 80 % de una mezcla, aproximadamente del 25 % a aproximadamente el 75 % de una mezcla, aproximadamente del 30 % a aproximadamente el 70 % de una mezcla, aproximadamente del 35 % a aproximadamente el 65 % de una mezcla, aproximadamente del 40 % a aproximadamente el 60 % de una mezcla, aproximadamente del 45 % a aproximadamente el 55 % de una mezcla y/o aproximadamente el 50 % de una mezcla.

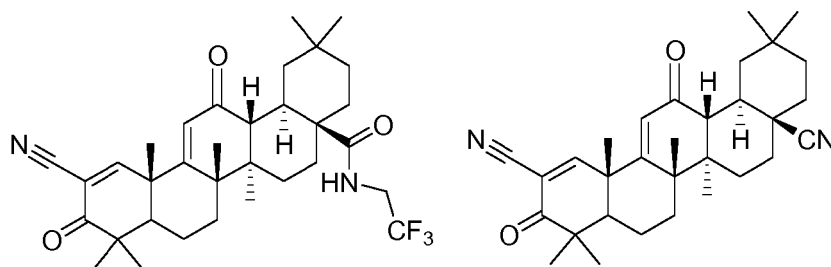
En otras realizaciones, una cualquiera de dos o más compuestos en una mezcla puede representar aproximadamente: 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de una mezcla.

Aunque los antioxidantes no pueden cancelar los efectos negativos de la peroxidación de PUFA debido a la naturaleza estocástica del proceso y la estabilidad de los productos de peroxidación de PUFA (carbonilos reactivos) al tratamiento antioxidante, la coadministración de antioxidantes con composiciones resistentes a la oxidación, tales como las descritas en el presente documento, puede resultar beneficioso para el tratamiento de trastornos relacionados con el estrés oxidativo.

Ciertos antioxidantes considerados útiles para la coadministración incluyen los siguientes: vitaminas, tales como vitamina C y vitamina E; glutatión, ácido lipoico, ácido úrico, carotenos, licopeno, luteína, antocianinas, ácido oxálico, ácido fítico, taninos, coenzima Q, melatonina, tocoferoles, tocotrienoles, polifenoles incluyendo resveratrol, flavonoides, selenio, eugenol, idebenona, mitoquinona, mitoquinol, ubiquinona, péptidos de Szeto-Schiller y antioxidantes dirigidos a las mitocondrias. Cuando no se mencionan explícitamente, los derivados de quinona de los antioxidantes antes mencionados también se contemplan como útiles para la coadministración.

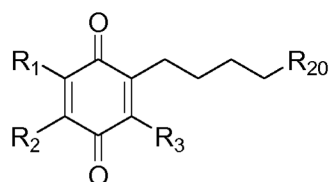
En algunas realizaciones, los compuestos estabilizados se administran con compuestos que regulan positivamente los genes antioxidantes. En otras realizaciones, los compuestos estabilizados se administran con compuestos que afectan las vías de señalización, como la vía de señalización Keap1/Nrf2/ARE, dando como resultado la producción de proteínas antiinflamatorias y/o antioxidantes, como la hemoxygenasa-1 (HO-1). En algunas realizaciones, los compuestos estabilizados se administran con moduladores de inflamación antioxidantes. Los moduladores antioxidantes de la inflamación suprimen los factores de transcripción prooxidantes y/o proinflamatorios. En algunas realizaciones, los moduladores antioxidantes de la inflamación son activadores del factor de transcripción Nrf2. La activación de Nrf2 promueve la regulación positiva de genes antioxidantes, desintoxicantes y antiinflamatorios. En otras realizaciones, los moduladores de inflamación antioxidantes suprimen NF-κB. En algunas realizaciones, los moduladores de inflamación antioxidantes suprimen STAT3. En otras realizaciones, los compuestos estabilizados se administran con compuestos que afectan la actividad de la histona desacetilasa. En algunas realizaciones, los compuestos estabilizados se administran con compuestos que se unen a elementos de respuesta antioxidante (ARE). En otras realizaciones, los compuestos estabilizados se administran con metil-bardoxolona (éster metílico del ácido 2-ciano-3,12-dioxooleano-1,9(11)-dien-28-oico) como modulador antioxidante de la inflamación. En algunas realizaciones, el modulador antioxidante de la inflamación es ácido 2-ciano-3,12-dioxooleano-1,9(11)-dien-28-oico, o un éster farmacéuticamente aceptable del mismo. En otras realizaciones, el modulador de inflamación antioxidante es una amida del ácido 2-ciano-3,12-dioxooleano-1,9(11)-dien-28-oico. En algunas realizaciones, el modulador de inflamación antioxidante es un triterpenoide. En otras realizaciones, el modulador de inflamación antioxidante se selecciona de los siguientes compuestos:





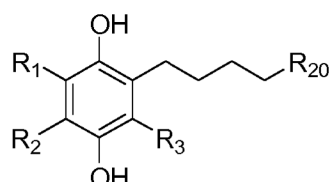
Los antioxidantes adicionales que se cree que son útiles en las terapias de coadministración incluyen los compuestos desvelados en las Patentes de Estados Unidos n.º 6.331.532; 7.179.928; 7.232.809; 7.888.334; 7.888.335; 7.432.305; 7.470.798; y 7.514.461; y Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 20020052342; 20030069208; 20040106579; 20050043553; 20050245487; 20060229278; 20070238709; 20070270381; 20080161267; 20080275005; 20090258841; 20100029706; y 20.110.046.219; en el cual los compuestos allí desvelados se incorporan como referencia. Estos compuestos son compuestos dirigidos a las mitocondrias e incluyen, pero sin limitación:

10 Compuestos de Fórmulas I o II



Fórmula I

or



Fórmula II

en donde R₁ y R₂ se seleccionan independientemente entre -alquilo C₁-C₄, -haloalquilo C₁-C₄, -CN, -F, -Cl, -Br y -I; R₃ se selecciona entre -alquilo C₁-C₄, -haloalquilo C₁-C₄, -CN, -F, -Cl y -I, y R₂₀ se selecciona independientemente entre -alquilo C₁-C₂₀, -alqueno C₁-C₂₀, -alquino C₁-C₂₀ y -C₁-C₂₀ que contiene al menos un doble enlace y al menos un triple enlace.

Compuestos tales como: Éster metílico del ácido 3-(6-hidroxi-2-metil-3,4,7,8,9,10-hexahidro-7,10-metano-2H-benzo[h]croman-2-il)-propiónico; Ácido 3-(6-hidroxi-2-metil-3,4,7,8,9,10-hexahidro-7,10-metano-2H-benzo[h]croman-2-il)-propiónico; 2,2-Dimetil-3,4,7,8,9,10-hexahidro-7,10-metano-2H-benzo[h]croman-6-ol; Éster metílico del ácido 3-(6-hidroxi-2-metil-3,4,7,8,9,10-hexahidro-7,10-propano-2H-benzo[h]croman-2-il)-propiónico; 2-Metil-2-[3-(tiazol-2-ilsulfanil)-propil]-3,4,7,8,9,10-hexahidro-7,10-metano-2H-benzo[h]croman-6-ol; Éster metílico del ácido [3-(6-hidroxi-2-metil-3,4,7,8,9,10-hexahidro-7,10-metano-2H-benzo[h]croman-2-il)-propil]-fosfónico; Ácido [3-(6-hidroxi-2-metil-3,4,7,8,9,10-hexahidro-7,10-metano-2H-benzo[h]croman-2-il)-propil]-fosfónico; Éster metílico del ácido 3-(6-hidroxi-2-metil-3,4,7,8,9,10-hexahidro-7,10-metano-2H-benzo[h]croman-2-il)-propiónico; Dimetilamida del ácido 4-(6-hidroxi-2-metil-3,4,7,8,9,10-hexahidro-7,10-metano-2H-benzo[h]croman-2-il)-butano-1-sulfónico; 2-(3-Hidroxi-propil)-2-metil-3,4,7,8,9,10-hexahidro-7,10-metano-2H-benzo[h]croman-6-ol; 2-(3-Cloro-propil)-2-metil-3,4,7,8,9,10-hexahidro-7,10-metano-2H-benzo[h]croman-6-ol; 2,2-Dimetil-3,4,7,8,9,10-hexahidro-7,10-metano-2H-benzo[h]croman-6-ol; 2-(2-Cloro-etil)-2-metil-3,4,7,8,9,10-hexahidro-7,10-metano-2H-benzo[h]croman-6-ol; 2-Metil-2-tiazol-2-il-3,4,7,8,9,10-hexahidro-7,10-metano-2H-benzo[h]croman-6-ol; 2,2-Dimetil-3,4,7,8,9,10-hexahidro-7,10-etano-2H-benzo[h]croman-6-ol; Ácido 3-(6-hidroxi-2-metil-3,4,7,8,9,10-hexahidro-7,10-etano-2H-benzo[h]croman-2-il)-propiónico; 2-(3-Cloro-propil)-2-metil-3,4,7,8,9,10-hexahidro-7,10-etano-2H-benzo[h]croman-6-ol; 4-(6-Hidroxi-2,2-dimetil-3,4,7,8,9,10-hexahidro-7,10-metano-2H-benzo[h]croman-5-ilmetileno)-2-metil-5-propil-2,4-dihidro-pirazol-3-ona.

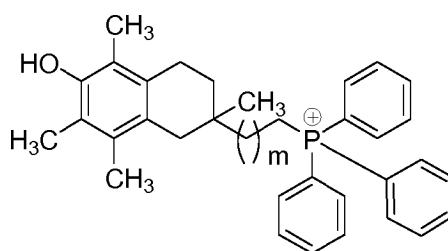
Compuestos tales como: 2,2,7,8-Tetrametil-5-fenil-croman-6-ol; Éster metílico del ácido 4-(6-hidroxi-2,2,7,8-tetrametil-croman-5-il)-benzoico; Ácido 4-(6-hidroxi-2,2,7,8-tetrametil-croman-5-il)-benzoico; 2,2,7,8-Tetrametil-5-piridin-4-il-croman-6-ol; 2,2,7,8-Tetrametil-5-piridin-3-il-croman-6-ol; 5-(4-Metanosulfonil-fenil)-2,2,7,8-tetrametil-croman-6-ol; 5-(4-Dimetilamino-fenil)-2,2,7,8-tetrametil-croman-6-ol; 5-(4-Cloro-fenil)-2,2,7,8-tetrametil-croman-6-ol; 4-(6-Hidroxi-2,2,7,8-tetrametil-croman-5-il)-bencenosulfonamida; 5-(4-Metoxi-fenil)-2,2,7,8-tetrametil-croman-6-ol; (6-Hidroxi-2,2,7,8-tetrametil-croman-5-ilmetil)-1-hidroxiurea; 2,2,7,8-Tetrametil-5-(3-nitro-fenil)-croman-6-ol; 2,2,7,8-Tetrametil-5-(4-trifluorometil-fenil)-croman-6-ol; 5-(4-terc-Butil-fenil)-2,2,7,8-tetrametil-croman-6-ol; 2,2,7,8-Tetrametil-5-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-croman-6-ol; 4-(6-Hidroxi-2,2,7,8-tetrametil-croman-5-il)-benzonitrilo; 5-(2,5-Dimetoxi-3,4-dimetil-fenil)-2,2,7,8-tetrametil-croman-6-ol; 5-(6-Hidroxi-2,2,7,8-tetrametil-croman-5-il)-benceno-1,2,3-triol; 5-(6-Hidroxi-2,2,7,8-tetrametil-croman-5-il)-2,3-dimetil-benceno-1,4-diol; 5-(2-Cloro-fenil)-2,2,7,8-tetrametil-croman-6-ol; 5-Furan-2-il-2,2,7,8-tetrametil-croman-6-ol; 5-Alilsulfanilmetil-2,2,8-trimetil-7-(3-metil-butil)-croman-6-ol; 5-Ciclopentilsulfanilmetil-2,2,7,8-tetrametil-croman-6-ol; 5-Hexilsulfanilmetil-2,2,7,8-tetrametil-croman-6-ol; 5-Alilsulfanilmetil-2,2,7,8-tetrametil-croman-6-ol; 5-(4,6-Dimetil-pirimidin-2-ilsulfanilmetil)-2,2,7,8-tetrametil-croman-6-ol; Ácido 1-[3-(6-hidroxi-2,2,7,8-tetrametil-croman-5-il-metilsulfanil)-2-metil-propionil]-pírrolidin-2-carboxílico; 4-(6-Hidroxi-2,2,7,8-tetrametil-croman-5-

ilmetileno)-5-metil-2-fenil-2,4-dihidro-pirazol-3-ona; 4-(6-Hidroxi-2,2,7,8-tetrametil-croman-5-il-metileno)-3-fenil-4H-isoxazol-5-ona; Ácido 4-[4-(6-hidroxi-2,2,7,8-tetrametil-croman-5-il-metileno)-3-metil-5-oxo-4,5-dihidro-pirazol-1-il]-benzoico; 4-(6-Hidroxi-2,2,7,8-tetrametil-croman-5-il-metileno)-2-metil-5-propil-2,4-dihidro-pirazol-3-ona; 5-Hidroxi-3-(6-hidroxi-2,2,7,8-tetrametil-croman-5-il-metileno)-3H-benzofuran-2-ona; 2,5,7,8-Tetrametil-2-tiofen-2-il-croman-6-ol; 2-(2,5-Dimetil-tiofen-3-il)-2,5,7,8-tetrametil-croman-6-ol; 2-(2,5-Dimetil-tiofen-3-il)-2,7,8-trimetil-croman-6-ol; 8-Cloro-2-(2,5-dimetil-tiofen-3-il)-2,5,7-trimetil-croman-6-ol; 5-Cloro-2,7,8-trimetil-2-tiofen-2-il-croman-6-ol; 5-[3-(6-Metoximatoxi-2,7,8-trimetil-croman-2-il)-propilideno]-tiazolidin-2,4-diona; 5-[3-(6-Hidroxi-2,7,8-trimetil-croman-2-il)-propilideno]-tiazolidin-2,4-diona; Ácido 3-[6-hidroxi-2,7,8-trimetil-2-(4,8,12-trimetil-tridecil)-croman-5-il-metilsulfanil]-2-metil-propiónico; 2,7,8-Trimetil-5-(5-metil-1H-benzimidazol-2-il-sulfanilmetil)-2-(4,8,12-trimetil-tridecil)-croman-6-ol; Ácido 2-[6-hidroxi-2,7,8-trimetil-2-(4,8,12-trimetil-tridecil)-croman-5-ilmetilsulfanil]-etanosulfónico; 5-(4,6-Dimetil-pirimidin-2-ilsulfanilmetil)-2,7,8-trimetil-2-(4,8,12-trimetil-tridecil)-croman-6-ol; Ácido 4-[2-(4,8-dimetil-tridecil)-6-hidroxi-2,7,8-trimetil-croman-5-ilmetilsulfanil]-benzoico; Ácido 1-[3-[6-hidroxi-2,7,8-trimetil-2-(4,8,12-trimetil-tridecil)-croman-5-ilmetilsulfanil]-2-metil-propionil]-pirrolidin-2-carboxílico; 2-(2,2-Dicloro-vinil)-2,5,7,8-tetrametil-croman-6-ol; 2-(2,2-Dibromo-vinil)-2,5,7,8-tetrametil-croman-6-ol; 5-(5-Cloro-3-metil-pent-2-enil)-2,2,7,8-tetrametil-croman-6-ol; 5-Cloro-2-(2,5-dimetil-tiofen-3-il)-2,7,8-trimetil-croman-6-ol; 2-(3-Cloro-propil)-5,7-dimetil-2-tiofen-2-il-croman-6-ol; 5-Cloro-2-(2,5-dimetil-tiazol-4-il)-2,7,8-trimetil-croman-6-ol; 5-Cloro-2-(2,5-dimetil-tiazol-4-il)-2,7,8-trimetil-2H-cromen-6-ol; y 5-Cloro-2-(2,5-dimetil-tiazol-4-il)-2,7,8-trimetil-croman-6-ol.

Compuestos tales como: dimebolina (2,8-dimetil-5-(2-(6-metilpiridin-3-il)etil)-2,3,4,5-tetrahidro-1H-pirido[4,3-b]indol), 8-cloro-2-metil-5-(2-(6-metilpiridin-3-il)etil)-2,3,4,5-tetrahidro-1H-pirido[4,3-b]indol, mebhidrolina (5-bencil-2-metil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-pirido[4,3-b]indol), 2,8-dimetil-1,3,4,4a,5,9b-hexahidro-1H-pirido[4,3-b]indol, 8-fluoro-2-(3-(piridin-3-il)propil)-2,3,4,5-tetrahidro-1H-pirido[4,3-b]indol y 8-metil-1,3,4,4a,5,9b-tetrahidro-1H-pirido[4,3-b]indol.

Compuestos tales como: 2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-3,5-dimetil-6-(4-(trifluorometil)fenil)ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-6-(4-metoxifenil)-3,5-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 4-(5-(3-hidroxi-3-metilbutil)-2,4-dimetil-3,6-dioxociclohexa-1,4-dienil)benzonitrilo; 2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-3,5-dimetil-6-(naftalen-2-il)ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(3,4-difluorofenil)-6-(3-hidroxi-3-metilbutil)-3,5-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(4-fluorofenil)-6-(3-hidroxi-3-metilbutil)-3,5-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(4-clorofenil)-6-(3-hidroxi-3-metilbutil)-3,5-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(2,3-dihidrobenzofuran-2-il)-6-(3-hidroxi-3-metilbutil)-3,5-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetil-3-fenilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetil-3-fenilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-bencil-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetil-3-(3-fenilpropil)ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(1-hidroxi-2-feniletal)-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-3-(4-metoxifenil)-5,6-dimetil-ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetil-3-(4-(trifluorometil)-fenil)ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetil-3-(naftalen-2-il)ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(benzofuran-2-il)-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(4-clorofenil)-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(4-etilfenil)-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetil-3-(3-(trifluorometil)fenil)-ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(4-terc-butilfenil)-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetil-ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(4-fluorofenil)-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(3-fluorofenil)-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 4-(2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-4,5-dimetil-3,6-dioxociclohexa-1,4-dienil)benzonitrilo; 2-(3,4-difluorofenil)-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetil-ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(2-fluorofenil)-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-3-(3-metoxifenil)-5,6-dimetil-ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(2,4-difluorofenil)-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-3-(4-metoxifenil)-5,6-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(4-clorofenil)-6-(3-hidroxi-3-metilbutil)-3,5-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetil-3-(2-(tiazol-2-il)etil)ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetil-3-(2-(tiazol-5-il)etil)ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetil-3-(2-(piridin-2-il)etil)ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetil-3-(2-(piridazin-4-il)etil)ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetil-3-(2-(tiofen-2-il)etil)ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetil-3-(2-(tiofen-3-il)etil)ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(2-(furan-2-il)etil)-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(2-(furan-3-il)etil)-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(2-(1H-pirazol-5-il)etil)-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(2-(1H-pirazol-4-il)etil)-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(2-(1H-pirazol-1-il)etil)-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(2-(1H-imidazol-5-il)etil)-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(2-(1H-imidazol-2-il)etil)-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetil-3-(2-(oxazol-5-il)etil)ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetil-3-(2-(oxazol-2-il)etil)ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetil-3-(2-(oxazol-4-il)etil)ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; y 2-(2-(1H-indol-3-il)etil)-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5,6-dimetilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona.

Compuestos tales como:



en donde m es -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₁-C₂₀, -alquinilo C₁-C₂₀ o -C₁-C₂₀ que contiene al menos un doble enlace y al menos un triple enlace y el contraión es un anión farmacéuticamente aceptable.

Compuestos tales como: sales de 3-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)propil trifenilfosfonio; sales de 4-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)butil trifenilfosfonio; sales de 5-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)pentil trifenilfosfonio; sales de 6-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)hexil trifenilfosfonio; sales de 7-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)heptil trifenilfosfonio; sales de 8-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)octil trifenilfosfonio; sales de 9-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)nonil trifenilfosfonio; sales de 10-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)decil trifenilfosfonio; sales de 11-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)undecil trifenilfosfonio; sales de 12-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)dodecil trifenilfosfonio; sales de 13-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)tridecil trifenilfosfonio; sales de 14-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)tetradecil trifenilfosfonio; sales de 15-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)pentadecil trifenilfosfonio; sales de 16-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)hexadecil trifenilfosfonio; sales de 17-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)heptadecil trifenilfosfonio; sales de 18-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)octadecil trifenilfosfonio; sales de 19-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)nonadecil trifenilfosfonio; sales de 20-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)icosenil trifenilfosfonio; sales de 3-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dihidroxifenil)propil trifenilfosfonio; sales de 4-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dihidroxifenil)butil trifenilfosfonio; sales de 5-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dihidroxifenil)pentil trifenilfosfonio; sales de 6-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dihidroxifenil)hexil trifenilfosfonio; sales de 7-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dihidroxifenil)heptil trifenilfosfonio; sales de 8-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dihidroxifenil)octil trifenilfosfonio; sales de 9-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dihidroxifenil)nonil trifenilfosfonio; sales de 10-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dihidroxifenil)decil trifenilfosfonio; sales de 11-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dihidroxifenil)undecil trifenilfosfonio; sales de 12-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dihidroxifenil)dodecil trifenilfosfonio; sales de 13-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dihidroxifenil)tridecil trifenilfosfonio; sales de 14-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dihidroxifenil)tetradecil trifenilfosfonio; sales de 15-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dihidroxifenil)pentadecil trifenilfosfonio; sales de 16-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dihidroxifenil)hexadecil trifenilfosfonio; sales de 17-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dihidroxifenil)heptadecil trifenilfosfonio; sales de 18-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dihidroxifenil)octadecil trifenilfosfonio; sales de 19-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dihidroxifenil)nonadecil trifenilfosfonio; sales de 20-(4,5-dimetoxi-2-metil-3,6-dihidroxifenil)icosenil trifenilfosfonio; en donde el contraión de la sal es un anión farmacéuticamente aceptable tal como bromuro, metanosulfonato, etanosulfonato, propanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato o 2-naftileno sulfonato.

Adicionalmente, se contempla que la coadministración de antioxidantes podría tomar la forma de consumir alimentos que se sabe que tienen niveles aumentados de antioxidantes beneficiosos. Estos alimentos incluyen tanto los alimentos habituales como los "superalimentos" que contienen antioxidantes. Estos alimentos incluyen frutas, verduras y otros productos alimenticios tales como fresas, grosellas negras, moras, naranjas, arándanos, granadas, té, café, aceite de oliva, chocolate, canela, hierbas, vino tinto, cereales en grano, huevos, carne, legumbres, frutos secos, espinaca, nabo, ruibarbo, granos de cacao, maíz, judías, repollo y similares.

Administración y formulaciones adicionales:

Es bien sabido que los triglicéridos son los constituyentes principales de los aceites vegetales y grasas animales. También se sabe que un triglicérido es un compuesto éster derivado del glicerol y tres ácidos grasos. Los triglicéridos son metabolizados por enzimas como las lipasas que hidrolizan los enlaces éster y liberan ácidos grasos y glicerol. De hecho, este metabolismo libera ácidos grasos que después pueden captarse por las células a través de una proteína transportadora de ácidos grasos. Se contempla que los PUFA y los miméticos de PUFA que son útiles en el tratamiento de diversas enfermedades pueden incorporarse en grasas como los triglicéridos, diglicéridos y/o monoglicéridos para la administración a un paciente.

La administración de los PUFA, los miméticos de PUFA, los profármacos de PUFA y los triglicéridos que contienen PUFA y/o miméticos de PUFA podrían ser a través de una dieta modificada. Alternativamente, los PUFA, los miméticos de PUFA, los profármacos de PUFA y los triglicéridos que contienen PUFA y/o miméticos de PUFA pueden administrarse como alimentos o suplementos alimenticios, por sí mismos o como complejos con 'vehículos', incluyendo, pero no limitado a, complejos con albúmina.

Otros métodos de administración de los PUFA reforzados o sus precursores, tales como los métodos típicamente

usados para la administración de fármacos y la administración de medicamentos, también pueden emplearse. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, administración oral, administración tópica, administración transmucosa tal como administración nasal, administración nasal a través de placa cribiforme, administración intravenosa, administración subcutánea, inhalación o mediante gotas para los ojos.

5 Los métodos de administración dirigidos y métodos de liberación sostenida, incluyendo, pero no limitado a, el método de administración de liposomas, también pueden emplearse.

10 En algunas realizaciones, los compuestos isotópicamente modificados descritos en el presente documento pueden administrarse durante un transcurso de tiempo en el cual las células y tejidos del sujeto contendrán niveles en aumento de compuestos isotópicamente modificados durante el transcurso del tiempo en el cual se administran los compuestos.

15 Las composiciones que contienen el principio activo pueden estar en una forma adecuada para su uso oral, por ejemplo, como comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleaginosas, emulsiones de aceite en agua, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas o jarabes o elixires. Tales composiciones pueden contener excipientes tales como agentes volumétricos, agentes de solubilización, agentes de enmascarado de sabor, estabilizantes, agentes colorantes, conservantes y otros agentes conocidos por los expertos habituales en la técnica de la formulación farmacéutica. Además, las formas orales pueden incluir alimentos o suplementos alimenticios que contienen los compuestos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones
20 los suplementos pueden hacerse a medida para que un tipo de PUFA, tales como los ácidos grasos omega-3 u omega-6 pueden añadirse a los alimentos o usarse como suplemento dependiendo de la grasa dominante que contenga el alimento o la dieta del sujeto. Por otra parte, las composiciones pueden hacerse a medida en función de la enfermedad a tratar. Por ejemplo, una afección relacionada con LDL puede requerir más ácido D-linoleico porque la cardiolipina, que está hecho de ácido linoleico, se oxida. En otras realizaciones, tales como la enfermedad de la retina y afecciones neurológicas/del SNC pueden requerir más ácidos grasos omega-3 tales como el ácido D-linolénico, porque los ácidos grasos D-omega-3 son más relevantes para el tratamiento de estas enfermedades. En algunos aspectos, cuando la enfermedad se asocia a HNE, después deben prescribirse ácidos grasos D-omega-6, mientras que para HHE, deben prescribirse ácidos grasos D-omega-3.

30 Las composiciones también pueden ser adecuadas para su administración mediante aplicación tópica, como un pulverizador, crema, pomada, loción o como componente o aditivo de un parche, vendaje o apósito para heridas. Además, el compuesto puede administrarse al sitio de la enfermedad por medios mecánicos o dirigirse al sitio de la enfermedad mediante el uso de tecnologías de orientación sistémica tales como los liposomas (con o sin modificación química que les proporcione afinidad por el tejido enfermo), anticuerpos, aptámeros, lectinas o ligandos químicos tales
35 como la albúmina, con afinidad por aspectos del tejido enfermo que son menos abundantes o no están presentes en el tejido normal. En algunos aspectos, La aplicación tópica de cosméticos puede incluir el uso de un vehículo que es un compuesto o mimético isotópicamente modificado descrito en el presente documento para administrar a través de la piel tal como mediante un parche. Los trastornos oculares pueden tratarse con colirios.

40 Una composición farmacéutica también puede estar en una forma adecuada para la administración por inyección. Tales composiciones pueden estar en forma de una solución, una suspensión o una emulsión. Tales composiciones pueden incluir agentes estabilizantes, agentes antimicrobianos u otros materiales para mejorar la función del medicamento. Algunos aspectos de la invención también abarcan formas secas o desecadas de los compuestos que pueden formarse o reconstituirse fácilmente en una solución, suspensión o emulsión adecuada para la administración
45 por inyección o para su uso oral o tópico. La administración por inyección puede ser adecuada para la administración sistémica y también la administración local tal como la inyección en el ojo para tratar trastornos relacionados con el ojo.

Dosificaciones

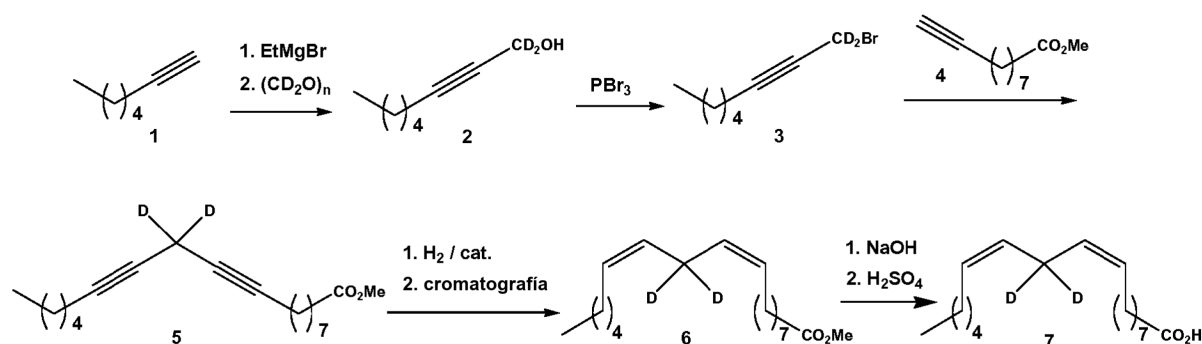
50 En algunas realizaciones, los compuestos se dosifican de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg y/o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. En otras realizaciones, los compuestos se dosifican a aproximadamente: 0,01, 0,1, 1,0, 5,0, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 y/o 1000 mg/kg.

Ejemplos

Experimental: Los espectros de masas MALDI-TOF se registraron en un instrumento de extracción retardada PE-ABI Voyager Elite. Los espectros se adquirieron con un voltaje de aceleración de 25 KV y un retraso de 100 ms en el modo
60 de iones positivos. A menos que se especifique de otro modo, los espectros de RMN ¹H se registraron en un espectrómetro Varian Gemini de 200 MHz. La HPLC se llevó a cabo en un sistema Waters. Los productos químicos eran de Sigma-Aldrich Chemical Company (EE. UU.), Avocado research chemicals (RU), Lancaster Synthesis Ltd (RU) y Acros Organics (Fisher Scientific, RU). El gel de sílice, las placas de TLC y los disolventes eran de BDH/Merck. Los espectros de IR se registraron con el espectrómetro Vertex 70. Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se obtuvieron con
65 un instrumento Bruker AC 400 a 400 y 100 MHz respectivamente, en CDCl₃ (TMS a δ = 0,00 o CHCl₃ a δ = 7,26 para ¹H y CHCl₃ a δ = 77,0 para ¹³C como un patrón interno).

Un experto en la materia reconocerá que las síntesis descritas a continuación se pueden modificar fácilmente para preparar compuestos adicionales resistentes a la oxidación. Por ejemplo, se reconocerá que el éster de un tipo de compuesto estabilizado puede escindirse para producir el correspondiente ácido carboxílico. De forma análoga, los ácidos carboxílicos se pueden convertir fácilmente en derivados adicionales, tales como ésteres. De manera adicional, se apreciará que variando la identidad de los materiales de partida marcados isotópicamente, se pueden preparar variantes isotópicas de los compuestos descritos a continuación. En las síntesis que se describen a continuación, el paraformaldehído- d_2 se usa como material de partida marcado isotópicamente. Uno apreciará fácilmente que las mismas transformaciones sintéticas se pueden usar con paraformaldehído- d_1 , formaldehído- d_1 , paraformaldehído- d_2 , formaldehído- d_2 y variantes marcadas con carbono 13 de los compuestos mencionados anteriormente. El formaldehído- d_1 es un compuesto bien caracterizado y está fácilmente disponible de fuentes conocidas, tales como ácido fórmico- d_1 , ácido fórmico- d_2 y/o diclorometano- d_1 usando transformaciones sintéticas generalmente conocidas y entendidas. Además, los análogos radiactivos de los compuestos descritos en este documento se pueden preparar usando materiales de partida que contienen tritio. Estos compuestos serían útiles para determinar la incorporación en las células y tejidos de animales.

Ejemplo 1. Síntesis de ácido 11,11-D2-linoleico



1,1-Dideutero-oct-2-yn-1-ol (2) A una solución de bromuro de etilmagnesio preparado a partir de bromoetano (100 ml), 1,2-dibromoetano (1 ml) y virutas de magnesio (31,2 g) en THF seco (800 ml), se le añadió gota a gota heptin-1 ((1); 170 ml) durante 30-60 min en una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h y después se le añadió cuidadosamente deuteroparaform (30 g) en una porción. La mezcla de reacción se sometió a reflujo suavemente durante 2 h, se enfrió a -10°C y después se añadieron lentamente 5-7 ml de agua. La mezcla se vertió en 0,5 kg de suspensión de hielo triturado y 40 ml de ácido sulfúrico concentrado y se lavó con 0,5 l de hexano. La fase orgánica se separó, y la fase acuosa restante se extrajo con 5:1 de hexano:acetato de etilo (3 x 300 ml). La fracción orgánica combinada se lavó con NaCl sat. (1 x 50 ml), NaHCO_3 sat., (1 x 50 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se evaporó al vacío para producir 119,3 g (99 %) de aceite incoloro, el cual se usó sin purificación adicional. HRMS, m/z calculado para $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{D}_2\text{O}$: 128,1168; encontrado: 128,1173. RMN ^1H (CDCl_3 , δ): 2,18 (t, $J = 7,0$, 2H), 1,57 (s, 1H), 1,47 (c, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,31 (m, 4H), 0,87 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H).

1,1-Dideutero-1-bromo-oct-2-ina (3) A una solución de (2) (3,48 g; 27,2 mmol) y piridina (19 ml) en éter dietílico seco (300 ml), se le añadieron gota a gota 36 ml de PBr_3 en 35 ml de éter dietílico con agitación durante 30 min a -15°C en una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se dejó calentar gradualmente hasta t.a. y después se sometió a reflujo 3 h con agitación y 1 h sin agitación. Después, la mezcla de reacción se enfrió hasta -10°C y se añadieron 500 ml de agua fría. Cuando el residuo se disolvió, se añadieron NaCl saturado (250 ml) y hexano (250 ml) y la capa orgánica se separó. La fracción acuosa se lavó con hexano (2 x 100 ml), y las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con NaCl (2 x 100 ml) y se secaron sobre Na_2SO_4 en presencia de trazas de hidroquinona y trietilamina. El disolvente se retiró por destilación a presión atmosférica seguido de evaporación rotatoria. El residuo se fraccionó por destilación al vacío (3 mm de Hg) para dar 147,4 g (82 % contando por deutero-paraform) de aceite de color amarillo pálido. P. e. 75°C . HRMS, m/z calculado para $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{D}_2\text{Br}$: 190,0324; encontrado: 189,0301, 191,0321. RMN ^1H (CDCl_3 , δ): 2,23 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H, CH_2), 1,50 (m, 2H, CH_2), 1,33 (m, 4H, CH_2), 0,89 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H, CH_3),

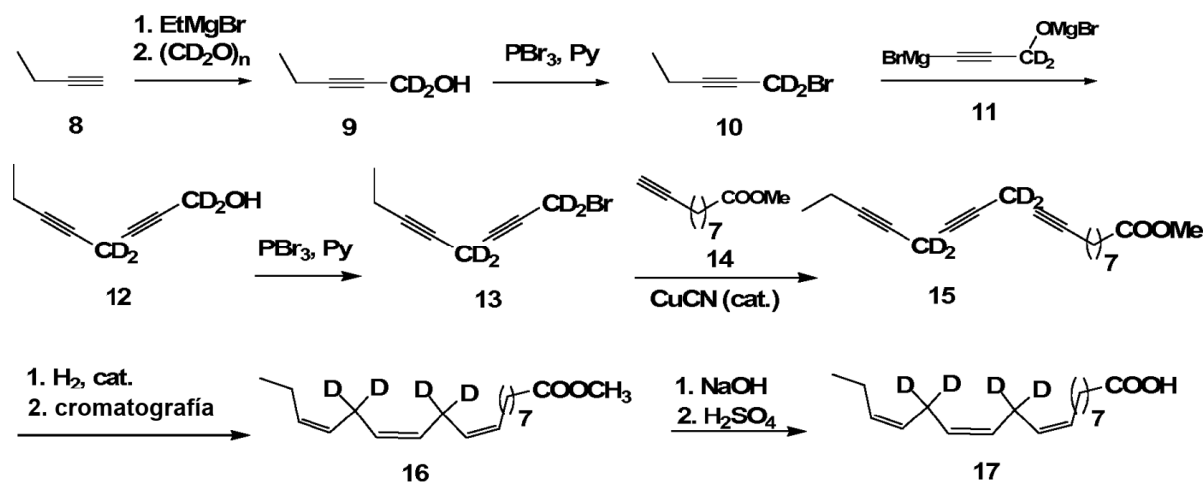
Éster metílico del ácido 11,11-dideutero-octadeca-9,12-diinoico (5) Se añadió rápidamente CuI (133 g) a 400 ml de DMF (destilada recientemente sobre CaH_2), seguido de NaI seco (106 g), K_2CO_3 (143 g). Después, se añadió en una porción éster metílico del ácido dec-9-inoico ((4); 65 g), seguido de bromuro (3) (67 g). Se usaron 250 ml adicionales de DMF para enjuagar los reactivos de las paredes del matraz en la mayor parte de la mezcla de reacción, que después se agitó durante 12 h. Después, se añadieron 500 ml de NH_4Cl acuoso saturado con agitación, seguido en unos pocos minutos por NaCl acuoso saturado y después por una mezcla 5:1 de hexano:EtOAc (300 ml). La mezcla se agitó adicionalmente durante 15 min y después se filtró a través de un filtro de vidrio Schott de malla fina. El residuo se lavó varias veces con una mezcla de hexano:EtOAc. La fracción orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo adicionalmente (3 x 200 ml). La fracción orgánica combinada se secó (Na_2SO_4), se añadieron trazas de hidroquinona y difenilamina y el disolvente se evaporó al vacío. El residuo se destiló inmediatamente a 1 mm de Hg, para dar 79 g

(77 %) de una fracción de ebullición de 165-175 °C. HRMS, m/z calculado para $C_{19}H_{28}D_2O_2$: 292,2369; encontrado: 292,2365. RMN ^1H ($CDCl_3$, δ): 3,67 (s, 3H, OCH_3), 2,3 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, CH_2), 2,14 (t, $J = 7,0$ Hz, 4H, CH_2), 1,63 (m, 2H, CH_2), 1,47 (m, 4H, CH_2), 1,3 (m, 10H, CH_2), 0,88 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H, CH_3).

Éster metílico del ácido 11,11-dideutero-*cis,cis*-octadeca-9,12-dienoico (6) Una suspensión de tetrahidrato de acetato de níquel (31,5 g) en EtOH al 96 % (400 ml) se calentó con agitación a aprox. 50-60 °C hasta que la sal se disolvió. El matraz se lavó abundantemente con hidrógeno, y después se añadieron gota a gota 130 ml de solución de $NaBH_4$ (preparado mediante unos 15 min de agitación de suspensión de $NaBH_4$ (7,2 g) en EtOH (170 ml) seguido de filtración) durante 20-30 min con agitación. En 15-20 min, se añadió etilendiamina (39 ml) en una porción, seguido en 5 min por una adición de **(5)** (75 g) en EtOH (200 ml). La mezcla de reacción se agitó muy vigorosamente en hidrógeno (1 atm). La absorción de hidrógeno se detuvo en aproximadamente 2 h. A la mezcla de reacción se le añadieron 900 ml de hexano y 55 ml de AcOH enfriado con hielo, seguido de agua (15 ml). Se añadió hexano (400 ml) y la mezcla se dejó separar. Las fracciones acuosas se extrajeron mediante una mezcla 5:1 de hexano:EtOAc. La finalización de la extracción se controló por TLC. La fase orgánica combinada se lavó con una solución diluida de H_2SO_4 , seguido de $NaHCO_3$ saturado y NaCl saturado y después se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se retiró a presión reducida. Se añadió gel de sílice (gel de sílice 60, Merck; 162 g) a una solución de nitrato de plata (43 g) en MeCN anhidro (360 ml) y el disolvente se retiró en un rotavap. El gel de sílice impregnado obtenido se secó durante 3 h a 50 °C (bomba de aspiración) y después 8 h en una bomba de aceite. Se usaron 30 g de esta sílice por gramo de producto. La mezcla de reacción se disolvió en un pequeño volumen de hexano y se aplicó al gel de sílice modificado con plata y se lavó previamente con un gradiente de EtOAc al 1-3 %. Cuando se lavaron los contaminantes no polares (control por TLC), el producto se eluyó con EtOAc al 10 % y el disolvente se evaporó al vacío para dar 52 g del éster del título **(6)** en forma de un líquido incoloro. HRMS, m/z calculado para $C_{19}H_{32}D_2O_2$: 296,2682; encontrado: 296,2676. IR (CCl_4): $\tilde{\nu} = 1740\text{ cm}^{-1}$. RMN ^1H ($CDCl_3$, δ): 5,32 (m, 4H), 3,66 (s, 3H, OCH_3), 2,29 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, CH_2), 2,02 (m, 4H, CH_2), 1,60 (m, 2H, CH_2), 1,30 (m, 14H, CH_2), 0,88 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H, CH_3).

Ácido 11,11-dideutero-*cis,cis*-octadeca-9,12-dienoico (7) Una solución de KOH (46 g) en agua (115 ml) se añadió a una solución de éster **(6)** (46 g) en MeOH (60 ml). La mezcla de reacción se agitó a 40-50 °C durante 2 h (control por TLC) y después se diluyó con 200 ml de agua. Se retiraron dos tercios del disolvente (rotavap). Se añadió ácido sulfúrico diluido al residuo a pH 2, seguido de éter dietílico con un poco de pentano. Se separó la capa orgánica y se lavó la capa acuosa con éter dietílico con un poco de pentano. Las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con NaCl acuoso saturado y después se secaron sobre Na_2SO_4 . El disolvente se evaporó para dar 43 g de **(7)** (99 %). IR (CCl_4): $\tilde{\nu} = 1741, 1711\text{ cm}^{-1}$.

Ejemplo 2. Síntesis de ácido 11,11,14,14-D4-linolénico



1,1 -Dideutero-pent-2-in-1-ol (9) Se burbujeó lentamente but-1-ina (**8**) a través de una solución de bromuro de etilmagnesio preparado a partir de bromoetano (100 ml) y virutas de magnesio (31,3 g) en THF seco (800 ml) en un baño (-5 °C). De vez en cuando se detenía el burbujeo y se pesaba el cilindro con but-1-ina para medir la tasa de consumo. El suministro de alquino se detuvo poco después de que se formara un precipitado voluminoso (la masa medida de alquino consumida fue de 125 g). La mezcla de reacción se calentó a t.a. durante 30 min, y después se agitó durante 15 min. A continuación, la mezcla se calentó hasta 30 °C, momento en el cual se disolvió el precipitado y después se agitó a t.a. durante otros 30 min. Se añadió deuteroparaform (28 g) en una porción y la mezcla se calentó a reflujo durante 3 h, formando una solución transparente. Se enfrió a t.a. y se vertió en una mezcla de hielo picado (800 g) y 50 ml de H_2SO_4 conc. Se añadió hexano (400 ml) y la capa orgánica se separó. La fase acuosa se saturó con NaCl y se extrajo con una mezcla 4:1 de hexano:EtOAc (1 l). La finalización del proceso de extracción se controló por TLC. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaCl saturado, $NaHCO_3$ y de nuevo con NaCl y se secaron

sobre Na₂SO₄. El disolvente se retiró por destilación a presión atmosférica (105 °C de temperatura de vapor máx.). El residuo (70,5 g; 94 %) se usó sin purificación adicional. HRMS, *m/z* calculado para C₅H₆D₂O: 86,0699; encontrado: 86,0751. RMN ¹H (CDCl₃, δ): 2,21 (c, J = 7,5 Hz, 2H, CH₂), 1,93 (s a, 1H, OH), 1,12 (t, J = 7,5 Hz, 3H, CH₃). RMN ¹³C (CDCl₃, δ): 87,7, 77,6, 13,7, 12,3 (la señal de CD₂ está ausente).

1,1 -Dideutero-1-bromo-pent-2-ina (10) A una solución de **(9)** (70,5 g) y piridina (16,5 ml) en éter dietílico seco (280 ml), se le añadieron gota a gota 32,3 ml de PBr₃ en 50 ml de éter dietílico con agitación durante 30 min a -10 °C en una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se dejó calentar gradualmente hasta t.a. durante 1 h. Se añadió una pequeña cantidad de hidroquinona, y después, la mezcla se sometió a reflujo durante 4,5 h. Después, la mezcla de reacción se enfrió hasta -10 °C y se añadieron 350 ml de agua fría. Cuando el residuo se disolvió, se añadieron NaCl saturado (350 ml) y hexano (300 ml) y la capa orgánica se separó. La fracción acuosa se lavó con éter dietílico (2 x 150 ml), y las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con NaCl (2 x 50 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ en presencia de trazas de hidroquinona y trietilamina. El disolvente se retiró a presión atmosférica y después se retiró por destilación la fracción en ebullición a 147-155 °C. Como alternativa, al alcanzar 100 °C, se detuvo la destilación a presión atmosférica y el producto se destiló a 77-84 °C (25 mm de Hg). Rendimiento: 107 g de líquido transparente. HRMS, *m/z* calculado para C₅H₅D₂Br: 147,9855; encontrado: 146,9814, 148,9835. IR (CCl₄): $\tilde{\nu}$ = 2251 cm⁻¹. RMN ¹H (CDCl₃, δ): 2,23 (c, J = 7,5 Hz, 2H, CH₂), 1,11 (t, J = 7,5 Hz, 3H, CH₃). RMN ¹³C (CDCl₃, δ): 89,3, 74,5, 13,4, 12,6 (la señal de CD₂ está ausente).

1,1,4,4-Tetradutero-octa-2,5-diin-1-ol (12) Se añadió bromuro de etilmagnesio, preparado a partir de bromuro de etilo (53 ml) y virutas de magnesio (15,8 g) en 400 ml de THF seco, en pequeñas porciones, a 350 ml de THF seco, simultáneamente con burbujeo de acetileno a través de esta mezcla (a aprox. caudal de 25 l/h) con agitación vigorosa. La solución de reactivo de Grignard se alimentó a la mezcla a aprox. 10 ml por 2-5 min. Cuando se añadió todo el bromuro de etilmagnesio (después de aprox. 2,5 h), se burbujeó acetileno a través del sistema durante otros 15 min. Se añadieron deutero paraform (17,3 g) y CuCl (0,2 g) en atmósfera de argón y la mezcla de reacción se calentó a reflujo sin agitar durante 2,5 h, hasta que se disolvió el deutero paraform, para producir una solución de **(11)**. Se añadió gota a gota una solución de bromuro de etilmagnesio, preparado a partir de 14,8 g de magnesio y 50 ml de bromuro de etilo en 250 ml de THF seco, a la mezcla de reacción durante 20 min. Cuando cesó la emanación de gas, se colocó un condensador y se retiraron por destilación 250 ml de disolvente. Después, la mezcla de reacción se enfrió a 30 °C y se añadió CuCl (1,4 g) seguido de una adición gota a gota, durante 15 min, del bromuro **(10)** (69 g). Después, la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 5 h, se enfrió ligeramente (se formará un precipitado si el enfriamiento es demasiado rápido) y se vertió en una suspensión de hielo triturado (1-1,2 kg) y 40 ml de H₂SO₄ concentrado. La mezcla se lavó con hexano (600 ml). La fracción orgánica se separó, y la fracción acuosa se extrajo adicionalmente con 5:1 de hexano:EtOAc (2 x 400 ml). La fracción orgánica combinada se lavó, con NaCl saturado, seguido de NaHCO₃ saturado y NaCl. La mayor parte del disolvente se retiró a presión atmosférica en presencia de trazas de hidroquinona y trietilamina. El residuo se lavó abundantemente a través de 100 ml de gel de sílice (eluyente: 7:1 de hexano:EtOAc). La mayor parte del disolvente se retiró a presión atmosférica y el resto en un rotavapor. Se usaron 49,5 g (85 %) del compuesto del título obtenido sin purificación adicional. HRMS, *m/z* calculado para C₈H₆D₄O: 126,0979; encontrado: 126,0899. IR (CCl₄): $\tilde{\nu}$ = 3622 cm⁻¹. RMN ¹H (CDCl₃, δ): 2,16 (c, J = 7,5 Hz, 2H, CH₂), 1,85 (s a, 1H, OH), 1,11 (t, J = 7,5 Hz, 3H, CH₃). RMN ¹³C (CDCl₃, δ): 82,3, 80,4, 78,3, 72,6, 13,7, 12,2.

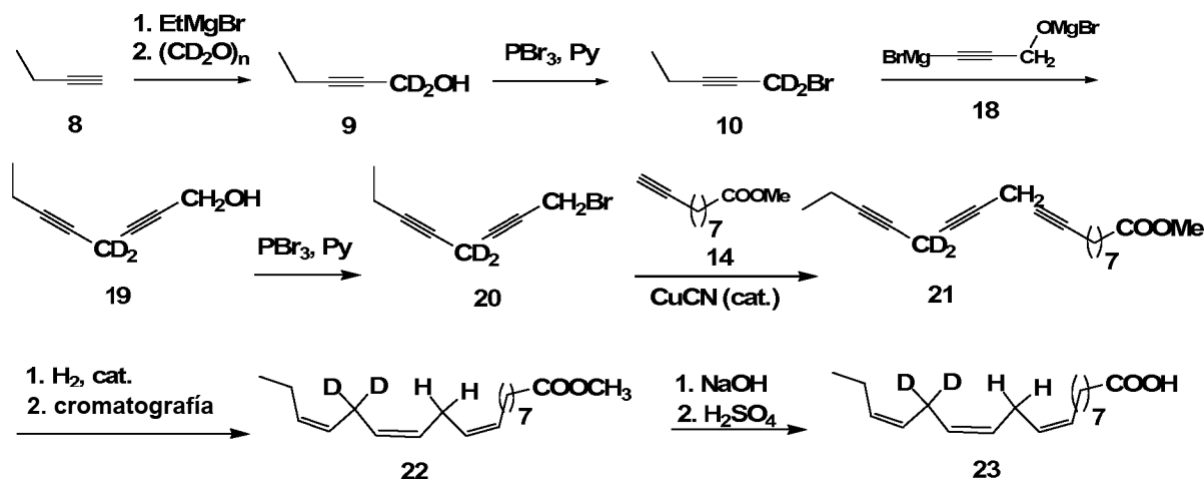
1,1,4,4-Tetradutero-1-bromo-octa-2,5-diina (13) se sintetizó como se describe para bromuro **(3)**; 2 ml de piridina, 14 ml PBr₃ y 250 ml de éter dietílico se usaron para 54,2 g de alcohol **(12)**. El producto se purificó por destilación a 4 mm de Hg. Rendimiento: 53 g (65 %) de **(13)**; p.e. 100-110 °C. HRMS, *m/z* calculado para C₈H₅D₄Br: 188,0135; encontrado: 187,0136, 189,0143. IR (CCl₄): $\tilde{\nu}$ = 2255 cm⁻¹. RMN ¹H (CDCl₃, δ): 2,13 (c, J = 7,5 Hz, 2H, CH₂); 1,07 (t, J = 7,5 Hz, 3H, CH₃). RMN ¹³C (CDCl₃, δ): 82,5, 81,8, 75,0, 72,0, 13,6, 12,2.

Éster metílico del ácido 11,11,14,14-tetradutero-octadeca-8,12,15-triinoico (15) se sintetizó de una manera similar a la que se describe para el éster metílico del ácido 11,11-dideutero-octadeca-9,12-diinoico **(5)**. Se añadió rápidamente Cul (97 g) a 400 ml de DMF (destilado recientemente para CaH₂), seguido de NaI seco (77,5 g), K₂CO₃ (104,5 g). Después se añadió éster metílico del ácido dec-9-inoico **(14)**; 47,5 g en una porción, seguido de bromuro **(13)** (48,5 g). Se usaron 250 ml adicionales de DMF para enjuagar los reactivos de las paredes del matraz en la mayor parte de la mezcla de reacción, que después se agitó durante 12 h. Después, se añadieron 500 ml de NH₄Cl acuoso saturado con agitación, seguido en unos pocos minutos por NaCl acuoso saturado (300 ml), seguido de una mezcla 5:1 de hexano:EtOAc (300 ml). La mezcla se agitó adicionalmente durante 15 min y después se filtró a través de un filtro de vidrio Schott de malla fina. El residuo se lavó varias veces con una mezcla de hexano:EtOAc. La fracción orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo adicionalmente (3 x 200 ml). La fracción orgánica combinada se secó (Na₂SO₄), se añadieron trazas de hidroquinona y difenilamina y el disolvente se evaporó al vacío. El residuo se destiló inmediatamente a 1 mm de Hg, para dar 45,8 g (62 %) de una fracción en ebullición de 173-180 °C. Se llevó a cabo una cristalización adicional como sigue a continuación. El éster **(15)** se disolvió en hexano (500 ml) y se enfrió hasta -50 °C. Los cristales formados se lavaron en hexano frío. El rendimiento de esta etapa es del 80 %. HRMS, *m/z* calculado para C₁₉H₂₂D₄O₂: 290,2180; encontrado: 290,2200. RMN ¹H (CDCl₃, δ): 3,66 (s, 3H, OCH₃), 2,29 (t, J = 7,5 Hz, 2H, CH₂), 2,15 (m, 4H, CH₂), 1,61 (m, 2H, CH₂), 1,47 (m, 2H, CH₂), 1,30 (m, 6H, CH₂), 1,11 (t, J = 7,5 Hz, 3H, CH₃). RMN ¹³C (CDCl₃, δ): 174,1, 82,0, 80,6, 74,7, 74,6, 73,7, 73,0, 51,3, 33,9, 28,9, 28,6, 28,52, 28,49, 24,8, 18,5, 13,7, 12,2.

Éster metílico del ácido 11,11,14,14-tetradéutero-*cis,cis,cis*-octadeca-8,12,15-trienoico (16) se sintetizó de un modo similar al que se describió para el éster metílico del ácido 11,11-dideutero-*cis,cis*-octadeca-9,12-dienoico ('6'). Una suspensión de tetrahidrato de acetato de níquel (42 g) en EtOH al 96 % (400 ml) se calentó con agitación a aprox. 50-60 °C hasta que la sal se disolvió. El matraz se lavó abundantemente con hidrógeno, y después se añadieron gota a gota 130 ml de solución de NaBH₄ (preparado mediante unos 15 min de agitación de suspensión de NaBH₄ (7,2 g) en EtOH (170 ml) seguido de filtración) durante 20-30 min con agitación. En 15-20 min, se añadió etilendiamina (52 ml) en una porción, seguido en 5 min por una adición de (15) (73 g) en EtOH (200 ml). La mezcla de reacción se agitó muy vigorosamente en hidrógeno (1 atm). La absorción de hidrógeno se detuvo en aproximadamente 2 h. A la mezcla de reacción, se le añadieron 900 ml de hexano y 55 ml de AcOH enfriado con hielo, seguido de agua (15 ml). Se añadió hexano (400 ml) y la mezcla se dejó separar. Las fracciones acuosas se extrajeron mediante una mezcla 5:1 de hexano:EtOAc. La finalización de la extracción se controló por TLC. La fase orgánica combinada se lavó con una solución diluida de H₂SO₄, seguido de NaHCO₃ saturado y NaCl saturado y después se secó sobre Na₂SO₄. El disolvente se retiró a presión reducida. Se preparó gel de sílice para purificación como se describe para el (6). Se usaron 30 g de esta sílice por gramo de producto. La mezcla de reacción se disolvió en un pequeño volumen de hexano y se aplicó al gel de sílice modificado con plata y se lavó previamente con un gradiente de EtOAc al 1-5 %. Cuando se lavaron los contaminantes no polares (control por TLC), el producto se eluyó con EtOAc al 10 % y el disolvente se evaporó al vacío para dar 42 g del éster del título (16) en forma de un líquido incoloro. HRMS, *m/z* calculado para C₁₉H₂₈D₄O₂: 296,2649; encontrado: 296,2652. IR (CCl₄): $\tilde{\nu}$ = 1740 cm⁻¹. RMN ¹H (CDCl₃, δ): 5,4 (m, 6H, CH-doble enlace), 3,68 (s, 3H, OCH₃), 2,33 (t, J = 7,5 Hz, 2H, CH₂), 2,09 (m, 4H, CH₂), 1,62 (m, 2H, CH₂), 1,33 (m, 8H, CH₂), 0,97 (t, J = 7,5 Hz, 3H, CH₃). RMN ¹³C (CDCl₃, δ): 174,1, 131,9, 130,2, 128,2, 128,1, 127,7, 126,9, 51,3, 34,0, 29,5, 29,04, 29,02, 27,1, 25,5, 24,9, 20,5, 14,2.

Ácido 11,11,14,14-tetradéutero-*cis,cis,cis*-octadeca-8,12,15-trienoico (17) Una solución de KOH (1,5 g, 27 mmol) en agua (2,6 ml) se añadió a una solución de éster (16) (1,00 g, 3,4 mmol) en MeOH (15 ml). La mezcla de reacción se agitó a 40-50 °C durante 2 h (control por TLC) y después se diluyó con 20 ml de agua. Se retiraron dos tercios del disolvente (rotavap). Se añadió ácido sulfúrico diluido al residuo a pH 2, seguido de éter dietílico con un pentano pequeño (50 ml). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se lavó con éter dietílico con un pentano pequeño (3 x 30 ml). Las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con NaCl acuoso saturado y después se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se evaporó para dar 0,95 g de (17) (100 %). IR (CCl₄): $\tilde{\nu}$ = 1741, 1711 cm⁻¹.

Ejemplo 3. Síntesis de ácido 14,14-D2-linolénico



4,4-Dideutero-octa-2,5-diin-1-ol (19) A una solución de bromuro de etilmagnesio, preparado a partir de bromuro de etilo (9,2 ml, 123,4 mmol) y virutas de magnesio (2,74 g, 112,8 mmol) en 40 ml de THF seco, en un baño de hielo con agitación, se le añadió alcohol propargílico (3,16 g, 56,4 mmol) en THF (5 ml) durante 10-15 min. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta t.a. y se agitó durante otras 2 h, con calentamiento ocasional a 40 °C. Al dianión generado de esta manera, se le añadieron 0,13 g de CuCl, seguido de la adición lenta (durante 15 min) de bromuro (10) (6,9 g) en THF (20 ml). Después, la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a t.a. y después se sometió a reflujo durante 5 h. Después, la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 5 h, se enfrió ligeramente (se formará un precipitado si el enfriamiento es demasiado rápido) y se vertió en una suspensión de hielo triturado y 2,5 ml de H₂SO₄ concentrado. La mezcla se lavó con hexano (600 ml). La fracción orgánica se separó y la fracción acuosa se extrajo adicionalmente con 5:1 de hexano:EtOAc. La fracción orgánica combinada se lavó, con NaCl saturado, seguido de NaHCO₃ saturado y NaCl, y se secó sobre Na₂SO₄. La mayor parte del disolvente se retiró a presión atmosférica en presencia de trazas de hidroquinona y trietilamina. El producto se purificó por CC (hexano:EtOAc = 15:1) para dar 3,45 g (59 %) del producto 19. HRMS, *m/z* calculado para C₈H₈D₂O: 124,0855; encontrado: 124,0849. IR (CCl₄): $\tilde{\nu}$ = 3622 cm⁻¹. RMN ¹H (CDCl₃, δ): 4,21 (m, 2H, CH₂), 2,4 (m, 1H, OH), 2,16 (c, J = 7,5 Hz, 2H, CH₂), 1,11 (t, J = 7,5 Hz, 3H, CH₃). RMN ¹³C (CDCl₃, δ): 82,3, 80,4, 78,3, 72,6, 51,0, 13,7, 12,2.

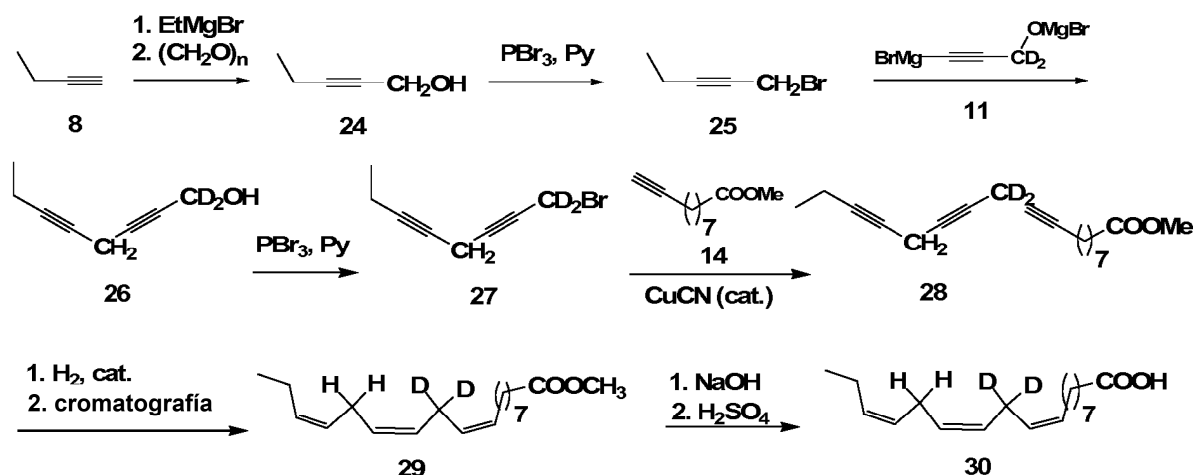
4, 4-Dideutero-1-bromo-octa-2,5-diina (20) se sintetizó como se describe para el (3), excepto que todo el disolvente en un rotavap. A partir de 3,4 g (27 mmol) de (19), se obtuvieron 3,9 g (75 %) del bromuro (20), el cual se usó sin purificación adicional. HRMS, m/z calculada para $C_8H_7D_2Br$: 186,0011; encontrado: 185,0019, 187,0012. IR (CCl_4): $\tilde{\nu}$ = 2255 cm^{-1} . RMN ($CDCl_3$, δ): 3,88 (s a, 2H, CH_2), 2,13 (c, J = 7,5 Hz, 2H, CH_2), 1,07 (t, J = 7,5 Hz, 3H, CH_3). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ): 82,5, 81,8, 75,0, 72,0, 14,8, 13,6, 12,2.

Éster metílico del ácido 14,14-dideutero-octadeca-8,12,15-trienoico (21) se sintetizó como se describe para el (5). El producto obtenido a partir de 9,7 g CuI, 7,8 g NaI, 10,5 g K_2CO_3 , 4,85 g de bromuro (20), 4,75 g de éster metílico (14) y 40 ml de DMF anhidra, se purificó por CC (25:1 de hexano:EtOAc) para dar 4,5 g (60 %) del compuesto del título. HRMS, m/z calculado para $C_{19}H_{24}D_2O_2$: 288,2056; encontrado: 288,2046. RMN ^1H ($CDCl_3$, δ): 3,66 (s, 3H, OCH_3), 3,12 (m, 2H, CH_2), 2,29 (t, J = 7,5 Hz, 2H, CH_2), 2,15 (m, 4H, CH_2), 1,61 (m, 2H, CH_2), 1,47 (m, 2H, CH_2), 1,30 (m, 6H, CH_2), 1,11 (t, J = 7,5 Hz, 3H, CH_3). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ): 174,1, 82,0, 80,6, 74,7, 74,6, 73,7, 73,0, 51,3, 33,9, 28,9, 28,6, 28,52, 28,49, 24,8, 18,5, 13,7, 12,2, 9,7.

Éster metílico del ácido 14,14-dideutero-cis,cis,cis-octadeca-8,12,15-trienoico (22) se sintetizó como se describe para el derivado de ácido linoleico (6). Para una reducción de 4,5 g de (21), se usaron 2,6 g de tetrahidrato de acetato de níquel y 3,2 ml de etilendiamina. El producto se purificó en gel de sílice impregnado con $AgNO_3$ como se describe para el (6). HRMS, m/z calculado para $C_{19}H_{30}D_2O_2$: 294,2526; encontrado: 294,2529. IR (CCl_4): $\tilde{\nu}$ = 1740 cm^{-1} . RMN ^1H ($CDCl_3$, δ): 5,37 (m, 6H, CH-doble enlace), 3,68 (s, 3H, OCH_3), 2,82 (m, 2H, CH_2), 2,33 (t, J = 7,5 Hz, 2H, CH_2), 2,09 (m, 4H, CH_2), 1,62 (m, 2H, CH_2), 1,33 (m, 8H, CH_2), 0,97 (t, J = 7,5 Hz, 3H, CH_3). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ): 174,1, 131,9, 130,2, 128,2, 128,1, 127,7, 126,9, 51,3, 34,0, 29,5, 29,1, 29,04, 29,02, 27,1, 25,5, 24,9, 20,5, 14,2.

Ácido 14,14-dideutero-cis,cis,cis-octadeca-8,12,15-trienoico (23) A una solución de (22) (1 g, 3,4 mmol) en MeOH (15 ml), se le añadió una solución de KOH (1,5 g, 27 mmol) en agua (2,6 ml) en una porción. Después, la mezcla de reacción se procesó como se describe para el (7) para producir 0,94 g (99 %) del ácido del título. IR (CCl_4): $\tilde{\nu}$ = 1741, 1711 cm^{-1} .

Ejemplo 4. Síntesis de ácido 11,11-D2-linolénico



Pent-2-in-1-ol (24) Se burbujeó butin-1 ((8); 10,4 g) a través de una solución enfriada con hielo preparada a partir de bromoetano (11,2 ml) y virutas de magnesio (3,6 g) en THF (100 ml). La mezcla de reacción se dejó calentar hasta t.a. y después se agitó durante 15 min. Después, la mezcla se calentó hasta 30 °C, momento en el cual se disolvió todo el precipitado. Se retiró el calentamiento y la mezcla se agitó durante otros 30 min, y después se añadió paraform (3 g) en una porción. La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 3 h (toda el paraform se disolvió), después se enfrió a t.a., se vertió en una mezcla de hielo triturado (80 g) y 8 ml de H₂SO₄ conc. y se extrajo con éter dietílico. La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ saturado y NaCl, y se secó sobre Na₂SO₄. El disolvente se retiró en un rotavap, y el residuo (7,56 g; 90 %) se usó sin purificación adicional. HRMS, m/z calculado para C_5H_8O : 84,0575; encontrado: 84,0583.

-1-Bromo-pent-2-ina (25) A una solución de (24) (11,7 g) y piridina (2,66 ml) en éter dietílico seco (34 ml), se le añadieron gota a gota 5,2 ml de PBr₃ en 5 ml de éter dietílico con agitación durante 30 min a -10 °C en una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se dejó calentar gradualmente hasta t.a. durante 1 h. Se añadió una cantidad catalítica de hidroquinona, y después, la mezcla se sometió a reflujo durante 4,5 h. Después, la mezcla de reacción se enfrió hasta -10 °C y se añadieron 35 ml de agua fría. Cuando el residuo se disolvió, se añadieron NaCl saturado (35 ml) y éter dietílico (30 ml) y la capa orgánica se separó. La fracción acuosa se lavó con éter dietílico (2x15 ml), y las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con NaCl (2 x 400 ml) y se secaron sobre MgSO₄. El disolvente se

retiró a presión atmosférica, y después a presión reducida (25 mm de Hg), se recogió la fracción de 60-90 °C. Rendimiento: 11,1 g (84 %). HRMS, m/z calculado para C_5H_7Br : 145,9731; encontrado: 144,9750, 146,9757.

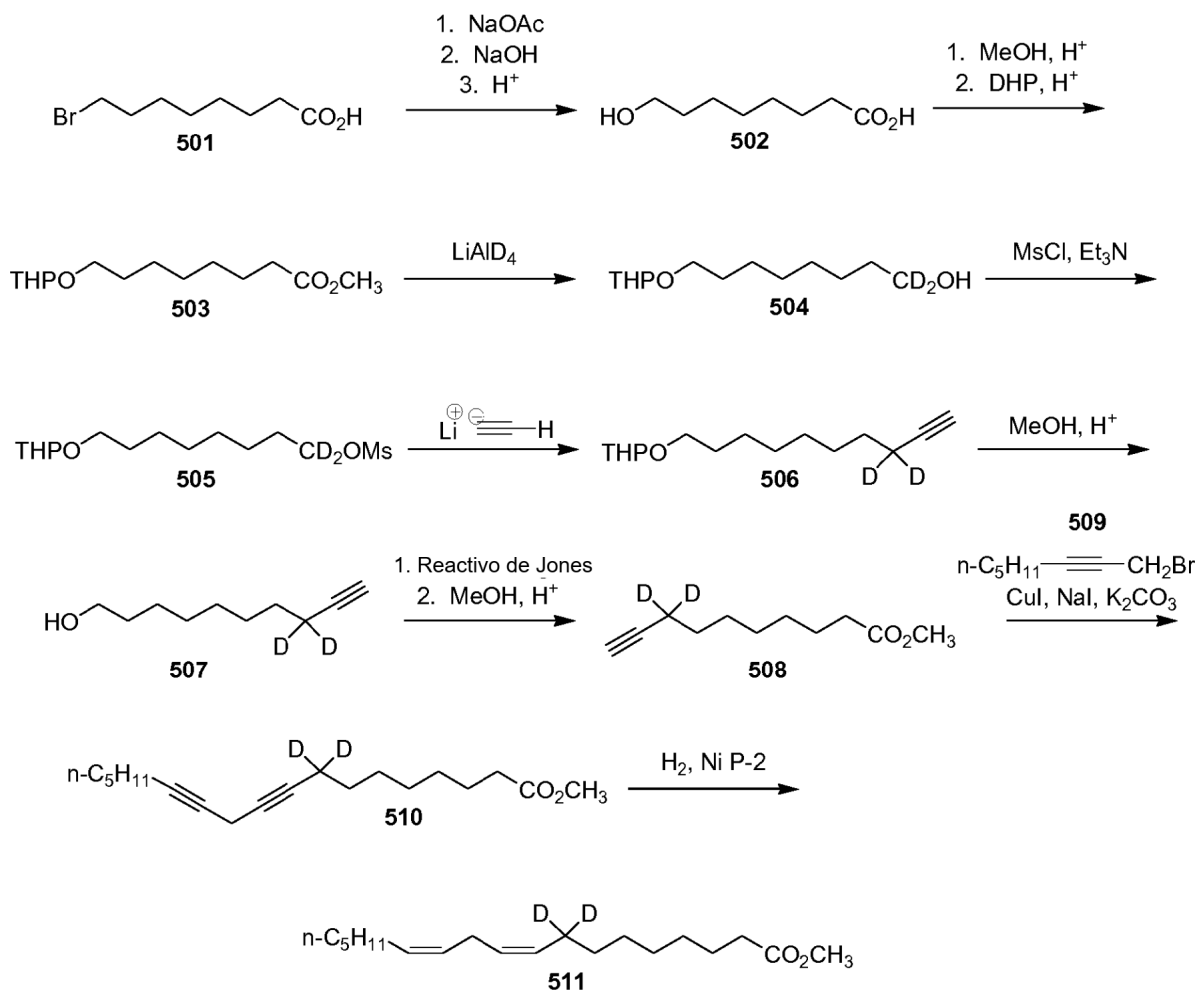
1,1-Dideutero-octa-2,5-diin-1-ol (26) se sintetizó como se describe para el (12) con un rendimiento del 87 %. HRMS, m/z calculado para $C_8H_8D_2O$: 124,0855; encontrado: 124,0868. IR (CCl_4): $\tilde{\nu}$ = 3622 cm^{-1} . RMN ($CDCl_3$, δ): 2,65 (m, 2H, CH_2), 2,4 (m, 1H, OH), 2,1 (c, 2H, CH_2), 1,09 (t, 3H, CH_3).

1,1-Dideutero-1-bromo-octa-2,5-diina (27) se sintetizó como se describe para el (3), excepto que se retiró todo el disolvente en un rotavap. El producto se purificó por destilación a presión reducida. Rendimiento: 86 % (p.e. 100-105 °C a 4 mm de Hg). HRMS, m/z calculada para $C_8H_7D_2Br$: 186,0011; encontrado: 184,9948, 187,9999. IR (CCl_4): $\tilde{\nu}$ = 2255 cm^{-1} . RMN ^1H ($CDCl_3$, δ): 2,66 (m, 2H, CH_2), 2,1 (c, 2H, CH_2), 1,09 (t, 3H, CH_3).

Éster metílico del ácido 11,11-dideutero-octadeca-8,12,15-trienoico (28) se sintetizó como se describe para el (5). El producto obtenido a partir de 7,1 g CuI, 5,66 g NaI, 7,65 g K_2CO_3 , 3,55 g de bromuro (27), 3,47 g de éster metílico (14) y 30 ml de DMF anhidra, se purificó por CC (25:1 de hexano:EtOAc) para dar 3,7 g del compuesto del título. HRMS, m/z calculado para $C_{19}H_{24}D_2O_2$: 288,2056; encontrado: 288,2069. RMN ^1H ($CDCl_3$, δ): 3,7 (s, 3H, OCH_3), 3,15 (s a, 2H, CH_2), 2,35 (m, 2H, CH_2), 2,17 (m, 4H, CH_2), 1,61 (m, 2H, CH_2), 1,48 (m, 2H, CH_2), 1,35 (m, 6H, CH_2), 1,11 (t, 3H, CH_3).

Éster metílico del ácido 11,11-dideutero-cis,cis,cis-octadeca-8,12,15-trienoico (29) se sintetizó como se describe para el derivado del ácido linoleico (6). Para una reducción de 3,7 g de (28), se usaron 2,16 g de tetrahidrato de acetato de níquel y 2,62 ml de etilendiamina. El producto se purificó sobre gel de sílice impregnado con $AgNO_3$ como se describe para (6) para dar 1,5 g. HRMS, m/z calculado para $C_{19}H_{30}D_2O_2$: 294,2526; encontrado: 294,2402. IR (CCl_4): $\tilde{\nu}$ = 1740 cm^{-1} . RMN ^1H ($CDCl_3$, δ): 5,37 (m, 6H, CH-doble enlace), 3,6 (s, 3H, OCH_3), 2,82 (m, 2H, CH_2), 2,33 (t, o = 7,5 Hz, 2H, CH_2), 2,09 (m 4H, CH_2), 1,62 (m, 2H, CH_2), 1,33 (m, 8H, CH_2), 0,97 (t, J = 7,5 Hz, 3H, CH_3). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ): 174,1, 131,9, 130,2, 128,2, 128,1, 127,7, 126,9, 51,3, 34,0, 29,5, 29,1, 29,04, 29,02, 27,1, 25,5, 24,9, 20,5, 14,2.

Ácido 11,11-dideutero-cis,cis,cis-octadeca-8,12,15-trienoico (30) A una solución de (29) (1,5 g, 5,1 mmol) en MeOH (7,5 ml), se le añadió una solución de KOH (1,5 g, 27 mmol) en agua (3 ml) en una porción. Después, la mezcla de reacción se procesó como se describe para el (17) para producir 0,9 g del ácido del título. IR (CCl_4): $\tilde{\nu}$ = 1741, 1711 cm^{-1} . RMN ^1H ($CDCl_3$, δ): 11,2 (s a, 1 H, COOH), 5,37 (m, 6H, CH-doble enlace), 2,83 (m, 2H, CH_2), 2,35 (t, J = 7,5 Hz, 2H, CH_2), 2,06 (m 4H, CH_2), 1,63 (m, 2H, CH_2), 1,32 (m, 8H, CH_2), 0,97 (t, J = 7,5 Hz, 3H, CH_3). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ): 180,4, 131,9, 130,2, 128,3, 128,1, 127,6, 127,1, 34,1, 29,5, 29,1, 29,03, 28,98, 27,2, 25,5, 24,6, 20,5, 14,2.

Ejemplo 5. Síntesis de éster metílico del ácido 8,8-D2-linoleico

Ácido 8-hidroxiocetanoico (502). Una solución de ácido 8-bromocaproílico (501, 37,5 g, 168 mmol), acetato sódico anhidro (60,0 g, 732 mmol) y yoduro sódico (1,0 g, 6,7 mmol) en DMF (200 ml) se agitó a 110-120 °C durante 8 h. La mezcla de reacción se enfrió a t.a., se añadió una solución de hidróxido potásico (28 g, 0,5 mol) en agua (150 ml), y la mezcla se agitó a 100 °C durante otra hora. La mezcla de reacción se enfrió a t.a. y se vertió en una suspensión de hielo y ácido sulfúrico concentrado (45 ml). La solución obtenida se saturó con NaCl y se extrajo (9 x 150 ml) con una mezcla de EtOAc y éter de petróleo (1:1). Las fracciones orgánicas combinadas se lavaron dos veces con NaCl saturado y se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se evaporó para dar 26,5 g (98 %) del producto, el cual se usó sin purificación adicional. Se purificó adicionalmente una pequeña cantidad del producto por CC sobre sílice (eluyente: éter de petróleo:EtOAc = 2:1) y se caracterizó. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,27-1,39 (m, 6H), 1,50-1,68 (m, 4H), 2,32 (t, 2H, J = 7,5 Hz), 3,62 (t, 2H, J = 6,5 Hz), 6,87 (s a, 2H).

8-(Tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)octanoato de metilo (503). Se disolvió ácido 8-hidroxiocetanoico (502; 26,3 g, 164 mmol) en metanol (500 ml) que contenía cloruro de acetilo (3,5 ml). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 5 h y el disolvente se retiró al vacío. Al residuo disuelto en CH₂Cl₂ (200 ml), se le añadió 3,4-dihidro-2H-pirano (29 ml, 318 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 20 min. Después de la adición de 5 ml de trietilamina, el disolvente se retiró al vacío, y el residuo se disolvió en éter de petróleo (100 ml) y se lavó con agua. La capa orgánica se purificó por lavado abundante en una columna pequeña de sílice (sílice, 100 ml; eluyente: de éter de petróleo a éter de petróleo:EtOAc = 20:1). El tratamiento produjo 38,2 g (90 %) del producto, el cual se usó sin purificación adicional. Se purificó adicionalmente una pequeña cantidad del producto por CC sobre sílice (eluyente: éter de petróleo: EtOAc = 15:1) y se caracterizó. IR (CCl₄): $\tilde{\nu}$ = 1741 cm⁻¹. RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 1,20-1,36 (m, 6H), 1,40-1,82 (m, 10H), 2,23 (t, 2H, J = 7,5 Hz), 3,30 (dt, 1 H, J = 9,5 Hz, 6,5 Hz), 3,39-3,46 (m, 1H), 3,59 (s, 3H), 3,65 (dt, 1 H, J = 9,5 Hz, 7,0 Hz), 3,76-3,83 (m, 1H), 4,47-4,52 (m, 1H).

[1,1-D₂]-8-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)octan-1-ol (504). A una solución en agitación de éster (503) (37,5 g, 145 mmol) en éter dietílico (100 ml) en un baño de hielo, se le añadió gota a gota una suspensión de LiAlD₄ (4,0 g, 95 mmol) en éter dietílico (300 ml) durante 1 h. A la mezcla de reacción fría, se le añadieron agua (4 ml), NaOH al 15 % NaOH (4 ml) y agua (12 ml) con agitación. El precipitado se filtró y se lavó con éter etílico. La evaporación al vacío dio 33,5 g (99 %) del producto. Se purificó adicionalmente una pequeña cantidad del producto por CC sobre

silíce (eluyente: éter de petróleo: EtOAc = 10:1) y se caracterizó. IR (CCl₄): $\tilde{\nu}$ = 3638, 3499 cm⁻¹. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,22-1,33 (m, 8H), 1,42-1,56 (m, 8H), 1,61-1,69 (m, 1H), 1,71-1,80 (m, 1H), 2,38 (s, 1H), 3,31 (dt, 1 H, J = 9,5 Hz, 6,5 Hz), 3,40-3,46 (m, 1H), 3,66 (dt, 1 H, J = 9,5 Hz, 7,0 Hz), 3,76-3,84 (m, 1H), 4,49-4,53 (m, 1H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 19,5, 25,3, 25,5, 26,0, 29,2, 29,3, 29,5, 30,6, 32,4, 62,1, 67,5, 98,7.

Metanosulfonato de [1,1-D₂]-8-(tetrahidro-2H-pirano-2-iloxi)octilo (505). A una solución de alcohol (504) (33,4 g, 144 mmol) y trietilamina (45 ml, 323 mmol) en éter dietílico (300 ml) a 0 °C, se le añadió gota a gota una solución de MsCl (14,2 ml, 183 mmol) en éter dietílico (100 ml) durante 1 h con agitación. La mezcla de reacción se calentó hasta t.a. y se trató con agua. La fase orgánica, combinada con lavados (2 x 50 ml) de la fase acuosa con Et₂O, se lavó dos veces con NaCl saturado, se secó sobre Na₂SO₄ y se decantó. Esta se purificó por lavado abundante en una columna pequeña de sílice (sílice, 100 ml; éter de petróleo:EtOAc = 10:1). El tratamiento produjo 43,7 g (98 %) de metanosulfonato (505). IR (CCl₄): $\tilde{\nu}$ = 1739 cm⁻¹. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,26-1,41 (m, 8H), 1,44-1,59 (m, 6H), 1,63-1,84 (m, 4H), 2,97 (s, 3H), 3,32 (dt, 1 H, J = 9,5 Hz, 6,5 Hz), 3,42-3,50 (m, 1H), 3,69 (dt, 1 H, J = 9,5 Hz, 7,0 Hz), 3,78-3,86 (m, 1H), 4,52-4,56 (m, 1H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 19,6, 25,2, 25,4, 26,0, 28,7, 28,8, 29,1, 29,5, 30,7, 37,2, 62,3, 67,4, 98,8.

2-([8,8-D₂]-dec-9-in-1-iloxi)tetrahidro-2H-pirano (506). Se añadió gota a gota metanosulfonato (505) (43,5 g, 140 mmol) en DMSO (100 ml) con agitación durante 1 h a una suspensión de un complejo de etilendiamina - acetilenuro de litio (70 g, 0,76 mol) en DMSO (200 ml), y después, la mezcla se agitó durante 90 min. La mezcla de reacción se vertió en hielo, se extrajo (Et₂O, 3 x 150 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó. Esta se purificó por lavado abundante en una columna pequeña de sílice (sílice, 100 ml; éter de petróleo). La retirada del disolvente (rotavap) dio 25,3 g (75 %) del producto. Se purificó adicionalmente una pequeña cantidad del producto por CC sobre sílice (eluyente: éter de petróleo: EtOAc = 25:1) y se caracterizó. IR (CCl₄): $\tilde{\nu}$ = 3314 cm⁻¹. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,21-1,38 (m, 8H), 1,42-1,57 (m, 8H), 1,62-1,70 (m, 1H), 1,73-1,83 (m, 1H), 1,89 (s, 1H), 3,32 (d.t., 1 H, J = 9,5 Hz, 6,5 Hz), 3,42-3,50 (m, 1H), 3,68 (d.t., 1 H, J = 9,5 Hz, 7,0 Hz), 3,78-3,86 (m, 1H), 4,51-4,54 (m, 1H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 19,6, 25,4, 26,1, 28,1, 28,5, 28,9, 29,2, 29,6, 30,6, 30,7, 62,1, 67,5, 68,0, 98,7.

[8,8-D₂]-dec-9-in-1-ol (507). Se disolvió éter (506) (25 g, 104 mmol) en metanol (300 ml) que contenía *para*-toluenosulfonato de piridinio (0,2 g). La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 3 h, se inactivó con Et₃N (1 ml), el disolvente se retiró al vacío, el residuo se disolvió en éter de petróleo y se filtró a través de una pequeña cantidad de gel de sílice. El disolvente se evaporó para dar 15,4 g (95 %) del producto. Se purificó adicionalmente una pequeña cantidad del producto por CC sobre sílice (eluyente: éter de petróleo: EtOAc = 15:1) y se caracterizó. IR (CCl₄): $\tilde{\nu}$ = 3638, 3508, 3314 cm⁻¹. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,22-1,40 (m, 8H), 1,42-1,56 (m, 4H), 1,91 (s, 1H), 2,29 (s, 1H), 3,59 (t, J = 6,5 Hz, 2H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 25,6, 28,1, 28,5, 29,0, 29,2, 32,6, 62,8, 68,1, 84,6.

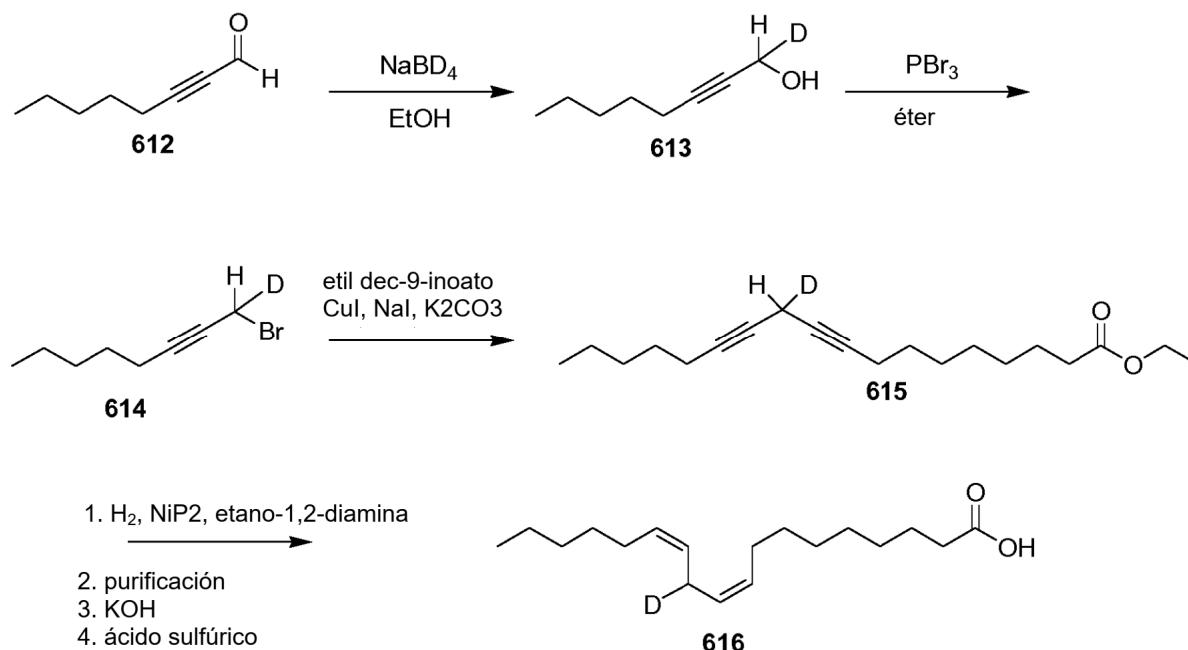
[8,8-D₂]-metil dec-9-inoato (508). A una solución de trióxido de cromio (24 g, 0,24 mol) y ácido sulfúrico concentrado (21 ml) en agua (100 ml) en un matraz de fondo redondo de dos bocas en un baño de agua a 30 °C con agitación, se le añadió gota a gota una solución de alcohol (507) (15,5 g, 99 mmol) en acetona (150 ml) durante 90 min. Tras la adición, la mezcla de reacción se agitó durante otros 15 min y el exceso de oxidante se inactivó con alcohol isopropílico. La mezcla se vertió en agua fría y se extrajo con éter dietílico (5 x 50 ml). Las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con NaCl saturado, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y el disolvente se retiró al vacío. El residuo se disolvió en metanol (200 ml) y tras la adición de ácido sulfúrico concentrado (1 ml) se sometió a reflujo durante 90 min. El ácido se inactivó con trietilamina (6,5 ml, 47 mmol), el disolvente se retiró al vacío y el residuo se purificó por CC sobre sílice (eluyente: éter de petróleo: EtOAc = 50:1) para dar 12,6 g (69 % contando por alcohol (507)) de éster (508) y se caracterizó. IR (CCl₄): $\tilde{\nu}$ = 3314, 1740 cm⁻¹. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,19-1,38 (m, 6H), 1,41-1,48 (m, 2H), 1,51-1,61 (m, 2H), 1,88 (s, 1H), 2,25 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 3,60 (s, 3H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 24,7, 28,0, 28,3, 28,6, 28,8, 33,9, 51,3, 68,1, 84,4, 174,0.

[8,8-D₂]-metil octadeca-9,12-diinoato (510). A DMF (20 ml) se le añadió con agitación CuI (3,9 g, 20 mmol), seguido de NaI (3,1 g, 21 mmol), K₂CO₃ (4,2 g, 30 mmol), éster (508) (1,9 g, 10,3 mmol) y bromuro (509) (2,04 g, 10,8 mmol, sintetizado como se describe en [2]). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 12 h. Se añadió cloruro de amonio acuoso saturado (20 ml) a la mezcla, seguido de NaCl saturado (15 ml). El precipitado y la fase acuosa se lavaron con éter de petróleo. Las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con cloruro sódico saturado, se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron al vacío. El residuo se purificó por CC sobre sílice (eluyente: éter de petróleo: EtOAc = 50:1) para dar 2,47 g (82 %) del producto. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0,86 (t, J = 7,0 Hz, 3H), 1,22-1,36 (m, 10H), 1,40-1,50 (m, 4H), 1,55-1,64 (m, 2H), 2,09-2,15 (m, 2H), 2,28 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 3,09 (t, J = 2,5 Hz, 2H), 3,64 (s, 3H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 9,6, 13,9, 18,6, 22,1, 24,8, 28,3, 28,4, 28,5, 28,7, 28,9, 31,0, 34,0, 51,4, 74,4, 74,5, 80,2, 80,4, 174,2.

[8,8-D₂]-octadeca-9,12-dienoato (511). Se calentó una suspensión de Ni(Ac)₂ finamente molido x 4H₂O (0,8 g, 3,2 mmol) en etanol al 96 % (25 ml) con agitación a 50-60 °C hasta que la sal se disolvió por completo. El sistema se lavó abundantemente con hidrógeno y después se añadió una solución de NaBH₄ (3,4 ml; obtenido por 15 min de agitación de una suspensión de NaBH₄ (0,53 g, 14 mmol) en etanol (12 ml) seguido de filtrado a través de un filtro fino) durante 10 min. Se observó desprendimiento de hidrógeno. En 15-20 min, se añadió etilendiamina (1,65 ml, 25 mmol) a la mezcla de reacción en una porción con agitación, seguido de la solución de (510) (2,4 g, 8,2 mmol) en etanol (10 ml). La mezcla de reacción se agitó vigorosamente en atmósfera de hidrógeno hasta que no

hubo más absorción de hidrógeno y después se trató con ácido acético (2,3 ml), agua (10 ml) y se extrajo con éter de petróleo: EtOAc (5:1). Las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con ácido sulfúrico al 10 % (10 ml), después con cloruro sódico saturado, se secaron sobre Na_2SO_4 y el disolvente se retiró al vacío. El residuo se purificó por CC sobre sílice (eluyente: éter de petróleo: EtOAc = 50:1) para dar 2,33 g (96 %) del producto. Después, el producto se purificó de nuevo por CC sobre sílice impregnada con AgNO_3 al 20 % (eluyente: éter de petróleo a éter de petróleo: EtOAc = 2:1). Se obtuvieron 1,75 g (72 %) del producto (97 % de pureza por CG). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 0,88 (t, J = 7,0 Hz, 3H), 1,20-1,40 (m, 14H), 1,55-1,66 (m, 2H), 1,97-2,09 (m, 2H), 2,29 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,72-2,79 (m, 2H), 3,66 (s, 3H), 5,28-5,41 (m, 4H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 14,0, 22,5, 24,9, 25,6, 27,2, 29,00, 29,08, 29,13, 29,3, 29,4, 31,5, 34,1, 51,4, 127,9, 128,0, 129,9, 130,2, 174,2.

Ejemplo 6. Síntesis de ácido 11-D-linoleico



oct-2-in-1-ol (13). A una solución de oct-2-inal [véase Corey, E. J.; Schmidt, G. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 399; Meyer, M. P.; Klinman, J. P. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 3600] (**612**; 1,00 g, 8,1 mmol) en etanol (15 ml) enfriado a 0 °C, se le añadieron 0,11 g (2,6 mmol) de NaBD_4 en porciones durante 5 min. Tras la adición, la solución se agitó durante otros 30 min, se diluyó con agua (100 ml) y después se extrajo con Et_2O (4 x 20 ml). Las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con NaCl saturado, se secaron (Na_2SO_4) y el disolvente se retiró a presión reducida. El alcohol **613** (0,85 g, 83 %) se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, éter de petróleo:EtOAc (15:1)). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 0,88 (t, J = 7,0 Hz, 3H, CH_3), 1,32 (m, 4H, CH_2), 1,49 (quint, J = 7,0 Hz, 2H, CH_2), 1,81 (s a, 1H, OH), 2,19 (td, J = 7,0 Hz, 2,0 Hz, 2H, CH_2), 4,22 (m, 1H, CHD).

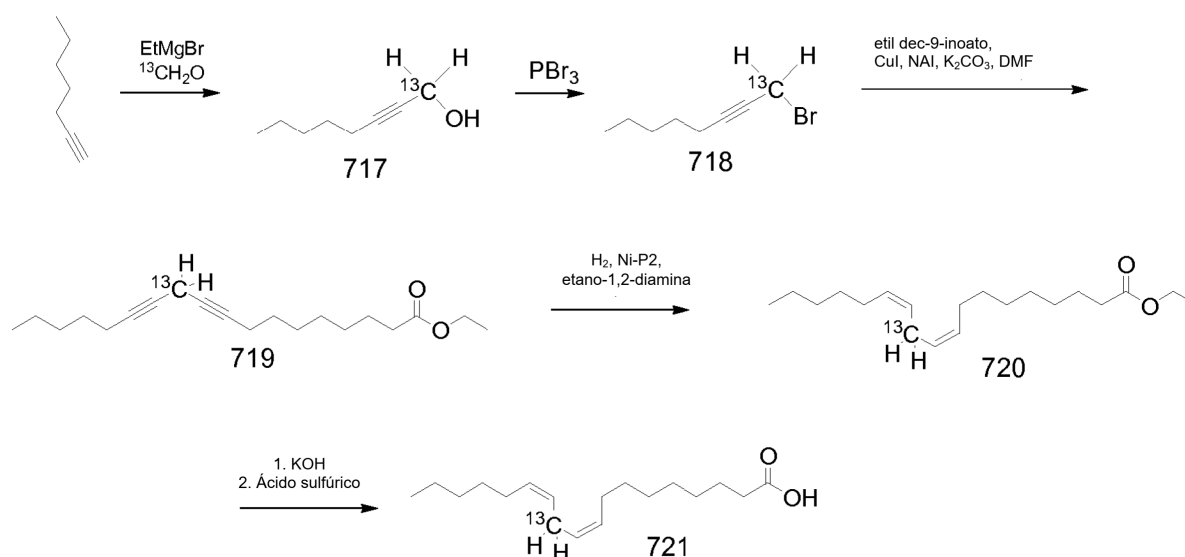
1-bromooct-2-ina (614) se sintetizó como se describe en [véase Hill, Sh.; Hirano, K.; Shmanai, V. V.; Marbois, B. N.; Vidovic, D.; Bekish, A. V.; Kay, B.; Tse, V.; Fine, J.; Clarke, C. F.; Shchepinov, M. S. *Free Radio. Biol. Med.*, **2011**, 50 (1), 130-138.]. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 0,89 (t, J = 7,0 Hz, 3H, CH_3), 1,32 (m, 4H, CH_2), 1,50 (quint, J = 7,0 Hz, 2H, CH_2), 2,22 (td, J = 7,0 Hz, 2,0 Hz, 2H, CH_2), 3,91 (m, 1H, CHD).

[11- ^2H]-etil octadeca-9,12-diinoato (615). se sintetizó como se describe en [véase Meyer, M. P.; Klinman, J. P. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 3600; Hill, Sh.; Hirano, K.; Shmanai, V. V.; Marbois, B. N.; Vidovic, D.; Bekish, A. V.; Kay, B.; Tse, V.; Fine, J.; Clarke, C. F.; Shchepinov, M. S. *Free Radio. Biol. Med.*, **2011**, 50 (1), 130-138], CuI (2 g, 10,5 mmol), NaI (1,58 g, 10,5 mmol), K_2CO_3 (2,1 g, 15 mmol), dec-9-inoato de etilo (1,02 g, 5,2 mmol) y bromuro **614** (1,03 g, 5,4 mmol) se añadieron a DMF (10 ml) con agitación. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 12 h, después, se añadieron NH_4Cl (10 ml) y NaCl (8 ml) y se continuó la agitación durante otros 5 min. El precipitado se separó y se lavó con éter de petróleo. Las capas orgánicas se separaron y la capa acuosa se extrajo con éter de petróleo. Las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con NaCl saturado, se secaron (Na_2SO_4) y el disolvente se retiró a presión reducida. La cromatografía en columna (gel de sílice, éter de petróleo:EtOAc (15:1)) produjo 1,29 g (81 %) del producto. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 0,89 (t, J = 7,0 Hz, 3H, CH_3), 1,25 (t, J = 7,0 Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 1,31 (m, 10H, CH_2), 1,49 (m, 4H, CH_2), 1,61 (m, 2H, CH_2), 2,15 (td, J = 7,0 Hz, 2,0 Hz, 2H, CH_2 en posición propargílica), 2,28 (t, J = 7,5 Hz, 2H, CH_2COOEt), 3,10 (m, 1H, CHD), 4,12 (c, J = 7,0 Hz, 2H, OCH_2CH_3). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 9,6 (t, J = 19,0 Hz), 13,9, 14,1, 18,56, 18,57, 22,1, 24,8, 28,4, 28,6, 28,7, 28,9, 28,9, 31,0, 34,2, 60,0, 74,3, 74,5, 80,2, 80,3, 173,7.

Ácido [11-²H]-linoleico (616) Una suspensión de tetrahidrato de acetato de níquel triturado (0,4 g, 1,6 mmol) en etanol al 96 % (12 ml) se calentó a 50-60 °C con agitación hasta que la sal se disolvió. El sistema se lavó abundantemente con hidrógeno, y después se añadieron 1,7 ml de NaBH₄ (obtenido en 15 min de agitación de una suspensión de NaBH₄ (0,27 g, 14 mmol) en etanol (6 ml) seguido de filtrado) durante 10 min, con desprendimiento de algunas burbujas de gas. En 15-20 min, se añadió etilendiamina (0,8 ml, 12 mmol) en una porción con agitación, seguido en 5 min por una solución de diina **615** (1,2 g, 3,9 mmol) en etanol (5 ml). La mezcla de reacción se agitó vigorosamente hasta que no hubo más absorción de hidrógeno y después se trató con ácido acético (1,2 ml), agua (10 ml) y se extrajo con una mezcla de éter de petróleo y EtOAc (5:1). Las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con ácido sulfúrico al 10 % (5 ml) y después con NaCl saturado, se secó (Na₂SO₄) y el disolvente se retiró a presión reducida. La cromatografía en columna (gel de sílice, éter de petróleo:EtOAc (50:1)) produjo 1,14 g (94 %) del producto. El producto se purificó adicionalmente [3] en sílice impregnada con nitrato de plata (AgNO₃ al 20 %), con éter de petróleo: EtOAc (2:1) como eluyente para dar 0,73 g (60 %) del éster etílico del ácido linoleico (> 96 % de pureza por CG; CG-EM: MW 309 (CG-MS para un éster etílico de ácido linoleico no deuterado de control: MW 308). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0,89 (t, J = 7,0 Hz, 3H, CH₃), 1,25 (t, J = 7,0 Hz, 3H, CH₃CH₂O), 1,30 (m, 14H, CH₂), 1,61 (m, 2H, CH₂), 2,04 (m, 2H), 2,28 (t, J = 7,5 Hz, 2H, CH₂COOEt), 2,74 (m, 1H, CHD), 4,12 (c, J = 7,0 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 5,34 (m, 4H, CH=CH). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 14,1, 14,2, 22,6, 25,0, 25,3 (t, J = 19,5 Hz), 27,17, 27,19, 29,08, 29,09, 29,14, 29,3, 29,6, 31,5, 34,4, 60,1, 127,8, 128,0, 130,0, 130,2, 173,9.

Para obtener el ácido [11-²H]-linoleico libre (**616**), a la solución del éster etílico del ácido linoleico (0,704 g, 2,3 mmol) en etanol (10 ml), se le añadió una solución de KOH (0,4 g, 7,1 mmol) en agua (0,8 ml). La mezcla se agitó a 50 °C durante 10 min y después se diluyó con agua (20 ml), se trató con una solución al 10 % de ácido sulfúrico (5 ml) y se extrajo con Et₂O (4 x 20 ml). Las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con NaCl saturado, se secó sobre Na₂SO₄ y el disolvente se retiró a presión reducida. El residuo se lavó abundantemente a través de un pequeño volumen de gel de sílice (2 ml; eluyente: éter de petróleo:EtOAc (2:1)) y el disolvente se retiró al vacío para producir 0,629 g (98 %) de del indicado ácido **616**. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0,88 (t, J = 7,0 Hz, 3H, CH₃), 1,30 (m, 14H, CH₂), 1,60 (m, 2H, CH₂), 2,03 (m, 4H, CH₂), 2,33 (t, J = 7,5 Hz, 2H, CH₂COOEt), 2,74 (m, 1H, CHD), 5,32 (m, 4H, CH=CH), 11,6 (s a, 1H, COOH). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 14,1, 22,6, 24,6, 25,3 (t, J = 19,0 Hz), 27,16, 27,18, 29,00, 29,05, 29,12, 29,3, 29,6, 31,5, 34,0, 127,8, 128,0, 130,0, 130,2, 180,1.

Ejemplo 7. Síntesis de ácido [11-¹³C]-linoleico



[1-¹³C]-oct-2-in-1-ol (717). El compuesto del título se ha sintetizado de acuerdo con los protocolos descritos anteriormente (Hill, Sh.; Hirano, K.; Shmanai, V. V.; Marbois, B. N.; Vidovic, D.; Bekish, A. V.; Kay, B.; Tse, V.; Fine, J.; Clarke, C. F.; Shchepinov, M. S. *Free Radio. Biol. Med.*, **2011**, 50 (1), 130-138) usando ¹³C-paraform y se usó sin purificación adicional. RMN ¹H (CDCl₃, δ): 4,22 (a, J = 148 Hz, 2H), 2,18 (td, J₁ = 7,0, J₂ = 1 Hz, 2H), 1,91 (s a, 1H), 1,47 (quint, J = 7,0 Hz, 2H), 1,31 (m, 4H), 0,87 (t, J = 7,0 Hz, 3H).

[1-¹³C]-1-bromooct-2-ina (718) se sintetizó como se describe en (Hill, Sh.; Hirano, K.; Shmanai, V. V.; Marbois, B. N.; Vidovic, D.; Bekish, A. V.; Kay, B.; Tse, V.; Fine, J.; Clarke, C. F.; Shchepinov, M. S. *Free Radio. Biol. Med.*, **2011**, 50 (1), 130-138). Rendimiento: 82 % partiendo de ¹³C-paraform (para dos etapas). RMN ¹H (CDCl₃, δ): 3,93 (dt, J₁ = 158 Hz, J₂ = 2 Hz, 2,23 (m, 2H), 1,50 (m, 2H), 1,33 (m, 4H), 0,89 (t, J = 7 Hz, 3H).

[11-¹³C]-etil octadeca-9,12-diinoato (719). se sintetizó como se describe previamente (véase Meyer, M. P.; Klinman, J. P. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 3600; Hill, Sh.; Hirano, K.; Shmanai, V. V.; Marbois, B. N.; Vidovic, D.; Bekish, A. V.;

Kay, B.; Tse, V.; Fine, J.; Clarke, C. F.; Shchepinov, M. S. *Free Radio. Biol. Med.*, **2011**, *50* (1), 130-138). Rendimiento: 93 %. RMN ^1H (CDCl_3 , δ): 4,10 (c, J = 7 Hz, 2H), 3,1 (dm, J = 134 Hz, 2H), 2,27 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,13 (m, 4H), 1,60 (m, 2H), 1,47 (m, 4H), 1,3 (m, 10H), 1,24 (t, J = 7 Hz, 3H), 0,88 (t, J = 7,0 Hz, 3H).

Éster etílico del ácido [11- ^{13}C]-linoleico (720) se sintetizó como se describe previamente (véase Meyer, M. P.; Klinman, J. P. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3600; Hill, Sh.; Hirano, K.; Shmanai, V. V.; Marbois, B. N.; Vidovic, D.; Bekish, A. V.; Kay, B.; Tse, V.; Fine, J.; Clarke, C. F.; Shchepinov, M. S. *Free Radio. Biol. Med.*, **2011**, *50* (1), 130-138). Rendimiento: 56 %. RMN ^1H (CDCl_3 , δ): 5,34 (m, 4H), 4,12 (c, J = 7 Hz, 2H), 2,77 (dm, J = 126 Hz, 2H), 2,28 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,04 (m, 4H), 1,61 (m, 2H), 1,30 (m, 14H), 1,25 (t, J = 7 Hz, 3H), 0,88 (t, J = 7,0 Hz, 3H).

Ácido [11- ^{13}C]-linoleico (721) se sintetizó como se describe previamente (véase Meyer, M. P.; Klinman, J. P. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3600; Hill, Sh.; Hirano, K.; Shmanai, V. V.; Marbois, B. N.; Vidovic, D.; Bekish, A. V.; Kay, B.; Tse, V.; Fine, J.; Clarke, C. F.; Shchepinov, M. S. *Free Radio. Biol. Med.*, **2011**, *50* (1), 130-138); rendimiento del 98 %. RMN ^1H (CDCl_3 , δ): 10,5 (s a, 1H), 5,34 (m, 4H), 2,77 (dm, J = 126 Hz), 2,33 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,03 (m, 4H), 1,60 (m, 2H), 1,30 (m, 14H), 0,88 (t, J = 7,0 Hz, 3H).

Ejemplo 8. Preparación general de ésteres A-D

PUFA — Alcohol/polialcohol

A

PUFA — Polialcohol — PUFA

B

PUFA — Polialcohol — PUFA

PUFA

C

PUFA — Polialcohol — PUFA

PUFA

D

Procedimiento general para el compuesto A. Se añadió lentamente cloruro de tionilo (2 equivalentes) a una solución de PUFA (1 equivalente) en CHCl_3 . La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 h, después se dejó enfriar a temperatura ambiente y el disolvente se evaporó a presión reducida para producir el derivado de cloruro de ácido carboxílico del PUFA. Después, se disolvió el derivado de cloruro de ácido carboxílico en piridina anhidra y se añadió lentamente el alcohol (1 equivalente) disuelto en piridina (téngase en cuenta que el orden de adición se invierte cuando el alcohol es un polialcohol). Tras la finalización de la adición, la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Después, el disolvente se retiró a presión reducida y el producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna para producir el Compuesto A.

Ácido 11,11-dideutero-cis,cis,cis-octadeca-8,12,15-trienoico (**30**); Ácido 14,14-dideutero-cis,cis,cis-octadeca-8,12,15-trienoico (**23**); Ácido 11,11,14,14-tetradeutero-cis,cis,cis-octadeca-8,12,15-trienoico (**17**); y Ácido 11,11-dideutero-cis,cis-octadeca-9,12-dienoico (**7**) cada uno se somete al procedimiento descrito anteriormente con los siguientes alcoholes: etanol, glicerol, propilenglicol; glucosa; 2-(2-etoxietoxi)etanol; y estradiol para producir productos que corresponden a la fórmula general del Compuesto A.

Procedimiento general para el compuesto B. Se añadió lentamente cloruro de tionilo (2 equivalentes) a una solución de PUFA (1 equivalente) en CHCl_3 . La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 h, después se dejó enfriar a temperatura ambiente y el disolvente se evaporó a presión reducida para producir el derivado de cloruro de ácido carboxílico del PUFA. Después, se disolvió el derivado de cloruro de ácido carboxílico en piridina anhidra y se añadió lentamente el alcohol (Compuesto A, 1 equivalente) disuelto en piridina. Tras la finalización de la adición, la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Después, el disolvente se retiró a presión reducida y el producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna para producir el Compuesto B.

Los productos del Compuesto A que se forman a partir de la condensación de Ácido 11,11-dideutero-cis,cis,cis-octadeca-8,12,15-trienoico (**30**); Ácido 14,14-dideutero-cis,cis,cis-octadeca-8,12,15-trienoico (**23**); Ácido 11,11,14,14-tetradeutero-cis,cis,cis-octadeca-8,12,15-trienoico (**17**); y Ácido 11,11-dideutero-cis,cis-octadeca-9,12-dienoico (**7**) con glicerol, propilenglicol; glucosa; y estradiol se tratan de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente con Ácido 11,11-dideutero-cis,cis,cis-octadeca-8,12,15-trienoico (**30**); Ácido 14,14-dideutero-cis,cis,cis-octadeca-8,12,15-trienoico (**23**); Ácido 11,11,14,14-tetradeutero-cis,cis,cis-octadeca-8,12,15-trienoico (**17**); y Ácido 11,11-dideutero-cis,cis-octadeca-9,12-dienoico (**7**).

11,11-dideutero-cis,cis-octadeca-9,12-dienoico (**7**) como los PUFA para producir productos correspondientes a la fórmula general del Compuesto B.

Procedimiento general para el compuesto C. Se añadió lentamente cloruro de tionilo (2 equivalentes) a una solución de PUFA (1 equivalente) en CHCl_3 . La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 h, después se dejó enfriar a temperatura ambiente y el disolvente se evaporó a presión reducida para producir el derivado de cloruro de ácido carboxílico del PUFA. Después, se disolvió el derivado de cloruro de ácido carboxílico en piridina anhidra y se añadió lentamente el alcohol (Compuesto B, 1 equivalente) disuelto en piridina. Tras la finalización de la adición, la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Después, el disolvente se retiró a presión reducida y el producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna para producir el Compuesto C.

Los productos del Compuesto B que se forman a partir de la condensación de los productos del Compuesto A con glicerol y glucosa se tratan de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente con Ácido 11,11-dideutero-cis,cis,cis-octadeca-8,12,15-trienoico (**30**); Ácido 14,14-dideutero-cis,cis,cis-octadeca-8,12,15-trienoico (**23**); Ácido 11,11,14,14-tetradeutero-cis,cis,cis-octadeca-8,12,15-trienoico (**17**); y Ácido 11,11-dideutero-cis,cis-octadeca-9,12-dienoico (**7**) como los PUFA para producir productos correspondientes a la fórmula general del Compuesto C.

Procedimiento general para el compuesto D. Se añadió lentamente cloruro de tionilo (2 equivalentes) a una solución de PUFA (1 equivalente) en CHCl_3 . La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 h, después se dejó enfriar a temperatura ambiente y el disolvente se evaporó a presión reducida para producir el derivado de cloruro de ácido carboxílico del PUFA. Después, se disolvió el derivado de cloruro de ácido carboxílico (4 equivalentes) en piridina anhidra y se añadió lentamente el alcohol (1 equivalente) disuelto en piridina. Tras la finalización de la adición, la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Después, el disolvente se retiró a presión reducida y el producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna para producir el Compuesto D.

Los productos del Compuesto C que se forman a partir de la condensación de los productos del Compuesto A con glucosa se tratan de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente con Ácido 11,11-dideutero-cis,cis,cis-octadeca-8,12,15-trienoico (**30**); Ácido 14,14-dideutero-cis,cis,cis-octadeca-8,12,15-trienoico (**23**); Ácido 11,11,14,14-tetradeutero-cis,cis,cis-octadeca-8,12,15-trienoico (**17**); y Ácido 11,11-dideutero-cis,cis-octadeca-9,12-dienoico (**7**) como los PUFA para producir productos correspondientes a la fórmula general del Compuesto D.

Ejemplo 9. Análisis RMN ^1H y ^{13}C de los PUFA deuterados descritos en los Ejemplos 1-4 (Figura 2).

Áreas características de los espectros de ^1H y ^{13}C , todos los valores en ppm. (*Panel A*) Deuteración de ácido Lin en pos. 11 se confirma por la desaparición de picos en los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C . Se espera la desaparición del pico en δ_{H} 2.764 debido a la ausencia de átomos de H (RMN ^1H). La desaparición del pico en δ_{C} 25,5 se debe a la combinación del efecto de sobrecarga nuclear y la división de este átomo de carbono en particular en un quinteto por dos átomos de D en la forma deuterada del ácido Lin. (*Panel B*) El espectro de RMN ^1H muestra que los átomos de H en las posiciones C11 y C14 de αLnn deuterado específicamente para el sitio coinciden (δ_{H} 2,801), por lo tanto, la deuteración en cualquiera de los sitios (11,11- H_2 , 14,14- D_2 u 11,11- D_2 , 14,14- H_2) conduce a una disminución del 50 % en la integración de este pico, mientras que la deuteración de ambos sitios (11,11,14,14- D_4) conduce a la desaparición completa del pico en δ_{H} 2,801. Sin embargo, los experimentos de RMN ^{13}C pueden distinguir claramente entre las tres formas deuteradas, ya que los picos observados para las posiciones C11 y C14 están separados por una diferencia pequeña pero detectable. Por lo tanto, la deuteración en las posiciones C11 o C14 conduce a la desaparición del pico en δ_{C} 25,68 o δ_{C} 25,60, respectivamente, mientras que la deuteración en ambos sitios conduce a la desaparición de los dos picos correspondientes.

Ejemplo 10. El refuerzo de isótopos puede detener la peroxidación de PUFA

La levadura Q-less (mutantes *coq*) proporciona un sistema ideal para evaluar la autooxidación *in vivo* de ácidos grasos. La coenzima Q (ubiquinona o Q) actúa como un pequeño antioxidante lipófilo así como lanzadera de electrones en la cadena respiratoria de la membrana interna mitocondrial. Se requieren diez genes de *S. cerevisiae* (COQ1-COQ10) para la biosíntesis y función de la coenzima Q y la eliminación de cualquiera de ellos como resultado de una deficiencia respiratoria (Tran UC, Clarke CF. *Mitochondrion* 2007;7S:S62). Se demostró que los mutantes de levadura *coq* son exquisitamente sensibles a los productos de autooxidación de los PUFA (Do TQ et al, *PNAS USA* 1996;93:7534-7539; Poon WW, Do TQ, Marbois BN, Clarke CF. *Mol. Aspects Med.* 1997;18:S121). Aunque *S. cerevisiae* no produce PUFA (Paltauf F, Daum G. *Meth. Enzymol.* 1992;209:514-522), son capaces de utilizar PUFA cuando se proporcionan de forma exógena, permitiendo que su contenido sea manipulado (Paltauf F, Daum G. *Meth. Enzymol.* 1992;209:514-522). Menos del 1 % de mutantes de levadura Q-less (*coq2*, *coq3* y *coq5*) son viables después de un tratamiento de cuatro horas con ácido linolénico (Do TQ et al, *PNAS USA* 1996;93:7534-7539; Poon WW, Do TQ, Marbois BN, Clarke CF. *Mol. Aspects Med.* 1997;18:S121). Por el contrario, el 70 % de las células de tipo silvestre (el fondo genético parental es la cepa W303-1B) sometidas a este tratamiento permanecen viables. Las levaduras Q-less también son hipersensibles a otros PUFA que se autooxidan fácilmente (tales como el ácido araquidónico), pero se comportan igual que la cepa parental de tipo silvestre al tratamiento con ácido oleico monoinsaturado (Do TQ et al, *PNAS USA* 1996;93:7534-7539). La hipersensibilidad de los mutantes de levadura Q-less no es un efecto secundario de la incapacidad para respirar, porque la levadura mutante *cor1* o *atp2* (que carece del complejo bc1 o de la ATP sintasa,

respectivamente) muestra una resistencia de tipo silvestre al tratamiento con PUFA (Do TQ et al, *PNAS USA* **1996**;93:7534-7539; Poon WW, Do TQ, Marbois BN, Clarke CF. *Mol. Aspects Med.* **1997**;18,s121).

Puede usarse un ensayo de dilución en placa para evaluar la sensibilidad a los PUFA. Este ensayo puede realizarse colocando diluciones en serie de cinco veces de alícuotas en medio de placa YPD (**Figura 3**). La sensibilidad de las diferentes cepas puede observarse mediante la inspección visual de la densidad de células en cada lugar.

El tratamiento con ácido linolénico provoca una pérdida drástica de viabilidad de mutantes nulos *coq*. En marcado contraste, los mutantes tratados *coq* con el ácido D4-linolénico no murieron y retuvieron viabilidades similares a las de la levadura tratada con ácido oleico. El recuento cuantitativo de colonias reveló que la viabilidad de las células tratadas con oleico y D4-linolénico era similar (**Figura 4**), mientras que la viabilidad de los mutantes *coq* se redujo más de 100 veces después del tratamiento con el ácido linolénico convencional durante 4 h. Estos resultados indican que el ácido linolénico reforzado con isótopos es mucho más resistente a la autooxidación que el ácido linolénico convencional, como se evidencia por la resistencia de los mutantes *coq* hipersensibles a la muerte celular.

Ejemplo 11. GC-EM puede detectar ácidos grasos y PUFA en células de levadura

Las levaduras no sintetizan PUFA, sin embargo, incorporan ácidos linoleico y linolénico suministrados exógenamente (Avery SV, et al. *Applied Environ. Microbiol.* **1996**; 62,3960; Howlett NG, et al. *Applied Environ. Microbiol.* **1997**; 63,2971). Por lo tanto, parece probable que la levadura también incorpore ácido D4-linolénico suministrado de forma exógena. Sin embargo, es posible que la sensibilidad diferencial al linolénico y al D4-linolénico se pueda atribuir a diferencias en la integración en la célula más que a la autooxidación. Para probar si este es el caso, se controló el grado de absorción de este ácido graso. En primer lugar se determinaron las condiciones de separación de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) de C18:1, C18:3, D4-18:3 y C17:0 (para usarse como patrón interno). El cromatograma GC-MS que se muestra en la **Figura 5** establece tanto la separación como la sensibilidad de detección de estos patrones de ésteres metílicos de ácidos grasos.

Las levaduras de tipo silvestre se recolectaron durante el crecimiento en fase logarítmica y se incubaron en presencia de ácido graso añadido exógenamente (durante 0 o 4 h) en presencia de tampón fosfato más dextrosa al 0,20 %, como se describe para el ensayo de sensibilidad a los ácidos grasos. Las células se recogieron, se lavaron dos veces con 10 ml de agua estéril y los sedimentos de células de levadura se procesaron luego mediante metanólisis alcalina como se describe anteriormente. Los ácidos grasos se detectan como ésteres metílicos (FAME) siguiendo la GC-EM con C17:0 añadido como patrón interno (**Figura 6**). Las cantidades de 18:3 y D4 detectadas después de 4 h de incubación se extrapolaron de la curva de calibración. Estos resultados indican que la levadura incorpora ávidamente ácido linolénico y D4-linolénico durante el período de incubación de 4 h. Basándose en estos resultados, es obvio que la resistencia mejorada de la levadura mutante *coq* al tratamiento con D4-C18:3 no se debe a la falta de absorción.

El ácido D2-linolénico, 11, 11-D2-linolénico y ácido 14, 14-D2-linolénico, también se usaron en este modelo de levadura y ofrecieron una protección comparable.

Ejemplo 12. Efecto isotópico cinético en la oxidación no enzimática de D2-LA en un formato de reacción en cadena.

Se estudió la cinética del consumo de oxígeno durante la oxidación de LA y D2-LA con un microvolumen capilar de vidrio (**Figura 7**). La tasa de oxidación, R_{ox} , se midió como una pendiente de trazas de $[O_2]$. La tasa de iniciación, R_{IN} , se determinó mediante el método del inhibidor con HPMC ("6-hidroxi-2,2,5,7,8-pentametilbenzocromano") como inhibidor de referencia. Se calculó R_{IN} a partir del período de inducción de la oxidación inhibida, t_{IND} : $R_{IN} = 2 \cdot [HPMC] / t_{IND}$. Se encontró que la tasa de oxidación de 0,71 M LA (**Figura 7**) era de $6,1 \times 10^{-6}$ M/s. Cuando el proceso fue inhibido por el antioxidante HPMC 0,23 mM que rompe la cadena, la duración del período de inducción, t_{IND} , fue de aproximadamente 48 min, con el valor R_{IN} valor de alrededor de $0,16 \times 10^{-6}$ M/s. La longitud de la cadena cinética calculada a partir de estos datos fue: $\bar{\nu} = R_{ox} / R_{IN} = 38 \pm 3$. Basándose en estos datos, la oxidabilidad calculada de LA fue $0,0215 \pm 0,008 \text{ M}^{-0,5} \text{ s}^{-0,5}$ ($n = 5$) [Cosgrave J.P, et. al. *Lipids*, **1987**, 22, 299-304]. Para D2-LA, se observó la reducción de R_{ox} a $0,18 \times 10^{-6}$ M/s (**Figura 7**). En contraste con el LA, la adición de HPMC no resultó en la disminución de R_{ox} y la aparición de cualquier período de inducción detectable (datos no mostrados). Este último excluye una determinación directa de R_{IN} . Para un valor de R_{IN} para la oxidación de D2-LA es comparable al de LA, se deduce que la oxidación de D2-LA no fue un proceso en cadena ($\bar{\nu} = 0,18 \times 10^{-6} / 0,16 \times 10^{-6} \approx 1,1$). Un efecto isotópico cinético estimado ("KIE"), a partir de la comparación de R_{ox} para LA y D2-LA, fue alrededor de $6,1 \times 10^{-6} / 0,18 \times 10^{-6} \approx 35$. Se determinó un KIE similar durante la oxidación de LA y 11,11-d₂-LA en micelas acuosas Triton X-100 (datos no mostrados). Con fines comparativos, el KIE teórico es 6,9 a 25 °C. Véase Carpenter, "Determination of Organic Reaction Mechanisms" (John Wiley & Sons, 1984), p. 89.

Ejemplo 13. Pequeñas cantidades de D2-LA protegen a LA contra la peroxidación.

Para simular las condiciones *in vivo* probables, se estudió la cinética de oxidación de las mezclas de D2-LA y LA (**Figura 8**). En los experimentos, la concentración de LA más 11,11-d₂-LA fue de 0,775 M; la concentración de AMVN fue 0,0217 M; y las reacciones se llevaron a cabo a 37 °C. Los resultados proporcionaron una R_{IN} de $1,10 \pm 0,08 \times 10^{-6}$

⁷ M/s. Adicionalmente, se encontró que la tasa de oxidación de las mezclas no era aditiva y era mucho más baja que el valor aditivo de Rox para los compuestos individuales. Sorprendentemente, D2-LA esencialmente 'protege' el LA no deuterado contra la autooxidación. También se observó un efecto cualitativamente similar durante la oxidación de la mezcla de 11,11-D2-LA con linoleato de metilo no deuterado (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que incluso una sustitución parcial de LA no deuterada por D2-LA puede ralentizar sustancialmente la peroxidación de PUFA.

Ejemplo 14. Pequeñas cantidades de D2-LA protegen a LA contra la peroxidación *in vivo*.

Los resultados descritos en el Ejemplo 13 Se reprodujeron *in vivo* usando cepas de levadura Q-less *coq3* y diferentes proporciones de LA a D2-LA (Figura 9). Las levaduras de tipo silvestre, Q-less *coq3*, o los mutantes nulos *cor1* deficientes respiratorios se incubaron en presencia de 200 μ M de LA y D2-LA en diferentes proporciones de PUFA, como se indica en la Figura 9. Se colocaron diluciones en serie (1:5) a partir de 0,2 DO/ml en medio de placa sólida YPD. Adicionalmente, se utilizó un control sin tratar de tiempo cero y los resultados se muestran en la parte superior izquierda de la Figura 9. El crecimiento fue a 30 °C. Los resultados indican que aproximadamente el 10-15 % de D2-LA era una cantidad suficientemente mínima para cancelar la toxicidad de LA. Una incubación similar con PUFA monodeuterado, 11,11-D₂-LA, no produjo ninguna pérdida detectable en la viabilidad celular después de 3 horas de tratamiento (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que tanto D2-LA como 11,11-D₂-LA eran resistentes a la peroxidación lipídica.

Las células de levadura de tipo se trataron como se describe anteriormente, excepto que la levadura se trató con 200 μ M del ácido graso designado durante 2 horas, se lavó con agua estéril y no se trataron (triángulos) o se trataron con CuSO₄ 50 μ M (cuadrados) a temperatura ambiente. Después de 60 min de tratamiento con cobre, las células se trataron con C11-Bodipy 581/591 8 μ M durante 30 min a temperatura ambiente. Se sembraron cuatro alícuotas de 100 μ l en una placa de 96 pocillos y se midió la fluorescencia. Las células de levadura de tipo silvestre tratadas con cobre en ausencia o presencia de PUFA tienen niveles significativamente más altos de peroxidación lipídica en comparación con la levadura no tratada con cobre. Sin embargo, las células de levadura de tipo silvestre estresadas con cobre tratadas con 11,11-D₂-LA tienen niveles más bajos de peroxidación lipídica similar a la levadura no tratada con PUFA. 11,11-D₂-LA mono-deuterado ofreció una protección similar.

Ejemplo 15. Pequeñas cantidades de D4-ALA protegen el ALA contra la peroxidación *in vivo*.

El protocolo experimental descrito para el Ejemplo 14 también se reprodujo *in vivo* usando cepas de levadura Q-less *coq3* (Figura 10) y diferentes relaciones de ALA a D4-ALA. Las levaduras de tipo silvestre, Q-less *coq3*, o los mutantes nulos *cor1* deficientes respiratorios se incubaron en presencia de 200 μ M de LA y D4-Lnn (Ácido linolénico) en diferentes proporciones de PUFA, como se indica en la Figura 10. Se colocaron diluciones en serie (1:5) a partir de 0,2 DO/ml en medio de placa sólida YPD. El crecimiento fue a 30 °C. Los resultados indican que aproximadamente el 15-20 % de D2-Lnn era una cantidad suficientemente mínima para cancelar la toxicidad de ALA. Por otra parte, los resultados indican que el contenido de PUFA captado por las células de levadura refleja aproximadamente las relaciones añadidas y sugiere que las células de levadura no discriminan entre los PUFA proporcionados.

Ejemplo 16. D-PUFA mitiga el estrés oxidativo y aumenta la supervivencia en las células de la retina implicadas en AMD y la patología de la retinopatía diabética

Varios tipos de células, incluyendo el endotelio microvascular (MVEC), el epitelio pigmentario de la retina (RPE) y las neuronas de la retina (células ganglionares de la retina) se probaron para la supervivencia en cultivo celular. Las células se mantuvieron en el medio que contenía ácidos D2-linoleico hidrogenado (control) o deuterado (ω -6; LA) y D4-linolénico (ω -3; ALA) (20 μ M; relación de ω -6 a ω -3: 1:1 o 2:1) durante 72 horas. La incorporación de PUFA en las células fue monitorizada por GC (Figura 11). Se demostró que los PUFA se captan fácilmente por las células de acuerdo con la Tabla 1, que muestra la incorporación de PUFA en los MVEC.

Tabla 1

		Área sin marcar	Área marcada	relación
control	linoleato	78392976	4556042	0,058
	linolenato	1488866	149411	0,100
PUFA	linoleato	96026830	5525295	0,058
	linolenato	2347729	113468	0,048
PUFA deuterado	linoleato	34957060	2599969	0,074
	linolenato	747128	134824	0,180

Las células se trataron después con paraquat (PQ; 500 μ M), un compuesto común que genera estrés oxidativo. Para medir la supervivencia, las células se contaron usando un hemocitómetro y un método de exclusión con azul tripán. Figura 12 muestra la supervivencia de células MVEC tratadas con H- y D- PUFA después de la intoxicación aguda por paraquat. Para todos los tipos celulares probados, D-PUFA tuvo un efecto protector en comparación con los controles, similar al que se muestra en la Figura 8 para las células MVEC.

Ejemplo 17. Los estudios de toxicología de ratones suplementados con D-PUFA no revelan anomalías en los principales biomarcadores sanguíneos.

5 Con un paradigma de dosificación más prolongado (es decir, 3 semanas de reemplazo dietético), el análisis químico del suero sanguíneo de ratones suplementados con H-PUFA y D-PUFA (realizado en UC Davis) no reveló diferencias en los principales biomarcadores de la función renal, función hepática, lípidos en sangre, etc. para ratones tratados con solución salina H-PUFA/D-PUFA. En este ejemplo, D-PUFA es una mezcla 2:1 de ácido D2-linoleico: ácido D4-linolénico.

10 Los parámetros probados incluyeron mediciones de triglicéridos; proteína total; bilirrubina total; fósforo; ácidos grasos libres; HDL; glucosa; creatina; colesterol; calcio; nitrógeno de urea en sangre; fosfatasa alcalina; albúmina; aspartato aminotransferasa; y otros en la Tabla 2.

Tabla 2

N ° de ID de ratón	Volumen de muestra	Alanina aminotransferasa U/l	Aspartato aminotransferasa U/l	Albúmina g/dl	Fosfatasa alcalina U/l	Nitrógeno de urea en sangre mg/dl	Calcio mg/dl	Colesterol mg/dl	Creatinina mg/dl	Glucosa mg/dl	Lipoproteína de alta densidad mg/dl	Ácido graso no esterificado mEq/l	Fósforo mg/dl	Bilirrubina total mg/dl	Proteína total g/dl	Triglicérido mg/dl
4	100	273,0	3008,7	3,09	81,7	19,1	7,96	148,3	0,189	160,2	104,49	1,08	13,07	0,185	5,32	38,9
5	110	5726,7	8478,9	3,42	31,1	25,4	7,40	185,1	0,356	355,6	134,37	1,07	18,59	0,275	6,56	57,9
7	100	156,0	1470,6	2,82	35,1	18,9	7,64	151,2	0,154	174,6	107,39	1,11	10,14	0,192	5,26	82,7
10	60	518,4	4653,0	3,02	QNS	20,1	6,78	184,0	0,151	136,5	138,15	1,06	QNS	0,272	6,07	46,1
11	70	144,0	1635,3	3,63	72,7	20,3	8,75	170,8	0,179	107,9	139,86	1,18	9,33	0,162	5,72	33,5
13	14	3518,1	15669,0	QNS	<0,1	31,5	QNS	166,5	1,126	176,4	135,09	0,99	QNS	QNS	QNS	31,5
14	75	216,9	2107,8	3,03	42,4	24,4	7,46	173,6	0,170	93,3	47,78	1,06	10,41	0,235	6,07	43,8
25	75	589,5	4707,0	3,20	18,8	18,0	5,97	193,4	0,126	164,5	147,96	1,01	18,39	0,269	6,74	41,0
27	100	727,2	6015,6	2,63	<0,1	36,2	5,71	166,7	1,453	88,3	98,46	0,87	24,57	0,301	6,26	26,9
28	100	468,9	4018,5	2,93	49,3	21,2	6,90	164,4	0,232	224,9	50,54	1,02	14,16	0,231	5,87	49,6
29	29	1898,1	12510,0	QNS	QNS	24,9	QNS	208,8	0,111	QNS	77,58	0,20	QNS	QNS	QNS	27,9
30	100	2963,7	5371,2	3,38	50,3	18,2	6,29	174,7	0,225	227,4	131,04	1,17	21,42	0,349	6,28	46,7
D-PUFA medio	76	1508	5289	3,17	52,6	22,8	7,67	168,5	0,332	172,1	115,30	1,08	12,31	0,220	5,83	47,8
SD D-PUFA	33	2225	5189	0,30	23,0	4,6	0,66	14,5	0,357	87,0	33,21	0,06	3,78	0,048	0,50	17,7
H-PUFA medio	81	1329	6524	3,04	39,5	23,7	6,22	181,6	0,429	176,3	101,12	0,85	19,64	0,288	6,29	38
SD D-PUFA	31	1078	3428	0,33	17,9	8	0,51	19,0	0,575	65,5	39,40	0,38	4,44	0,050	0,36	11

Ejemplo 18. Estudios histopatológicos

20 Los cambios microscópicos se codificaron según el diagnóstico topográfico y morfológico más específico y se usaron como directrices los manuales de terminología de la Nomenclatura Sistematizada de Medicina (SNOMED) y el Sistema de Gestión de Datos de Toxicología (TDMS) del Programa Nacional de Toxicología. Los datos se registraron en el módulo 4.30 de Histopatología de Labcat®. Un sistema de clasificación de cuatro etapas (mínimo, leve, moderado y marcado) se usó para definir cambios graduables.

25 A los ratones macho C57BL6 se les administró una dosis oral de PUFA en la dieta en los días de estudio 1 a 14, y se les realizó la necropsia el día 15 de estudio. El grupo 1 consistió en 4 ratones y recibió PUFA hidrogenados. El grupo 2 consistió en 5 ratones y recibió PUFA deuterados (D2-LA y D4-ALA) el día 8 del estudio, todos los ratones recibieron solución salina intraperitoneal (IP). Juegos completos de tejidos especificados por el protocolo [hígado (3 a 7 secciones), pulmones con bronquios (2 a 5 lóbulos), bazo, corazón y riñones] de todos los ratones sometidos se examinaron histopatológicamente. No se observaron diferencias entre los grupos H-PUFA y D-PUFA.

Ejemplo 19. Evaluación de la deuteración específica de tejido

35 Los ratones TS se alojaron a 12 animales (machos separados de las hembras) por jaula y se alimentaron durante 90 días a discreción (normalmente, 5-6 g/día) con la dieta AIN 93, como gránulos, con 6 % de grasa total. Aproximadamente el 10 % de esa grasa total estaba compuesta por una mezcla 1:1 de D2-LA/D4-ALA (grupo 1), D2-LA/ALA (grupo 2) o LA/ALA (grupo de control). Los animales fueron sacrificados, se recogieron los órganos y se almacenaron a baja temperatura antes del análisis sin el uso de agentes de conservación. Se separaron las fracciones

de lípidos, se pre-trataron y se analizaron por CL-EM de acuerdo con protocolos convencionales usando LA, D2-LA, ALA y D4-ALA como controles.

Los estudios de dosificación de D2-LA/D4-ALA 1:1 indicaron que los tejidos se enriquecieron mucho en deuterio, con aproximadamente el 40 % de la grasa total deuterada (**Figura 13**). Por otra parte, estos estudios indicaron que la distribución de grasas permaneció relativamente sin cambios por la dosificación probada (**Figura 14**). Después de los estudios de dosificación de D2-LA/ALA 1:1, se determinó que aproximadamente el 27 % de la grasa total estaba deuterada (**Figura 15**).

Los órganos específicos, tales como el hígado y el cerebro, también se evaluaron (**Figuras 16-21**). Aunque el hígado tenía un perfil de grasa diferente al de los tejidos estudiados anteriormente (**Figura 16**), los estudios de dosis de 90 días con D2-LA/D4-ALA demostraron que los tejidos se enriquecieron mucho en deuterio, con aproximadamente el 40 % de la grasa total deuterada (**Figura 17**). Por otra parte, el estudio hepático indicó que la distribución de grasas permaneció relativamente sin cambios por la dosificación probada (**Figura 16-17**). Adicionalmente, los estudios de dosis de 90 días con D2-LA solo ilustraron un perfil de grasa similar al de los estudios anteriores, junto con aproximadamente el 32 % de grasa total estando deuterada (**Figura 18**). En consecuencia, los perfiles de grasa y los perfiles de deuteración en el hígado se mantuvieron independientemente del componente deuterado administrado. Como el hígado, el cerebro también tenía un perfil de grasa diferente al de los tejidos estudiados previamente (**Figuras 19-21**). Los estudios de dosis de 90 días con D2-LA/D4-ALA demostraron que los tejidos se enriquecieron mucho en deuterio, con aproximadamente el 30 % de la grasa total deuterada (**Figura 19**). Por otra parte, el estudio cerebral indicó que la distribución de grasas permaneció relativamente sin cambios por la dosificación probada (**Figuras 19-21**). Adicionalmente, los estudios de dosis de 90 días con D2-LA/ALA ilustraron un perfil de grasa similar al de los estudios anteriores, junto con aproximadamente el 23 % de grasa total estando deuterada (**Figura 20**). En consecuencia, los perfiles de grasa y los perfiles de deuteración en el cerebro se mantuvieron independientemente del componente deuterado administrado.

Ejemplo 20: Prueba de eficacia contra la esteatosis hepática no alcohólica y la esteatohepatitis

Cincuenta ratas heterocigotas macho, 45 días de edad, de la especie *Rattus norvegicus* y linaje Wistar se mantienen en jaulas de polipropileno, en grupos de cinco animales, en un ciclo de 12 h claro/oscurito y en condiciones de temperatura controlada. La inducción de NASH se lleva a cabo mediante una dieta deficiente en metionina y colina (MCD) de acuerdo con procedimientos conocidos (Véase Rogers AE, Newbome PM. Alcoholic and nutritional fatty liver and cirrhosis. *Am J Pathol.* 1973;73:817-20). D-PUFA (0,01, 0,1, 1,0, 10,0 y 100 mg/kg de D2-LA, D4-ALA y combinaciones 1:1 de D2-LA y D4-ALA) o H-PUFA (0,01, 0,1, 1,0, 10,0 y 100 mg/kg de LA, ALA y combinaciones 1:1 de LA y ALA) se administran diariamente a las ratas durante un período de tres meses. Durante el periodo de estudio, los animales se pesan semanalmente y la dosis de fármaco se reajusta según sea necesario. El primer día del estudio, además de determinar el peso de los animales, su sangre se recolecta mediante punción del plexo retroorbital para análisis bioquímico: alanina-aminotransferasa (ALT) y aspartato-aminotransferasa (AST) (prueba colorimétrica, usando el kit Labtest). Un día después de concluir el período de inducción y la administración del compuesto (90 días), los animales se sacrifican por decapitación. Una vez más, la sangre de cada animal se recolecta para análisis bioquímico. Después, se realiza laparotomía con hepatectomía total y preparación hepática para lipoperoxidación (LPO) y análisis histológico. Las muestras de tejido hepático se analizan usando la medición de la sustancia reaccionante de ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acuerdo con métodos conocidos (Véase Lowry et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75) y los resultados se expresan en nmol de malondialdehído/mg de proteína. Los portaobjetos con fragmentos de hígado también se tiñen con hematoxilina-eosina y picrosirius, para evaluar el nivel de fibrosis, y con Peris para evaluar la presencia de depósitos de hierro, habiendo sido examinado por un único patólogo ciego a los datos de los animales. El criterio histológico mínimo para el diagnóstico de NASH es la presencia de esteatosis relacionada con el balonizado hepatocelular, que implica la zona 3 y el infiltrado inflamatorio lobular. Los corpúsculos de Mallory y fibrosis sinusoidal, que implica la zona 3 pueden estar presentes o no. La graduación de la actividad necroinflamatoria y fibrosis se lleva a cabo de acuerdo con clasificaciones conocidas (Véase Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* 1999;94:2467-74). Se espera que D2-LA y D4-ALA reduzcan la cantidad de MDA que se encuentra en las muestras de hígado y reviertan los signos histológicos de NASH.

Ejemplo 21: Prueba de eficacia contra la esteatosis hepática alcohólica, esteatohepatitis y cirrosis

Cincuenta ratas heterocigotas macho, 45 días de edad, de la especie *Rattus norvegicus* y linaje Wistar se mantienen en jaulas de polipropileno, en grupos de cinco animales, en un ciclo de 12 h claro/oscurito y en condiciones de temperatura controlada. La inducción de enfermedad hepática alcohólica y cirrosis se lleva a cabo mediante una dieta que contiene un 5 % de etanol durante 6 semanas. D-PUFA (0,01, 0,1, 1,0, 10,0 y 100 mg/kg de D2-LA, D4-ALA y combinaciones 1:1 de D2-LA y D4-ALA) o H-PUFA (0,01, 0,1, 1,0, 10,0 y 100 mg/kg de LA, ALA y combinaciones 1:1 de LA y ALA) se administran diariamente a las ratas durante un período de tres meses. Durante el periodo de estudio, los animales se pesan semanalmente y la dosis de fármaco se reajusta según sea necesario. El primer día del estudio, además de determinar el peso de los animales, su sangre se recolecta mediante punción del plexo retroorbital para análisis bioquímico: alanina-aminotransferasa (ALT) y aspartato-aminotransferasa (AST) (prueba colorimétrica,

usando el kit Lab test). Un día después de concluir el período de inducción y la administración del compuesto (90 días), los animales se sacrifican por decapitación. Una vez más, la sangre de cada animal se recolecta para análisis bioquímico. Después, se realiza laparotomía con hepatectomía total y preparación hepática para lipoperoxidación (LPO) y análisis histológico. Las muestras de tejido hepático se analizan usando la medición de la sustancia reaccionante de ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acuerdo con métodos conocidos (Véase Lowry et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75) y los resultados se expresan en nmol de malondialdehído/mg de proteína. Los portaobjetos con fragmentos de hígado también se tiñen con hematoxilina-eosina y picrosirius, para evaluar el nivel de fibrosis, y con Peris para evaluar la presencia de depósitos de hierro, habiendo sido examinado por un único patólogo ciego a los datos de los animales. Se espera que D2-LA y D4-ALA reduzcan la cantidad de MDA que se encuentra en las muestras de hígado y reviertan los signos histológicos de esteatosis hepática.

Ejemplo 22: Modelo *in vitro* para determinar la efectividad contra el estrés oxidativo en el hígado

Los cultivos de hepatocitos pueden probarse para la supervivencia en cultivo celular en respuesta al estrés oxidativo usando la metodología descrita para el Ejemplo 16. Los hepatocitos se mantienen en un medio que contiene D-PUFA (0,01, 0,1, 1,0, 10,0 y 100 µM de D2-LA, D4-ALA y combinaciones 1:1 de D2-LA y D4-ALA) o H-PUFA (0,01, 0,1, 1,0, 10,0 y 100 µM de LA, ALA y combinaciones 1:1 de LA y ALA) durante 72 horas. La incorporación de PUFA en las células se monitoriza mediante GC como se describe para el Ejemplo 2 y 7. Como se describe para el Ejemplo 7, los hepatocitos también se tratan con paraquat (PQ; 500 µM), un compuesto que genera estrés oxidativo. Para medir la supervivencia, las células se cuentan usando un hemocitómetro y un método de exclusión con azul tripán. Se espera que los PUFA se capten fácilmente por los hepatocitos. Se espera que los D-PUFA tengan efectos protectores en comparación con las muestras de control.

Ejemplo 23. Modelo para probar la incorporación en los tejidos adiposo y cardíaco

La espectrometría de masas de relación de isótopos puede usarse para confirmar la incorporación de D-PUFA en las membranas de fosfolípidos del tejido adiposo y del corazón. Cuando se administra D2-LA y D4-ALA a través de suplementos dietéticos, la incorporación en tejidos animales puede controlarse mediante una técnica de espectrometría de masas de relación de isótopos que permitirá medir el aumento total de la composición de deuterio en las membranas lipídicas, informando de esta manera la incorporación de D2-LA, D4-ALA y cualquier otro PUFA derivado de estos compuestos. Usando este método, puede detectarse una captación sustancial de D-PUFA en tejido animal. Por ejemplo, los ratones se suplementan con D-PUFA (0,01, 0,1, 1,0, 10,0 y 100 mg/kg de D2-LA, D4-ALA y combinaciones 1:1 de D2-LA y D4-ALA) o H-PUFA (0,01, 0,1, 1,0, 10,0 y 100 mg/kg de LA, ALA y combinaciones 1:1 de LA y ALA) como la única fuente de PUFA durante 6 días, se exponen de forma aguda a un oxidante conocido o vehículo salino y se continúan con la misma dieta durante 6 días adicionales. Se extraen el tejido adiposo y el corazón y se analizan muestras homogeneizadas de ratones de control y ratones tratados con el compuesto de ensayo para determinar el contenido de deuterio como se describe en el Ejemplo 7 anterior. Se espera que D2-LA y D4-ALA se encuentren en los tejidos adiposos y cardíacos analizados.

Ejemplo 24. Modelo para probar la efectividad contra la hipertensión

El modelo de hipertensión de rata con hipertensión espontánea propensa a ictus (SHRSP), que se ha descrito (McIntyre et al., 1997 *Hypertension* 30:1517; Alexander et al., 1999 *Cardiovasc. Res.* 43:798; Fennell et al., 2002 *Gene Ther.* 9:110), puede usarse para evaluar la capacidad de un compuesto para mitigar la hipertensión.

Por ejemplo, grupos (8-9 animales/grupo) de ratas SHRSP macho de 8 semanas de edad se suplementan con D-PUFA (0,01, 0,1, 1,0, 10,0 y 100 mg/kg de D2-LA, D4-ALA y combinaciones 1:1 de D2-LA y D4-ALA) o H-PUFA (0,01, 0,1, 1,0, 10,0 y 100 mg/kg de LA, ALA y combinaciones 1:1 de LA y ALA) como la única fuente de PUFA durante un período de 8 semanas y las mediciones de la presión arterial sistólica se registran a intervalos semanales. Se espera que los animales tratados con D2-LA y D4-ALA muestren una reducción de la presión arterial sistólica.

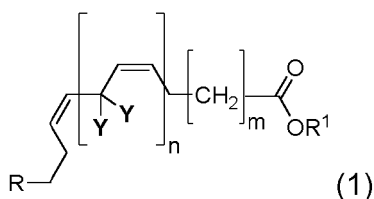
Ejemplo 25. Modelo para probar la efectividad contra diversos trastornos cardíacos

Los compuestos de prueba descritos en el presente documento también pueden evaluarse usando el modelo de perfusión cardíaca aislado de Langendorf. Por ejemplo, grupos (8-9 animales/grupo) de ratas macho de 8 semanas de edad se suplementan con D-PUFA (0,01, 0,1, 1,0, 10,0 y 100 mg/kg de D2-LA, D4-ALA y combinaciones 1:1 de D2-LA y D4-ALA) o H-PUFA (0,01, 0,1, 1,0, 10,0 y 100 mg/kg de LA, ALA y combinaciones 1:1 de LA y ALA) como la única fuente de PUFA durante un período de 8 semanas. Después del período de tratamiento, los corazones de rata se analizan mediante ecocardiografía para medir el grosor muscular del ventrículo izquierdo, la aurícula izquierda, el ventrículo derecho y la aurícula derecha y electrocardiografía para medir la actividad eléctrica. Después de la evaluación en vivo, las ratas se sacrifican humanamente y sus corazones se aíslan y se conectan al sistema de perfusión aislado Langendorf (Véase Jennings et al., *Am. Surg.* 2004; 70(9), 797-800). A continuación, se mide la presión del ventrículo izquierdo con un balón ventricular izquierdo. También se mide el flujo coronario. La función cardíaca se evalúa además determinando el efecto de la administración de compuestos de prueba sobre la velocidad de contracción y relajación del corazón. Para determinar si los efectos observados sobre la función cardíaca se deben

al efecto del compuesto de prueba sobre la función mitocondrial, se evalúa la actividad mitocondrial antes y después de la isquemia para cada uno de los grupos de tratamiento. Se espera que D2-LA y D4-ALA reduzcan los síntomas y marcadores asociados a los trastornos cardíacos.

REIVINDICACIONES

1. Una sustancia poliinsaturada para su uso en el tratamiento o inhibición de la progresión de (a) esteatosis hepática alcohólica, esteatosis hepática no alcohólica, esteatohepatitis, cirrosis, carcinoma hepatocelular, ictericia obstructiva, coleditiasis o una enfermedad del tracto biliar en un paciente con trastorno hepático o (b) lipidemia, trastornos de la liporegulación, lipotoxicidad, cardiopatía isquémica, hipertensión, fibrilación auricular, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad de las arterias coronarias o aterosclerosis en un paciente con lipidemia o factores de riesgo relacionados con el corazón,
 en donde la sustancia poliinsaturada comprende un ácido graso o un éster de ácido graso que está isotópicamente modificado con deuterio en una o más posiciones;
 en donde la sustancia poliinsaturada se incorpora al cuerpo de un paciente después de la administración; y
 en donde la cantidad del ácido graso o éster de ácido graso isotópicamente modificado comprende entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 75 % de la cantidad total de ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos administrados o ingeridos por el paciente.
2. La sustancia poliinsaturada para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ácido graso o éster de ácido graso está isotópicamente modificado en una posición bisalílica, en donde el átomo de deuterio está presente en un nivel significativamente superior al nivel de abundancia natural del deuterio.
3. La sustancia poliinsaturada para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el ácido graso o éster de ácido graso isotópicamente modificado comprende entre el 10 % y el 50 % de la cantidad total de ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos ingeridos por el paciente.
4. La sustancia poliinsaturada para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde una célula o tejido del paciente mantiene una concentración suficiente del ácido graso o éster de ácido graso isotópicamente modificado para evitar la autooxidación del ácido graso o éster de ácido graso poliinsaturado de origen natural.
5. La sustancia poliinsaturada para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la sustancia poliinsaturada es un ácido graso omega 3, éster de ácido graso omega 3, ácido graso omega 6 o éster de ácido graso omega 6.
6. La sustancia poliinsaturada para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la sustancia poliinsaturada se selecciona del grupo que consiste en ácido 11,11-D2-linolénico, ácido 14,14-D2-linolénico, ácido 11,11,14, 14-D4-linolénico, ácido 11,11-D2-linoleico, ácido 11-D-linolénico, ácido 14-D-linolénico, ácido 11,14-D2-linolénico y ácido 11-D-linoleico.
7. La sustancia poliinsaturada para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la sustancia poliinsaturada se modifica además isotópicamente en una posición pro-bis-alílica.
8. La sustancia poliinsaturada para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la sustancia poliinsaturada es un éster de ácido graso.
9. La sustancia poliinsaturada para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el éster es un triglicérido, diglicérido o monoglicérido.
10. La sustancia poliinsaturada para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el uso comprende además administrar un antioxidante.
11. La sustancia poliinsaturada para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el antioxidante es Coenzima Q, idebenona, mitoquinona, mitoquinol, vitamina C o vitamina E.
12. La sustancia poliinsaturada para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el ácido graso o éster de ácido graso modificado isotópicamente comprende la estructura de:

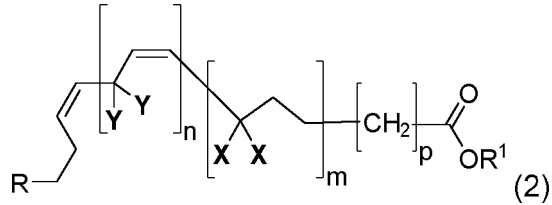


en donde R es H o C₃H₇;
 R¹ es H o alquilo;
 cada Y es independientemente H o D y al menos un Y es D;
 m es de 1 a 10; y

n es de 1 a 5.

13. La sustancia poliinsaturada para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el ácido graso o éster de ácido graso modificado isotópicamente comprende la estructura de:

5



en donde R es H o C₃H₇;

R¹ es H o alquilo;

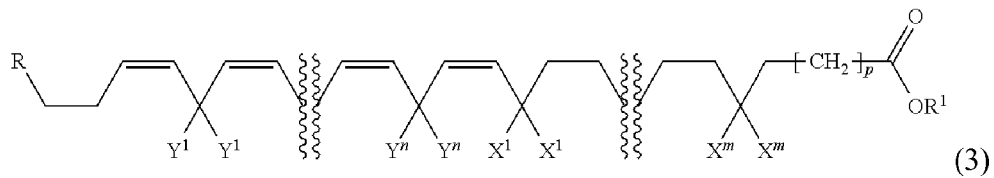
10 cada Y y X es independientemente H o D y al menos un Y es D;

m es de 1 a 10;

n es de 1 a 5; y

p es de 1 a 10.

15 14. La sustancia poliinsaturada para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el ácido graso o éster de ácido graso modificado isotópicamente comprende la estructura de:



20 en donde R es H o C₃H₇;

R¹ es H o alquilo;

Y¹-Yⁿ son independientemente H o D y al menos uno de Y¹-Yⁿ es D; y

X¹-X^m son independientemente H o D;

m es de 1 a 10;

25 n es de 1 a 6; y

p es de 1 a 10; o

m es de 1 a 12; y

n es de 1 a 5.

FIG. 1A

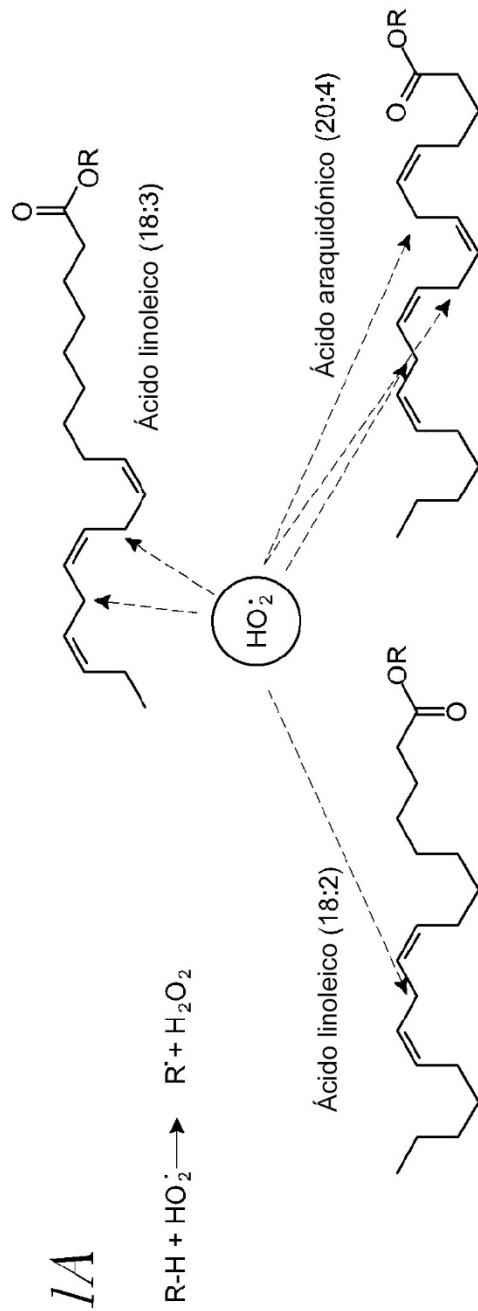


FIG. 1B

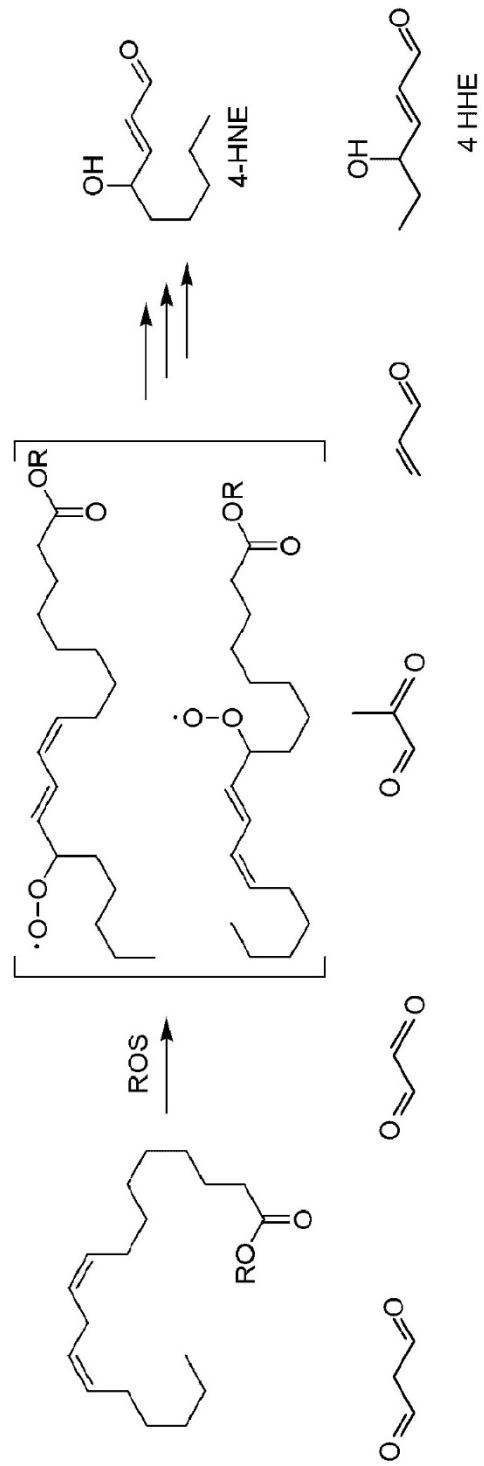


FIG. 2A

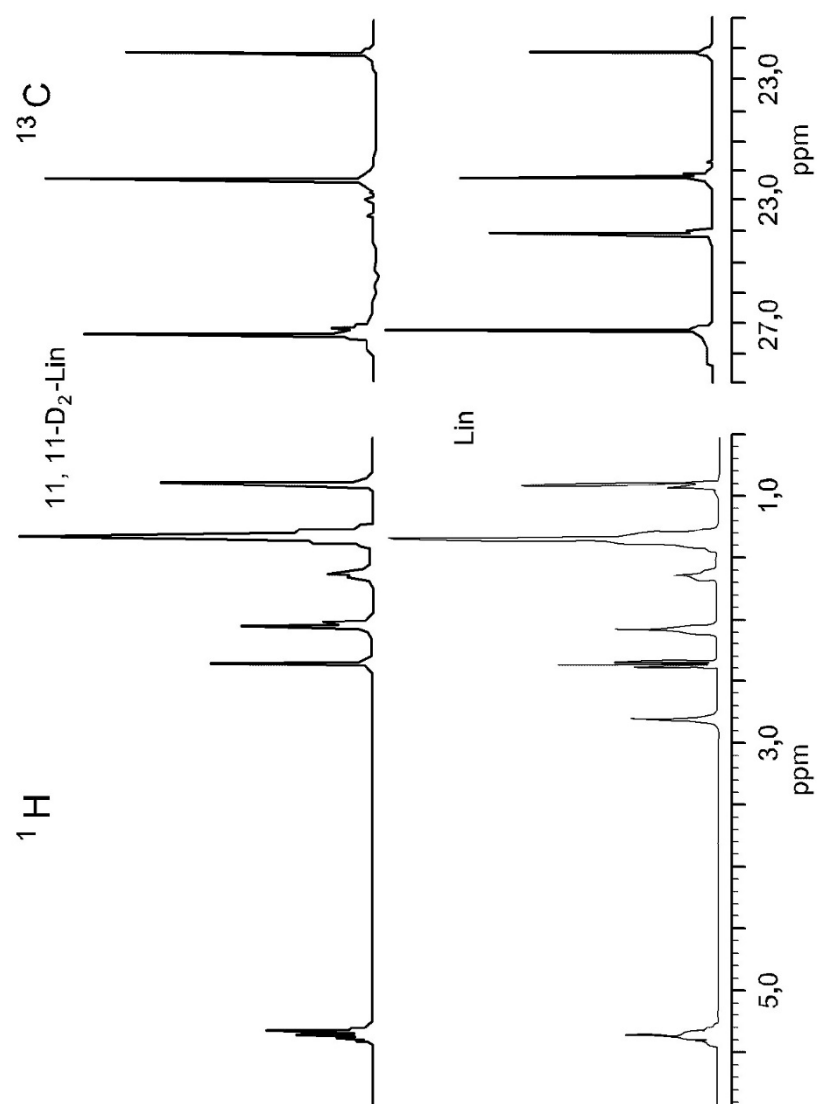
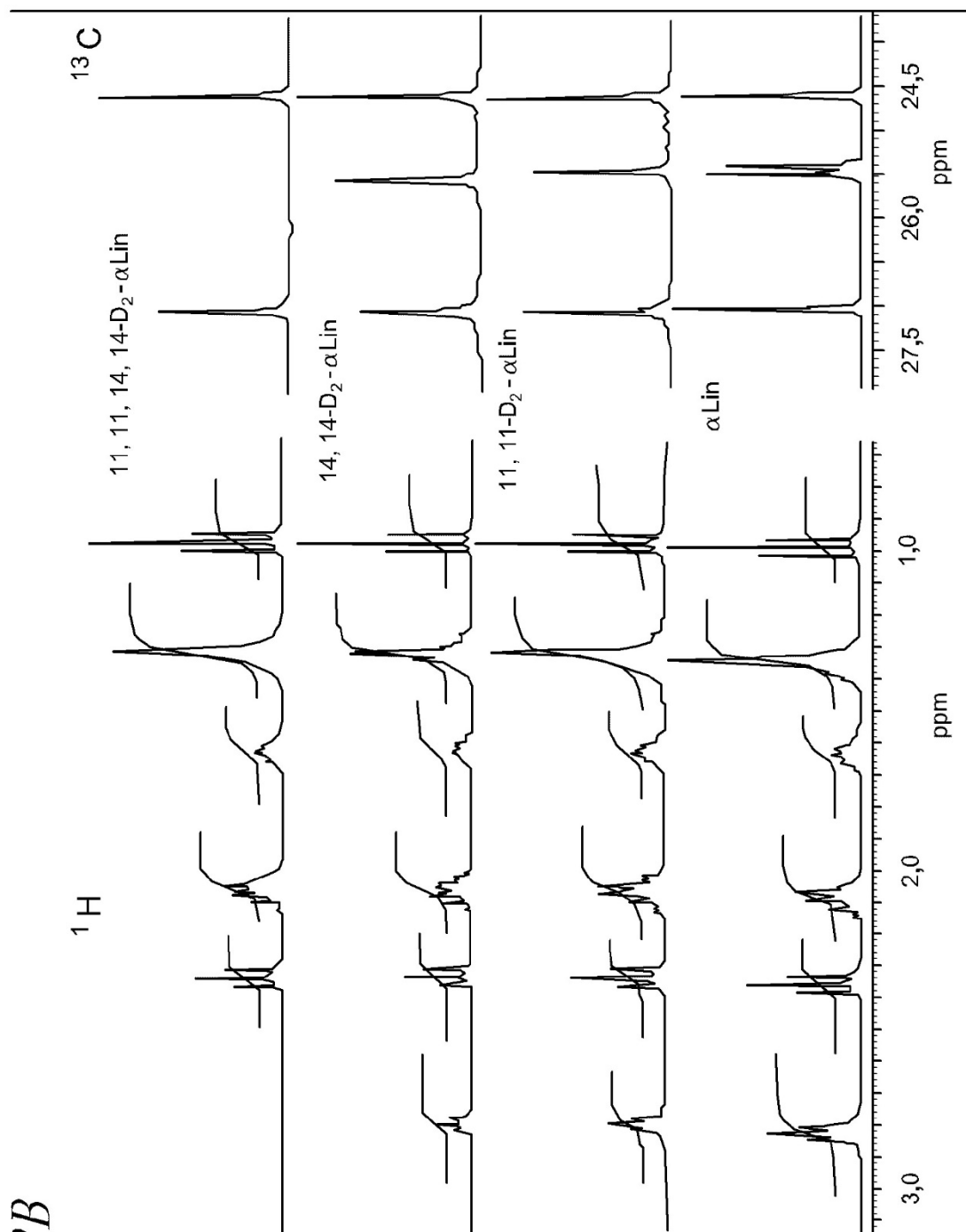


FIG. 2B



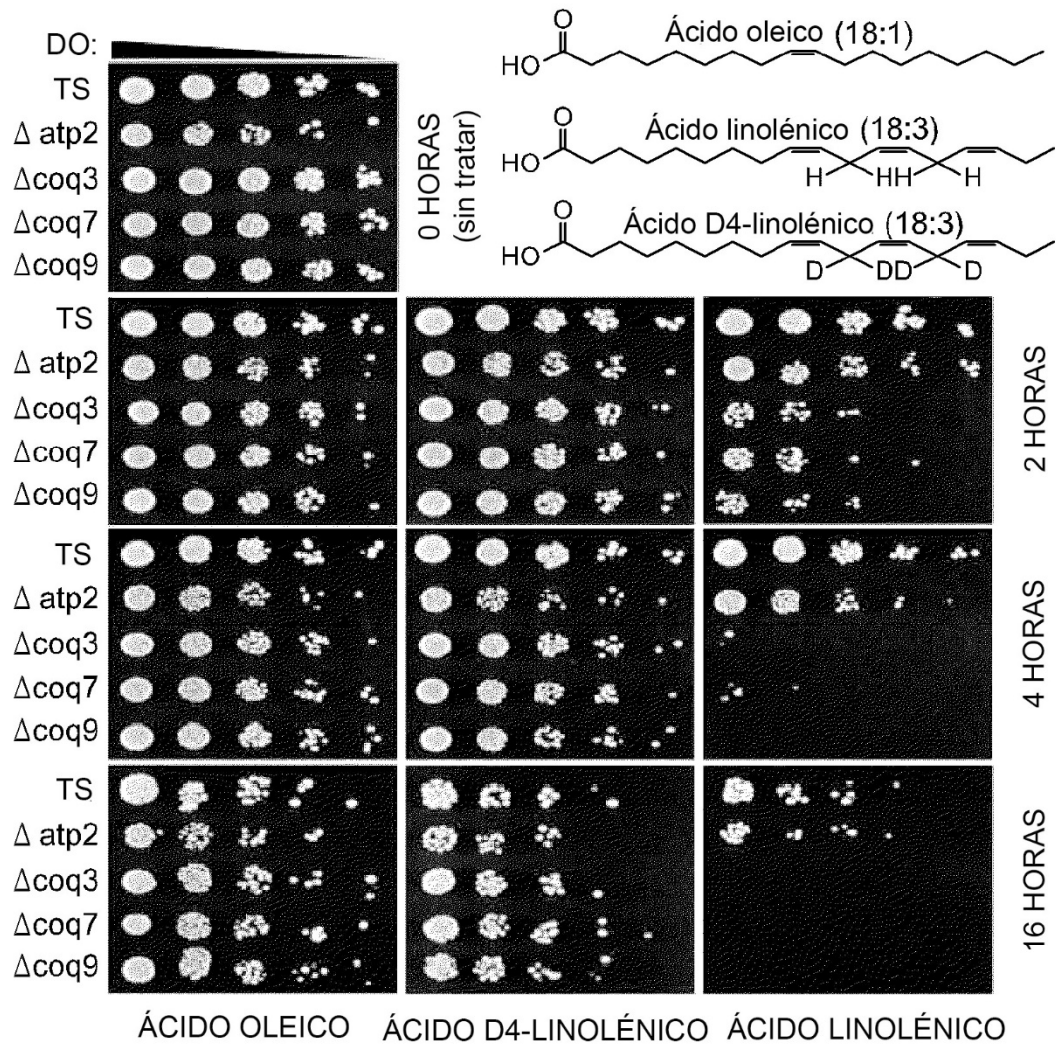


FIG. 3

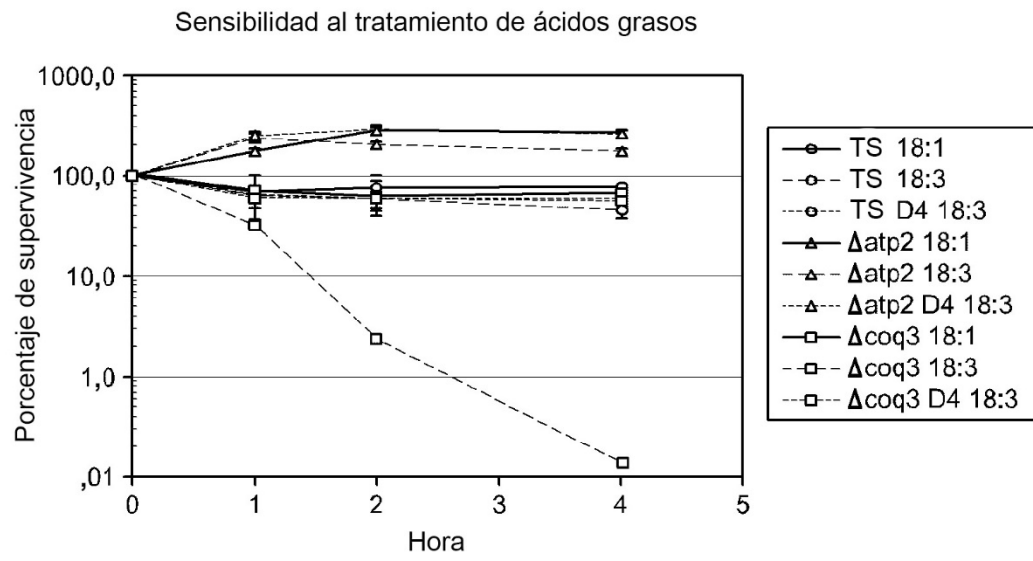


FIG. 4

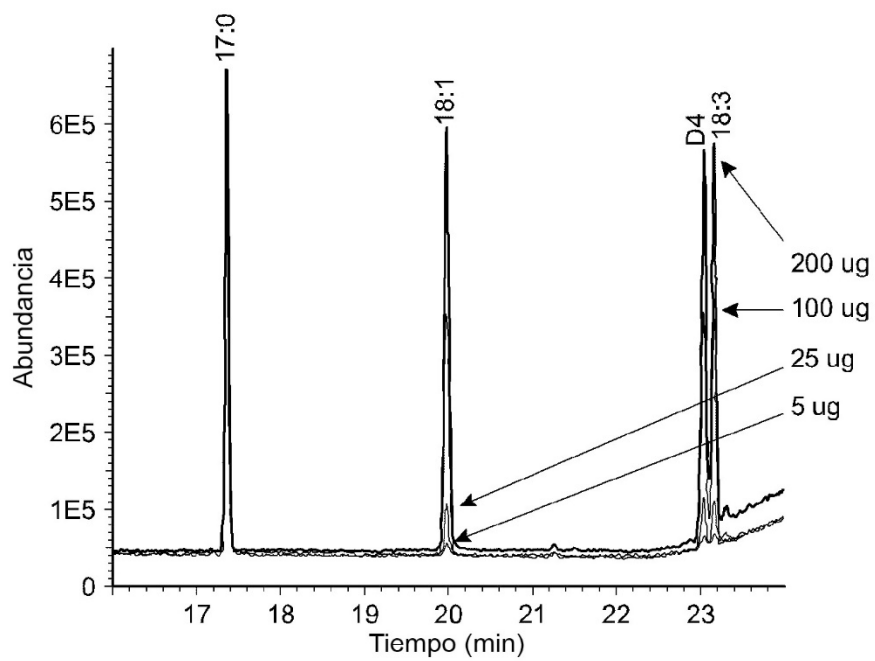


FIG. 5

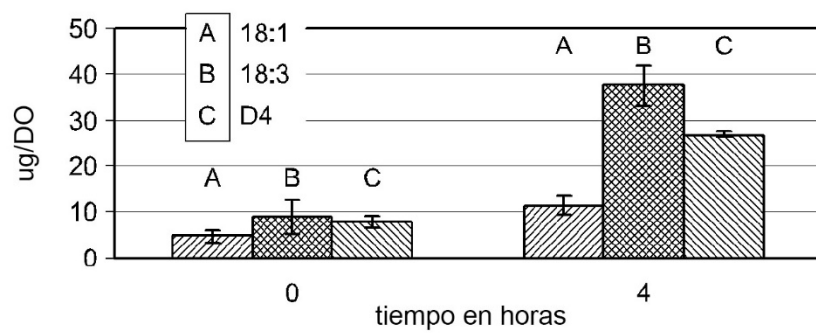
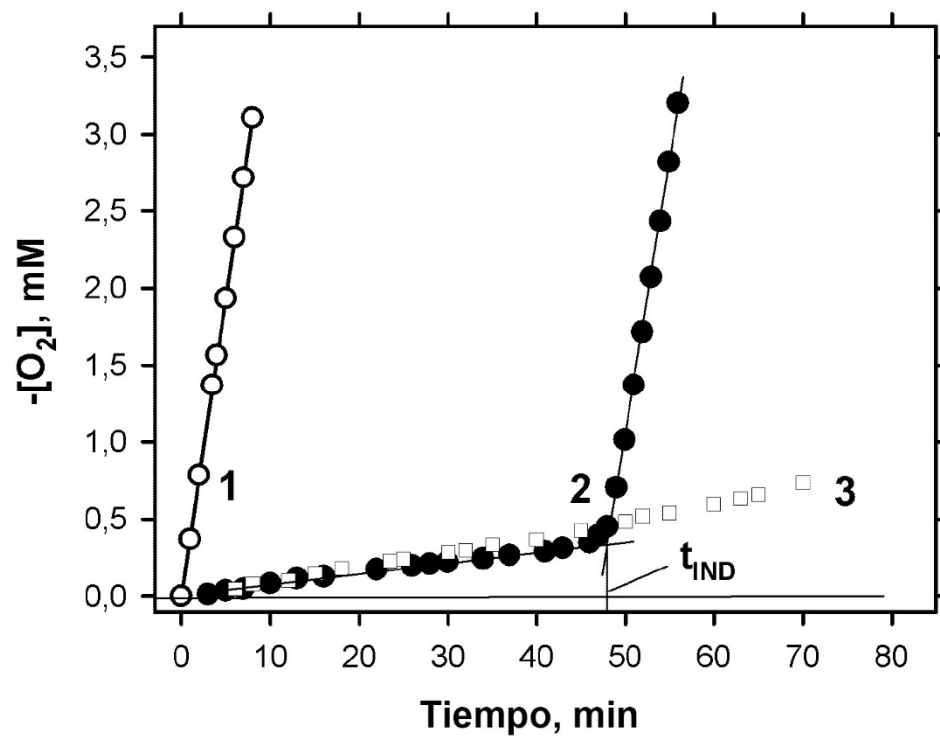


FIG. 6

*FIG. 7*

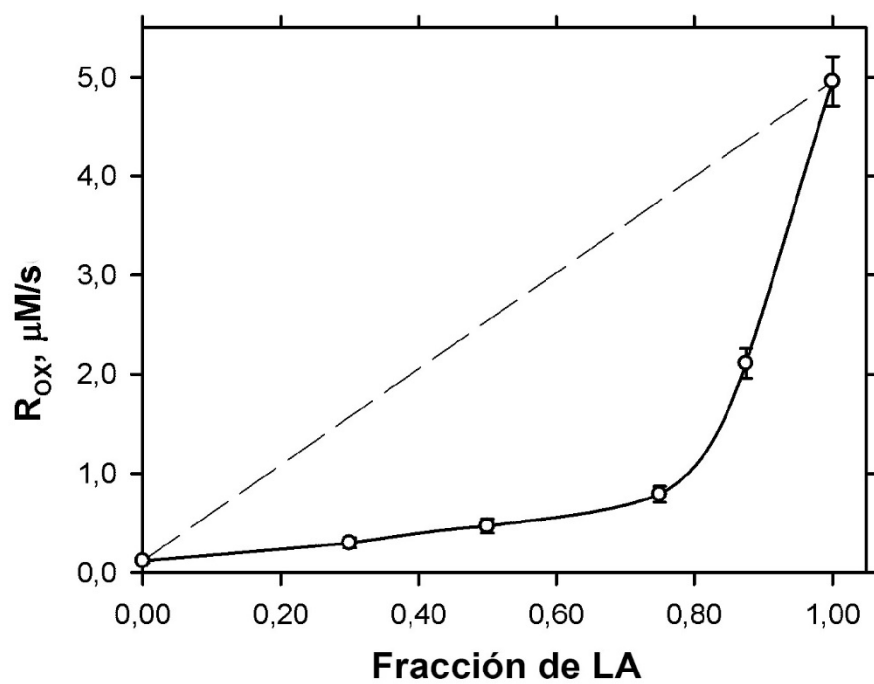
*FIG. 8*

FIG. 9

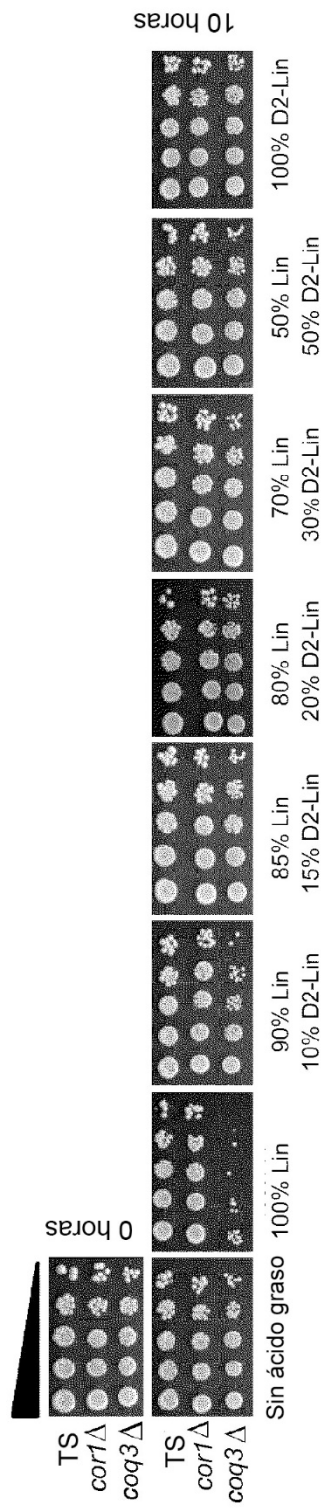


FIG. 10

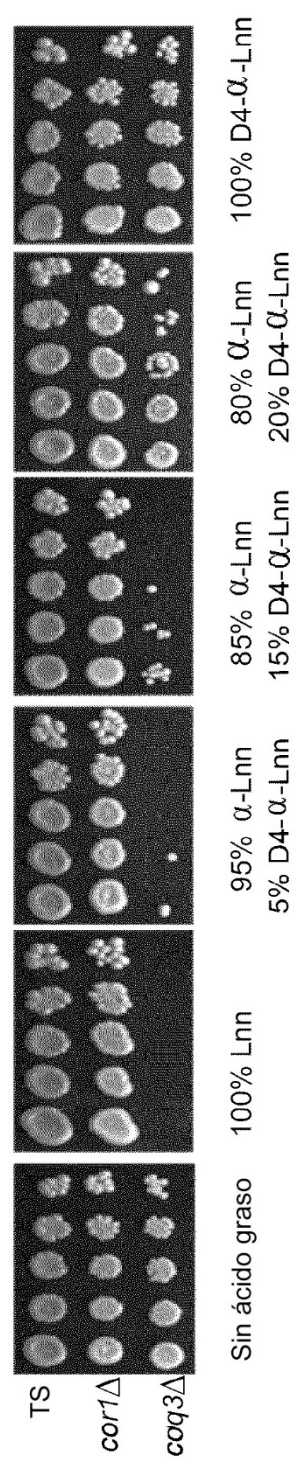
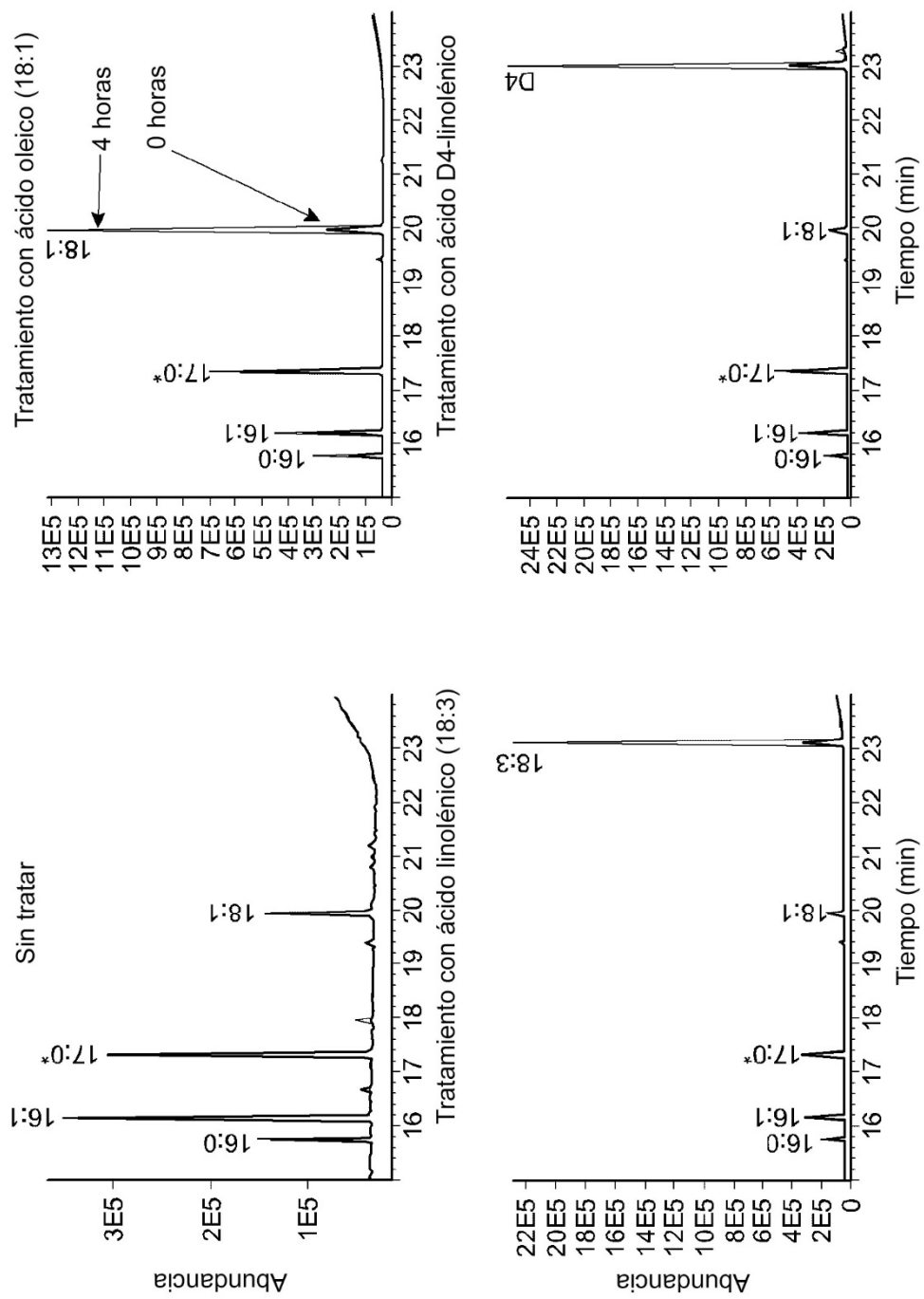


FIG. 11



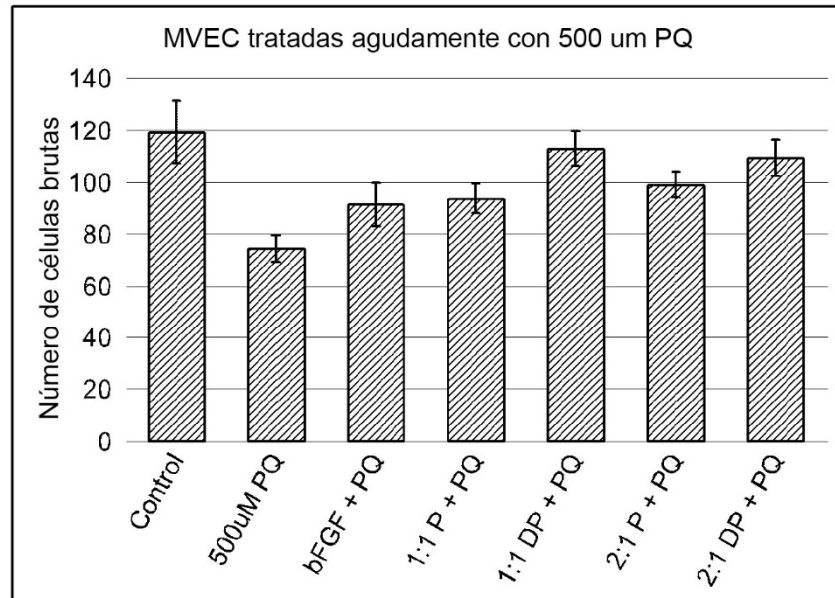


FIG. 12

FIG. 13

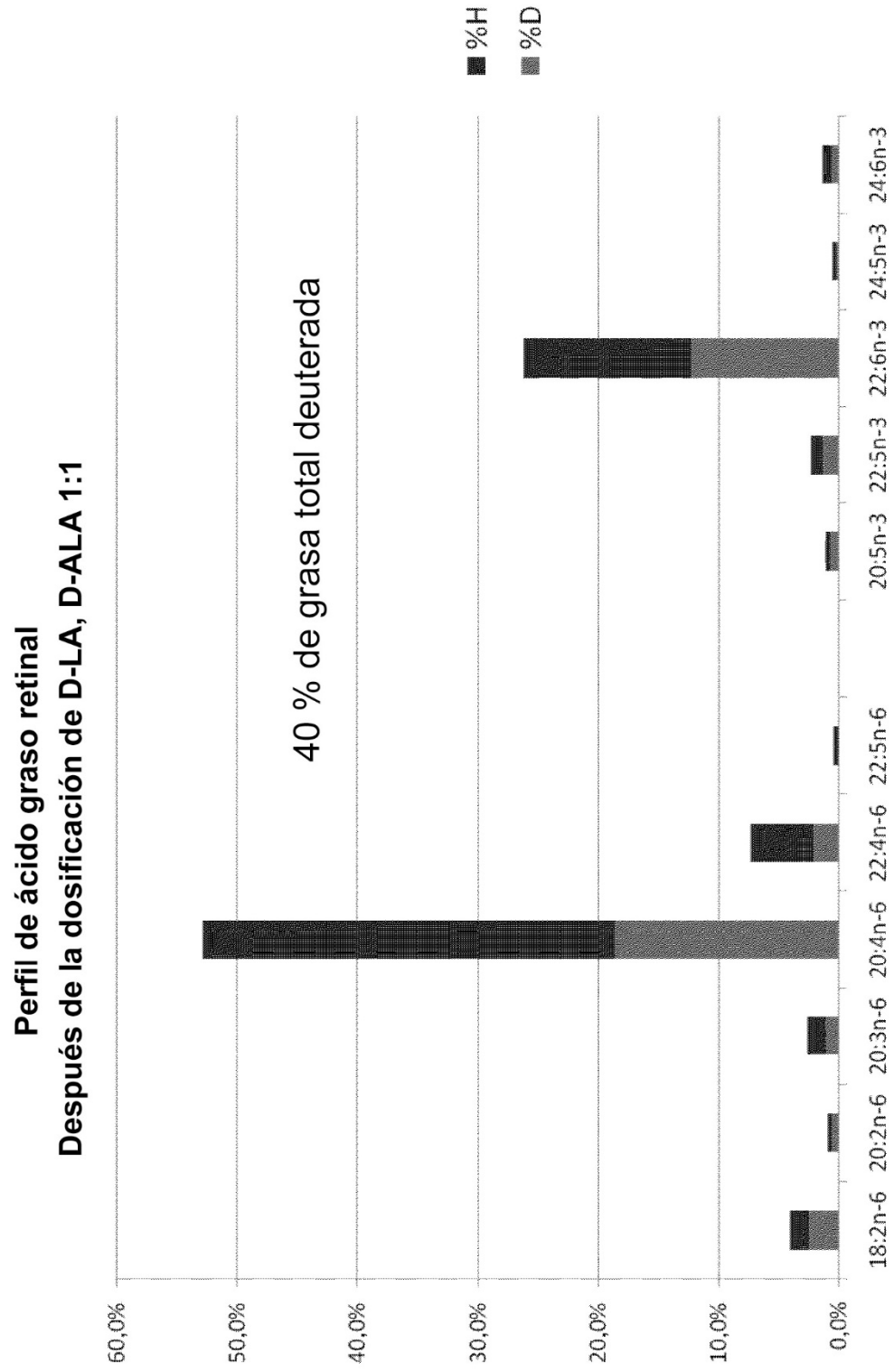


FIG. 14

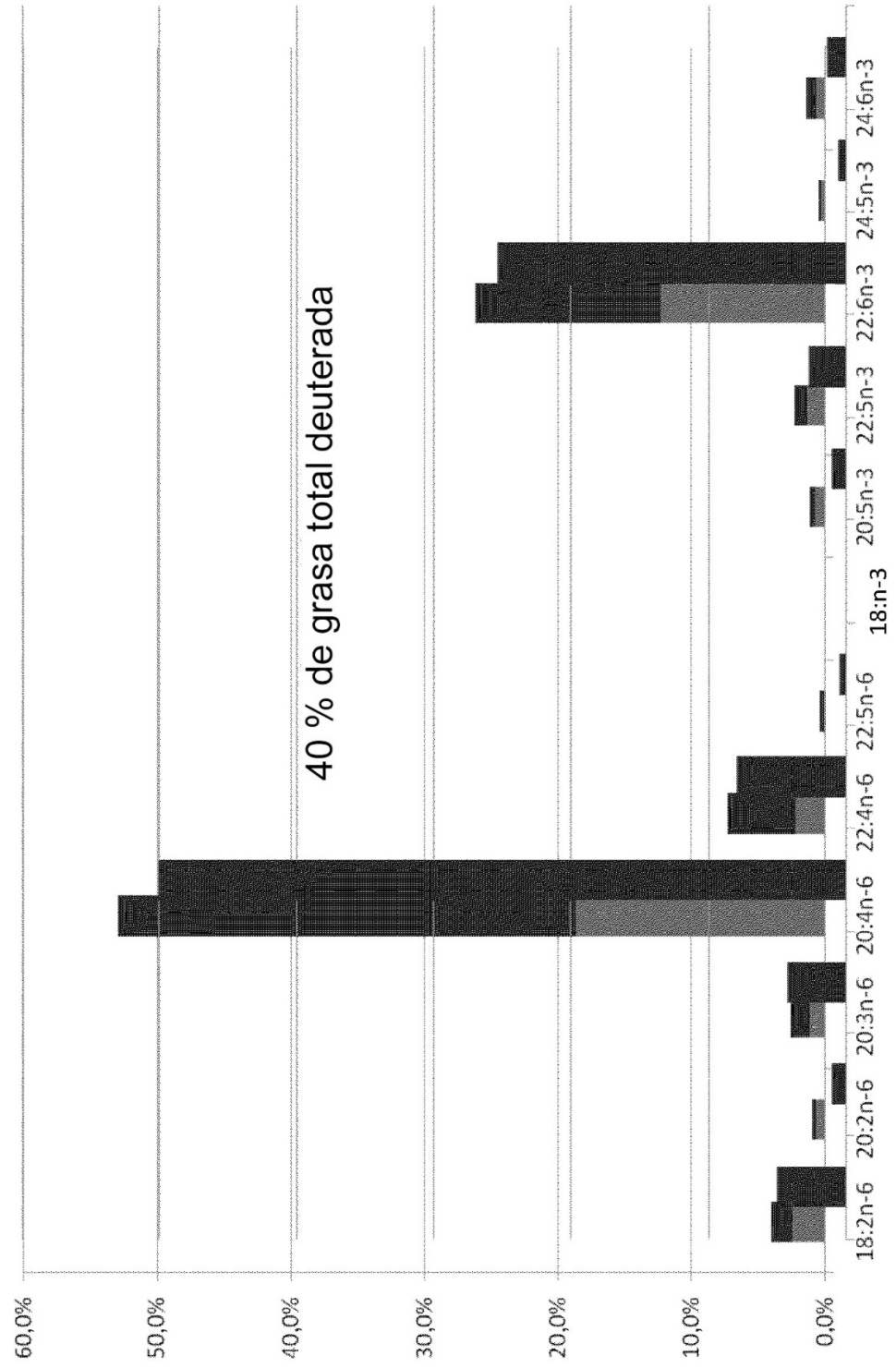


FIG. 15

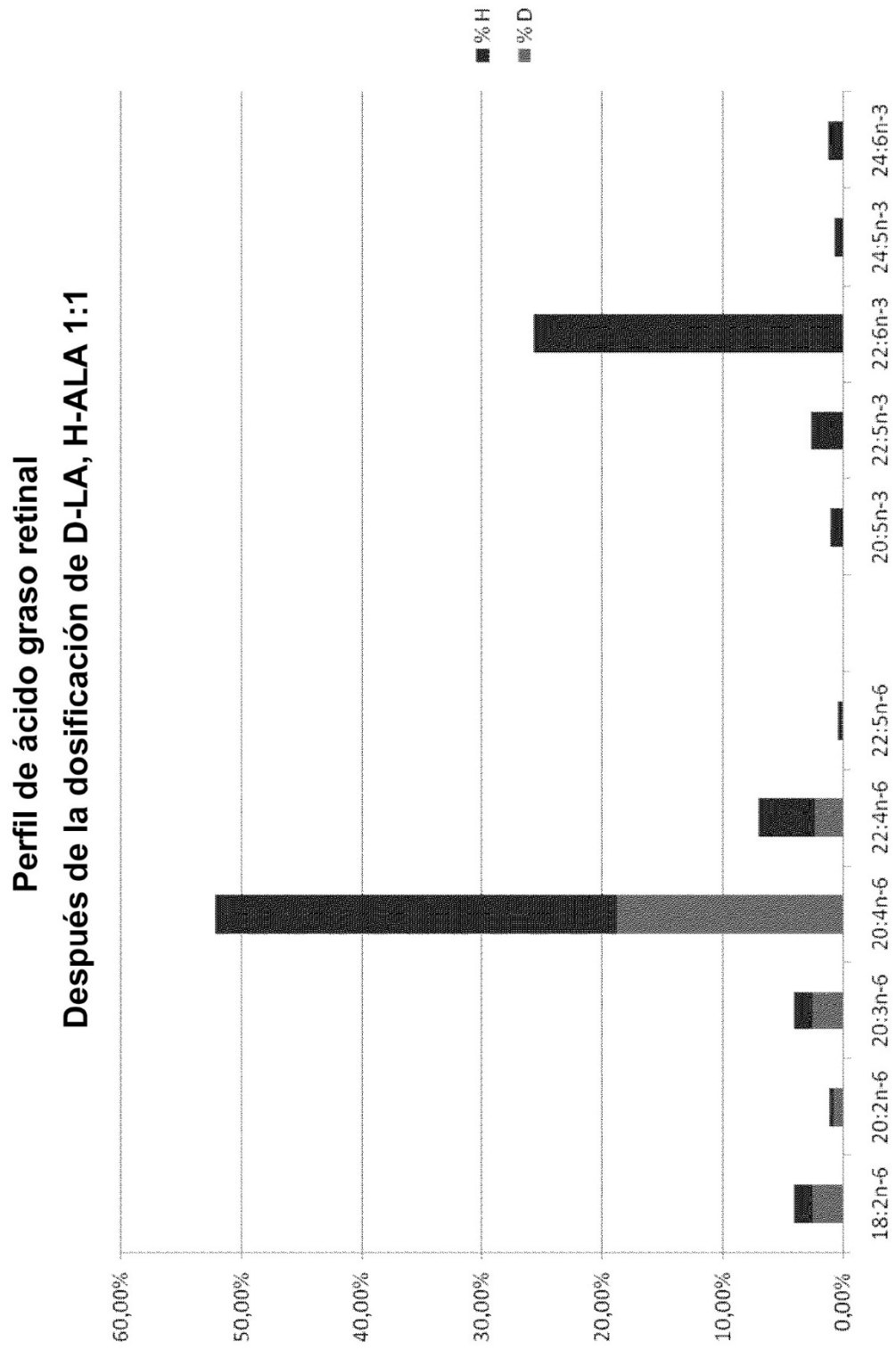


FIG. 16

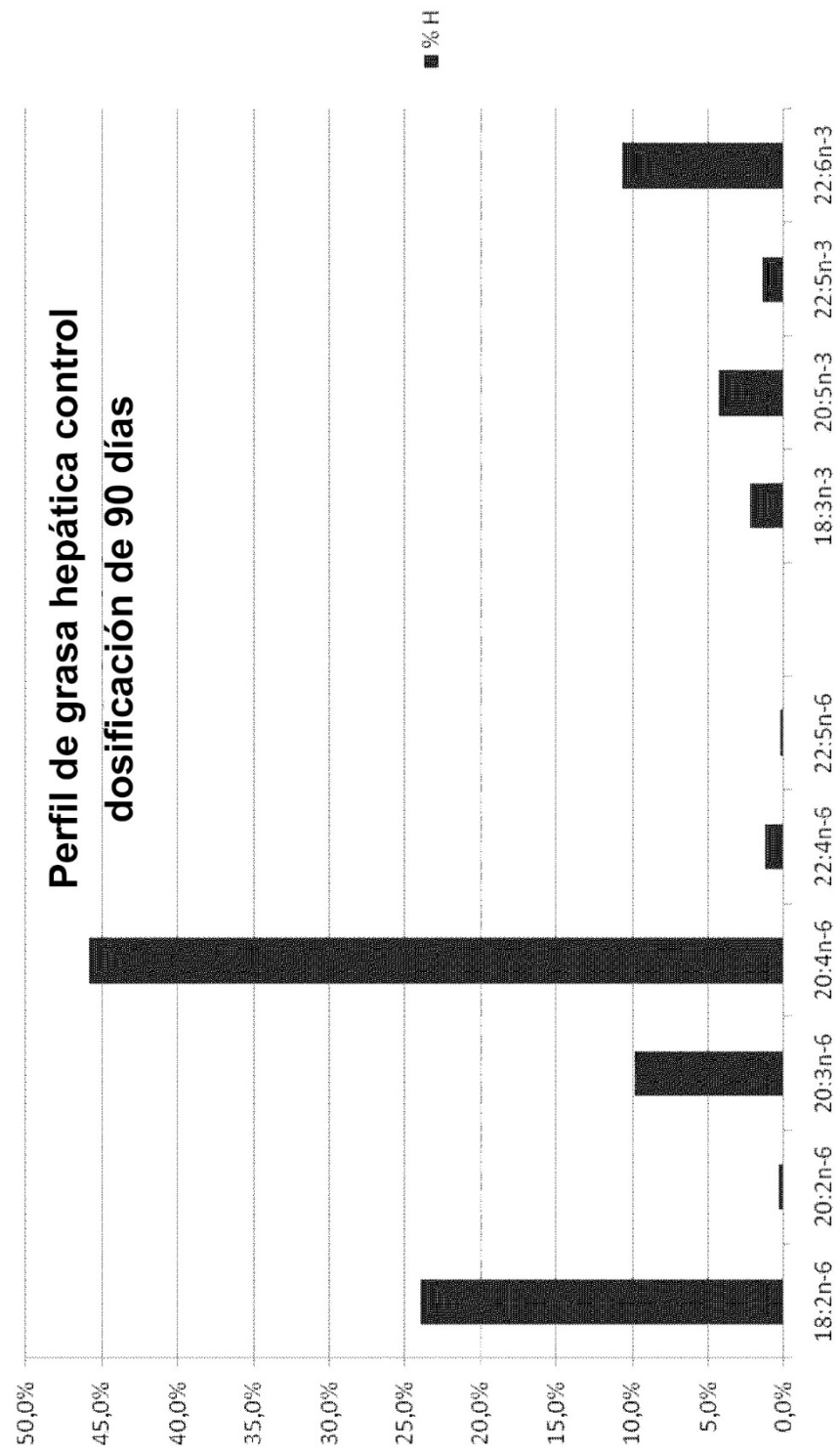


FIG. 17

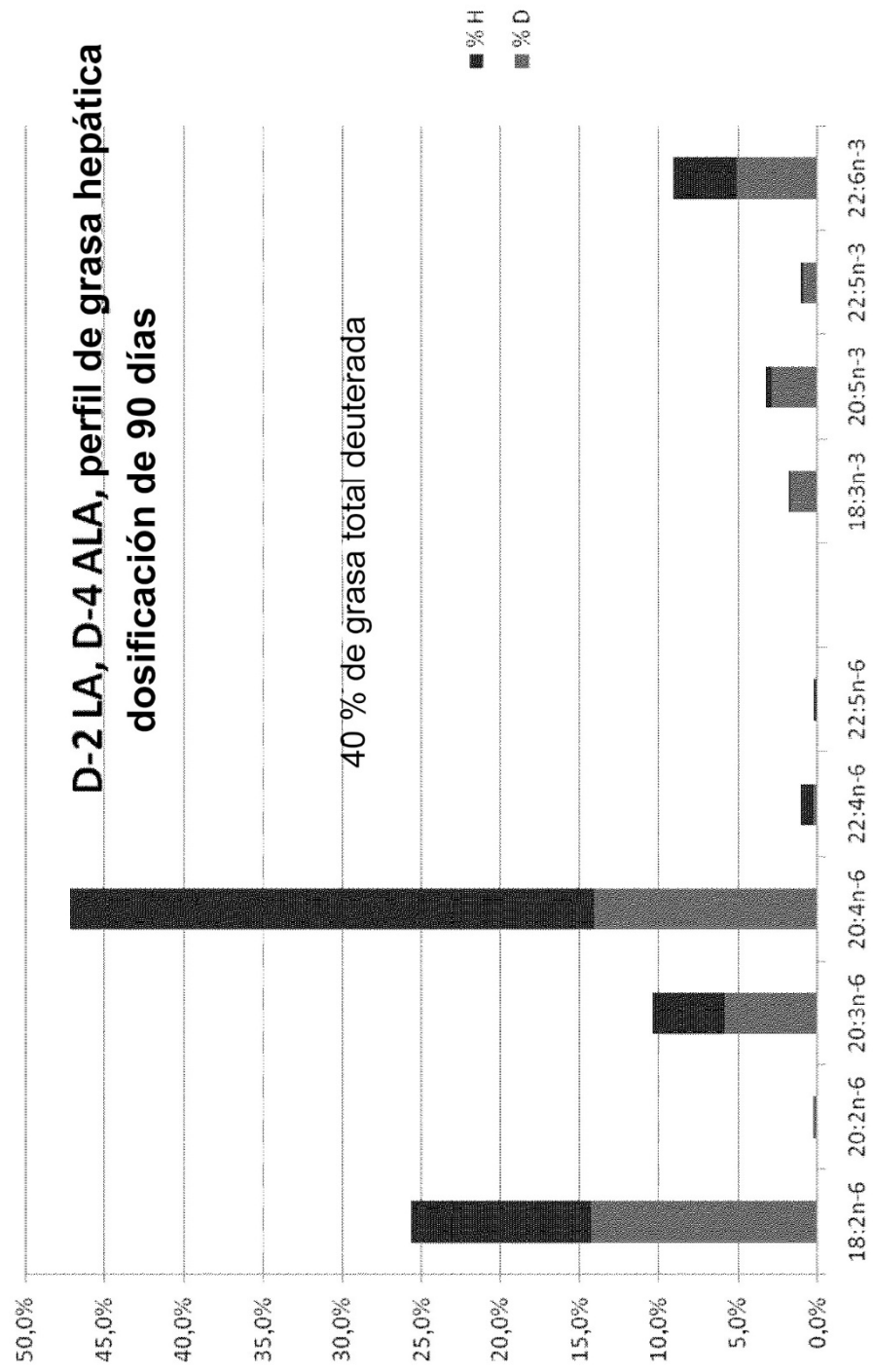


FIG. 18

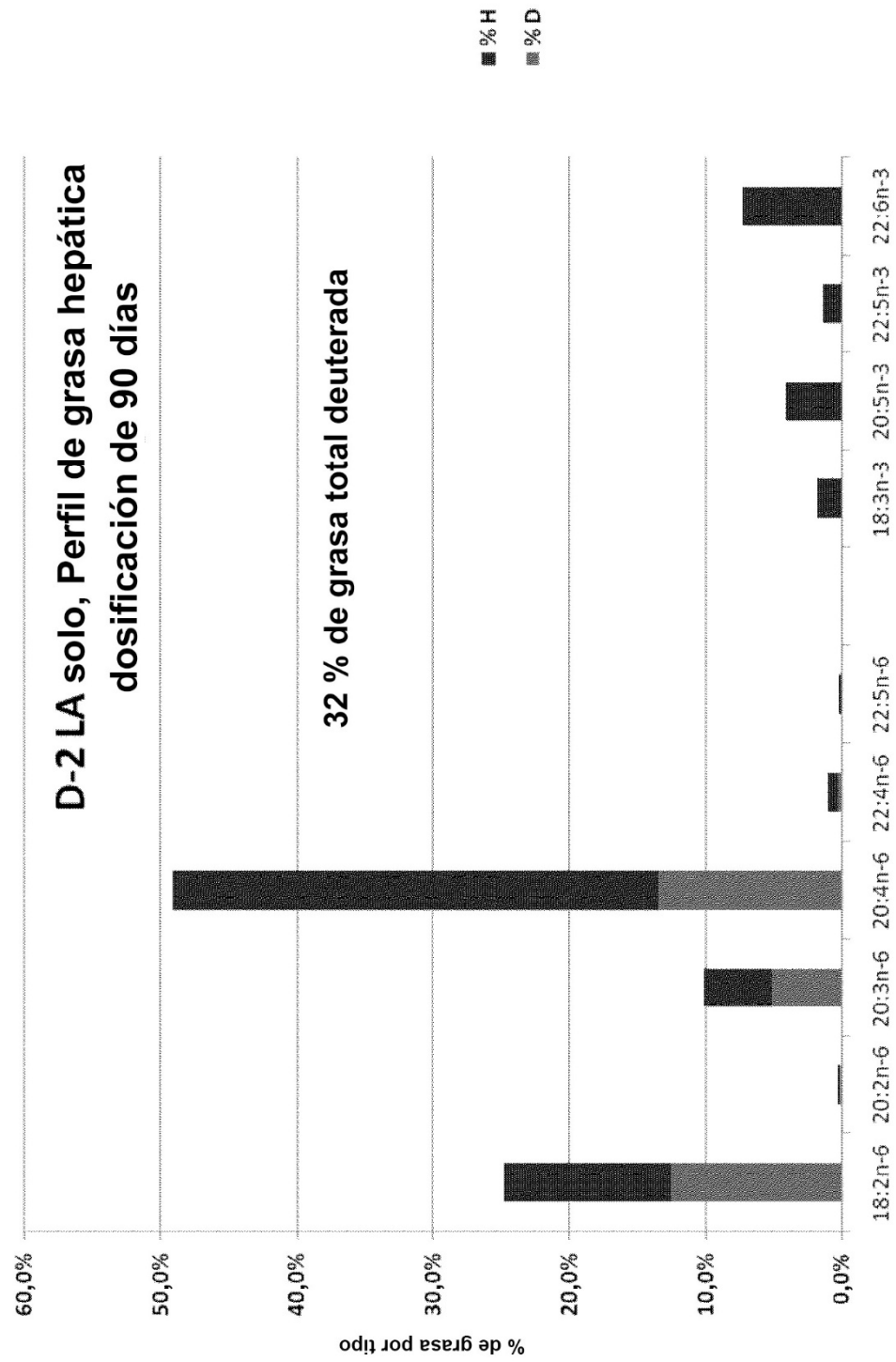


FIG. 19

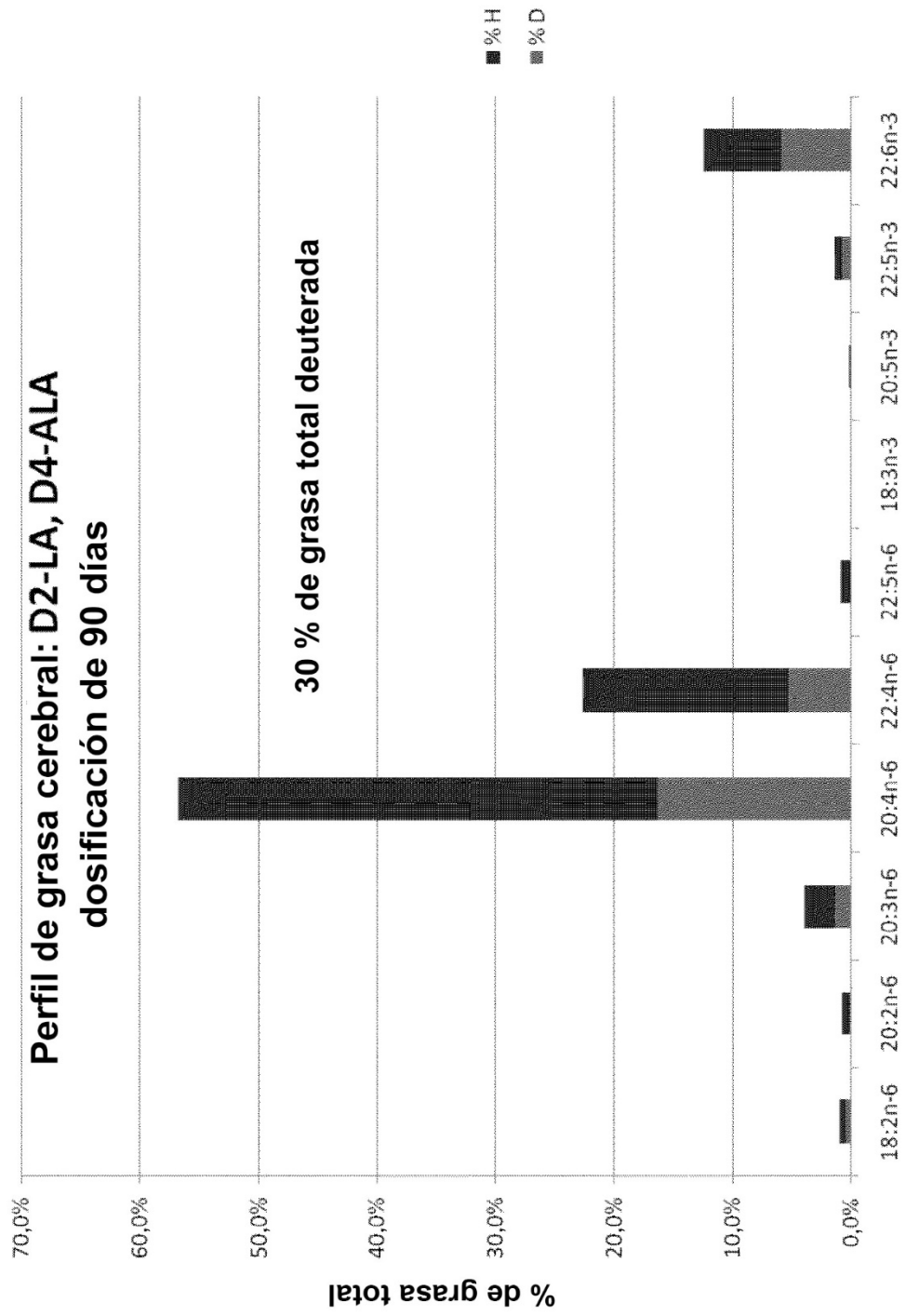


FIG. 20

**Perfil de grasa cerebral: D2-LA, H4-ALA
dosificación de 90 días**

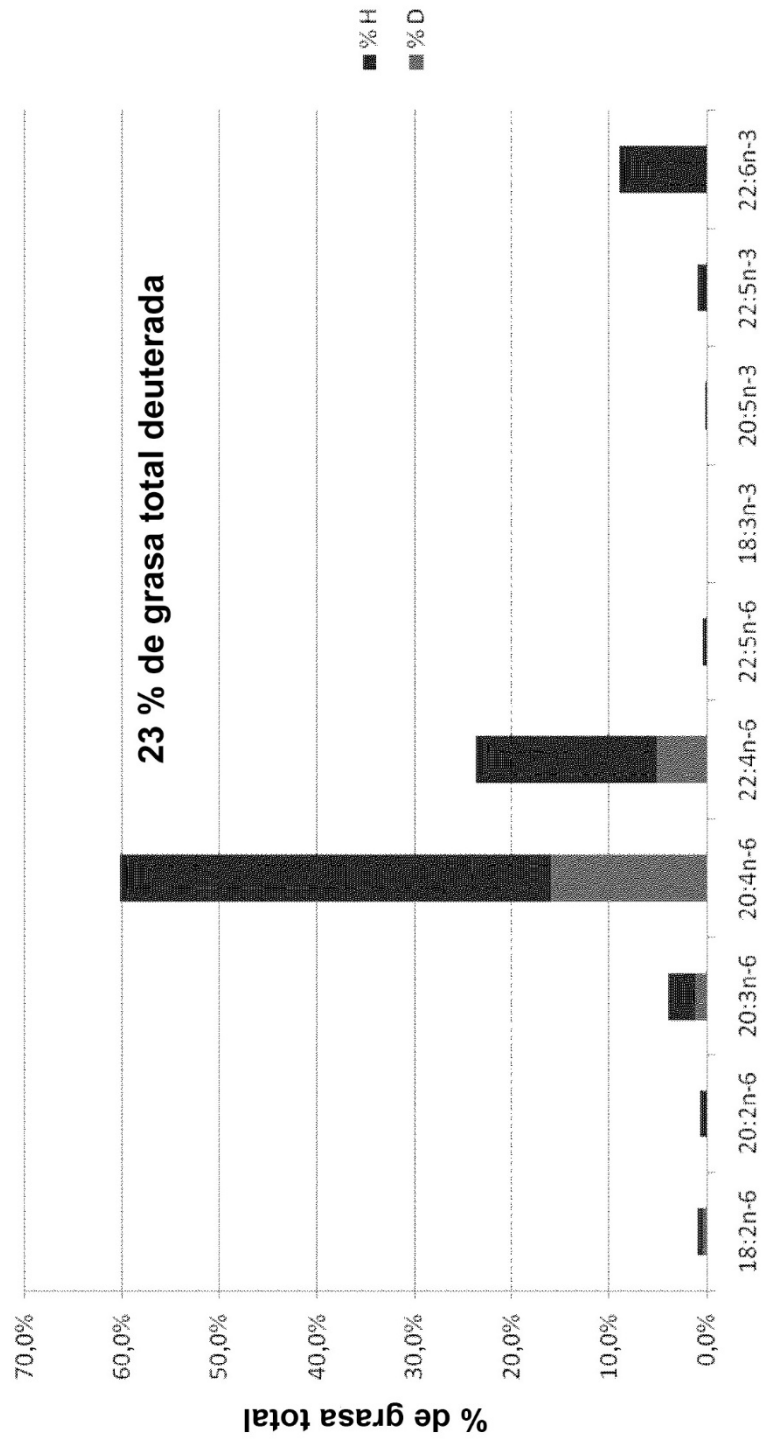


FIG. 21

