

Synthesis of fatty acid derivatives of
catechol compounds that exhibit negative
modulation of food intake and antioxidant
properties

Bruno Almeida Cotrim

TESI DOCTORAL UPF / ANY 2010

DIRECTORES DE LA TESI

Dr. Rafael de la Torre Fornell (Department of Experimental
and Health Sciences)

Dr. Jesús Joglar Tamargo (Department of Biological
Chemistry and Molecular Modeling. IQAC, CSIC)

Dedico este trabajo a la memoria del Prof. Dr. Octavio Augusto Ceva Antunes por contribuir a mi ilusión por la ciencia.

“Del Rigor en la Ciencia

En aquel imperio, el arte de la cartografía logró tal perfección que el mapa de una sola provincia ocupaba toda una ciudad, y el mapa del imperio, toda una provincia. Con el tiempo, estos mapas desmesurados no satisficieron y los colegios de cartógrafos levantaron un mapa del imperio, que tenía el tamaño del imperio y coincidía puntualmente con él. Menos adictas al estudio de la cartografía, las generaciones siguientes entendieron que ese dilatado mapa era inútil y no sin impiedad lo entregaron a las inclemencias del sol y los inviernos. En los desiertos del oeste perduran despedazadas ruinas del mapa, habitadas por animales y por mendigos; en todo el país no hay otra reliquia de las disciplinas geográficas.”

Jorge Luis Borges
Historia Universal de la Infamia

Agradecimientos

Agradezco a mis padres por todo.

Agradezco formalmente a mis directores científicos por haber trillado este camino junto a mí.

Agradezco a Luciana Silva da Costa por el todo apoyo en estos años de tesis.

Agradezco a todos mis colegas de la Fundación IMIM, de la Fundación IMABIS y del CSIC-IQAC y a todos aquellos que de alguna manera me han ayudado en este largo camino que fue esta tesis doctoral. He evitado los nombres propios en este agradecimiento por miedo de olvidarme injustamente de alguien, pero estad seguros que tales muestras de gratitud serán ofrecidas personalmente.

Financial Support

- Centro de Investigación Biomédica en Red-Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBN, which is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain)
- Alban Program, the European Union Program of High Level Scholarships for Latin America, scholarship number E06D101051BR (B.A.)
- Intramural financial support from IMIM Foundation and CSIC-IQAC is acknowledged

Abstract

Obesity constitutes a problem whose manifestations have consequences in almost every field of the medicine and nowadays there is a lack of pharmacological therapy alternatives for its long term treatment. Lipidic compounds as endocannabinoids and PPAR- α ligands are known to play an important role in the modulation of appetite and metabolism. Three series of fatty acid derivatives of catechol compounds were synthesized and their biological activity evaluated. Some of the synthesized compounds presented LDL antioxidant activity and/or food intake modulation in an animal model and their mechanism of action was also evaluated. The pharmacodynamics of the synthesized compounds could be explained by CB₁ and PPAR- α interactions nevertheless it does not explain the activity of all compounds.

Resumen

La obesidad es un problema cuyas manifestaciones tienen consecuencias en casi todos los campos de la medicina y actualmente existe una escasez de terapias farmacológicas para su tratamiento de uso continuo. Se sabe que algunos compuestos lipídicos como los endocannabinoides y ligandos del PPAR- α participan de manera importante en la modulación del apetito y en el metabolismo. Tres series de compuestos derivados de ácidos grasos con compuestos catecólicos fueron sintetizadas y sus actividades biológicas fueron evaluadas. Algunos de los compuestos presentó inhibición de la oxidación de la LDL y/o modulación de la ingesta en modelo animal y sus mecanismos de acción fueron también evaluados. La actividad de los compuestos pasa por interacciones con el receptor CB₁ y el PPAR- α pero estas interacciones no explican la actividad de todos los compuestos.

Preface

The idea of studying the biological activity of lipidic catechol compounds derived from the previous projects of Dr. Rafael de la Torre in:

I. hydroxytyrosol derivatives through the study of the antioxidant activity of its glucuronide metabolites (Khymenets **2006**, Khymenets **2010**), and

II. MDMA metabolism through the synthesis and detection of MDMA catechol metabolites (Pizarro **2002**) and their tioether adducts (Perfetti **2009**) in biological fluids.

At the molecular level there is a strong molecular similarity between hydroxytyrosol and MDMA catechol metabolites and, in addition, both classes of compounds have a strong similarity with dopamine.

Having in mind that dopamine fatty acid amides (OLDA and NADA) have biological activities as endocannabinoids and endovanilloids (Chu **2003**, Berzuglov **2001**, Bisogno **2000**, Huang **2002**) our original idea was to synthesize and evaluate the biological activity of phenolic olive oil compounds and catechol MDMA metabolites fatty acid derivatives.

The work is divided in three main chapters:

First chapter – It is presented the published article and the deposited patent that describe the synthesis, food intake modulation activity evaluation and pharmacodynamics study of fatty acid amides of catechol MDMA metabolites.

Second Chapter – It is presented an article manuscript that describes the synthesis and LDL antioxidant activity of olive oil phenolic fatty acid esters.

Third chapter – It is presented an article manuscript and a patent that describe the synthetic development of fatty alcohol ethers of olive oil phenolic compounds and the study of its food intake modulation activity and pharmacodynamics.

Bruno Almeida Cotrim, Barcelona 2010

ABBREVIATIONS

- ¹³C RMN** – Carbon 13 nuclear magnetic resonance
¹H NMR – Hydrogen nuclear magnetic resonance
2-AG – 2-arachidonylglycerol
5-HT - Serotonin
5-HT_{2c} receptor – Serotonin receptor 2C
AA – Arachidonic acid
AC – Adenilate Cyclase
ACN – Acetonitrile
AEA – Anandamide
ATP – Adenosine triphosphate
BDNF gene - Brain-derived neurotrophic factor gene
BMI – Body mass index
BSA – Bovine serum albumin
CB₁ receptor – Type 1 cannabinoid receptor
CB₂ receptor - Type 2 cannabinoid receptor
CCK – Cholecystokinin
CVD – Cardiovascular diseases
d – Doublet
DAGL – Diacyl glycerol lipase
dd – Double doublet
DMEM - Eagle's minimal essential medium
DMF – *N,N*-Dimethylformamide
DMSO – Dimethylsulfoxide
DNA – Deoxyribonucleic acid
DOPET - 3,4-dihydroxyphenylethanol (hydroxytyrosol)
DOTAP - *N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium methylsulfate
DPP4 – Dipeptyl peptidase 4
EMA - European Medicines Agency
EMT – Endocannabinoid membrane transporter
ESI – Electrospray ionization
FAAH – Fatty acid amide hydrolase
FDA – USA Food and Drug Administration
FTO gene – Fatty mass and obesity-associated gene
GLP-1 – Glucagon like peptide 1
HDL - High density lipoprotein
HHA – 3,4-dihydroxyamphetamine

HHMA - 3,4-dihydroxymethamphetamine
HMA – 3-methoxy-4-hydroxyamphetamine
IDL – Intermediate density lipoproteins
IR – Infrared
iR – Ionotropic receptor
LDL – Low density lipoproteins
m – Multiplet
MAGL – Monoacyl glycerol lipase
MAPK – Mitogen-activated protein kinase
MC4R – Melanocortin 4 receptor
MCH-1 – Melanin concentrating hormone
MDA - 3,4-methylenedioxyamphetamine
MDMA – 3,4-methylenedioxymethamphetamine
MOMCI – Chloromethyl methyl ether
mR – Metabotropic receptor
MS – Mass spectrometry
MUFAs – Monounsaturated fatty acids
NADA – *N*-arachidonoyl dopamine
NAPE-PLD – *N*-acylphosphatidylethanolamide-selective phospholipase D
NAT – *N*-acyl transferase
NPY – Neuropeptide Y
NT – Neurotransmitter
OEA – Oleoyl ethanolamide
OLDA – *N*-oleoyl dopamine
PBS – Phosphate buffer saline
PC – Phenolic compounds
PLC – Phospholipase C
POMC – Proopiomelanocortin
PPAR – Peroxisome proliferator activated receptor
ppm – Parts per million
PPRE – PPAR response elements
PYY – Peptide tyrosine-tyrosine
ROS – Reactive oxygen species
RXR – Retinoid X receptor
s – Singlet
t – Triplet
THC – Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
THF – Tetrahydrofuran

TLC – Thin layer chromatography

TOF – Time of flight

TRPV1 – Transient receptor potential cation channel type V1

VLDL – Very low density lipoprotein

Contents

	Pàg.
1 - INTRODUCTION.....	1
1.1 - Obesity.....	1
1.1.1 - What is obesity?.....	1
1.1.2. - Obesity Demography and Social Impact.....	2
1.2 - Appetite regulation and satiety physiology....	4
1.3 - Obesity Genesis.....	10
1.4 - Obesity Treatment.....	12
1.4.1 - Non-Pharmacological Treatment.....	12
1.4.2 - Pharmacological Treatment.....	13
1.4.3 - Current drug developments for the treatment of obesity.....	17
1.5 - The endocannabinoid system and the Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) as targets for the development of drugs with therapeutic potential in the treatment of obesity.....	21
1.5.1 – The endocannabinoid system	21
1.5.2 – Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR).....	27
1.6 - Lipidomics and brain biological active lipids.	31
2. - HYPOTHESIS.....	35
3 - OBJECTIVES.....	41
4 - CHAPTER 1.....	43
4.1 - Article #1 and corresponding Supporting Information.....	43
4.2 - Patent #1.....	69
5 - CHAPTER 2.....	123
5.1 - Article #2.....	123
6 - CHAPTER 3.....	145
6.1 - Article #3 and corresponding Supporting Information.....	145
6.2 - Patent #2.....	173
7 – DISCUSSION.....	221
8 – CONCLUSIONS.....	227
9 - BIBLIOGRAPHY.....	231

1 – INTRODUCTION

1.1 – Obesity

1.1.1 – What is obesity?

The pathology of obesity can be understood as the result of an imbalance when energy intake exceeds energy output or expenditure; the excess calories are stored as adipose tissue and it leads to an enlargement of adipose cells, resulting, over time, in obesity. Those large fat cells release more fatty acids and cytokines that can lead to the most known consequences of obesity as insulin resistance and changes in the thrombotic, inflammatory and coagulation processes. (Bishop **2006**, Bray **2006**)

Obesity is found to be an important factor in decreased health-quality of life and life expectancy. Furthermore, obese patients are at an increased risk of type-2 diabetes, stroke, coronary artery disease, gallbladder disease, hiperlipidaemia, hypertension, and several cancer types among others diseases. (Withrow **2010**)

1.1.2 - Obesity Demography and Social Impact

Following the definition of the World Health Organization overweighted people are those displaying a body mass index (BMI) higher than 25 and obese people those with a BMI higher than 30. The body mass index is calculated by the ratio between the weight in kilograms and the square of the height in meters.

Obesity is nowadays a pandemy which incidence is growing at dramatic pace. The World Health Organization estimates that there are currently around 400 millions obese adults and projections by the year 2015 are that about 700 millions adults will be obese worldwide (World Health Organization **2006**).

In a recent review it was concluded that obese patients were found to increase medical costs by 6 to 45% when compared to their normal-weight peers. Obesity places a significant financial burden on the healthcare system estimated to be between 0.7 and 2.8% of a country total healthcare expenditures (Withrow **2010**).

In Spain the prevalence of obesity in people older than 18 years is 13.6 % and of overweighted people of 36.5 % (Ministerio de Sanidad y Política Social – Gobierno de España **2007**). It can be observed from those indicators, that

there are more obese subjects among men than in women and that more than a half of the Spanish population is considered sedentary (Table 1).

	Total %	Male %	Female %
Overweight prevalence (>18 year-old)	36.5	45.1	28.3
Overweight prevalence (2-7 year-old)	18.6	19.7	17.5
Obesity prevalence (>18 year-old)	13.6	13.3	13.9
Obesity prevalence (2-7 year-old)	8.5	8.7	8.3
Sedentarism prevalence (>15 year-old)	58.4	53.7	62.9

Table 1 - Percentage of obese, overweighed and sedentary people in Spain in 2007 data from "Indicadores Clave del sistema nacional de salud (Mnisterio de Sanidad y Política Social – Gobierno de España 2007)

1.2 – Appetite regulation and satiety physiology.

Obesity constitutes a problem whose manifestations have consequences in almost every field of the medicine. The regulation of the food intake and energy metabolism is located in the central nervous system (CNS), more specifically in the hypothalamus. The network that controls the body energy homeostasis integrates diverse sensory inputs and leads to a coordination of behavior, endocrine and autonomic responses. Disorders in those functions lead to alterations in the system and frequently in obesity.

Our understanding about the circuitry that controls the neuropharmacology of appetite has grown considerably in the last few years. This is of great importance in order to discover new therapeutical targets for the obesity treatment.

The regulation of energy metabolism displays a prototypical homeostatic system, with the brain acting as the central coordinator of the circuitry of food behavior (Broberger **2005**).

Along the gastrointestinal system there are a series of different sensory receptors reporting information to the brain about the taste, texture and mechanic stress of ingested food providing an "online" description of the alimentary state.

The afferent vagus nerve receives stimulus from the gastroduodenal distension, the presence of different nutrients and cholecystokinin, a well characterized peptide produced by endocrine cells. (Broberger **2005**). Through the vagus nerve, this information reaches the CNS causing satiation.

There are a number of **molecular entities that regulates the food intake and satiety through interactions with the nervous system regulating the appetite down and upstream**. Some, but not all of them are described bellow:

Leptin - Besides being a deposit of triglycerides, adipose tissue is also an endocrine gland that produces and excretes the hormone leptin, which serves as a key mediator on the feedback loop linking peripheral adiposity with the central control of feeding and energy expenditure (Handlon **2006**, Abhiram **2004**, Kershaw **2004**). In order to regulate food intake as fat increases, more leptin is produced. Under normal conditions leptin inhibits the release of orexigenic neuropeptides such the neuropeptide Y (NPY) and melanin concentrating hormone (MCH-1). Hypothalamic leptin simultaneously up-regulates the secretion of anorectic peptides such as the alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH). Serum leptin is proportional with the quantity of body fat deposits. Obese people have more leptin than lean

people which leads to believe that obese people have a resistance to leptin.

Insulin - In addition of the control of peripheral glucose uptake, insulin also has powerful CNS effects in synergism with leptin. Intracerebroventricular administration of insulin decreases food intake via insulin receptors expressed in the CNS (Woods **1979**). Furthermore the neuron specific knockout and the hypothalamic decrease of insulin receptor expression cause hyperphagia (Obici **2002**, Brüning **2000**).

Peptide tyrosine-tyrosine (PYY, a member of the NPY family group) – Two major types of PYY hormone are released in the gut: PYY(1-36) and PYY(3-36) the last being the major circulating form produced by the cleavage of two amino acid residues (Suzuki **2010**). PYY(3-36) has been shown to act as an important signal from the gut to the hypothalamus. In the postprandial state, stimulated by the presence of lipids and carbohydrates, PYY(3-36) is released into the circulation. Peripheral administration of PYY(3-36) hormone causes hypophagia and weight loss. (Suzuki **2010**, Batterham **2002** Morley **1987**).

Ghrelin - Ghrelin is the only known orexigenic gut hormone. Ghrelin levels increases in preprandrial state resulting in stimulation of both feeding and gastric emptying through actions possibly involving the vagus nerve

(Cummings **2001**, Broberger **2005**). Both CNS and peripheral administration of ghrelin result in an increase in food intake and weight gain in animal models (Nakazato **2001**, Tschöp **2000**). The decrease of ghrelin release has been suggested to be the major cause of weight loss of people who passed through a bariatric surgery. (Näslund **2001**)

Endocannabinoids – Regulation of energy intake by the cannabinoid system occurs centrally. Pharmacology stimulation of CB₁ receptors by the systemic administration of plant derived or endogenous cannabinoids stimulates eating (Di Marzo **2005**). It is suggested that the brain endocannabinoid system controls food intake at two levels: (i) it reinforces the motivation to find and consume food with high incentive value, and (ii) it is activated on demand in the hypothalamus after short term food deprivation, and then transiently regulates the levels of other orexigenic and anorectic mediators to induce appetite. It has also been observed that the endocannabinoid synthesis is also regulated by hormones as leptin and grehlin and the content of the diet. Leptin decreases endocannabinoid levels in the hypothalamus while it has been suggested that the enhanced ghrelin in the bloodstream after food deprivation is linked with the increase of the endocannabinoid tone. Finally it is observed that endocannabinoids concentration are increased in obese people, this fact could be explained due the high availability of polyunsaturated fatty acids, endocannabinoid

precursors that stimulate endocannabinoid synthesis (Di Marzo **2005**).

Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) -

There is evidence that the fatty acid amide oleoylethanolamide (OEA), chemically but not pharmacologically similar to the endocannabinoids, could act indirectly in the brain through the vagus nerve inhibiting the appetite and leading to a decrease in body weight (de Fonseca **2001**). The metabolic actions of OEA depend on the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR- α) (de Fonseca **2001**; Fu **2003**; Schwartz **2008**). Notably, drugs that targets PPAR- α (for example gemfibrozil) are already in clinical use to treat hypercholesterolemia.

Integration of molecular entities that regulates the food intake and satiety at the central nervous system (CNS) -

The brain (more specifically the hypothalamus) is informed about the metabolic status of the individual via two main channels. The first channel is constituted by the hormonal signals described before (leptin, ghrelin, PYY, etc.), which communicate the brain about the availability and demand for metabolic fuel via neurons in the hypothalamus. Depending on the stimulation, one group of hypothalamic neurons expresses neuropeptide Y (NPY), resulting in increased food intake and decreased energy expenditure or another one expresses the proopiomelanocortin (POMC), precursor of

several neuropeptides including melanocortin peptides which activity results in the opposite effect of NPY cells triggering (Broberger **2005**). The production of one peptide or the other depends on the stimulus received by the hypothalamus. The second channel is the brainstem that communicates the brain about the energy balance in particular via the vagus nerve whose afferents fibers excite neurons in the brainstem nucleus (Figure 1).

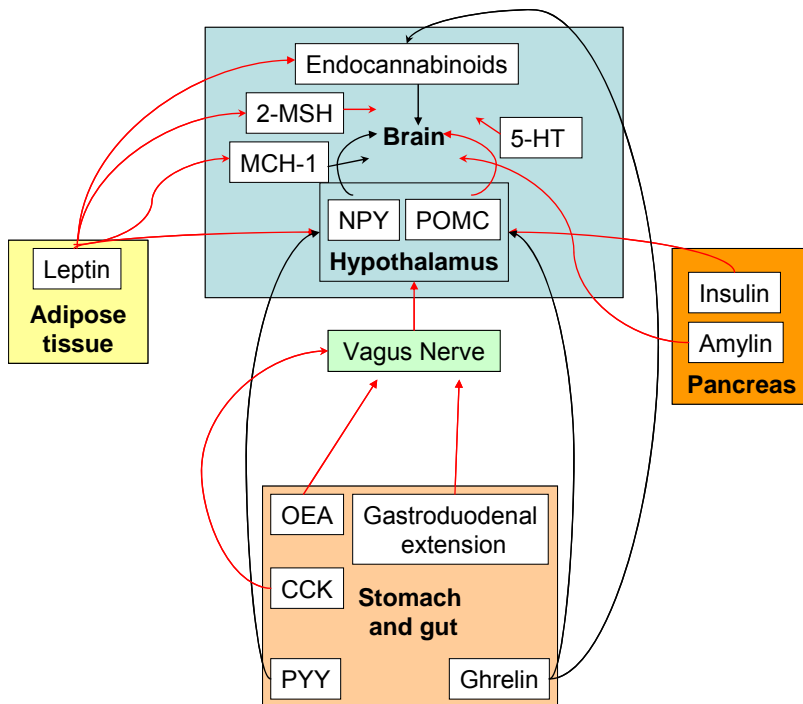


Figure 1 - Neural regulatory network of appetite and satiety. (Black arrows –appetite activation; red arrows –appetite inhibition).

1.3 - Obesity Genesis.

We have seen before that the central nervous system has several mechanisms to maintain the body mass. The question is: why the supposed body homeostasis is broken and which factors contribute to the development of obesity. Enclosed is a list of contributory factors to obesity development:

-Genetic predisposition: Scientists have identified the association of increased food intake and obesity with specific variants of the fat mass and obesity-associated (FTO) gene. Individuals who carry alleles of the FTO are more prone to be obese and to consume more calories relative to the individuals with the wild-type genotype. (Fawcett **2010**). Although FTO is the most studied obesity associated gene there are evidences that other genes as MC4R, BDNF, SH2B1 play a role in the tendency to develop obesity (Thorleifsson **2009**, Willer **2009**).

-Behavioral – An eating behavior characterized by, fast eating, taking large spoonfuls and chewing less before swallowing, is predictive for a large short-term intake and would promote the development of overweight and obesity (Laessle **2009**).

- The consumption of energy-dense foods (fat or sugar) promotes a large energy intake and often produces comparatively weak satiety if compared with the consumption of the same caloric content of a less dense food (Kral **2004**).

- Given the powerful influence of palatability differences in eating rates observed during meals may not indicate specific deficits in satiation so much as the overriding impact of the hedonic experience to promote consumption. There are clear evidences of higher rates of hedonic influences in response to food among obese people (Blundell **2005**).

- **Hormonal signaling deregulation** - Despite the increased caloric loads of obese individuals, the hormonal response to ingestion in those individuals seems to be attenuated. As for example the level of PYY is diminished in obese individuals (le Roux **2006**, English **2002**).

1.4 - Obesity Treatment.

There are two therapeutic strategies to treat obesity: One is to wait until associated diseases such as diabetes, hypertension, and dyslipidemia develop and treat them individually. Alternatively, and preferably, one would treat obesity itself and so doing reduce the risk of developing those diseases. (Bray 2006).

1.4.1 – Non-pharmacological treatment

Portions size control and low fat, low carbohydrate diets or a balanced reduction of all micronutrients are promising strategies with long term results. Comparing four popular diets the average weight loss at 6 and 12 months was the same. The best predictor of weight loss for each of the diets was the degree of adherence to the diet. Exercise has been an important component of weight loss programs, but when used alone, it has not been successful. (Dansinger 2005).

Surgery is the most effective therapy (among morbid obese people) at this time for significant, rapid and sustained weight loss and it consists in a surgical intervention into the stomach called bariatric surgery. The bariatric surgery could consist in a reduction of the size of the stomach using a

medical device (gastric banding), through removal of a part of the stomach or through a gastric bypass surgery where a small stomach pouch is created with a stapler device, and connected to the distal small intestine. Nowadays surgical intervention for obesity has become more popular. However, these treatments have short-term and long-term risks associated with the procedures, including reported early mortality rates ranging from 0.3 % to 1.9 %. (Bishop **2006**).

The surgical approach was designed to promote weight loss by the reduction of stomach volume; nevertheless its effects cannot be fully attributed to the reduced gastric volume. A number of studies have shown that changes in gut hormones concentrations after bariatric surgery may be responsible for the appetite control and the resulting weight loss experienced post-operatively (Pournaras **2009**).

1.4.2 – Pharmacological treatment

Amphetamines were one of the first classes of compounds being used for the obesity treatment (Bray **1993**). Dextroamphetamine (the *S*-pure enantiomer of amphetamine) was the first amphetamine introduced in the obesity therapeutics in the 1930s. It was found that it produced weight loss by the negative modulation of appetite.

The severe abuse potential of amphetamine and methamphetamine led to the development of new

derivatives maintaining the suppressive appetite characteristics of amphetamine but with a reduced abuse potential. Chemical manipulation of the amphetamine molecule structure led to the development of fenfluramine, D-fenfluramine, and phentermine. Fenfluramine was taken out the market due to cardiovascular side effects and phentermine is nowadays used only for short term treatment of obesity (Bray **2006**) (Figure 2).

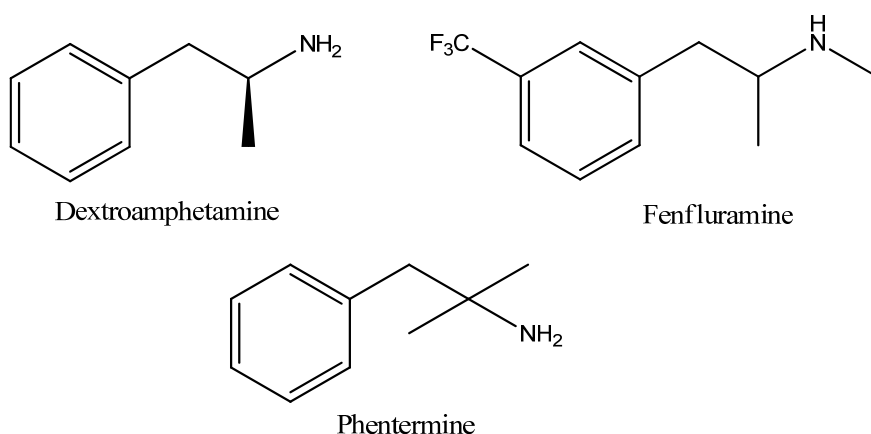


Figure 2 - Amphetamines used for obesity treatment (Phentermine is used until now but with serious restrictions)

Nowadays in Europe for the **long term pharmacological treatment** of obesity only one drug is now available, Orlistat (Xenical®). Orlistat (Figure 3) is an intestinal lipase inhibitor that blocks triglyceride digestion and consequently enhances fecal loss of fat in the stools. It also reduces the absorption of cholesterol from the intestine causing in part the reduced plasma cholesterol found in

patients treated with this drug. (Bray **2006**). Orlistat main side effects are forgetfulness and gastrointestinal side effects (Akbas **2009**, Clark **2004**, Kaya **2004**).

The withdrawn from the European market in the time period 2008 and 2010 of two drugs, rimonabant and sibutramine, explains the current lack of alternatives for long term pharmacological obesity treatment.

Rimonabant (Acomplia®), a CB₁ antagonist, started to be commercialized in Europe for the obesity treatment in 2006 and was taken off the market in 2008. Rimonabant is a drug that acts in the cannabinoid system decreasing the appetite through the blockage of the activation of the CB₁ receptor. One of the side effects of Rimonabant that caused more concern was the development of affective disorders on susceptible patients and was taken off the market due to the risk of serious psychiatric problems and even suicide. (Christensen **2007**, Blüher **2008**).

Sibutramine (Meridia®) (Figure 3) is an inhibitor of the reuptake of norepinephrine, serotonin and dopamine, with similar molecular mechanism as the amphetamines described before, and produces dose dependent weight loss. It was recently been withdrawn the market in Europe Union due to its side effects. Sibutramine causes a small increase of blood pressure in some subjects (Luque **1999**) and an increased

risk of cardiovascular diseases (CVD) that could lead to heart attack and stroke (James **2010**). The European Medicines Agency (EMA) and the Food and Drug Administration (FDA) recommended this year (2010) its withdrawal from the market

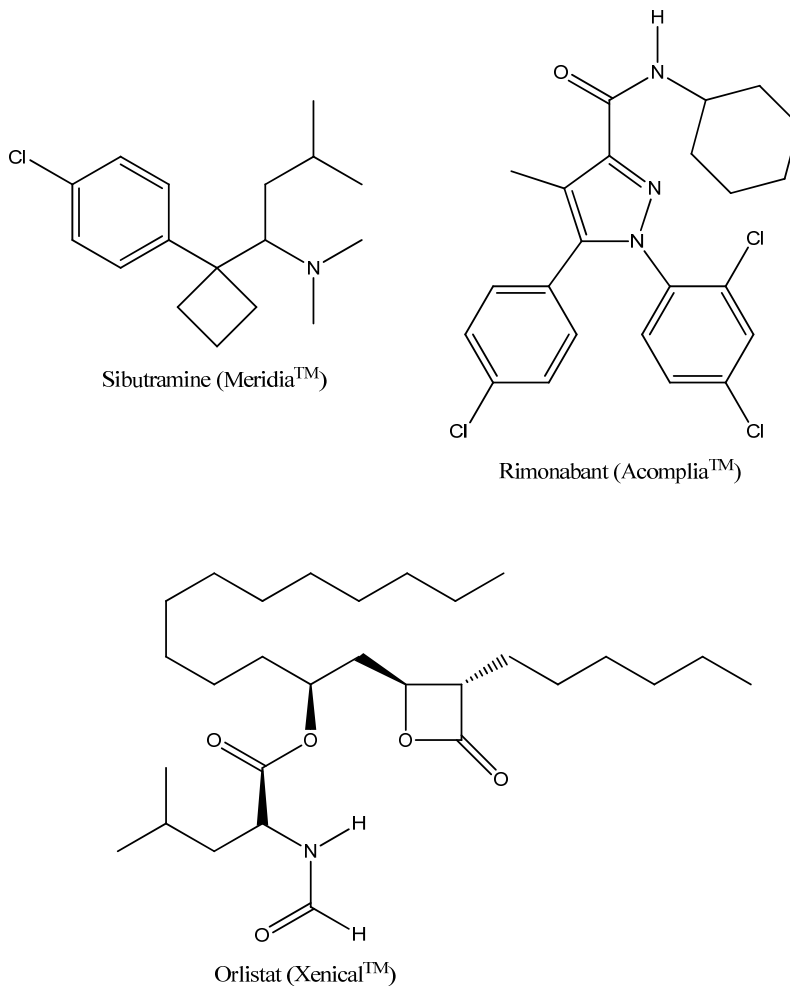


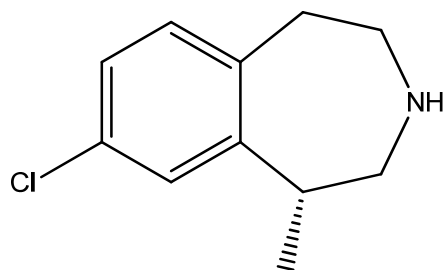
Figure 3 - Molecular structure of sibutramine, rimonabant and orlistat.

In summary, drugs for obesity treatment used until now display considerable adverse effects and only Orlistat could be used in long term therapies.

1.4.3 - Current drug developments for the treatment of obesity

Current efforts in the development of pharmacological treatment are directed at improving efficacy while reducing adverse effects. There are several classes of molecular entities that nowadays are discussed because they target receptors that may have potential interest for obesity therapeutics. Some of them have been previously discussed (Sargent **2009**):

5-HT_{2c} receptor –The 5-HT_{2c} serotonergic receptor agonists are potential targets for obesity therapy (Smith **2005**, Garfield **2009**). It was reported in 1995 that knockout mice lacking the 5-HT_{2c} receptor develop hyperphagia and become overweighted and obese. (Nilsson **2006**). Nowadays there are few ongoing clinical studies of 5-HT_{2c} receptors agonists. A compound that is in the most advanced clinical study phases for obesity treatment is lorcaserin (Smith **2005**; Smith **2008**) (Figure 4). Its indication as an anti obesity drug has been already submitted to the Food and Drug Administration (FDA) in the United States and is pending for approval (Nilsson **2006**)



Lorcaserin

Figure 4 - Molecular structure of lorcaserin.

CB₁ receptor - Despite the discontinuation of Rimonabant commercialization, pharmaceutical companies are still investing in obesity drugs acting in the endocannabinoid system (Antel **2006**). One promising drug is a CB₁ inverse agonist peptide called haemopresin. Haemopresin is a drug that is currently commercialized for the treatment of bleeding oesophageal varices and is now being evaluated for the treatment of obesity. (Dodd **2010**).

MC4R receptor - Melanocortin-4-receptor (MC4R). The distribution of MC4R pattern in the brain is highly correlated with brain sites displaying high sensitivity to melanocortin-regulated feeding behavior. Loss of function of variants in the MCR4 is associated with hyperphagia, obesity, and metabolic defects. MCR4 agonists present a number of opportunities for therapeutic intervention; thus far, there are no reported MCR4 agonists under clinical evaluation (Nargund **2006**).

MCHR-1 receptors - The melanin concentrating hormone 1 receptor (MCHR-1) is located in areas of the brain that coordinate feeding behavior. In 1996 it was discovered that MCHR-1 is up regulated during fasting in both normal and obese mice. It needs to be demonstrated in clinics whether an increase in metabolism can be achieved without a concomitant alteration in resting heart rate, blood pressure, or internal temperature, which may be considered adverse effects. (Handlon **2006**)

Glucagon like peptide 1 (GLP-1) based drugs. GLP-1 is a hormone synthesized in the intestine that is released short after food ingestion and thus is associated with post-meal satiety. The subcutaneous injection of GLP-1 induces weight loss in obese people but its usefulness is limited by its quick disposition by the endogenous enzyme dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) (Halford **2010**). Exenatide and liraglutide are DPP4 resistant synthetic versions of GLP-1 that have been evaluated in a clinical study for the treatment of type 2 diabetes mellitus (Hansen **2009**). During the treatment those drugs seem to stimulate insulin secretion and produce a sustained weight loss and a growing number of GLP-1 agonists and DPP4 inhibitors are under clinical study for obesity treatment.

Peptide YY (PYY) - The PYY administration reduces pre-meal hunger (Batterham **2007**, Boggiano **2005**, Onaga **2002**) and the food intake in lean and obese people but only at high and non physiological doses, where high doses induced nausea in some patients. Despite this, there are some ongoing clinical studies based in PYY administration.

Amylin based drugs - Amylin is a peptide hormone synthesized by the pancreatic beta cells together with the insulin (Field **2009**). Peripheral administration of amylin reduces food intake. Pramlintide is a synthetic analogue of amylin that is nowadays used for the treatment of type 1 and type 2 diabetes mellitus. The use of pramlintide was shown to reduce significantly food intake in type 2 diabetes mellitus obese patients. Several clinical studies are evaluating the use of pramlintide as a drug for the obesity treatment. (Field **2009**).

Opioid based treatments - Naltrexone is an opioid formerly used for the treatment of cocaine and alcohol addiction. Early studies in obese individuals suggested a reduction in hunger and food intake. Clinical trials indicated that the weight loss with the use of naltrexone treatment was minimal but it could be of use in a combination therapy with proopiomelanocortin (POMC). (Drewnowski **1995**)

1.5 - The endocannabinoid system and the Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) as targets for the development of drugs with therapeutic potential in the treatment of obesity

1.5.1 – The Endocannabinoid System

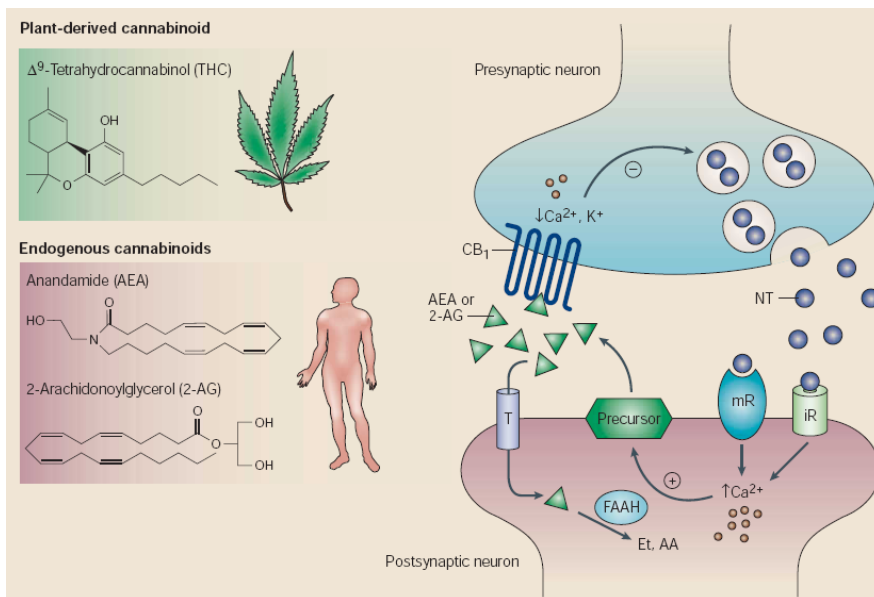
The endocannabinoid system has been studied recently as a therapeutic target for treating a series of diseases as neuropathic pain, drug abuse, multiple sclerosis and obesity as earlier discussed.

The term endocannabinoid was coined in the middle 1990s after the discovery of membrane receptors for the cannabis psychoactive principle, Δ^9 -tetrahydrocannabinol and their endogenous ligands such as anandamide and oleamide (Matsuda **1990**, Abood **1997**, Bramblett **1995**).

The endocannabinoid system is composed of the cannabinoid receptors, endogenous ligands (endocannabinoids), and the enzymatic apparatus necessary for their synthesis and degradation (Mackie **2006**). Nowadays two types of cannabinoid receptors: CB₁ and CB₂ are well characterized. Both cannabinoid receptors are coupled to a G

protein from which they modulate the activity of adenilate cyclases (AC) (mostly inhibit) and mitogen activated protein kinases (stimulate) and these intracellular events lead the regulation of several genes. The activation of CB₁ receptors also regulates voltage activated Ca⁺² channels (inhibit) and inwardly rectify K⁺ channels (stimulate). CB₁ is found in the central and peripheral nervous system and several peripheral organs while CB₂ receptors are mostly restricted to cells and tissues of the immune system (Di Marzo **2004**).

The endocannabinoids are different to classical neurotransmitters (e.g. monoamines) in two aspects: (I) they work as retrograde signalers, as they are secreted post synaptically and act on the presynaptic neuron and (ii) they are synthesized and secreted on demand when and where needed and are not stored in vesicles as neurotransmitters are (Di Marzo **2004**) (Figure 5).



*Figure 5 - Endocannabinoids biosynthesis and actions (Adapted from Guzmán **2003**).*

Once released from cells, and having activated their molecular targets, endocannabinoids need to be rapidly inactivated. This process occurs via intracellular degradation and – as suggested by data – by the presence of a membrane transporter that does the reuptake of these compounds. This putative endocannabinoid membrane transporter (EMT) also seems to be responsible for the release of endocannabinoids.

Anandamide was the first endocannabinoid isolated and identified (Devane **1992**; Mackie **2006**, Smith **1994**). The second endocannabinoid identified was 2-arachidonoylglycerol (2-AG) (Sugiura **1995**). Series of similar

compounds, varying in the nature of the fatty acid are also found in tissues as homo- γ -linolenylethanolamide, oleoylethanolamide and palmitoylethanolamide.

The long chain fatty acid amides of dopamine *N*-arachidonoyl dopamine (NADA) and *N*-oleoyl dopamine (OLDA) were synthesized and described as having biological activity even before being discovered as endocannabinoids. Among them, *N*-arachidonoyl dopamine (NADA) was described as a potent agonist for the CB₁ and the vanilloid TRPV1 receptor while OLDA has lower CB₁ agonist activity and mainly is a TRPV1 agonist. The *in vivo* biosynthesis of these compounds has already been reported. (Chu **2003**, Bezuglov **2001**)

All the endocannabinoids described up to date are fatty acid derivatives with polar head groups. Those polar heads could be bound to the fatty chain through an amide (anandamide, *N*-oleoyl dopamine, *N*-arachidonoyl dopamine), an ester (2-AG), (Sugiura **1995**, Mechoulam **1995**) or an ether (noladin) linkage (Hanus **2001**; Avraham **2005**) (Figure 6).

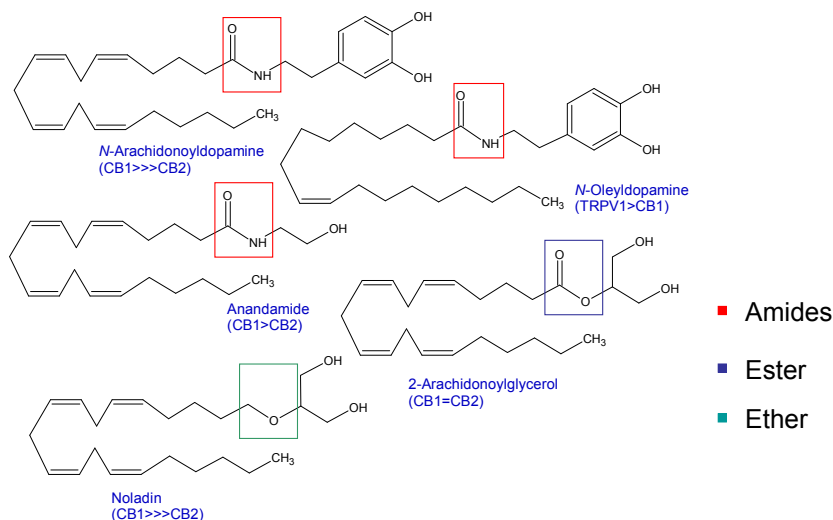
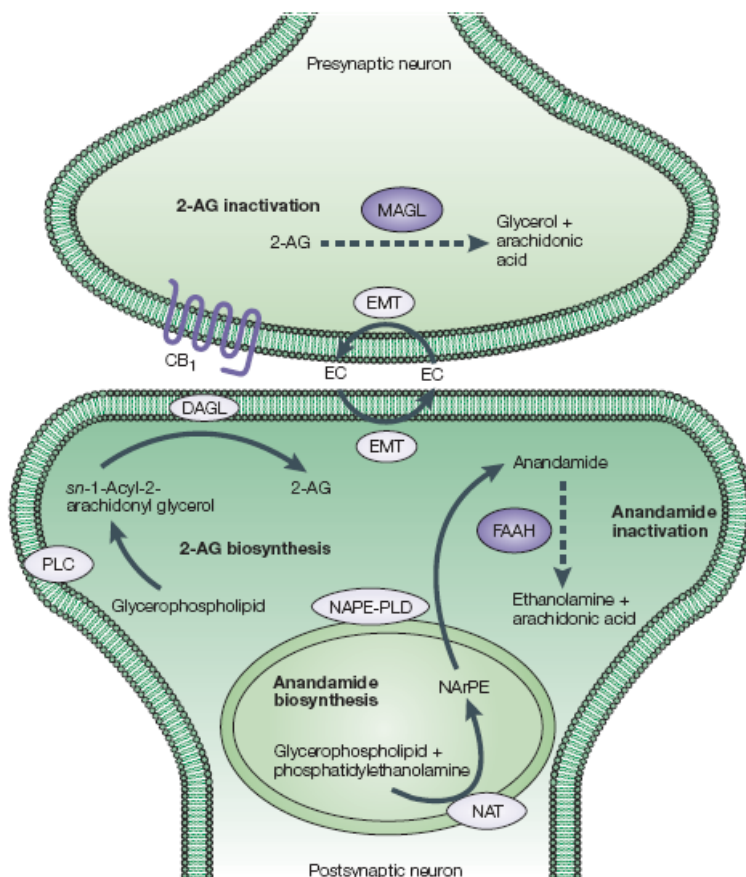


Figure 6 - Molecular structures of endocannabinoids

The two endocannabinoids better characterized are anandamide (AEA) and 2-arachidonoyl glycerol (2-AG). Anandamide is synthesized from membrane phospholipids through the action of the enzymes *N*-acyl transferase (NAT) and *N*-acylphosphatidylethanolamide–selective phospholipase D (NAPE-PLD) and is degraded by the enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH). 2-Arachidonoyl glycerol (2-AG) is synthesized by the enzyme diacyl glycerol lipase (DAGL) and is degraded through the action of the enzyme monoacyl glycerol lipase (MAGL). It is also hypothesized the existence of one endocannabinoid membrane transporter (EMT), a protein that seems to facilitate the release and re-uptake of endocannabinoids (Hillard **1997**, Kaczochaa **2009**) (Figure 7).

Each step of the endocannabinoids biosynthesis and metabolism could be a therapeutic target for the treatment of a series of diseases. (Di Marzo **2004**, Akbas **2009**)



*Figure 7 - Anabolic and catabolic pathways of endocannabinoids (Adapted from Di Marzo **2004**)*

A deep understanding on how the endocannabinoids are synthesized and how cells regulate their levels has been recognized as a high priority in cannabinoid research (Di Marzo **2004**).

With the growing knowledge of the cannabinoid system it was proposed that the CB₁ receptor could be a good therapeutic target for obesity. It is well known the appetite increasing effect of *Cannabis sativa* use and it was postulated that if the CB₁ receptor THC agonism could increase appetite the development of a CB₁ antagonist could modulate negatively food intake. Sanofi was the first pharmaceutical company to receive the FDA approval for the commercialization of a CB₁ antagonist for the treatment of obesity (Accomplia®) (Colombo **1998**, Rinaldi-Carmona **1994**; Van Gaal **2005**, Pi-Sunyer **2006**). As discussed earlier, this drug was withdrawn from the market because its central nervous system side effects. This fact could illustrate the difficulty to create a drug that dissociates the appetite modulation from other central nervous system functions regulated by the endocannabinoid system (Christensen **2007**, Blüher **2008**).

1.5.2 – Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR)

The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are a group of nuclear receptor proteins that function as transcription factors regulating the expression of genes. Among other functions, PPARs play an essential role in the regulation of cellular differentiation, development, and metabolism (carbohydrate, lipid, protein) of higher organisms.

Oleoylethanolamide, an endogenous lipid, displays hypophagic effects. Although structurally related to the endogenous cannabinoid anandamide, OEA does not bind to cannabinoid receptors. It was observed that it interacts with a nuclear receptor called Peroxisome Proliferator-Activated Receptor type alpha (PPAR- α) (de Fonseca **2001**). PPAR is found in metabolically active tissues as the liver, heart and muscle and acts on genes involved in the metabolism regulation, energetic homeostasis and inflammation (Stienstra **2007**, Pyper **2010**).

Peroxisome proliferator-activated receptors belong to a family of nuclear receptors comprising three isoforms (α alpha, δ delta and γ gamma) (Kota **2005**). PPARs heterodimerize with the retinoid X receptor (RXR) and bind to DNA sequences called PPAR response elements (PPREs) which lead to the transcription of target genes through ligand activation. (O'Sullivan **2007**) (Figure 8).

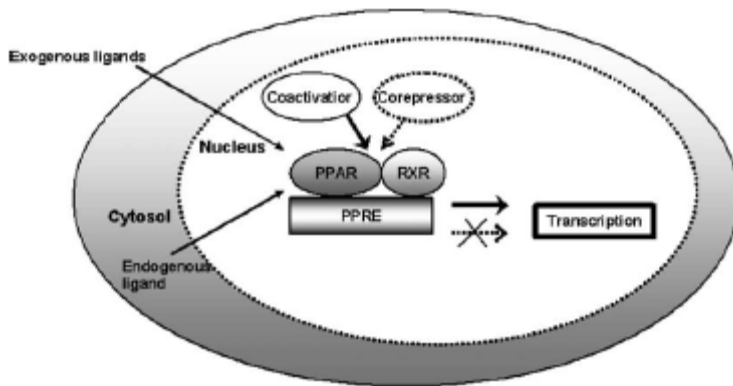


Figure 8 - Gene transcription mechanisms of PPAR (Adapted from Kota 2005)

It has been described short, medium, and large chain fatty acids and eicosanoids with PPAR- α affinity producing a substantial reduction of the plasma triglycerides, a moderate reduction of low density protein associated cholesterol, and a satiety effect (Forman 1997, Fu 2005). For that reason, the alpha subtype represents a very interesting therapeutic target for the treatment of diseases related with metabolic alterations as dislipidaemias, cardiovascular diseases, diabetes and obesity (Evans 2004, Abourbih 2009, Plutzky 2000, Henke 2004; Willson 2000).

There is a broad crosstalk between the endocannabinoid system and PPAR- α . For example the natural endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) and synthetic CB₁ agonist WIN55212-2 act over PPAR- α (O'Sullivan 2007, Sun 2006). It was also postulated that dual

active compounds (CB₁ antagonist and PPAR-alpha agonists) could be useful for the obesity treatment as the simultaneous action over both receptors could lead to a synergic action for the food intake negative modulation (Serrano **2008**, Alvarado **2008**).

1.6 - Lipidomics and brain biological active lipids

Lipidomics is the part of the metabolomics that studies the systems-level analysis and characterization of lipids and their interacting moieties (Wenk **2005**, Andrew **2006**, Piomelli **2007**).

The renewed interest in the research of the function of lipids in neuroscience leads to a series of convergent discoveries in the neural development, synaptic physiology and receptor pharmacology, which have begun to reveal the roles played by lipid messengers and their receptor pharmacology. As examples of those discoveries we can mention the discovery of fatty acid amides such as anandamide (AEA) and oleoylethanolamide (OEA), their importance as signaling molecules and biological activity in the central and autonomous nervous system (Tan **2006**).

Usually when talking about information carrying molecules most of people think about nucleic acids and proteins. Nevertheless, when we give a closer look at the lipidome and notice how the structural units of some lipids can rearrange in space and time, we are brought to conclude that lipids have also a bewildering potential to carry information. (Piomelli **2005**).

Until recently, technical challenges, particularly those associated with chemical analyses and purification, had hindered the identification of those low concentration signalers. Improvement in chromatography and mass spectrometry (MS) now permit rapid identification of novel, low abundance, signaling lipids (Piomelli **2005**).

2 – HYPOTHESIS

The research group where this PhD was undertaken has a large experience with hydroxytyrosol and MDMA metabolites, all of them having chemical structures related to dopamine. The biological activity displayed by fatty acid amides of dopamine and the ability of fatty acid amides to modulate food ingestion lead us to hypothesize that fatty acid derivatives of: a) hydroxytyrosol and its derivatives, and b) 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) metabolites; could display biological activity over food intake acting through PPAR and the cannabinoid systems. These compounds (hydroxytyrosol and phenolic compounds of olive oil and MDMA catechol metabolites) will be briefly described below:

a) **MDMA** has two main metabolic pathways (Figure 9)
1) *O*-demethylenation followed by methylation and/or glucuronide/sulphate conjugation and 2) *N*-dealkylation. MDMA *N*-demethylation gives rise to 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA). Then, the parent compound and MDA are further *O*-demethylenated to 3,4-dihydroxymetamphetamine (HHMA) and 3,4-dihydroxyamphetamine (HHA), respectively. Both HHMA and HHA are subsequently *O*-methylated to 4-hydroxy-3-methoxymetamphetamine (HMMA) and 4-hydroxy-3-

methoxyamphetamine (HMA), respectively. These metabolites are mainly present in plasma and urine as their glucuronide or sulphate conjugates (de la Torre **2004**, de la Torre **2004b**). Catechols (HHA, HHMA) are highly redox active and may form adducts, after their oxidation to the corresponding quinones, with glutathione (Perfetti **2009**). The compounds we were interested to prove are the catechol derivatives HHA and HHMA and the O-methylated compound HMA.

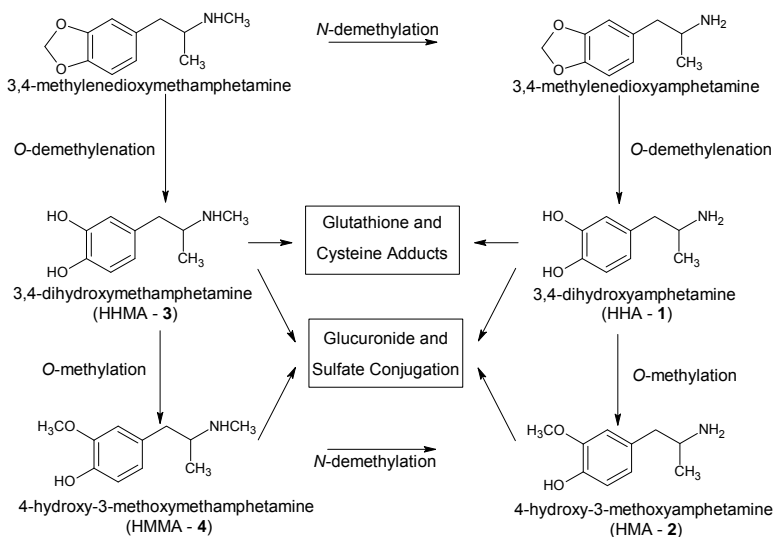


Figure 9 - MDMA metabolic disposition in humans

b) Virgin olive oil is rich in monounsaturated fatty acids (MUFAs) (principally oleic acid), and phenolic compounds (PC) (although the refined olive oil does not have representative amounts of the last compounds). The main PCs presented in olive oil are oleuropein and ligstroside

aglycones which by hydrolysis give rise to **hydroxytyrosol** and **tyrosol** respectively (Vissers **2004**) (Figure 10).

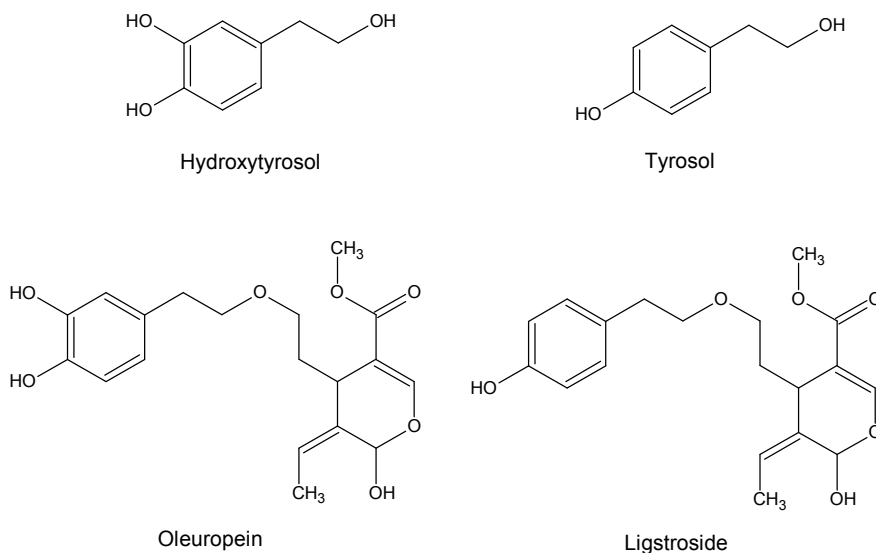


Figure 10 - Phenolic compounds present in olive oil

Hydroxytyrosol can be eliminated unmetabolized but essentially as its glucuronide and monosulfate conjugates or as homovanillic acid and homovanillic alcohol (Gordon **2001**).

The antioxidant activity of hydroxytyrosol and some of its metabolites has already been proven (Gordon **2001**, Mateos **2003**). Hydroxytyrosol is also a potent *in vitro* inhibitor of low density lipoproteins (LDL) oxidation being capable of breaking peroxidative chain reactions (Visioli **1995**).

These two classes of compounds were selected for two main reasons: (i) the high molecular similarity of both

classes of compounds with dopamine and (ii) because of the large expertise of our group in MDMA metabolism and olive oil antioxidants as hydroxytyrosol and tyrosol (Miro-Casas **2003**; Fitó **2005**) (Figure 11).

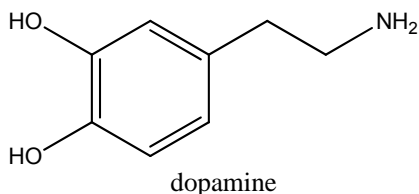
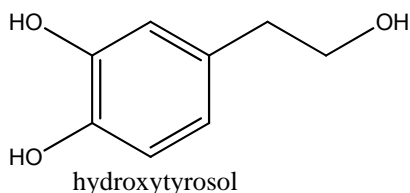
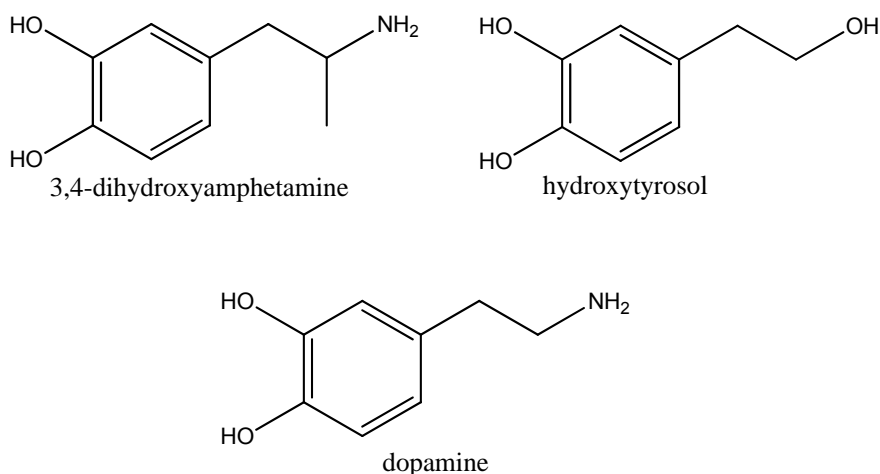


Figure 11 - Molecular structure of HHA, hydroxytyrosol and dopamine

Knowing that the amides of dopamine with arachidonic (NADA) and oleic acid (OLDA) have cannabinoid activity, and having in mind the LDL antioxidant potency of hydroxytyrosol, we propose the synthesis of fatty acid amides of HHA, HMA and HHMA as well as ester and ether fatty acid derivatives of hydroxytyrosol and related compounds (Figure 12) expecting that those compounds could display cannabinoid and PPAR activity and/or LDL antioxidant activity.

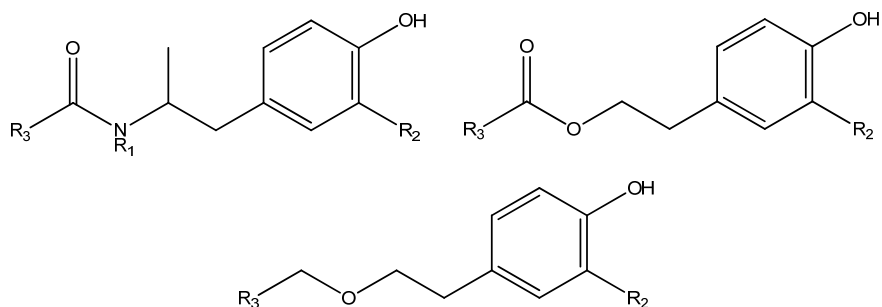


Figure 12 - Proposed products: MDMA metabolites fatty acid amides and esters and ether fatty acid derivatives of hydroxytyrosol and related compounds.

3 – OBJECTIVES

In the context of the background information previously provided, the objectives of the presented work are:

1) Synthesis of new fatty acid derivatives of catechol compounds, more specifically the new compound series described as follows:

- oleic and arachidonic fatty acid amides of MDMA metabolites HHA, HMA, and HHMA,

- esters and ethers of hydroxytyrosol and related compounds with natural unsaturated fatty acids derivatives.

2) Study of the LDL antioxidant activity of the synthesized compounds.

3) Evaluation of the food intake modulation of synthesized compounds in an animal model.

4) Study of the pharmacodynamics of the synthesized compounds through studies of their interaction with CB₁ receptors, PPAR- α , FAAH and TRPV₁.

4 - CHAPTER 1

4.1 – Article #1

Synthesis of Fatty Acid Amides of Catechol Metabolites that Exhibit Antiobesity Properties

Almeida B, Joglar J, Luque Rojas MJ, Decara JM, Bermúdez-Silva FJ, Macias-González M, et al. [Synthesis of fatty acid amides of catechol metabolites that exhibit antiobesity properties](#). ChemMedChem. 2010; 5(10): 1781-7.

4.2 – Patent #1

Derivados de Amida de Ácidos Grasos con Anfetaminas para el Tratamiento de Desordenes Alimenticios



Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P200931269	
Fecha de recepción:	24 diciembre 2009, 11:35 (CET)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	ES2228.1	
Solicitante:	FUNDACION IMIM (50%)	
Número de solicitantes:	3	
País:	ES	
Título:	DERIVADOS DE AMINA DE ACIDOS GRASOS CON ANFETAMINAS PARA EL TRATAMIENTO DE DESORDENES ALIMENTICIOS	
Documentos enviados:	Descripción-1 .pdf (30 p.) Reivindicaciones-1 .pdf (8 p.) Resumen-1 .pdf (1 p.) Dibujos-1 .pdf (5 p.) FEERCPT-1 .pdf (1 p.)	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=ENTIDAD PONS CONSULTORES DE PROPIEDAD INDUSTRIAL SA - CIF A28750891 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J,OU=703015345,OU=fnmt clase 2 ca,O=FNMT,C=es	
Fecha y hora de recepción:	24 diciembre 2009, 11:36 (CET)	
Codificación del envío:	3B:05:31:83:5E:A6:CF:83:64:23:15:73:C3:70:DC:74:34:CA:C7:07	

/Madrid, Oficina Receptora/

(1) MODALIDAD:	PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD	<input checked="" type="checkbox"/>
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACION ADICION A LA PATENTE EUROPEA ADICION A LA PATENTE ESPANOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL.	<input checked="" type="checkbox"/> [] [] [] [] [] []
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
(4) LUGAR DE PRESENTACION: LUGAR		OEPM, Presentación Electrónica
(5-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACIÓN SOCIAL: NACIONALIDAD: CODIGO PAIS: DNI/CIF/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: INVENCION LABORAL: CONTRATO: SUCESION:	FUNDACION IMIM (50%) España ES G60072253 C/ DR. AIGUADER, 88 BARCELONA 08 Barcelona 08003 España ES <input checked="" type="checkbox"/> [] []
(5-2) SOLICITANTE 2:	DENOMINACIÓN SOCIAL: NACIONALIDAD: CODIGO PAIS: DNI/CIF/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO:	FUNDACION IMABIS - INSTITUTO MEDITERRANEO PARA EL AVANCE DE LA BIOTECNOLOGIA Y LA INVESTIGACION SANTARIA (40%) España ES G29830643 AVENIDA CARLOS HAYA, 25 LOCAL BAO MALAGA 29 Málaga 29010 España ES

	PERSONA DE CONTACTO:	
MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:	INVENCIÓN LABORAL:	<input checked="" type="checkbox"/>
	CONTRATO:	<input type="checkbox"/>
	SUCESIÓN:	<input type="checkbox"/>
(5-3) SOLICITANTE 3:	DENOMINACIÓN SOCIAL:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (10%)
	NACIONALIDAD:	España
	CODIGO PAÍS:	ES
	DNI/CIF/PASAPORTE:	Q2818002D
	CNAE:	
	PYME:	
	DOMICILIO:	C/ SERRANO, 117
	LOCALIDAD:	MADRID
	PROVINCIA:	28 Madrid
	CÓDIGO POSTAL:	28006
	PAÍS RESIDENCIA:	España
	CÓDIGO PAÍS:	ES
	TELÉFONO:	
	FAX:	
	CORREO ELECTRÓNICO:	
	PERSONA DE CONTACTO:	
MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:	INVENCIÓN LABORAL:	<input checked="" type="checkbox"/>
	CONTRATO:	<input type="checkbox"/>
	SUCESIÓN:	<input type="checkbox"/>
(6-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS:	DE LA TORRE FORNELL
	NOMBRE:	RAFAEL
	NACIONALIDAD:	España
	CÓDIGO PAÍS:	ES
	DNI/PASAPORTE:	0-T.
(6-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS:	FARRE ALBADALEJO
	NOMBRE:	MAGIN
	NACIONALIDAD:	España
	CÓDIGO PAÍS:	ES
	DNI/PASAPORTE:	0-T.
(6-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS:	COVAS PLANELLS
	NOMBRE:	MARIA ISABEL
	NACIONALIDAD:	España
	CÓDIGO PAÍS:	ES
	DNI/PASAPORTE:	0-T.
(6-4) INVENTOR 4:	APELLIDOS:	FITO COLOMERT
	NOMBRE:	MONTSERRAT
	NACIONALIDAD:	España
	CÓDIGO PAÍS:	ES
	DNI/PASAPORTE:	0-T.
(6-5) INVENTOR 5:	APELLIDOS:	ALMEIDA COTRIM
	NOMBRE:	BRUNO
	NACIONALIDAD:	Brasil
	CÓDIGO PAÍS:	BR
	DNI/PASAPORTE:	
(6-6) INVENTOR 6:	APELLIDOS:	RODRIGUEZ DE FOSECA
	NOMBRE:	FERNANDO
	NACIONALIDAD:	España
	CÓDIGO PAÍS:	ES

(6-7) INVENTOR 7:	DNI/PASAPORTE:	0-T.
	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	DECARA DEL OLMO JUAN MANUEL Argentina AR
(6-8) INVENTOR 8:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	MACIAS GONZALEZ MANUEL España ES 0-T.
(6-9) INVENTOR 9:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	ROMERO CUEVAS MIGUEL España ES 0-T.
(6-10) INVENTOR 10:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	JOGLAR TAMARGO JESUS España ES 0-T.
(6-11) INVENTOR 11:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	CAPLES SABORIT PEDRO España ES 0-T.
(7) TÍTULO DE LA INVENCIÓN:		DERIVADOS DE AMINA DE ACIDOS GRASOS CON ANFETAMINAS PARA EL TRATAMIENTO DE DESORDENES ALIMENTICIOS
(8) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:		SI NO <input checked="" type="checkbox"/>
(9) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACCELERADO DE CONCESIÓN		SI NO <input checked="" type="checkbox"/>
(10) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:		SI NO <input checked="" type="checkbox"/>
(11) DEPÓSITO: REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):		
(12) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS: LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(13) EXPOSICIONES OFICIALES:		LUGAR: FECHA:
(14) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:		PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO:

FECHA:		
(15) AGENTE/REPRESENTANTE:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/CIF/PASAPORTE: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: NÚMERO DE PODER:	PONS ARIÑO ANGEL España ES 50534279-J GLORIETA DE RUBEN DARIO, 4 MADRID 28 Madrid 28010 España ES 20081765
(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:	DESCRIPCIÓN: REIVINDICACIONES: DIBUJOS: RESUMEN: FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: ARCHIVO DE PRECONVERSION: DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: JUSTIFICANTE DE PAGO (1): LISTA DE SECUENCIAS PDF: ARCHIVO PARA LA BUSQUEDA DE LS: OTROS (Aparecerán detallados):	<input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 30 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de reivindicaciones: 17 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de dibujos: 10 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 <input type="checkbox"/> N.º de figura(s): <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/>
(17) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA:	DOC COPIA DNI: DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS: DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES: DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA: DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA: DOC COPIA OTROS:	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(18) NOTAS:		
(19) FIRMA DIGITAL:	FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE: LUGAR DE FIRMA: FECHA DE FIRMA:	ENTIDAD PONS CONSULTORES DE PROPIEDAD INDUSTRIAL SA - CIF A28750891 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J Madrid 24 Diciembre 2009



TASA en materia de Propiedad Industrial
CÓDIGO 511

Modelo
791

Identificación

Ejercicio: 2009
Nro. Justificante: 7915110982283

Sujeto Pasivo:
N.I.F.: Apellidos y Nombre o Razón social:
Calle/Plaza/Avda.: Nombre de la vía pública: N° Esc Piso Puerta Tfno.
Municipio: Provincia: Código Postal:

Agente o Representante legal: (1)
N.I.F.: Apellidos y Nombre o Razón social:
A28760891 PONS CONSULTORES DE PROPIEDAD INDUSTRIAL SA
Calle/Plaza/Avda.: Nombre de la vía pública: N° Esc Piso Puerta Tfno.
Municipio: Provincia: Código Postal:
Código de Agente o Representante: (2) Dígito de control:
0000 0

Autoliquidación

Titular del expediente si es distinto del pagador: **Fundación IMIM**
Expediente Modalidad: **P** Número: Tipo: (3)
Clave: **IE01** Año: **2009** Concepto: **Solicitud de invención por Internet**
Unidades: **1** Importe: **77,94**

Referencia OEPM: **88015733431**



909992100200188015733431

Declarante

Fecha: **24/12/2009**
Firma:
PONS CONSULTORES DE PROPIEDAD INDUSTRIAL SA

Ingreso

Importe en Euros:
Adeudo en cuenta:
Entidad: **2100** Oficina: D.C. Nro. Cuenta
NRC Asignado: 7915110982283W6E258BFA

(1) Solo cuando el pago se realice con cargo a la cuenta corriente del representante o agente.
(2) En el caso de que tenga asignado un número por la OEPM.
(3) En el caso de patentes europeas, se pondrá una P si es el número de publicación o una S si es el número de solicitud.
(4) Una copia de este impreso se acompañará con la presentación de documentación en la OEPM.

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS		
Hoja informativa sobre pago de tasas de una solicitud de patente o modelo de utilidad		
1. REFERENCIA DE SOLICITUD	ES2228.1	
2. TASAS	Importe (en euros)	
Concepto	Código de barras asignado	Importe
Solicitud de demanda de depósito o de rehabilitación.	88015733431	77,94
Solicitud de cambio de modalidad en la protección		0,00
Prioridad extranjera (0)		0,00
Petición IET		0,00
El solicitante se acoge a la exención del pago de tasas	<input type="checkbox"/>	
El solicitante es una Universidad pública	<input type="checkbox"/>	
	Importe total	77,94
	Importe abonado	77,94
	Importe pendiente de pago	0,00

Se ha aplicado el 15% de descuento sobre la tasa de solicitud de acuerdo con la D. Adic. 8.2 Ley de Marcas.

Si no hubiera realizado el pago previamente al envío de la solicitud, consignando los números del código de barras en la casilla correspondiente, recibirá una notificación de la Oficina Española de Patentes y Marcas a partir de la recepción de la cual tendrá un mes para realizar dicho pago.

Transcurrido este plazo, sin que se hubiera procedido al pago de la tasa de solicitud, la solicitud de patente de invención o de modelo de utilidad se tendrá por desistida.

DERIVADOS DE AMIDA DE ACIDOS GRASOS CON ANFETAMINAS PARA EL TRATAMIENTO DE DESORDENES ALIMENTICIOS

5 La presente invención se refiere a una nueva serie de derivados de amida de ácidos grasos con anfetaminas y sus sales, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, que muestran una afinidad por receptores cannabinoides tipo 1 (CB1) y del subtipo alfa de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR-alfa), y como potentes agentes antioxidantes en la oxidación de la Lipoproteína de Baja Densidad (LDL). Los
10 compuestos pueden modular las acciones reguladas por los citados receptores, como la inducción de la saciedad y control de ingesta, la disminución de la grasa corporal y la regulación del metabolismo lipídico.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 El sistema endocannabinoide está compuesto por los receptores cannabinoides, ligandos endógenos (endocannabinoides) y los sistemas enzimáticos necesarios para su biosíntesis y degradación (Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **2006** 46:101). Hasta el momento han sido identificados
20 dos tipos de receptores cannabinoides: CB1 y CB2. Los dos receptores cannabinoides se encuentran acoplados a la proteína G a través de la cual modulan la actividad de las adenilato ciclasas (AC) y proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), y eventos intracelulares que llevan a la regulación en la expresión de diversos genes. La activación de los receptores
25 CB1 también regula los canales de Ca^{+2} voltaje dependientes y los canales de potasio. Los receptores CB1 se encuentran distribuidos en el sistema nervioso central y en otros órganos como tejido adiposo, páncreas endocrino, músculo, pulmones, hígado y riñones, mientras que los receptores CB2 se expresan principalmente en el sistema inmunológico y células hematopoyéticas (Nature
30 Reviews Drug Discovery **2004** 3:771).

El sistema endocannabinoide parece estar relacionado con un gran número de condiciones fisiológicas y patológicas a nivel neurológico, psiquiátrico, cardiovascular, desarrollo del cáncer, trastornos reproductivos y alimentarios.

Un mejor conocimiento de las vías de biosíntesis de los endocannabinoides y los mecanismos de regulación a nivel celular de dichas vías se consideran las principales prioridades en la investigación de los cannabinoides (Nature Reviews Drug Discovery **2004** 3:771).

5

El receptor CB1 fue, dentro del sistema endocannabinóide, la diana terapéutica que inicialmente recibió mayor atención en las investigaciones para el tratamiento de la obesidad. Es bien conocido que sustancias agonistas cannabinoides aumentan el apetito y por tanto se postuló que bloqueando este receptor se podría disminuir la ingesta de comida llevando a una pérdida de peso. El Rimonabant, también conocido como SR141716 o Acomplia®, fue el primer antagonista CB1 en ser descrito y uno de los primeros en ser estudiado clínicamente para el tratamiento de obesidad (Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. **2006** 46:101, Nat Rev Drug Disc. **2004** 3:771). Los ensayos clínicos llamados RIO (Rimonabant In Obesity) (Lancet **2005** 365:1389; JAMA **2006** 295:761; Lancet **2006**) 368:1160 mostraron la eficacia de Rimonabant como agente anti-obesidad. Desafortunadamente algunos datos de los estudios clínicos han asociado el uso crónico del Rimonabant con un aumento de la depresión, ansiedad y un aumento de tendencias suicidas (Lancet **2007** 370:1706; Lancet **2008** 371:556; Lancet **2008** 371:555). Por lo que, en octubre de 2008, la Agencia Europea del Medicamento decide la suspensión temporal del mismo.

25

Por otro lado, los receptores activados por el proliferador de peroxisoma (PPAR) son una superfamilia perteneciente a los receptores nucleares hormonales (NHR), que son factores de transcripción activados por ligando que juegan un papel fundamental en la regulación del metabolismo de lípidos y de glúcidos. Tres subtipos de receptores PPAR han sido descritos: PPAR-alfa, PPAR-gamma y PPAR-delta (Pharmacol. Res. **2005** 51:85)

30

La activación del subtipo PPAR-alfa por sus ligandos naturales está relacionada con el control de las concentraciones de lípidos circulantes. Se han descrito ácidos grasos de cadena media, larga y eicosanoides (PNAS **1997** 94:4312) que producen una reducción sustancial de los triglicéridos del plasma, una reducción moderada del colesterol asociado a lipoproteínas de baja

densidad (LDL) y un efecto de saciedad. Por ello, el subtipo alfa de esta familia de receptores se presenta como una diana terapéutica muy interesante para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con alteraciones metabólicas como las dislipemias, enfermedad cardiovascular, diabetes y obesidad (Nature Medicine **2004** 10:355)

5

Las dislipemias son alteraciones del metabolismo de los lípidos, con su consecuente alteración de las concentraciones de lípidos (ej. colesterol y triglicéridos) y lipoproteínas en la sangre: lipoproteínas de baja densidad (LDL), de muy baja densidad (VLDL) y de densidad intermedia (IDL). Normalmente, la molécula de colesterol es transportada ligada a las lipoproteínas LDL. Un incremento en las concentraciones LDL-colesterol está directamente relacionada con el riesgo de enfermedad coronaria. Un porcentaje más pequeño de las moléculas de colesterol es transportado a través de las lipoproteínas de alta densidad, las HDL, cuya función principal es extraer el colesterol depositado en las paredes arteriales y transportarlo hasta el hígado para su eliminación vía intestinal. Se ha descrito que un nivel elevado de HDL-colesterol está asociado con la disminución del riesgo de enfermedad coronaria. Por tanto, en el tratamiento de las dislipemias es igualmente importante reducir las concentraciones de LDL-colesterol como aumentar las de HDL-colesterol (Am. J. Med. **1977** 62:707; N. England J. Med. **1991** 325:373; Ann. Internal. Med. **1979** 90:85) En la actualidad se están utilizando clínicamente los derivados del fibrato para el control de las dislipemias (Am J Med. **2009** 122: 962), dando lugar a distintos métodos con derivados como el clofibrato y el fenofibrato (WO2007047880 **2007**; WO2007047724 **2007**), que se unen al receptor PPAR-alfa y regulan distintos factores de transcripción implicados en algunos de los procesos anteriormente descritos (Curr. Atheroscler Rep **2000** 2: 327). Además del tratamiento de las dislipemias, se están describiendo agentes agonistas duales de PPAR-alfa/gamma con potencial uso para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (J Med Chem **2004** 47:4118).

10

15

20

25

30

La enfermedad coronaria es la principal causa de mortalidad en los países industrializados. La oxidación de los lípidos presentes en las lipoproteínas de

baja densidad (LDL) es un marcador del desarrollo de arteriosclerosis y enfermedad coronaria (Cell **2001** 104:503). Se postula que la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) está implicada en la patogénesis de la arteriosclerosis y la hipertensión (Physiol. Rev. **2002** 82:47), la oxidación del LDL por las ROS es uno de los primeros eventos en el desarrollo de la enfermedad. La arteriosclerosis puede ser considerada como una forma de inflamación crónica resultado de la interacción entre lipoproteínas modificadas, macrófagos, células T y elementos celulares naturales de la pared arterial. El proceso inflamatorio puede conducir al desarrollo de lesiones complejas o placas. La ruptura de las placas y la trombosis resulta en el infarto de miocardio (Cell **2001** 104:503).

Se ha descrito que algunos de los endocannabinoides conocidos presentan además de afinidad por el receptor CB1 también por el receptor PPAR-alfa como por ejemplo el noladin éter y virodhamida (Br. J Pharmacol **2007** 152:576; Biochem Soc Trans **2006** 34:1095). Algunos cannabinoides sintéticos también han demostrado afinidad por el receptor PPAR-alfa como el WIN55212-2. (Biochem Soc Trans **2006** 34:1095).

Los endocannabinoides tienen menor afinidad por el receptor PPAR-alfa que los ligandos sintéticos actualmente disponibles como las tiazolidindionas (Anal. Biochem. **2005** 344:8). Es importante saber que la Food and Drug Administration de Estados Unidos dictó que, antes de empezar estudios clínicos con agonistas PPAR, debería ser hecho un estudio de 2 años en roedores (<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm071624.pdf>)

Ligandos duales que presentaran actividad inhibitoria del receptor CB1 y que, al mismo tiempo tengan una afinidad moderada por el receptor PPAR-alfa, pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades como la obesidad, pues la acción simultánea en los dos receptores puede llevar a una acción sinérgica para la modulación negativa del apetito (Neuropharmacology. **2008** 54: 226-34). También se cree que el hecho de que la afinidad por el receptor PPAR sea

menor disminuye el riesgo de efectos colaterales observados (Toxicology 2007 346:2).

- 5 El hecho de que estos compuestos, además de regular la saciedad tengan un efecto protector sobre la oxidación de la LDL puede ser interesante ya que esta actividad se relaciona con una reducción del riesgo de problemas cardiovasculares que, muchas veces, están asociados a la obesidad.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- 10 La invención se refiere a una nueva clase de moléculas, concretamente derivados amida de ácidos grasos conjugados con anfetaminas derivadas de la 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) como ligandos duales de los receptores PPAR-alfa y CB1, e inhibidores de la oxidación de la LDL, así como su procedimiento de preparación y su utilización.

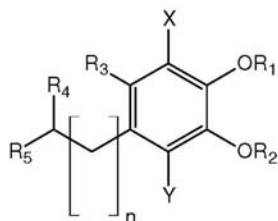
- 15 Estos compuestos pueden ser utilizados para la preparación de un medicamento para la inducción de saciedad y control de ingesta, modulación de la grasa corporal y regulación del metabolismo lipídico así como la preparación de un medicamento para el tratamiento diabetes, obesidad, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares.
- 20

La presente invención describe derivados de ácidos grasos con anfetaminas para el tratamiento de desórdenes alimenticios.

- 25 Por lo tanto, la presente invención está referida a una nueva familia de compuestos derivados de ácidos grasos con anfetaminas de fórmula general (I). Estos compuestos han mostrado una clara actividad inhibitoria de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y del apetito y con afinidad por los receptores CB1 y PPAR-alfa. Es conocido el papel fundamental que tienen los receptores anteriores en enfermedades y condiciones de muy diversa naturaleza, especialmente alimenticia.
- 30

Por lo tanto un primer aspecto de la presente invención se refiere a un nuevo compuesto de fórmula general (I) (también referido como el compuesto de la invención):

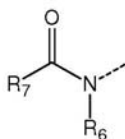
5



(I)

donde

- 10 X e Y pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H, halógeno y metilo;
 n es un número entero desde 1 a 4;
 R₁ y R₂ pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H y alquilo C₁-C₆ o pueden estar unidos por un enlace simple
 15 entre los dos átomos de oxígeno, formando un nuevo ciclo;
 R₃ se selecciona entre H, alquilo C₁-C₆ y alqueno C₁-C₄;
 R₄ se selecciona entre H, halógeno y alquilo C₁-C₄;
 R₅ es un compuesto de fórmula general (II):



(II)

donde:

- 5 R_6 se selecciona entre H y alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$;
 R_7 se selecciona entre alquilo $\text{C}_8\text{-C}_{30}$ y alqueno $\text{C}_8\text{-C}_{30}$;
 y sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable,
 solvatos y prodrogas del mismo.
- 10 El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 4, y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, etc. Los grupos alquilo pueden
- 15 tener opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, carbonilo, ciano, acilo, alcóxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.
- 20 El término "alqueno" se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas que contienen uno o más enlaces carbono-carbono dobles, por ejemplo, vinilo, 1-propenilo, alilo, isoprenilo, 2-butenilo, 1,3-butadienilo, etc. Los radicales alquenos pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halo, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcóxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.
- 25 Halógeno se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

En una realización preferida X e Y pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H y metilo.

5 En una realización preferida n es un número entero seleccionado entre 1 ó 3.

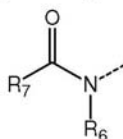
En una realización preferida R₁ y R₂ pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H y metilo o pueden estar unidos por un enlace simple entre los dos átomos de oxígeno, formando un nuevo ciclo.

10

En una realización preferida R₃ se selecciona entre H y alquilo C₁-C₃.

En una realización preferida R₄ se selecciona entre H y CH₃.

15 En una realización preferida R₅ es un compuesto de fórmula (II):



(II)

donde R₆ se selecciona entre H y CH₃ y R₇ es un grupo alqueno C₁₅-C₂₅.

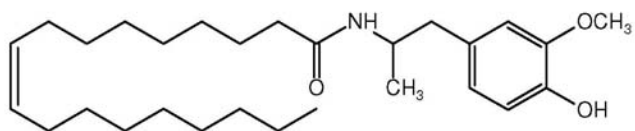
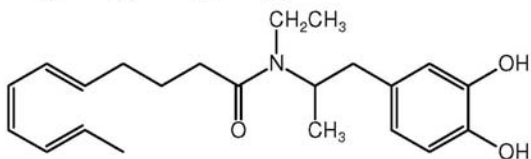
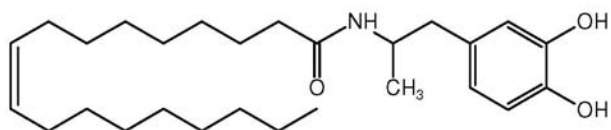
20

En una realización preferida R₇ tiene un número de insaturaciones entre 1 y 6.

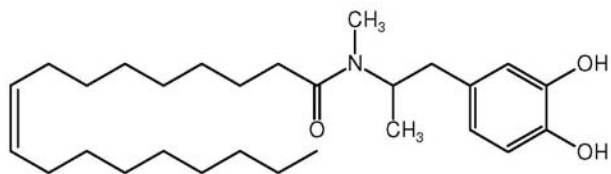
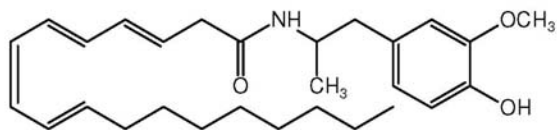
En otra realización preferida el compuesto de fórmula general (I) se refiere a un compuesto que se selecciona del siguiente grupo:

25

9

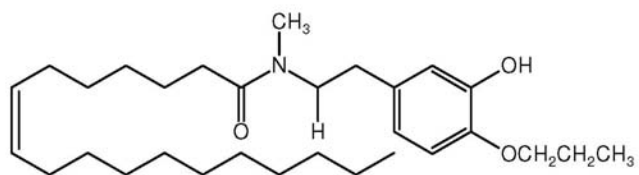


5

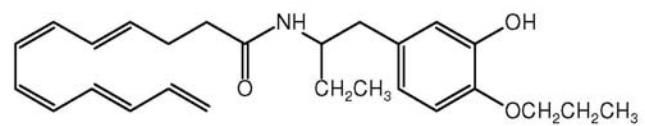
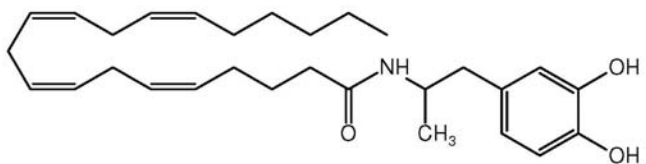


10

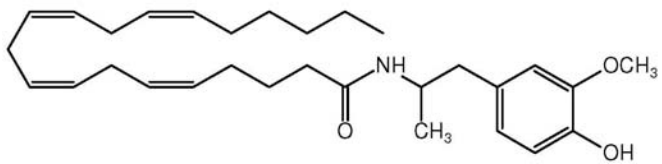
10



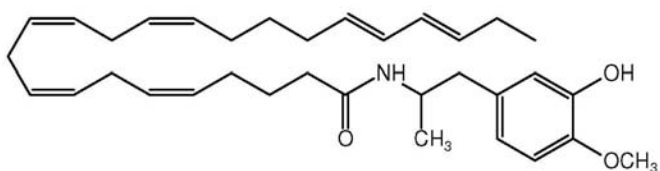
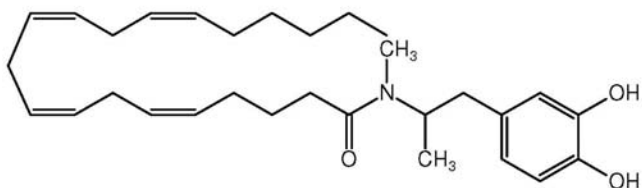
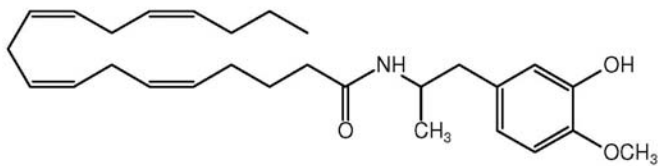
5



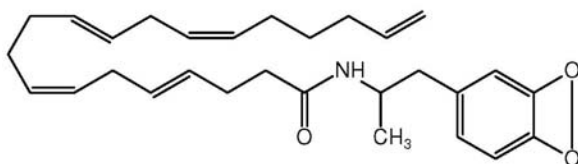
10



11



5



10 o un isómero, una sal farmacéuticamente aceptable, un pro-fármaco o un solvato del mismo.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples, incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el término isómero también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros, racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente activos o las mezclas en distintas proporciones de los mismos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos de los compuestos de fórmula (I). El término "prodroga" o "profármaco" tal como aquí se utiliza incluye cualquier compuesto derivado de un compuesto de fórmula (I) -por ejemplo y no limitativamente: ésteres (incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc.), carbamatos, amidas, etc.- que al ser administrado a un individuo puede ser transformado directa o indirectamente en dicho compuesto de fórmula (I) en el mencionado individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos. En este sentido, el término "solvato", tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales

farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación conocidos por los expertos en la materia.

Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I), sus sales, profármacos o solvatos, se encontrarán, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, y todavía más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% de compuesto de fórmula (I), o de sus sales, solvatos o profármacos.

En otra realización preferida el compuesto de fórmula general (I) se usa como medicamento.

En otro aspecto, la presente invención también se refiere a las composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto de la invención, o un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, un derivado o un profármaco del mismo, junto con un transportador o carrier farmacéuticamente aceptable, un excipiente o un vehículo, para la administración a un paciente.

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende además otro principio activo.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas, calculada para producir el efecto deseado y, en general, 5
vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

Los compuestos descritos en la presente invención, sus sales, profármacos y/o 10
solvatos así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos, o principios activos, adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su 15
administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o una sal, profármaco o solvato del mismo.

En una realización preferida de la presente invención, las composiciones 20
farmacéuticas son adecuadas para la administración oral, en forma sólida o líquida. Las posibles formas para la administración oral son tabletas, cápsulas, siropes o soluciones y pueden contener excipientes convencionales conocidos en el ámbito farmacéutico, como agentes agregantes (p.e. sirope, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinil pirrolidona), rellenos (p.e. lactosa, 25
azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina), disgregantes (p.e. almidón, polivinil pirrolidona o celulosa microcristalina) o un surfactante farmacéuticamente aceptable como el lauril sulfato de sodio.

Las composiciones para administración oral pueden ser preparadas por 30
métodos los convencionales de Farmacia Galénica, como mezcla y dispersión. Las tabletas se pueden recubrir siguiendo métodos conocidos en la industria farmacéutica.

Las composiciones farmacéuticas se pueden adaptar para la administración parenteral, como soluciones estériles, suspensiones, o liofilizados de los productos de la invención, empleando la dosis adecuada. Se pueden emplear excipientes adecuados, como agentes tamponadores del pH o surfactantes.

5

Las formulaciones anteriormente mencionadas pueden ser preparadas usando métodos convencionales, como los descritos en las Farmacopeas de diferentes países y en otros textos de referencia.

10

La administración de los compuestos o composiciones de la presente invención puede ser realizada mediante cualquier método adecuado, como la infusión intravenosa y las vías oral, intraperitoneal o intravenosa. La administración oral es la preferida por la conveniencia de los pacientes y por el carácter crónico de las enfermedades a tratar.

15

La cantidad administrada de un compuesto de la presente invención dependerá de la relativa eficacia del compuesto elegido, la severidad de la enfermedad a tratar y el peso del paciente. Sin embargo, los compuestos de esta invención serán administrados una o más veces al día, por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 veces diarias, con una dosis total entre 0.1 y 1000 mg/Kg/día. Es importante tener en cuenta que puede ser necesario introducir variaciones en la dosis, dependiendo de la edad y de la condición del paciente, así como modificaciones en la vía de administración.

20

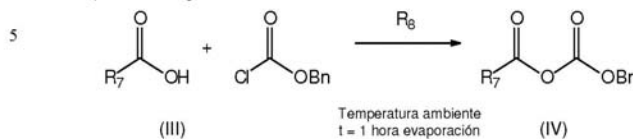
25

Los compuestos y composiciones de la presente invención pueden ser empleados junto con otros medicamentos en terapias combinadas. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o de otra composición diferente, para su administración al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

30

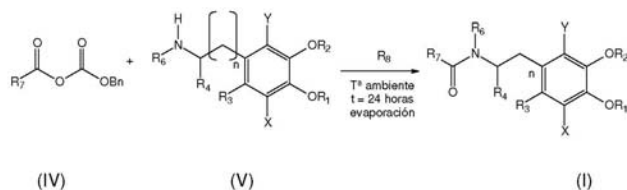
En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un compuesto de fórmula (I) que comprende las siguientes etapas:

- conjugación entre un compuesto de fórmula general (III) y cloroformiato de bencilo para dar lugar a un nuevo compuesto de fórmula general (IV), que comprende la siguiente reacción:



10 donde R_7 se selecciona entre alquilo $\text{C}_8\text{-C}_{30}$ y alqueniilo $\text{C}_8\text{-C}_{30}$ y R_8 se selecciona entre NH_3 , $\text{NH}_2\text{-CH}_3$, $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$, $\text{NH-(CH}_2)_2$, $\text{N-(CH}_2)_3$, $\text{NH-(CH}_2\text{-CH}_3)_2$ y $\text{N-(CH}_2\text{-CH}_3)_3$;

15 - reacción del compuesto de fórmula general (IV) con un compuesto de fórmula general (V) para dar lugar al compuesto de fórmula general (I) usando dimetilformamida como disolvente:



donde

20 X e Y pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H, halógeno y metilo;

n es un número entero desde 1 a 4;

R_1 y R_2 pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H y alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ o pueden estar unidos por un enlace simple entre los dos átomos de oxígeno, formando un nuevo ciclo;

25 R_3 se selecciona entre H, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ y alqueniilo $\text{C}_1\text{-C}_4$;

R_4 se selecciona entre H, halógeno y alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$;

R₆ se selecciona entre H y alquilo C₁-C₄;

R₇ se selecciona entre alquilo C₈-C₃₀ y alquenoilo C₈-C₃₀;

R₈ se selecciona entre NH₃, NH₂-CH₃, NH₂-CH₂-CH₃, NH-(CH₃)₂, N-(CH₃)₃, NH-(CH₂-CH₃)₂ y N-(CH₂-CH₃)₃;

5

- evaporación de la dimetilformamida y extracción con acetato de etilo y agua;

- tratamiento de la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro y evaporación del disolvente;

10

- purificación del compuesto de fórmula (I) por cromatografía en columna de gel de sílice FLASH.

15

Los compuestos de fórmula general (V) fueron sintetizadas de acuerdo con la metodología previamente descrita (Bioorg. Med. Chem. **2002** 10:1085).

En otro aspecto la presente invención se refiere al uso de al menos un compuesto de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad o trastorno de la alimentación.

20

En otro aspecto la presente invención se refiere al uso de al menos un compuesto de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad mediada por el receptor cannabinoide CB1 y/o mediada por los receptores PPAR-alfa y/o para la inhibición de la oxidación de LDL.

25

Preferiblemente los desórdenes o trastornos de la alimentación se seleccionan de la lista que comprende: obesidad, anorexia, disfunción lipídica, diabetes, enfermedades cardiovasculares y síndrome metabólico.

30

Adicionalmente el compuesto de fórmula (I) se usa para reducir la grasa subcutánea y/o para la inducción de saciedad y control de la ingesta.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 10 Figura 1 – Experimento de ingesta aguda con OLHHA (*N*-oleil-3,4-dihidroxianfetamina).
- 15 Figura 2 - Experimento de ingesta aguda con OLHMA (*N*-oleil-3-metoxi-4-hidroxianfetamina).
- Figura 3 - Experimento de ingesta aguda con OLHMA (*N*-oleil-*N*-metil-3,4-dihidroxianfetamina).
- 20 Figura 4 - Experimento de ingesta aguda con AAHHA (*N*-araquidonil-3,4-dihidroxianfetamina).
- Figura 5 - Experimento de ingesta aguda con AAHMA *N*-araquidonil-3-metoxi-4-hidroxianfetamina.
- 25 Figura 6 – Experimento de ingesta aguda con AAHMA (*N*-araquidonil-*N*-metil-3,4-dihidroxianfetamina).
- Figura 7 – Experimento de ingesta aguda con (*N*-oleil-2-feniletilamina).
- 30 Figura 8 – Ensayo de ligando receptor con OLHHA.
- Figura 9 – Ensayo ligando receptor con OLHMA.

Figura 10 – Ensayo ligando receptor con AAHHA.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

5 A continuación se muestran una serie de ejemplos que en todo momento se exponen para ilustrar la síntesis de algunos compuestos particulares de la presente invención y para ejemplificar los procedimientos generales. De acuerdo con lo anterior, la siguiente sección de ejemplos no tiene la intención de ningún modo de limitar el alcance de la invención contemplada en la
10 presente memoria descriptiva.

En esta memoria descriptiva los símbolos y convenciones usados en estos procedimientos, esquemas y ejemplos son consistentes con los usados en el Sistema Internacional y la bibliografía científica contemporánea, por ejemplo, el
15 Journal of Medicinal Chemistry. Salvo que se indique otra cosa, todos los materiales de partida se obtuvieron de proveedores comerciales y se usaron sin purificación adicional. Específicamente, se pueden usar las siguientes abreviaturas en los ejemplos y a lo largo de toda la memoria descriptiva: g (gramos); mg (miligramos); kg (kilogramos); μ g (microgramos); L (litros); mL (mililitros); μ L (microlitros); mmol (milimoles); mol (moles); $^{\circ}$ C (grados Celsius); Hz (hertzio); MHz (megahertzio); δ (desplazamiento químico); s (singlete); d (doblete); t (triplete); q (cuartete); m (multiplete); RMN (resonancia magnética nuclear); M (molar); Et₃N (trietilamina); DMF (dimetilformamida); DMSO (dimetilsulfóxido); ACN (acetonitrilo); PBS (búfer fosfato salino).

25 Las anfetaminas HHA, HMA y HHMA, metabolitos del MDMA, fueron obtenidas por síntesis orgánica de acuerdo con la metodología descrita en la literatura (Bioorg. Med. Chem. **2002** 10:1085). Todos los reactivos y disolventes usados, salvo cuando se ha indicado, se obtuvieron de proveedores comerciales y fueron utilizados sin ninguna purificación previa. Todos los análisis de RMN de ¹H y ¹³C fueron realizadas con espectrómetros Varian Anova 500 y Varian Mercury 400. El progreso de todas las reacciones fue monitorizado por CCF (cromatografía de capa fina) en hojas de aluminio con una capa de gel de sílice 60 (HF-254, Merck), con un grosor de 0,25 mm.

30

Síntesis química

Preparación del oleato de 3,4-dihidroxianfetamina.

5 En un balón de reacción bajo atmósfera de nitrógeno y equipado con agitador magnético se adicionó ácido oleico (45 mmol), acetonitrilo (5 mL), trietilamina (62 mmol) y clorofornato de bencilo (54 mmol) y la mezcla fue agitada durante una hora a 4 °C. El acetonitrilo fue eliminado bajo presión reducida y el residuo
10 seco fue redissuelto en dimetilformamida (DMF) (5 mL). Sobre la solución en DMF, bajo atmósfera de nitrógeno y a 4 °C se adicionó al balón trietilamina (46 mmol) y 3,4-dihidroxianfetamina (HHA) (49 mmol). Se agitó la reacción durante 24 horas a 25 °C. La conversión de la reacción fue evaluada por CCF. La DMF fue eliminada bajo presión reducida y el producto fue purificado por columna
15 cromatográfica flash usando como eluyente acetato de etilo/hexano 20%.

El producto fue obtenido como un aceite amarillo con un rendimiento del 43 %:
1 H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 0.86 (t, $J = 6.95$ Hz, 3H), 1.11 (d, $J = 6.58$ Hz, 3H), 1.19 – 1.34 (m, 20H), 1.50-1.60 (m, 2H), 1.96-2.03 (m, 4H), 2.12 (t, $J =$
20 7.78 Hz, 2H), 2.57 (A of an ABX syst., $J = 7.08$, 13.65 Hz, 1H), 2.66 (B of an ABX syst., $J = 6.55$, 13.70 Hz, 1H), 4.16 – 4.28 (X of an ABX syst., m, 1H), 5.28 – 5.39 (m, 2H), 5.53 (d, $J = 8.28$ Hz, 1H), 6.51 (dd, $J = 1.40$, 8.00, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.76 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 14.34, 20.37, 22.92, 26.03, 27.41, 27.46, 29.34, 29.44, 29.56, 29.77, 29.95, 30.00, 32.14,
25 37.20, 42.26, 46.91, 114.97, 115.90, 121.34, 129.90, 129.96, 130.22, 143.51, 144.51, 174.11.

Preparación del oleato de 3-metoxi-4-hidroxianfetamina

30 El compuesto representado se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente utilizando los mismos reactivos de partida y las mismas cantidades molares, substituyendo 3,4-dihidroxianfetamina por 3-metoxi-4-hidroxianfetamina.

El producto fue obtenido como un aceite amarillo con un rendimiento del 30 %.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.87 (t, *J* = 6.58 Hz, 3H), 1.09 (d, *J* = 6.61 Hz, 3H), 1.20-1.37 (m, 20H), 1.51-1.62 (m, 2H), 1.95-2.05 (m, 4H), 2.10 (t, *J* = 7.48, 7.48 Hz, 2H), 2.60 (A of an ABX syst., *J* = 7.34, 13.61 Hz, 1H), 2.76 (B of an ABX syst., *J* = 5.70, 13.59 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 4.18-4.29 (X of an ABX syst., m, 1H), 5.24-5.41 (m, 3H), 6.63 (dd, *J* = 1.28, 7.95 Hz, 2H), 6.69 (d, *J* = 1.39 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 7.97 Hz, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm: 14.36, 20.24, 22.92, 26.02, 27.40, 27.45, 29.36, 29.45, 29.51, 29.55, 29.75, 29.95, 29.99, 32.13, 37.25, 42.44, 46.25, 56.12, 111.87, 114.32, 122.34, 129.97, 130.04, 130.21, 144.45, 146.71, 172.72.

Preparación del oleato de 3,4-dihidroxiacetanfetamina

El compuesto se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente utilizando los mismos reactivos de partida, utilizando las mismas cantidades molares y substituyendo 3,4-dihidroxiacetanfetamina por 3,4-dihidroxiacetanfetamina.

El producto fue obtenido como un aceite amarillo con rendimiento 45 %. El producto es una mezcla de dos rotámeros (cis y trans). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 0.85 (t, *J* = 6.87 Hz, 3H), 0.95 (trans, d, *J* = 6.80 Hz, 3H), 1.12 (cis, d, *J* = 6.50 Hz, 3H), 1.19-1.42 (m, 20 H), 1.36 – 1.42 (trans, m, 2H), 1.80 - 1.87 (cis, m, 2H) 1.94-2.00 (m, 4H), 2.06 – 2.09 (cis, m, 2H), 2.11 – 2.19 (trans, m, 2H), 2.46 – 2.55 (m, 2H), 2.66 (cis, s, 3H), 2.74 (trans, s, 3H), 3.95 – 4.06 (cis, m, 1H), 4.64 – 4.75 (trans, s, 1H), 5.28 – 5.36 (m, 2H), 6.36 – 6.41 (m, 1H), 6.52 – 6.54 (m, 1H), 6.56 – 6.70 (m, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) 14.36, 14.41, 15.57, 19.50, 21.29, 22.92, 25.34, 25.52, 27.12, 27.45, 29.36, 29.40, 29.47, 29.55, 29.76, 29.96, 30.01, 32.14, 33.24, 34.32, 39.68, 40.00, 55.42, 60.69, 114.94, 115.62, 115.98, 120.66, 120.80, 130.01, 130.16, 143.43, 143.66, 143.65, 144.39, 144.76, 171.53, 174.76, 175.21.

Preparación del araquidonato de 3,4-dihidroxiacetanfetamina.

El compuesto se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente utilizando los mismos reactivos de partida, utilizando las mismas cantidades molares substituyendo ácido oleico por ácido araquidónico.

El producto fue obtenido como un aceite amarillo con rendimiento 39 %. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.90 (t, *J* = 6.93 Hz, 3H), 1.13 (d, *J* = 6.62 Hz, 3H), 1.24-1.42 (m, 6H), 1.59-1.74 (m, 2H), 2.03-2.11 (m, 4H), 2.17 (t, 7.73 Hz, 2H), 2.59 (A of na ABX syst., *J* = 7.26, 13.69 Hz, 1H), 2.70 (B of na ABX syst., *J* = 6.48, 13.68 Hz, 1H), 2.77-2.87 (m, 6H), 4.19-4.29 (X of an ABX syst., m, 1H), 5.30 – 5.46 (m, 8H), 5.53 (d, *J* = 8.38 Hz, 1H), 6.54 (dd, *J* = 1.90, 8.02 Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.78 (d, *J* = 10.89, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm: 14.30, 20.34, 22.80, 25.81, 25.85, 26.75, 27.44, 29.54, 31.74, 36.49, 42.26, 47.03, 115.04, 115.93, 121.39, 127.73, 128.05, 128.31, 128.52, 128.85, 129.04, 129.17, 129.94, 130.76, 143.47, 144.48, 173.82.

Preparación del araquidonato de 3-metoxi-4-hidroxianfetamina.

El compuesto se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente utilizando los mismos reactivos de partida, utilizando las mismas cantidades molares y substituyendo 3,4-dihidroxianfetamina por 3-metoxi-4-hidroxianfetamina y ácido oleico por ácido araquidónico.

El producto fue obtenido como un aceite amarillo con rendimiento 40 %. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.87 (t, *J* = 6.60 Hz, 3H), 1.09 (d, *J* = 6.63 Hz, 3H), 1.21-1.40 (m, 6H), 1.61-1.76 (m, 2H), 1.99-2.15 (m, 6H), 2.59 (A of an ABX syst., *J* = 7.48, 13.59 Hz, 1H) 2.73–2.86 (m, 7 H, B of an ABX syst. + 6H), 3.85 (s, 3H), 4.15-4.27 (X of an ABX syst., m, 1H), 5.27-5.43 (m, 9H), 6.62 (dd, *J* = 1.50, 7.95 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 1.40 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 7.98 Hz, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm: 14.32, 20.18, 22.81, 25.80, 25.85, 26.86, 27.44, 29.55, 31.74, 36.52, 42.44, 46.33, 56.11, 111.89, 114.36, 122.33, 127.72, 128.06, 128.37, 128.44, 128.81, 128.95, 129.31, 130.01, 130.74, 144.47, 146.73, 172.45.

Preparación del araquidonato de 3,4-dihidroximetanfetamina.

El compuesto se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente utilizando las mismas cantidades molares y substituyendo 3,4-dihidroxianfetamina por 3,4-dihidroximetanfetamina y ácido oleico por ácido araquidónico.

El producto fue obtenido como un aceite amarillo con rendimiento 42 %. El producto es una mezcla de dos rotameros (cis and trans). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 0.87 (t, $J = 6.60$ Hz, 3H), 0.95 (trans, d, $J = 7.00$ Hz, 3H), 1.11 (cis, d, $J = 6.5$ Hz, 3H) 1.20 – 1.34 (m, 6H), 1.43 – 1.50 (trans, m, 2H), 1.83 – 1.94 (cis, m, 2H), 1.98 – 2.03 (m, 4H), 2.08 – 2.37 (m, 4H), 2.65 (cis, s, 3H), 2.73 (trans, s, 3H), 2.74 - 2.82 (m, 6H), 3.95 – 4.01 (cis, m, 1H), 4.65 – 4.72 (trans, m, 1H), 5.25 – 5.38 (m, 8H), 6.36 – 6.40 (m, 1H), 6.52 - 6.54 (m, 1H), 6.57 – 6.61 (m, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 17.57, 19.53, 22.81, 25.06, 25.20, 25.85, 26.83, 26.87, 27.13, 27.45, 29.35, 29.56, 31.74, 32.56, 33.65, 39.68, 39.97, 49.95, 55.37, 60.70, 114.97, 115.57, 115.99, 120.69, 120.83, 127.74, 127.77, 128.07, 128.13, 128.34, 128.39, 128.42, 128.52, 128.81, 129.81, 129.00, 129.32, 129.35, 130.05, 130.08, 130.73, 143.42, 143.67, 144.38, 144.67, 144.74, 174.42, 174.92.

15 Preparación del oleato de 2-feniletilamina.

El compuesto se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente utilizando las mismas cantidades molares de 2-feniletilamina y ácido oleico.

El producto fue obtenido como un sólido blanco con rendimiento del 95 %. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.87 (t, $J = 6.93$ Hz, 3H), 1.21-1.37 (m, 20H), 1.53-1.63 (m, 2H), 1.96-2.05 (m, 4H), 2.11 (t, $J = 7.60$ Hz, 2H), 2.81 (t, $J = 6.94$ Hz, 2H), 3.49-3.53 (m, 2H), 5.30-5.37 (m, 2H), 5.53 (br s, 1H), 7.18-7.33 (m, 5H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 14.38, 22.93, 25.99, 27.41, 27.46, 29.38, 29.48, 29.51, 29.56, 29.77, 29.95, 30.01, 32.14, 35.93, 37.05, 40.75, 126.72, 128.84, 128.99, 129.97, 130.22, 139.15, 173.47.

25

Ensayo de ligando receptor

El ensayo ligando receptor para el receptor CB1, evalúa la capacidad de los compuestos sintetizados de desplazar [^3H] SR141716 (conocido ligando con afinidad por receptor CB1) en un homogenado de cerebelo de ratas.

30

La prueba de ensayo ligando receptor fue realizada usando el antagonista CB1 marcado [^3H] SR141716. En cada tubo fueron adicionados 450 μL de solución reguladora de pH A (50 mM Tris pH=7.4 con 0.5 % de albúmina de suero bovino (BSA)), 100-200 μg de membranas de cerebelo de ratas, el producto

diluido y el antagonista CB1 marcado [^3H] SR141716. Después de 60 minutos de incubación a 37 C°, la reacción fue paralizada con 1 mL de solución reguladora de pH A. La mezcla fue centrifugada a 5000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet lavado con 1 mL más de solución reguladora de pH A, centrifugado y una más vez el sobrenadante fue descartado. Se adicionó líquido de centelleo y las muestras fueron leídas en un contador de partículas beta (Liquid Scintillation Analyzer, Tri-Carb 2100 TR, PACKARD, a Packard Bioscience Company). Todos los productos fueron diluidos en solución reguladora de pH B (50 mM Tris pH=7,4 con 0,5 % de albúmina de suero bovino (BSA) y 0,3% de DMSO) en las concentraciones de 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} y 10^{-11} M. Todas las concentraciones de cada producto fueron leídas por triplicado (Figuras 8 a 10).

Ensayo del "reporter gene assay"

El ensayo "reporter gene assay" es un método *in vitro* utilizado para determinar y cuantificar la existencia de interacciones físicas entre proteínas, siendo útil para confirmar en nuestro caso la interacción del factor de transcripción PPAR-alfa y el coactivador SRC-1 en células MCF-7. La oleiletanolamida fue usada como un control positivo y la anandamida como control negativo.

Oleiletanolamida (OEA), GW7647, anandamida (AEA) y ácido oleico fueron suministrados por Tocris Bioscience (Cookson Ltd. Bristol, UK). Para los experimentos *in vitro*, con cultivo de células todos los compuestos fueron disueltos y diluidos en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich Spain).

Constructos de DNA: Como vehículo de expresión del ADNc para el receptor PPAR- α humano se utilizó el vector de expresión eucariota pSG5 (4100 pares de bases, *Stratagene Co.*). Esta construcción se utilizó para la sobreexpresión *in vivo* de la proteína en células mamíferas.

Cuatro copias del gen CPT1 humano tipo DR1 RE (secuencia GTAGGGAAAAGGTCA) fueron individualmente fusionadas con el promotor de la timidina quinasa en el vector pGL-2 Basic (5598 pares de bases, *Promega*

Co.) que carece de promotor eucariota y que contiene un gen indicador (traducción de *reporter gene*) luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*). Este vector es muy utilizado en el análisis cuantitativo de factores capaces de regular la expresión de genes en células mamíferas. Este vector pGL-2 Basic también presenta una región de resistencia a la ampicilina (gen para β -lactamasa).

Células humanas de cáncer de mama MCF-7 fueron cultivadas en placas de 6 pocillos (10^5 células/mL) y crecidas durante toda la noche para su estabilización en un medio de *Eagle* modificado por *Dulbecco* (DMEM) libre de rojo fenol suplementado con un 5% de suero bovino fetal o FBS tratado con carbón.

Liposomas conteniendo plásmidos de DNA fueron formados incubando 1 μ g de un vector de expresión para PPAR-alfa, RXR-alfa y SRC-1 salvaje y 1 μ g de plásmido indicador luciferasa con 10 μ g de *N*-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-*N,N*-trimetilamonio metilsulfato (DOTAP, Roche) durante 15 minutos a temperatura ambiente en un volumen total de 100 μ L. Después de dilución con 900 μ L de DMEM libre de rojo fenol, los liposomas fueron añadidos a las células. El DMEM libre de rojo fenol suplementado con 500 μ L de FBS tratado con carbon al 15 % fue añadido 4 h después de la transfección. En este momento, las células fueron tratadas 16 horas con diferentes concentraciones en DMSO (10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 y 10^4 M) de OEA, GW7647, AEA, ácido oleico y los diferentes compuestos sobre evaluación como indicado.

Las células fueron lisadas 15 horas después de la estimulación usando la solución reguladora de pH de lisis del gen indicador siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics).

El ensayo de quimioluminiscencia que permite una determinación cuantitativa de actividad luciferasa en células transfectadas se llevó a cabo siguiendo también las indicaciones del proveedor (*Luciferase Reporter Gene Assay, constant light signal* de *Roche Diagnostics GmbH*): La presencia de esta enzima es detectable en extractos de células transfectadas gracias a su

bioluminiscencia: la reacción catalizada por la luciferasa transforma la luciferina en oxiluciferina en presencia de ATP, Mg²⁺ y O₂, y produce además fotones de luz visible.

- 5 La actividad luciferasa fue normalizada respecto a la concentración de proteína (obtenida previamente siguiendo el método de *Bradford* con el *kit* reactivo *Quick Start Bradford Protein Assay Kit 1x* suministrado comercialmente por *Bio-Rad Laboratories Inc.* y empleando un lector de microplacas *VERSAmax®* de *Molecular Devices Corp.*), y los factores de inducción se calcularon como la
- 10 ratio de actividad luciferasa de las células estimuladas por ligando respecto a los solventes como se muestra en la tabla 1 correspondiente a los resultados de experimentos de ensayo ligando receptor y de afinidad para PPAR-alfa.

Compuesto	CB1 Ki (M)	CB1 pKi	PPAR-α EC50 (nM)
SR141716	3,64E-10	9,44	-
Anandamida	1,7E-07 ^a	6,77	> 10.000
WIN55212-2	1,11E-8 ^a	7,95	-
OLHHA	3,65E-07	6,44	698 ± 102
OLHMA	1,44E-06	5,84	1022 ± 206
AAHHA	2,02E-07	6,69	> 10.000
Oleato de 2-feniletilamina	-	-	1879 ± 384
Acido Oleico	-	-	218 ± 150
OEA	-	-	148 ± 29
GW7647	-	-	65 ± 1

Tabla 1

15

^a valores recogidos en la literatura (*British Journal Pharmacology* **1999** 128:684)

Ensayo de inhibición de la hidrolasa de amidas de ácido graso (FAAH)

20

El ensayo de inhibición de la hidrolasa de amidas de ácido graso (FAAH) evalúa la capacidad de los compuestos descritos de inhibir la actividad de la enzima FAAH. Se utilizó córtex de cerebro de ratas como fuente de FAAH y anandamida tritlada como sustrato. La inhibición de la degradación de la

anandamida tritiada por los compuestos descritos fue monitorizada con un contador de partículas beta.

5 En cada tubo se adicionaron 440 μL de solución reguladora de pH A (50 mM Tris pH=7.4 con 0.5 % albúmina de suero bovino (BSA)) 100-200 μg de membranas de córtex de cerebros de ratas, los productos diluidos (concentraciones de 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} y 10^{-11} M), 0,025 μCi de [^3H]anandamida y 10 μM de anandamida. Después de 60 minutos de incubación con agitación a 37 $^{\circ}\text{C}$, se adicionó cloroformo (1mL). Los tubos
10 fueron agitados en vortex y posteriormente centrifugados a 3000 RPM durante 5 minutos. Se transfirieron 0,25 mL de cada tubo a viales con líquido de centelleo y se analizaron en un contador de partículas beta (Liquid Scintillation Analyzer, Tri-Carb 2100 TR, PACKARD A Packard Bioscience Company). Todos los productos fueron diluidos en solución reguladora de pH B (50 mM
15 Tris pH=7.4 con 0.5 % albúmina de suero bovino (BSA) and 0.3% DMSO). Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

Ninguno de los compuestos demostró actividad sobre el FAAH.

20 **Experimento de inhibición de la oxidación de la LDL**

Para probar el poder antioxidante de los compuestos sintetizados se monitorizó la cinética de oxidación de la LDL inducida por CuSO_4 en presencia o ausencia de los compuestos sintetizados.

25

La LDL fue aislada de acuerdo con un procedimiento anteriormente descrito (Med. Clin. (Barc.) **2000** 115:166).

30 **Monitorizado de la oxidación de la LDL.**

Se utilizó una placa de ELISA de 96 pocillos y en cada pocillo se añadieron 140 μL de la LDL diluida (0,06 g/L) y 10 μL del producto diluido en metanol y, con la misma pipeta, se homogenizó el contenido de cada pocillo. Posteriormente se añadieron 10 μL de una solución 100 μM de CuSO_4 (la concentración final en

5 cada pocillo fue: 0,1; 0,5; 1,0 μM de producto, 0,05 g/L de LDL y 5 μM de CuSO_4) y la placa fue puesta en el espectrofotómetro (Lector Infinite M200 – TECAN IBERICA, Männedorf, Switzerland). Se monitorizó la absorbancia a 234 nm en intervalos de 15 minutos a 36,5 °C. La variable utilizada para estudiar la resistencia de la LDL a la oxidación fue el "lag time" (minutos). El perfil de la curva de oxidación de los dienos presentes en la LDL puede dividirse en tres fases consecutivas: fase lenta, fase de propagación y fase de descomposición. El "lag time" es determinado por la intersección de la fase de propagación con la extrapolación de la fase lenta. El "lag time" fue calculado usando la absorbancia molar $\epsilon_{234\text{nm}}$ para dienos conjugados ($29.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Para cada experimento se utilizaron 4 pocillos como control negativo sin añadir ninguno de los productos y un control positivo con hidroxitirosol. Todos estos resultados se muestran en la tabla 2.

15

Compuestos	Ratio "Lag time"		
	(95% CI)		
	0,1 μM	0,5 μM	1 μM
HT	0,99 (0,91-1,07)	1,16 (1,01-1,31)	1,32 (0,49-2,15)
OLHHA	1,02 (0,94-1,09)	1,24 (1,12-1,37)	1,37 (1,15-1,59)
OLHMA	1,09 (0,94-1,24)	1,37 (1,16-1,58)	1,35 (1,11-1,59)
OLHHMA	1,03 (0,99-1,08)	1,32 (1,12-1,51)	1,56 (1,37-1,59)
AAHHA	1,07 (1,02-1,12)	1,12 (1,05-1,19)	1,15 (1,04-1,27)
AAHMA	1,04 (0,98-1,09)	1,25 (1,15-1,35)	1,38 (1,18-1,57)
AAHHMA	1,01 (0,97-1,06)	1,22 (1,10-1,34)	1,34 (0,92-1,76)
OLDA	1,01 (0,96-1,05)	1,13 (0,96-1,30)	1,43 (1,29-1,58)
NADA	1,01 (0,94-1,07)	1,25 (0,97-1,53)	1,33 (1,12-1,54)

Tabla 2

20 Experimentos *in vivo*

Todos los experimentos *in vivo* fueron hechos usando ratas Wistar macho con 200-450 g de peso. Los animales fueron alojados en jaulas individuales en una habitación con temperatura (23 °C) y humedad (50 %) controladas con ciclo de

luz y oscuridad de 12/12. Los animales disponían de agua y comida *ad libitum* excepto en procedimientos experimentales específicos. Los animales fueron manipulados una vez al día durante los dos días anteriores a las sesiones experimentales. Todos los productos fueron disueltos en una mezcla de DMSO 5%, Tween 60 5 % / salina 90 % y administrados intraperitonealmente.

Experimento de ingesta

El efecto agudo sobre la ingesta de todos los productos fue probado en animales en ayuno de 24 horas. La amida de 2-feniletilamina con ácido oleico (OLFEA) fue usada como teórico control negativo debido a la ausencia del grupo catecol.

Treinta minutos después de la inyección la comida previamente pesada fue repuesta en la jaula. La comida fue pesada a los 30, 60, 120 y 240 minutos después del inicio de la prueba. Todos los experimentos de ingesta fueron realizados con grupos de 8 animales (n=8) (Figuras 1 a 7).

Prueba de campo abierto

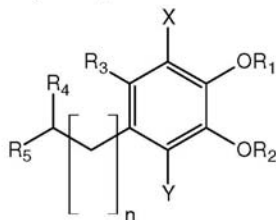
Para confirmar que la modulación negativa en el experimento de ingesta no era debido a un efecto anestésico de los productos se probó el compuesto OLHHA (unos de los compuestos más activos en el experimento de ingesta) en un experimento de campo abierto usando las mismas dosis.

La prueba de campo abierto mide el conflicto natural del animal entre la tendencia de explorar y la reacción de recelo de auto protección. Las ratas fueron aclimatadas a la habitación de la prueba durante 30 minutos antes de la prueba comportamental. El animal fue inyectado con el producto y puesto en el centro del tablero de dimensiones de 40 cm x 40 cm y paredes de 30 cm de altura. El desplazamiento total y el tiempo gasto por el animal en las esquinas o el centro del tablero fue registrado usando un sistema de seguimiento en video (Smart® Panlab, Barcelona, Spain).

El producto OLHHA no demostró modulación en el comportamiento del animal en la prueba de campo abierto.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I):



5

(I)

donde

X e Y pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H, halógeno y metilo;

n es un número entero desde 1 a 4;

10

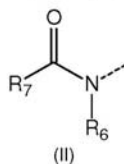
R₁ y R₂ pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H y alquilo C₁-C₆ o pueden estar unidos por un enlace simple entre los dos átomos de oxígeno, formando un nuevo ciclo;

R₃ se selecciona entre H, alquilo C₁-C₆ y alquenilo C₁-C₄;

R₄ se selecciona entre H, halógeno y alquilo C₁-C₄;

15

R₅ es un compuesto de fórmula general (II):



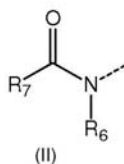
(II)

donde

R₆ se selecciona entre H y alquilo C₁-C₄;

R_7 se selecciona entre alquilo C_8-C_{30} y alqueno C_8-C_{30} ; y sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, solvatos y prodrogas del mismo.

- 5 2. Compuesto según la reivindicación 1, donde X e Y pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H y metilo.
3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde n es 1 ó 3.
- 10 4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R_1 y R_2 pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H y metilo o pueden estar unidos por un enlace simple entre los dos átomos de oxígeno, formando un nuevo ciclo.
- 15 5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde R_3 se selecciona entre H y alquilo C_1-C_3 .
- 20 6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde R_4 se selecciona entre H y CH_3 .
7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde R_5 es un compuesto de fórmula (II):

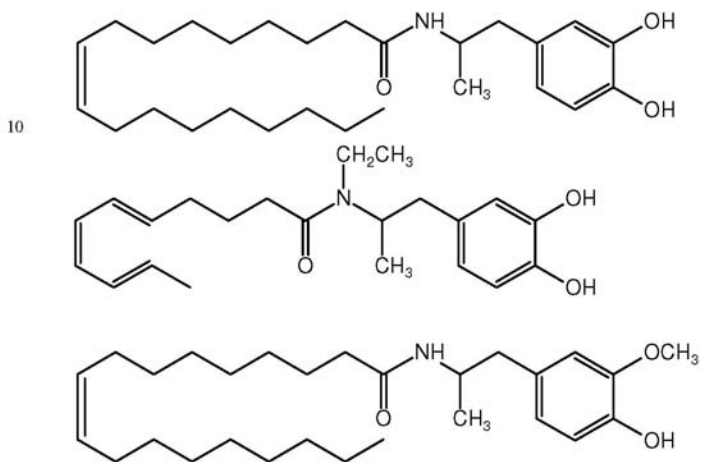


25

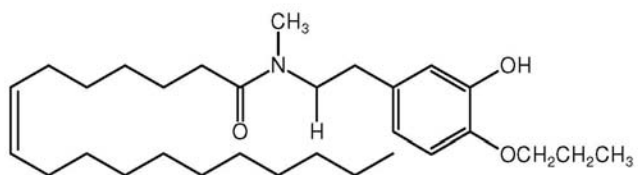
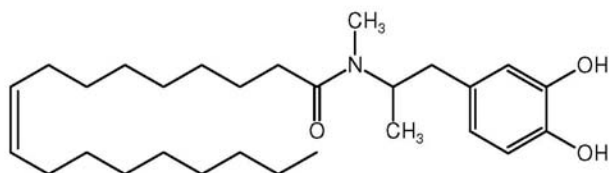
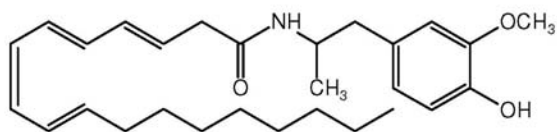
donde R_6 se selecciona entre H y CH_3 y R_7 es un grupo alquenoilo $C_{15}-C_{25}$.

5 8. Compuesto según la reivindicación 7, donde R_7 tiene un número de insaturaciones entre 1 y 6.

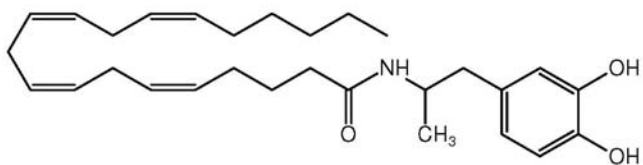
9. Compuesto según la reivindicación 1, seleccionado entre



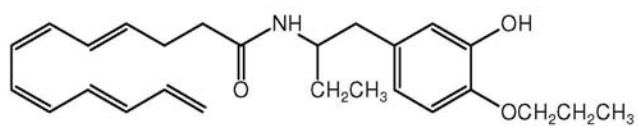
34



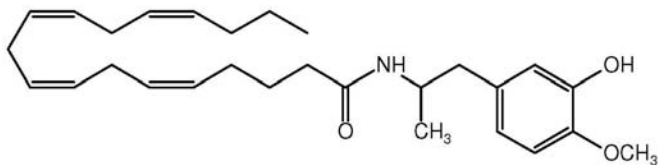
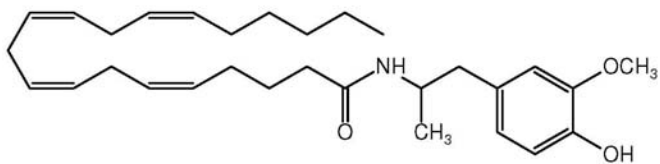
5



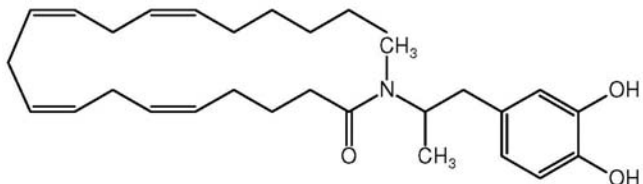
35

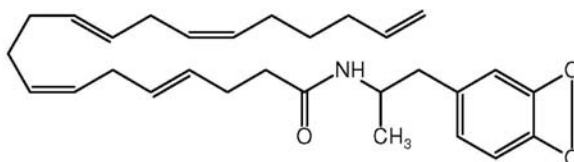
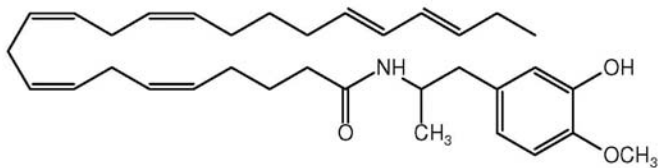


5



10

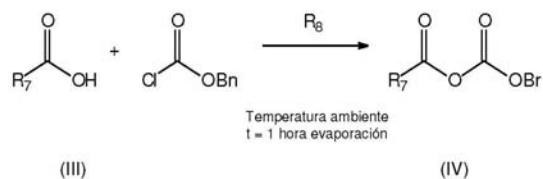




- 5 10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso como medicamento.
- 10 11. Composición farmacéutica que comprende al menos uno de los compuestos de fórmula (I) como se define en las reivindicaciones 1 a 10, o sus sales, solvatos o prodrogas del mismo, y al menos un transportador farmacéuticamente aceptable, adyuvante y/o vehículo.
- 15 12. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, que comprende además otro principio activo.
- 20 13. Uso del compuesto de fórmula (I) según reivindicación 1, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad o trastorno de la alimentación.
14. Uso del compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 13, para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad mediada por el receptor cannabinoide CB1

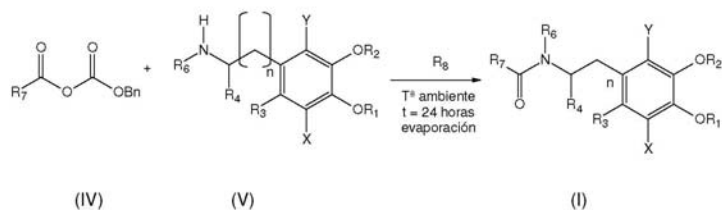
y/o mediada por los receptores PPAR-alfa y/o para la inhibición de la oxidación de LDL.

- 5 15. Uso del compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14 donde la enfermedad o trastorno de la alimentación se selecciona de la lista que comprende: obesidad, anorexia, disfunción lipídica, diabetes, enfermedades cardiovasculares y síndrome metabólico.
- 10 16. Uso del compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 13 para reducir la grasa subcutánea y/o para la inducción de saciedad y control de la ingesta.
- 15 17. Procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula general (I) según la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:
- a. conjugación entre un compuesto de fórmula general (III) y cloroformiato de bencilo para dar lugar a un nuevo compuesto de fórmula general (IV), que comprende la siguiente reacción:



- 20 donde R_7 se selecciona entre alquilo C_8-C_{30} y alqueniilo C_8-C_{30} y R_8 se selecciona entre NH_3 , NH_2-CH_3 , $NH_2-CH_2-CH_3$, $NH-(CH_3)_2$, $N-(CH_3)_3$, $NH-(CH_2-CH_3)_2$ y $N-(CH_2-CH_3)_3$;

- b. reacción del compuesto de fórmula general (IV) con un compuesto de fórmula general (V) para dar lugar al compuesto de fórmula general (I) usando como disolvente dimetilformamida:



- 5 donde
- X e Y pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H, halógeno y metilo;
- n es un numero entero desde 1 a 4;
- 10 R₁ y R₂ pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H y alquilo C₁-C₆ o pueden estar unidos por un enlace simple entre los dos átomos de oxígeno, formando un nuevo ciclo;
- R₃ se selecciona entre H, alquilo C₁-C₆ y alquenilo C₁-C₄;
- R₄ se selecciona entre H, halógeno y alquilo C₁-C₄;
- 15 R₆ se selecciona entre H y alquilo C₁-C₄;
- R₇ se selecciona entre alquilo C₈-C₃₀ y alquenilo C₈-C₃₀;
- R₈ se selecciona entre NH₃, NH₂-CH₃, NH₂-CH₂-CH₃, NH-(CH₃)₂, N-(CH₃)₃, NH-(CH₂-CH₃)₂ y N-(CH₂-CH₃)₃;
- 20 c. evaporación de la dimetilformamida y extracción con acetato de etilo y agua;
- d. tratamiento de la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro y evaporación del disolvente:
- 25 e. purificación del compuesto de fórmula (I) por cromatografía.

FIGURAS

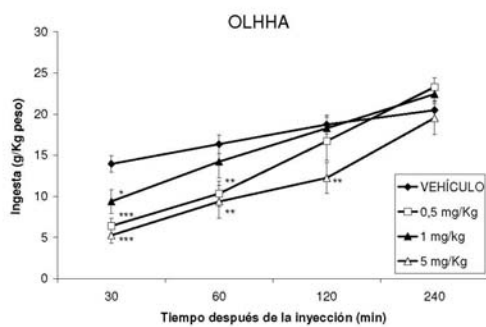


Figura 1

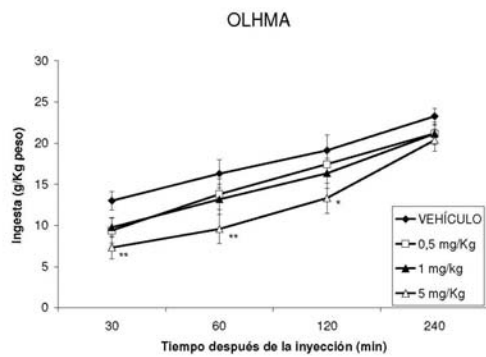


Figura 2

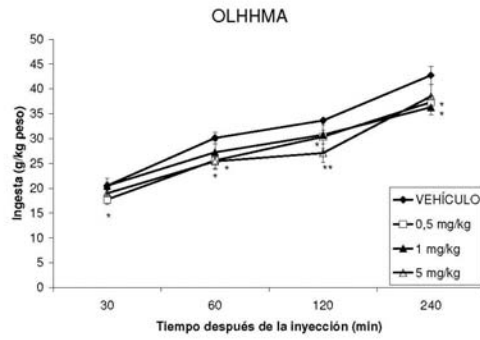


Figura 3

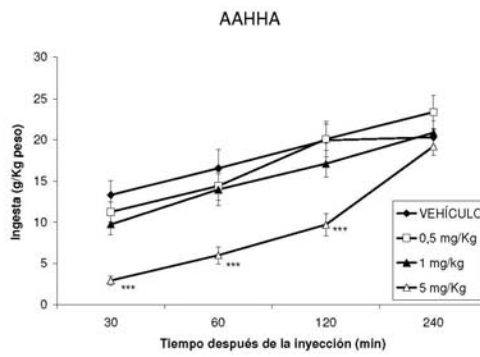


Figura 4

AAHMA

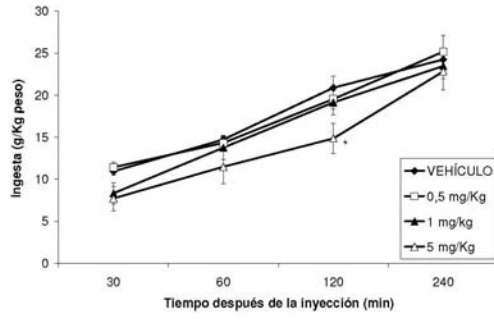


Figura 5

AAHHMA

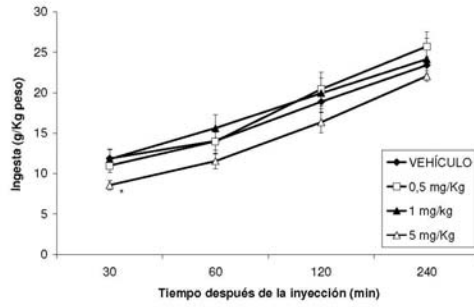


Figura 6

OLFEA

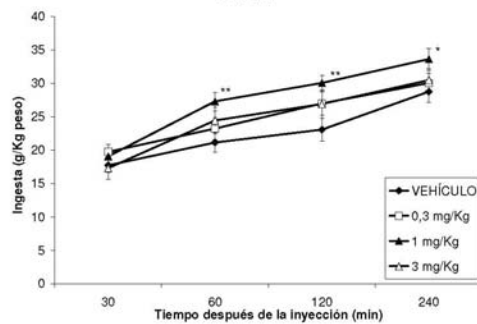


Figura 7

OLHHA

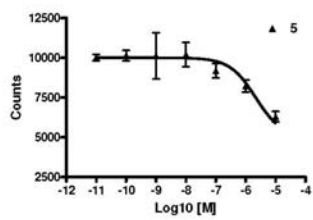


Figura 8

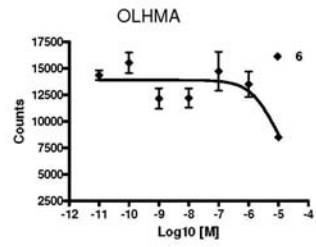


Figura 9

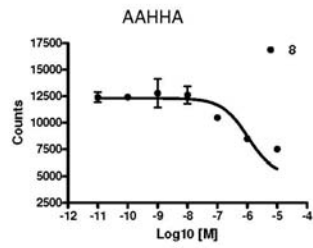


Figura 10

RESUMEN**DERIVADOS DE AMIDA DE ACIDOS GRASOS CON ANFETAMINAS PARA EL TRATAMIENTO DE DESORDENES ALIMENTICIOS**

5 La presente invención se refiere a nuevos derivados amidas de ácidos grasos
conjugados con anfetaminas, que se comportan como ligandos duales de los
receptores cannabionides tipo 1 (CB1) y del subtipo alfa de los receptores
activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR-alfa), y como potentes
10 agentes inhibidores de la oxidación de la Lipoproteína de Baja Densidad (LDL),
así como a su procedimiento de preparación, y su utilización como herramienta
farmacológica y como fármacos para modular las acciones reguladas por los
citados receptores, como la inducción de la saciedad y control de ingesta, la
15 disminución de la grasa corporal y la regulación del metabolismo lipídico.

5 – CHAPTER 2

5.1 – Article #2

Fatty Acid Hydroxytyrosyl, Tyrosyl and Homovanillyl Esters with LDL Antioxidant Activity

Fatty Acid Hydroxytyrosyl, Tyrosyl and Homovanillyl Esters with LDL Antioxidant Activity

Almeida B^[a,b,d], Joglar J^[c], Castañer O^e, Muñoz D^[e], Farré M^[a,f], Covas M^[d,e],
Fitó M^[d,e], de la Torre R^[a,b,d].

[a] Almeida B, Farré M, de la Torre R
Human Pharmacology and Clinical Neurosciences Research Group
Neuropsychopharmacology Research Program
IMIM-Hospital del Mar Research Institute
Dr. Aiguader 88, Barcelona 08003 (Spain)
Fax: (+34) 933160467
E-mail: rtorre@imim.es

[b] Almeida B, de la Torre R
Universitat Pompeu Fabra, CEXS-UPF
Dr. Aiguader 88, Barcelona 08003 (Spain)

[c] Joglar J
Departamento de Química Biológica y Modelización Molecular
Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC-CSIC)
Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona (Spain)
E-mail: joglar@iqac.csic.es

[d] Almeida B, Fitó, M Covas MI, de la Torre R
CIBEROBN, Instituto de Salud Carlos III, Madrid (Spain)

[e] Castañer O, Fito M, Covas MI, Muñoz D
Oxidative Stress and Nutrition Research Group
Inflammation and Cardiovascular Research Program
IMIM-Hospital del Mar, Dr. Aiguader 88, Barcelona 08003 (Spain)

[f] Farré M
Universitat Autònoma de Barcelona, UDIMAS-UAB
Dr. Aiguader 80, Barcelona 08003 (Spain)

Abstract

The Mediterranean Diet, in which olive oil is the main source of fat, has been associated with a reduced incidence of coronary heart disease (CHD). The main phenolic compounds present in olive oil are oleuperin and ligstroside aglycones which by hydrolysis give rise to hydroxytyrosol and tyrosol respectively. A series of hydroxytyrosol and related compounds fatty acid esters were synthesized and its LDL antioxidant activity was evaluated. The majority of the compounds had an activity equivalent or even higher if compared with free hydroxytyrosol. It was also proved that the LDL antioxidant activity of one of the most active compounds is dose dependent.

Introduction

Coronary heart disease is the main individual cause of mortality in industrialized countries. The Mediterranean Diet, in which olive oil is the main source of fat, has been associated with a reduced incidence of coronary heart disease (CHD).^{1,2} Oxidation of lipids present in low density lipoproteins (LDL) is a hallmark for atherosclerosis and CHD development.³

Excessive reactive oxygen species (ROS) production has been implicated in the pathogenesis of atherosclerosis and hypertension⁴ and the oxidation of LDL by ROS is one of the earliest events in the development of the disease.⁵ Atherosclerosis can be considered to be a chronic inflammation of the

arterial wall resulting from complex interactions between cholesterol homeostasis, oxidative stress injury, immunity system cells, and blood flow.

This inflammatory process can lead to the development of complex lesions or plaques. Plaque rupture and thrombosis result in myocardial infarction and stroke.³

Olive oil is the main source of fat in the Mediterranean diet. The beneficial effects of olive oil on cardiovascular risk factors are now recognized, but often only attributed to the high levels of MUFA present in olive oil.⁶ Olive oil, however, besides a high content of MUFA, contains other minor biologically active components.⁷ In human studies olive oil polyphenols have been shown to improve the lipid oxidative damage *in vivo*⁸ and the inflammatory status⁹⁻¹¹ among others processes.

The main PCs present in olive oil are oleuperin and ligstroside aglycones which by hydrolysis give rise to hydroxytyrosol and tyrosol respectively.¹²

Bioavailability studies in humans have investigated the fate of hydroxytyrosol after the oral consumption of olive oil and it was shown that its concentration in the plasma could reach values of 0.15 μM concentrations.¹³ The antioxidant activity of hydroxytyrosol and some of its metabolites have already been proved.^{14,15} Hydroxytyrosol is also potent *in vitro* inhibitor of low density lipoproteins (LDL) oxidation being capable of breaking peroxidative chain reactions.¹⁶

Some esters of hydroxytyrosol, tyrosol and homovanillic alcohol with fatty acids like oleic, linoleic and stearic acid have already been synthesised¹⁷⁻²⁰ and those compounds showed in lipid matrices similar antioxidant activity, at 1 and 5 μM concentrations, as hydroxytyrosol. The LDL antioxidant activity of these compounds was not yet tested.

We hypothesise that, due to their higher lipophilicity, the esters of hydroxytyrosol (HT), tyrosol (TYR) and homovanillic alcohol (HVAL) could interact better with LDL and display a superior antioxidant activity than hydroxytyrosol and homovanillic alcohol at the same physiologic concentration after olive oil ingestion (0.15 μM).¹³

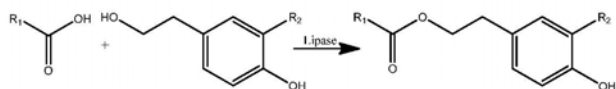
Objectives

The objective of the present work is to synthesise and evaluate the *in vitro* LDL antioxidant activity of hydroxytyrosol, tyrosol and homovanillic alcohol fatty acid ester derivatives tested at concentrations similar to those reached by hydroxytyrosol after the oral ingestion of dietary doses of virgin olive (0.15 μM).¹³

Discussion

The products were synthesised as described by Medina et al.²¹ using the lipase Cal B (Novozyme 435).(Table1)

Table 1 – Synthesized hydroxytyrosol, tyrosol and homovanillic alcohol fatty acid esters.



Compound	R ₁	R ₂	Yield
1	(Z)-(CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃	H	58.9 %
2	(Z)-(CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃	OH	78.3 %
3	(Z)-(CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃	OMe	63.1 %
4	(Z),(Z),(Z),(Z)-(CH ₂) ₂ (CH ₂ CH=CH) ₄ (CH ₂) ₃ CH ₃	H	52.8 %
5	(Z),(Z),(Z),(Z)-(CH ₂) ₂ (CH ₂ CH=CH) ₄ (CH ₂) ₃ CH ₃	OH	70.1 %
6	(Z),(Z),(Z),(Z)-(CH ₂) ₂ (CH ₂ CH=CH) ₄ (CH ₂) ₃ CH ₃	OMe	72.4 %

The hydroxytyrosol and tyrosol derivatives **1** and **2** have already been described by Trujillo et al.¹⁷ and Mateos et al.¹⁸ respectively compound **3** was synthesised by Weitkamp et al.¹⁹ Compounds **4**, **5** and **6** are original.

LDL oxidation experiments

In this experiment the oxidation kinetics of LDL induced by CuSO₄ was followed using a spectrophotometer. As the lipidic fractions of the LDL are being oxidized there is an increase of the formation of the conjugated double bonds and consequently an increase of the absorbance in the 234 nm wavelength. In the experiment we compared the time in which LDL native takes to be oxidized in the presence and absence of the synthesized compounds, hydroxytyrosol and

homovanillic alcohol. For each compound we calculated the maximum rate, maximum amount and lag time, all variables were calculated as ratios between values observed for each compounds versus those corresponding to the control LDL oxidation reaction (Table 2).

Table2 – Lag time ratio, maximum rate and max amount of synthesised compounds

Samples (0,15 μ M)	Lag Time Ratio	Max Rate μ mol/g LDL*min	Max Amount μ mol/g LDL
HT	1.30	6.5	465
HVAL	1.10	5.9	412
1	1.24	7.2	491
2	1.40	7.9	437
3	1.42	4.1	477
4	0.93	7.4	458
5	1.45	6.9	510
6	1.35	6.1	468

Almost all tested compounds induced an increase in the lag time if compared with native LDL. Those inducing the largest rise in lag time were compounds 5, 3, 6 and 2. They showed a greater lag time ratio than hydroxytyrosol at the same molar concentration (0.15 μ M). The fact that these compounds presented higher LDL antioxidant activity than hydroxytyrosol could be due the fact that having a lipidic chain and consequently being more lipophilic those compounds could interact better with the lipoprotein than hydroxytyrosol.

The activity of hydroxytyrosol fatty acids esters was expected because those compounds have a catechol group that, in general, is the chemical group considered responsible for the antioxidant activity. The catechol could receive electrons of free radicals and can be converted to a quinone.

Homovanillic derivatives **6** and **3** showed similar results as compound **2** and have one hydroxyl of the catechol group protected with a methyl and therefore can not be converted to the quinone. It is hypothesised that the LDL antioxidant activity of homovanillyl derivatives may happen through other mechanisms.

Tyrosol ester **4** showed no activity but **1** (having the same structure of **4** besides the fact of having oleic acid group in place of arachidonic acid one) showed similar activity as hydroxytyrosol. This result might show that the nature of the fatty acid group could be important for the antioxidant activity.

When the maximum rate was evaluated it was seen that in general all the compounds showed a decrease if compared with the native LDL. The greatest decrease of maximum rates was seen in the samples with HVAL and **6**. No changes are observed in the maximum amount results.

Compound **2** (one of the most LDL antioxidant active synthesised compounds) was selected to perform a dose dependent activity curve (Table3).

Table 3- Dose activity curve of compound 2

Concentrations (μM)	Lag Time ratio
0.15	1.163
0.3	1.32
0.5	1.47
1	1.33
5	9.01
10	-*

* Not measured. The LDL did not get oxidised during the experimental time interval.

We can observe that for compound 2 the LDL antioxidant activity is dose dependent but it is not directly proportional with the enhancement of the compound concentration. In other words, the increase of the activity for the 0.15, 0.30, 0.5 and 1 μM concentrations is proportionally smaller if we compare enhancement of the activity between the 1 and 5 μM activity. The 10 μM dose was sufficient to protect the LDL oxidation through the 27.7 hours that last the experiment for this reason it was not possible calculate the lag time for this dose.

Conclusions

We have data showing that fatty acid esters of hydroxytyrosol, tyrosol and homovanillic alcohol have LDL antioxidant activity *in vitro* at concentrations of 0.15 μM . The antioxidant activity over LDL oxidation of one of the most active

compounds (compound **2**) is dose dependent and it was observed that between the 1 and 5 μM doses there is an enhancement in the lag time ratio larger than the proportional increase of the compound concentration.

Methodology

Chemistry

All reagents and solvents used were commercially available and were employed without further purification unless specifically indicated. All ^1H and ^{13}C NMR analysis were carried out with Anova 500 and Varian Mercury 400 spectrometers. The ultracentrifuge used was a Sigma 3K30. The progress of all reactions was monitored by TLC on aluminum sheets pre-coated with silica gel 60 (HF-254, Merck), film thickness of 0.25 mm.

General Procedure for Acyl Esters Preparation

The products were synthesized as described by Medina et al.¹³ Briefly, a mixture of the alcohol (0.25 mmol), Novozyme 435 lipase (40 mg), fatty acid (0.30 mmol), toluene (1.5 mL) and molecular sieves (100 mg) was stirred at 25°C for 24 hours.

The mixture was filtered and afterwards purified with a silica-gel chromatography column using a mixture of hexane / ethyl acetate 4:1 as eluent.

Tyrosyl Oleate (1)

The product was obtained as an oil in 58.9 % yield. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.88 (t, $J = 6.99\text{ Hz}$, 3H), 1.16-1.41 (m, 20H), 1.55-1.65 (m, 2H), 1.97-2.04 (m, 4H), 2.28 (t, $J = 7.47\text{ Hz}$, 2H), 2.86 (t, $J = 7.11\text{ Hz}$, 2H), 4.24 (t, $J = 7.13\text{ Hz}$, 2H), 5.31-5.38 (m, 2H), 6.76 (d, $J = 8.16\text{ Hz}$, 2H), 7.07 (d, $J = 8.11\text{ Hz}$, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 14.37, 22.93, 25.16, 27.41, 27.45, 29.33, 29.41, 29.56, 29.76, 29.93, 30.00, 32.14, 34.48, 34.59, 65.27, 115.54, 130.00, 130.25, 154.53, 174.31.

Hydroxytyrosyl Oleate (2)

The product was obtained as an oil in 78.3 % yield. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.88 (t, $J = 7.00\text{ Hz}$, 3H), 1.20-1.38 (m, 20H), 1.54-1.63 (m, 2H), 1.98-2.03 (m, 4H), 2.29 (t, $J = 7.49\text{ Hz}$, 2H), 2.81 (t, $J = 7.16\text{ Hz}$, 2H), 4.24 (t, $J = 7.18\text{ Hz}$, 2H), 5.30-5.39 (m, 2H), 6.62 (dd, $J = 8.04, 1.71\text{ Hz}$, 1H), 6.73 (d, $J = 1.37\text{ Hz}$, 1H), 6.78 (d, $J = 8.04\text{ Hz}$, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 14.09, 22.66, 24.90, 27.14, 27.19, 29.06, 29.07, 29.14, 29.30, 29.50, 29.67, 29.74, 31.88, 34.39, 65.16, 115.24, 115.75, 121.16, 129.72, 129.99, 130.31, 142.36, 143.66, 174.70.

Homovanillyl Oleate (3)

The product was obtained as an oil in 63.1 % yield. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.88 (t, $J = 6.36\text{ Hz}$, 3H), 1.20-1.38 (m, 20H), 1.53-1.66 (m, 2H), 1.95-2.06 (m, 4H), 2.28 (t, $J = 7.51\text{ Hz}$, 2H), 2.86 (t, $J = 6.73\text{ Hz}$, 2H), 3.87 (s, 3H), 4.25 (t, $J = 7.00\text{ Hz}$, 2H), 5.29-5.39 (m, 2H), 6.68-6.73 (m, 2H), 6.84 (d, $J =$

8.55 Hz, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 14.34, 22.93, 25.19, 27.40, 27.45, 29.33, 29.42, 29.56, 29.76, 29.93, 30.00, 32.14, 34.58, 35.06, 56.07, 65.20, 111.55, 114.55, 121.83, 129.97, 130.23, 144.47, 146.64, 174.07.

Tyrosyl Arachidonate (4)

The product was obtained as an oil in 52.8 % yield. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.91 (t, $J = 6.94$ Hz, 3H), 1.26-1.42 (m, 6H), 1.65-1.75 (m, 2H), 2.04-2.14 (m, 4H), 2.33 (t, $J = 7.55$ Hz, 2H), 2.80-2.90 (m, 8H), 4.26 (t, $J = 7.13$ Hz, 2H), 5.32-5.46 (m, 8H), 6.79 (d, $J = 8.50$ Hz, 2H), 7.10 (d, $J = 8.55$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 14.40, 23.89, 26.06, 26.94, 27.84, 28.53, 30.64, 32.83, 35.03, 35.54, 66.45, 116.64, 128.83, 129.17, 129.47, 129.51, 129.89, 130.15, 130.22, 131.05, 131.32, 131.81, 155.64, 175.17.

Hydroxytyrosyl Arachidonate (5)

The product was obtained as an oil in 70.1 % yield. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.89 (t, $J = 7.11$ Hz, 3H), 1.20-1.44 (m, 6H), 1.61-1.76 (m, 2H), 1.99-2.14 (m, 4H), 2.31 (t, $J = 7.54$ Hz, 2H), 2.75-2.87 (m, 8H), 4.26 (t, $J = 7.14$ Hz, 2H), 5.27-5.46 (m, 8H), 6.65 (dd, $J = 2.00, 8.11$ Hz, 2H), 6.76 (d, $J = 1.91$ Hz, 2H), 6.81 (d, $J = 8.05$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 14.03, 22.52, 24.69, 25.57, 26.46, 27.16, 29.26, 31.46, 33.72, 34.36, 65.20, 115.29, 115.79, 121.06, 127.47, 127.80, 128.08, 128.19, 128.55, 128.81, 128.85, 130.15, 130.46, 142.46, 143.78, 174.31.

Homovanillyl Arachidonate (6)

The product was obtained as an oil in 72.4 % yield. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.91 (t, $J = 6.92$ Hz, 3H), 1.26-1.42 (m, 6H), 1.67-1.75 (m, 2H), 2.05-2.15 (m, 4H), 2.33 (t, $J = 7.56$ Hz, 2H), 2.80-2.90 (m, 8H), 3.89 (s, 3H), 4.27 (t, $J = 7.19$ Hz, 2H), 5.32-5.46 (m, 8H), 6.71-6.75 (m, 2H), 6.86 (d, $J = 8.58$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 14.31, 22.81, 25.01, 25.83, 25.85, 25.86, 26.77, 27.45, 29.55, 31.75, 33.93, 35.06, 56.09, 65.27, 111.54, 114.55, 121.82, 127.74, 128.07, 128.37, 128.43, 128.81, 129.07, 129.14, 129.80, 130.72, 144.48, 146.64, 173.78.

Dienes Conjugation Experiment

LDL Isolation

Blood from healthy volunteers was collected after an overnight fast in tubes containing 1g/L EDTA. Plasma was separated by centrifugation at 1000 x g at 4 °C for 15 minutes. LDL isolation was performed by sequential flotation ultracentrifugation. Native LDL was dialyzed by molecular size exclusion chromatography in a G25 Sephadex column (Pharmacia, Uppsala, Sweden), with 2.7 mL phosphate buffered saline (PBS) 0,01 M pH 7.4, under gravity feed at 4 °C. Apolipoprotein B100 content was determined by immunoturbidimetry method (ABX Diagnostics – Montpellier, France).

Dienes Conjugation Monitoring

LDL isolation was performed by sequential flotation ultracentrifugation. Native LDL was dialyzed by molecular size exclusion chromatography in a G25 Sephadex column (Pharmacia, Uppsala, Sweden), with 2.7 mL phosphate buffered saline (PBS) 0.01 M pH 7.4, under gravity feed at 4° C. Apolipoprotein-B was determined by immunoturbidimetry (ABX Diagnostics, Montpellier, France). In each cuvette we put 0.5 mL of isolated LDL (0.10 g/L), 0.485 mL of PBS 0.01 M (pH 7.4) and 15 μ L of the product solution in methanol in order to obtain a final concentration of 0.15, 0.3, 0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 μ M solution. The mixture in the cuvette is shaken with a vortex and afterwards 50 μ L of a 100 μ M CuSO_4 solution was added. The cuvette was shaken again and placed in the spectrophotometer. Absorbance at 234 nm was continuously monitored at 2 min intervals at 36.5°C by using a spectrophotometer (Hewlett Packard, Palo Alto, USA). Three variables were used to study the resistance to oxidation of LDL: lag time (minutes), maximum amount of dienes (μ mol dienes \cdot g⁻¹ of LDL protein) and maximal rate (μ mol dienes \cdot min⁻¹ \cdot g⁻¹ of LDL protein). The diene versus time profile can be divided into three consecutive phases: slow phase, propagation phase and decomposition phase. The length of the lag phase was determined as the intercept of the propagation phase tangent with the extrapolated line for the slow reaction. Maximum amount of dienes was calculated by the maximum increase of the absorbance. Maximal rate of oxidation was derived from the slope of the propagation phase tangent Lag time, maximum amount of dienes

and maximal rate were calculated using the molar absorbance ϵ_{234nm} for conjugated dienes ($29.500.L.mol^{-1}.cm^{-1}$).

We tested all the synthesized products. For each experiment we used one cuvette with a negative control without any product and a positive control with hydroxytyrosol. We also tested the hydroxytyrosol metabolite homovanillic alcohol.

Acknowledgements

This work was supported by Red de Trastornos Adictivos (FIS-TARD06/001/0026 and RD06/001/0000), Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBN, which is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain), Generalitat de Catalunya (AGAUR 2009 SGR 718), Alban Program, the European Union Program of High Level Scholarships for Latin America, scholarship number E06D101051BR (B.A.).

Bibliography

1 - F. Sofi, F. Cesari, R Abbate, G. F. Gensini, A Casini; Adherence to mediterranean diet and health status: Metaanalysis; *Brit. Med. J.* (2008) 337:a1344 (7 pages).

2 - A. Mente, L. de Koning; H. S. Shannon, S. S. Anand; A systematic review of the evidence supporting a causal link between dietary factors and coronary heart disease; *Arch. Intern. Med.* (2009) 169:659-69.

3 - C. K. Glass, J. L. Witztum; Atherosclerosis: The road ahead; Cell (2001) 104:503-16.

4 - W. Dröge; Free radicals in the physiological control of cell function; Physiol. Rev.(2002) 82:47-95.

5 - J. L. Witztum; The oxidation hypothesis of atherosclerosis; Lancet (1994) 344:793-5.

6 - US. Food and Drug Administration.; Press Release P04-100; November 1, (2004);
<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2004/ucm108368.htm>. Accessed on March 30, (2009))

7 - M. I. Covas, V. Ruiz-Gutierrez, R. De la Torre, A. Kafatos, R. M. Lamuela-Raventos, R. W. Osada, F. Visioli F; Minor components of olive oil: evidence to date of health benefits in humans; (2006) Nutrition Reviews 64, 20-30.

8 - M. I. Covas, K. Nyyssonen, H. E. Poulsen, J. Kaikkonen, H. J. Zunft, H. Kiesewetter, A. Gaddi, R. de la Torre, J. Mursu, H. Baumler, S. Nascetti, J. T. Salonen, M. Fito, J. Virtanen, J. Marrugat, EUROLIVE Study Group; The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial; (2006) Ann. Intern. Med. 145:333-41.

9 - P. Bogani, C. Galli, M. Villa, F. Visioli; Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil; *Atherosclerosis* (2007) 190:181-6.

10 - M. Fitó, M. Cladellas, R. de la Torre, J. Martí, D. Muñoz, H. Schröder, M. Alcántara, M. Pujadas-Bastardes, J. Marrugat, M. C. López-Sabater, J. Bruguera, M. I. Covas, SOLOS Investigators; Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: A randomized, crossover, controlled trial; *Eur. J. Clin. Nutr.* (2008) 62:570-4.

11 - Y. M. Pacheco, B. Bermudez, S. Lopez, R. Abia, J. Villar, F. J. Muriana, Minor compounds of olive oil have postprandial anti-inflammatory effects. *Brit. J. Nutr.* (2007) 98:260-3.

12 - M. N. Vissers, P. L. Zock; M. B. Katan; Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review; *Eur. J. Clin. Nutr.* (2004) 58:955-65.

13 - E. M. Casas, M. I. Covas, M. Farre, M Fito, J. Ortuño, T. Weinbrenner, P. Roset, R. de la Torre; Hydroxytyrosol disposition in humans; *Clin. Chem.* (2003) 49:945-52.

14 - M. H. Gordon, F. P. Martins, M. Almeida; Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols; *J. of Agr. Food Chem.* (2001) 49:2480-5.

- 15 - R. Mateos, M. M. Domínguez, J. L. Espartero, A. Cert; Antioxidant effect of phenolic compounds, α -tocopherol, and other minor components in virgin olive oil; *J. of Agr. Food Chem.* (2003) 51:7170-5.
- 16 - F. Visioli, G. Bellomo, G. Montedoro, C. Galli, Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents; *Atherosclerosis* (1995) 117 25-32.
- 17 - M. Trujillo, R. Mateos, L. C. de Teran, J. L. Espartero, R. Cert, M. Jover, F. Alcudia, J. Bautista, A. Cert, J. Parrado; Lipophilic hydroxytyrosol esters. Antioxidant activity in lipid matrices and biological systems; *J. Agr. Food Chem.* (2006) 54:3779-85.
- 18 - R. Mateos, M Trujillo, G Pereira-Caro, A. Madrona, A. Cert, J. L. Espartero; New lipophilic tyrosyl esters. Comparative antioxidant evaluation with hydroxytyrosyl esters; *J. Agr. Food Chem.* (2008) 56:10960-6.
- 19 - P. Weitkamp, N. Weber, K. Vosmann; Lipophilic (hydroxy)phenylacetates by solvent-free lipase-catalyzed esterification and transesterification in vacuo; *J. Agr. Food Chem.* (2008) 56:5083–5090.
- 20 - R. Bernini, E. Mincione, M. Barontini, F. Crisante; Convenient synthesis of hydroxytyrosol and its lipophilic derivatives from tyrosol or homovanillyl alcohol; *J. Agr. Food Chem.* (2008) 56:8897–904.

21 - I. Medina, S. Lois, D. Alacántara, R. Lucas, J. C. Morales; Effect of lipophilization of hydroxytyrosol on its antioxidant activity in fish oils and fish oil-in-water emulsions; *J. Agr. Food Chem.* (2009) 57:9773–9.

6 – CHAPTER 3

6.1 – Article #3

Unsaturated Fatty Alcohol Derivatives of Olive Oil Phenolic Compounds with Potential Antiobesity Properties

Unsaturated Fatty Alcohol Derivatives of Olive Oil Phenolic Compounds with Potential Antiobesity Properties.

Almeida B,^[a,b,e] Joglar J,^[c] Luque Rojas MJ,^[d] Decara JM,^[d] Romero-Cuevas M,^[d] Covas MI,^[f] Farré M,^[a,g] Rodríguez de Fonseca F,^[d,e] de la Torre R,^[a,b,e]

[a] Almeida B, Farré M, de la Torre R
Human Pharmacology and Clinical Neurosciences Research Group
Neuropsychopharmacology Research Program
IMIM-Hospital del Mar Research Institute
Dr. Aiguader 88, Barcelona 08003 (Spain)
Fax: (+34) 933160467
E-mail: rtorre@imim.es

[b] Almeida B, de la Torre R
Universitat Pompeu Fabra, CEXS-UPF
Dr. Aiguader 88, Barcelona 08003 (Spain)

[c] Joglar J
Departamento de Química Biológica y Modelización Molecular
Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC-CSIC)
Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona (Spain)
E-mail: joglar@iqac.csic.es

[d] Luque Rojas MJ, Decara JM, Romero-Cuevas M, Rodríguez de Fonseca F
Fundación IMABIS, Hospital Carlos Haya de Málaga
Avda. Carlos Haya 82. Pabellón de Gobierno.
29010 Málaga, Spain

[e] Almeida B, Covas MI, Rodríguez de Fonseca F, de la Torre R
CIBEROBN, Instituto de Salud Carlos III, Madrid (Spain)

[f] Covas Ml

Oxidative Stress and Nutrition Research Group

Inflammation and Cardiovascular Research Program

IMIM-Hospital del Mar, Dr. Aiguader 88, Barcelona 08003 (Spain)

[g] Farré M

Universitat Autònoma de Barcelona, UDIMAS-UAB Dr. Aiguader 80, Barcelona

08003 (Spain)

Summary

A new route for the synthesis of fatty alcohols derivatives of hydroxytyrosol and other olive oil phenolic compounds was developed that allows the preparation of unsaturated derivatives. The biological activity of synthesized compounds was evaluated and some of them presented modulation of food intake in rats. Because of the structure of the compounds we also tested whether they target the endocannabinoid system. The pharmacodynamics probably could not be explained by CB₁ receptor interaction as within the four compounds with biological activity only two had a CB₁ activity that possibly do not justify its whole *in vivo* activity.

Introduction

Obesity is a pandemic which incidence is growing at dramatic pace. It is estimated by the World Health Organization that there are currently 400 millions obese adults around the world.[1] Obese people have an increased risk to develop type-2 diabetes, stroke, coronary artery disease, gallbladder disease, hyperlipidaemia, hypertension, and several cancer types among other diseases.[2-4]

The endocannabinoid system was one of the most important discovered targets for pharmacological treatment of obesity. The first CB₁ antagonist for obesity treatment to reach the market was Rimonabant (Accompia; SR141716) that was approved for commercialization in 2006 but in 2008 it was withdrawn due to its side effects.[4]

All the endocannabinoids described up to date are fatty acid derivatives with polar head groups (Figure 1). Those polar heads could be linked to the fatty chain through an amide (anandamide, *N*-arachidonoyl dopamine, *N*-oleoyl dopamine), an ester (2-arachidonoylglycerol) or an ether (noladin ether) bond. It was also discovered that although oleyoethanolamide, an endogenous fatty

acid amide, inhibits food intake, it does not interact with CB₁ nor CB₂ receptors but through the PPAR- α nuclear receptor.[5]

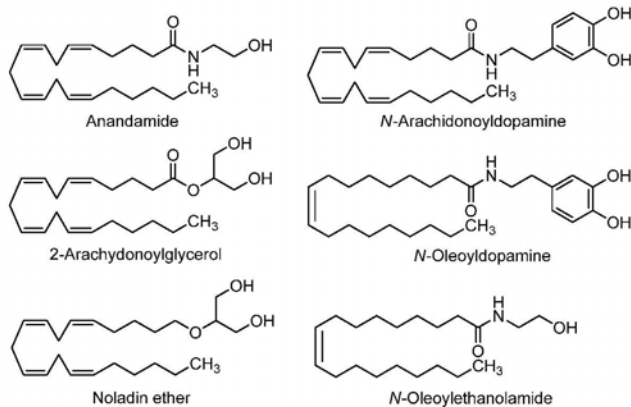


Figure 1 - Molecular structure of endocannabinoids

Hydroxytyrosol is a phenolic compound naturally found in virgin olive oil and is a potent *in vitro* inhibitor of low density lipoproteins (LDL) oxidation being capable of breaking peroxidative chain reactions.[6] Hydroxytyrosol is also a natural metabolite of dopamine (DOPET) and shares a structural similarity with it (Figure 2).[7, 8]

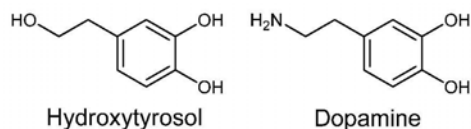


Figure 2 - Molecular structure of dopamine and hydroxytyrosol

Having in mind the structure of the endocannabinoids OLDA and NADA and the structural similarity of hydroxytyrosol with dopamine we hypothesise that ethers derivatives of fatty alcohols and hydroxytyrosol could have cannabinoid activity.

Lipidic ester and ether derivatives of hydroxytyrosol have already been synthesized in order to try to increase its bioavailability.[9,10] In the case of the ethers only some of their saturated derivatives were synthesised. The synthetic route described in the work of Madrona *et al.* does not allow the synthesis of unsaturated derivatives because a hydrogenation is needed in the last step for catechol deprotection.[10]

We proposed a new route for the synthesis of hydroxytyrosol ether derivatives (Figure 3) with natural unsaturated derived fatty alcohols as oleic and linoleic alcohol and hypothesise the activity of these compounds over food intake through interaction with CB₁ receptor.

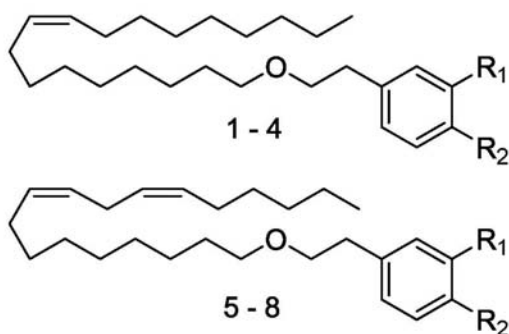
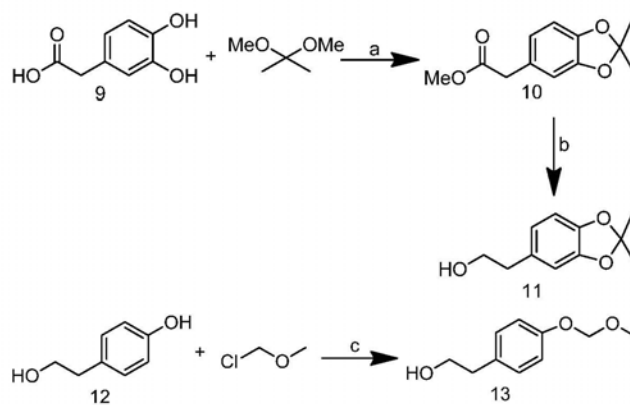


Figure 3. Proposed structures of fatty alcohol ethers. $R_1=R_2=H$, (Z)-1-(2-phenylethoxy)octadec-9-ene (1); (9Z,12Z)-1-(2-phenylethoxy)-octadeca-9,12-diene (5); $R_1=H$, $R_2=OH$, (Z)-1-(2-(4-hydroxyphenyl)ethoxy)octadec-9-ene (2); (9Z,12Z)-1-(2-(4-hydroxyphenyl)ethoxy)-octadeca-9,12-diene (6); $R_1=R_2=OH$, (Z)-1-(2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethoxy)octadec-9-ene (3); (9Z,12Z)-1-(2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethoxy)-octadeca-9,12-diene (7); $R_2,R_3= -OCH_2O-$, (Z)-1-(2-(3,4-methylenedioxyphenyl)ethoxy)octadec-9-ene (4); (9Z,12Z)-1-(2-(3,4-methylenedioxyphenyl)ethoxy)-octadeca-9,12-diene (8).

Results and Discussion

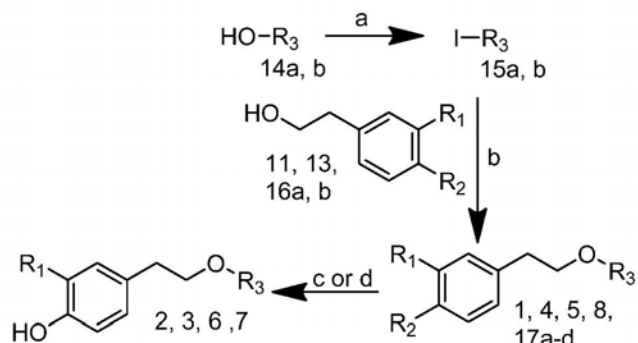
Chemistry

Phenyl alcohols with free phenolic hydroxyl groups were protected (Scheme 1). The protection of the catechol group of hydroxytyrosol was done similarly as described in the work of Gambacorta et al.[11]. The protected methyl ester intermediate **10** is synthesized through the reaction of **9** with 2,2-dimethoxypropane. Compound **10** is reduced with NaBH_4/I_2 to give compound **11**. Protection of phenol group of tyrosol (**12**) was done through the reaction with MOMCl in a biphasic system of $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{NaOH}$ 30% aq. using $(n\text{Bu})_4\text{NBr}$ as a phase transfer catalyst [12] yielding compound **13**.



Scheme 1 - Protection of phenolic hydroxyl groups of tyrosol and hydroxytyrosol. a) TsOH , Dean Stark, 100°C , toluene; b) NaBH_4 , I_2 , 66°C , THF; c) CH_2Cl_2 , H_2O , $(n\text{Bu})_4\text{NBr}$, 25°C .

The iodoalkenes **15a** and **15b** (Scheme 2) were obtained by reaction of oleic and linoleic alcohol (**14a,b**) with I_2/PPH_3 /imidazol at room temperature.[13] The synthesis of the fatty alcohol ethers (**17a-d**, **1,5,4** and **8**) was done through the conjugation of the iodine derivative of the fatty alcohol (**15a, b**) and the alcohols derivatives **16a-b**, **11** and **13**. [14, 15] In the case of compounds **17a-d** the phenolic hydroxyl was desprotected with HCl aq.



Scheme 2 - General synthesis of the fatty alcohol ethers. derivatives a) I_2 , PPH_3 , imidazole, $25^\circ C$, THF; b) Toluene, KOH 30% aq., $(nBu)_4NBr$, $100^\circ C$; c) HCl 6N aq, $100^\circ C$; d) HCl 6N aq., $iPrOH$, $80^\circ C$.

Biology

Feeding Experiments

The acute food intake effect of all products was tested in 24 hour food-deprived rats (Figure 4). Compounds **1**, **4**, **7** and **8** had significant activity in food intake modulation. Compounds **1** and **7** presented hypophagic effect, being compound **7** the most active one, presenting an acute food intake modulation profile and potency similar to that of oleoyl ethanolamide (OEA – a known anorectic endogenous compound that acts through PPAR- α selective activation) and to recently developed PPAR- α /CB1 amide ligands.[16] In contrast, the two compounds that carry a methylenedioxy group (**4** and **8**)

presented a hyperphagic effect at a 1 mg/kg dose. Compound **4** has a more long lasting activity than compound **8**, as the effect of compound **8** is only seen on the first 30 minutes.

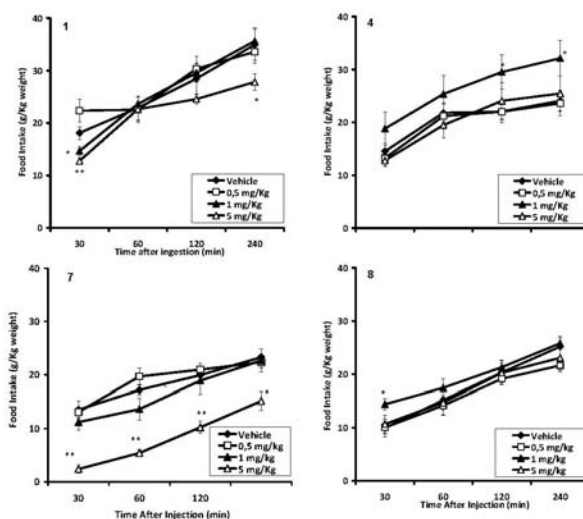


Figure 4. Relative food intake (g of food per kg of animal weight) of 24 hour food-deprived male Wistar rats. The food was weighed at 30, 60, 120 and 240 minutes after the injection. The results are shown as the mean \pm SEM of a group of eight animals. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$ (ANOVA analysis)

A study on the affinity of this series of compounds for the CB₁ receptor was performed to further evaluate the pharmacodynamics of synthesized compounds. The CB₁ receptor binding test evaluated the capacity of the synthesized compounds to displace [³H]-SR141716 in rat cerebellum homogenate. Compounds **1**, **4**, **7**, and **8**, the four active compounds in the food ingestion test, were evaluated. Compounds **7** and **8**, the linoleic alcohol

derivatives (Figure 5), had CB₁ receptor affinity although with a smaller pKi if compared with endogenous anandamide and synthetic CB₁ ligands as WIN55212-2 and SR141716 (Table 1).[17] Oleic alcohol derivatives compounds **1** and **4** had not activity at all.

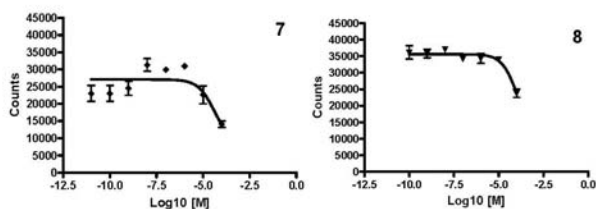


Figure 5 – CB₁ binding assay for compounds **7** and **8**.

We can say that both the alkenyl chain and the head group are important pharmacophores for the biological activity of the synthesized compounds. The change of the oleic to linoleic alcohol increased significantly the activity of the hydroxytyrosol derivatives if we compare derivatives **3** and **7**. Furthermore, comparing compounds **7** and **6**, the change of the group catechol to a phenol causes a total lack of biological activity.

Table 1. Pharmacological properties of fatty acid amides

Compound	CB ₁ Ki (M)	CB ₁ pKi
SR171716	1,15E-009	8,94
Anandamide	1,7E-07 ^a	6,55 ^a
WIN55212-2	1,11E-08 ^a	7,95 ^a
1	no activity	no activity
4	no activity	no activity
7	2,25E-05	4,65
8	7,49E-06	5,12

[a] values from the literature [17]

Conclusions

The synthesized class of compounds could be promising food intake inhibitors. The linoleic ether of hydroxytyrosol (**7**) was the most active *in vivo* compound with a hypophagic effect comparable to that of oleylethanolamide. Both the alkenyl chain and the "head" are important for the food intake activity and depending on modifications of the structure of the compound, the activity modulation could change in potency and also change from negative to positive and viceversa. Possibly the pharmacodynamic profile of the synthesized compounds operates through other mechanisms than CB₁ interaction as among the four compounds with modulated food activity, only two displayed CB₁ activity. This CB₁ activity does not justify its whole *in vivo* activity. Further studies should be performed to elucidate the synthesized compounds mechanism of action, as for example studying its PPAR- α affinity and/or TRPV₁ activity.

Experimental Section

Chemistry

All reagents and solvents used were commercially available and were employed without further purification unless specifically indicated. The infrared spectrophotometer was a Nicolet Avatar 360. ¹H and ¹³C NMR analysis were carried out with Varian Anova 500 and Varian Mercury 400 spectrometers. The ultracentrifuge used was a Sigma 3K30. The progress of all reactions was monitored by TLC on aluminium sheets pre-coated with silica gel 60 (HF-254, Merck), film thickness of 0.25 mm. Elemental analyses (C, H, N) were performed on a Thermo Finnigan Elemental Analyzer Flash 1112 Series and were within ± 0.3 % of theoretical values.

Oleyl iodide (**15a**)

In a round bottom flask equipped with magnetic stirrer, iodine (11.8 mmol), PPh₃ (12.6 mmol), imidazole (26.5 mmol), and THF (20 mL) were added at 4 °C. Oleyl alcohol (**14a**) (11.2 mmol) in THF (5 mL) was slowly added and the reaction was maintained at room temperature for 48 hours. The THF was removed under reduced pressure and the product was purified by flash chromatography using hexane. The product was obtained as colorless oil in 83% yield. IR (KBr): $\nu = 3003, 2924, 2853, 1464, 722 \text{ cm}^{-1}$. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.88 (t, $J = 6.84 \text{ Hz}$, 3H), 1.19-1.46 (m, 22H), 1.76-1.88 (m, 2H), 1.97-2.05 (m, 4H), 3.19 (t, $J = 7.05 \text{ Hz}$, 2H), 5.29-5.41 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.35, 14.13, 22.69, 27.15, 27.21, 28.51, 29.17, 29.31, 29.32, 29.52, 29.69, 29.76, 30.49, 31.90, 33.54, 129.74, 129.99. Anal. Calcd. for C₁₈H₃₅I: C 57.14, H 9.32. Found: C 57.01, H 9.30.

Linoleyl iodide (**15b**)

This compound was synthesized as described above for oleyl iodide but starting with linoleyl alcohol (**14b**). The product was obtained as colorless oil in 71% yield. IR (KBr): $\nu = 3008, 2926, 2854, 1464, 1179, 730, 631 \text{ cm}^{-1}$. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.88 (t, $J = 6.53 \text{ Hz}$, 3H), 1.20-1.47 (m, 16H), 1.74-1.88 (m, 2H), 1.98-2.12 (m, 4H), 2.77 (t, $J = 6.36 \text{ Hz}$, 2H), 3.19 (t, $J = 7.05 \text{ Hz}$, 2H), 5.27-5.44 (m, 4H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.36, 14.09, 22.58, 25.62, 27.18, 28.50, 29.17, 29.30, 29.34, 29.59, 30.48, 31.53, 33.53, 127.88, 128.02, 130.05, 130.21. Anal. Calcd. for C₁₈H₃₃I: C 57.44, H 8.84. Found: C 57.56, H 8.86.

3,4-(dimethylmethylenedioxy)phenylacetate methyl ester (**10**)

In a round bottom flask equipped with a Dean Stark apparatus and a magnetic stirrer, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (**9**) (11.9 mmol), *p*-toluenesulfonic acid (1.2 mmol), 2,2-dimethoxypropane (69.2 mmol) and toluene (30 mL) were

added. The reaction was heated under reflux for 24 hours. The organic phase was washed with distilled water (x2) and brine and then evaporated until dryness. The product was purified by flash chromatography using ethyl acetate/hexane as eluent. The product was obtained as colorless oil in 94% yield. IR (KBr): $\nu = 2990, 2952, 1740, 1498, 1255, 981, 838 \text{ cm}^{-1}$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.66 (s, 6H), 3.52 (s, 2H), 3.69 (s, 3H), 6.64-6.71 (m, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 25.85, 40.80, 52.01, 108.04, 109.44, 117.94, 121.70, 146.51, 147.55, 172.25. Anal. Calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$: C 63.45, H 5.81. Found: C 63.56, H 5.80.

2-(3,4-(dimethylmethylenedioxy)phenyl)-ethanol (**11**)

In a round bottom flask equipped with a magnetic stirrer, compound **10** (5.7 mmol), NaBH_4 (13.22 mmol) and THF (100 mL) were added at 4°C . Iodine (5.6 mmol) in THF was slowly added and the reaction was heated to reflux for 24 hours. The THF was removed under reduced pressure and the residue dissolved in ethyl acetate. The organic phase was washed with distilled water (x2) and brine and then evaporated until dryness. The product was purified by flash chromatography using ethyl acetate/hexane as eluent. The product was obtained as yellow oil in 72% yield. IR (KBr): $\nu = 3370, 2989, 2937, 2872, 1739, 1498, 1445, 1255, 1046, 981, 839, 807 \text{ cm}^{-1}$. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.66 (s, 6H), 2.77 (t, $J = 6.47 \text{ Hz}$, 2H), 3.81 (t, $J = 6.07 \text{ Hz}$, 2H), 6.62-6.74 (m, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 25.83, 38.85, 63.75, 108.08, 109.06, 117.71, 121.23, 131.36, 145.99, 147.57. Anal. Calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$: C 68.02, H 7.27. Found: C 67.85, H 7.29.

2-(4-(methoxymethylenoxy)phenyl)ethanol (**13**)

In a round bottom flask equipped with a magnetic stirrer, tyrosol (**12**) (0.26 mmol), MOMCl (3.51 mmol), tetrabutylammonium bromide (0.15 mmol), CH_2Cl_2 (6 mL) and aqueous NaOH (30% w/v, 6 mL) were added at room temperature and the reaction was stirred for 24 hours. The organic phase was separated and washed with distilled water (x2) and brine and then evaporated until

dryness. The product was purified by flash chromatography using ethyl acetate/hexane as eluent. The product was obtained as white solid in 65% yield. IR (KBr): $\nu = 3404, 2937, 2827, 1612, 1513, 1233, 1199, 1152, 1110, 1079, 1008, 922, 825 \text{ cm}^{-1}$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.79 (s, 1H), 2.80 (t, $J = 6.57 \text{ Hz}$, 2H), 3.47 (s, 3H), 3.80 (t, $J = 6.60 \text{ Hz}$, 2H), 5.15 (s, 2H), 6.99 (d, $J = 8.48 \text{ Hz}$, 2H), 7.14 (d, $J = 8.40 \text{ Hz}$, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 38.24, 55.85, 63.66, 94.39, 116.33, 129.92, 131.77, 155.75. Anal. Calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_3$: C 65.91, H 7.74. Found: C 66.02, H 7.75.

(Z)-1-(2-phenylethoxy)octadec-9-ene (**1**)

In a round bottom flask equipped with a magnetic stirrer, compound **16a** (0.60 mmol), oleyl iodide (1.32 mmol), tetrabutyl ammonium bromide (0.16 mmol), aqueous KOH (30% w/v, 10 mL) and toluene (10 mL) were added and the reaction was heated under reflux for 48 hours. The organic phase was separated and washed with distilled water (x2) and brine and then evaporated until dryness. The product was purified by flash chromatography using ethyl acetate/hexane as eluent. The product was obtained as colorless oil in 20.0 % yield. IR (KBr): $\nu = 2924, 2854, 2358, 1699, 1113, 747, 639 \text{ cm}^{-1}$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.89 (t, $J = 6.09 \text{ Hz}$, 3H), 1.21-1.40 (m, 22H), 1.51-1.64 (m, 2H), 1.95-2.13 (m, 4H), 2.89 (t, $J = 7.28 \text{ Hz}$, 2H), 3.43 (t, $J = 6.68 \text{ Hz}$, 2H), 3.63 (t, $J = 7.34 \text{ Hz}$, 2H), 5.29-5.42 (m, 2H) 7.15-7.36 (m, 5H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.12, 22.68, 26.15, 27.19, 29.24, 29.32, 29.45, 29.49, 29.52, 29.71, 29.76, 31.90, 36.37, 71.07, 71.79, 126.09, 128.27, 128.87, 129.82, 129.90, 139.03. Anal. Calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{O}$: C 83.80, H 11.90. Found: C 83.92, H 11.91.

(Z)-1-(2-(3,4-methylenedioxyphenyl)ethoxy)octadec-9-ene (**4**)

This compound was synthesized as already described for compound **1** starting with compound **16b**. The product was obtained as colorless oil in 35.0% yield. IR (KBr): $\nu = 2924, 2854, 1506, 1490, 1246, 1113, 1042, 940, 639 \text{ cm}^{-1}$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 5.79 \text{ Hz}$, 3H), 1.19-1.40 (m, 22H),

1.49-1.65 (m, 2H), 1.95-2.07 (m, 4H), 2.80 (t, $J = 7.12$ Hz, 2H), 3.42 (t, $J = 6.63$ Hz, 2H), 3.57 (t, $J = 7.16$ Hz, 2H), 5.27-5.42 (m, 2H), 5.92 (s, 2H), 6.66 (d, $J = 7.99$ Hz, 1H), 6.70-6.77 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.12, 22.68, 26.16, 29.19, 29.25, 29.32, 29.45, 29.49, 29.52, 29.70, 29.76, 31.90, 36.04, 71.08, 71.93, 100.74, 108.10, 109.35, 121.66, 129.83, 129.91, 132.88, 145.81, 147.45. Anal. Calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_3$: C 77.83, H, 10.64. Found: C 78.01, H 10.65.

(9Z,12Z)-1-(2-phenylethoxy)-octadeca-9,12-diene (**5**)

This compound was synthesized as already described for **1** starting with **15b**. The product was obtained as colorless oil in 27.0% yield. IR (KBr): $\nu = 3009, 2927, 2855, 2361, 1738, 1455, 1115, 698$ cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.89 (t, $J = 6.80$ Hz, 3H), 1.15-1.44 (m, 20H), 1.49-1.67 (m, 2H), 1.99-2.10 (m, 4H), 2.78 (t, $J = 6.10$ Hz, 2H), 2.89 (t, $J = 7.30$ Hz, 2H), 3.34-3.52 (m, 2H), 3.62 (t, $J = 7.30$ Hz, 2H), 5.27-5.46 (m, 4H), 7.14-7.41 (m, 5H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.06, 22.57, 25.61, 26.17, 27.19, 27.22, 29.25, 29.34, 29.44, 29.49, 29.66, 29.71, 31.52, 36.37, 71.07, 71.80, 126.10, 127.90, 127.94, 128.28, 128.87, 130.13, 130.18, 139.03. Anal. Calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{O}$: C 84.26, H, 11.42. Found: C 84.08, H 11.41.

(9Z,12Z)-1-(2-(3,4-methylenedioxyphenyl)ethoxy)-octadeca-9,12-diene (**8**)

This compound was synthesized as already described for compound **1** starting with compounds **15b** and **16b**. The product was obtained as colorless oil in 23.0% yield. IR (KBr): $\nu = 2927, 2855, 1741, 1489, 1246, 1113, 1043$ cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.89 (t, $J = 6.42$ Hz, 3H), 1.22-1.42 (m, 20H), 1.49-1.64 (m, 2H), 1.98-2.12 (m, 2H), 2.72-2.85 (m, 4H), 3.42 (t, $J = 6.65$ Hz, 2H), 3.57 (t, $J = 7.21$ Hz, 2H), 5.26-5.46 (m, 4H), 5.92 (s, 2H), 6.62-6.78 (m, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.08, 22.57, 25.61, 26.15, 27.19, 28.58, 29.25, 29.34, 29.45, 29.49, 29.66, 31.52, 36.04, 38.34, 71.08, 71.93, 100.74, 108.10, 109.35, 121.66, 127.90, 127.94, 130.13, 130.18, 132.88,

145.81, 147.57. Anal. Calcd. for $C_{27}H_{42}O_3$: C 78.21, H 10.21. Found: C 78.35, H 10.22.

(Z)-1-(2-(4-(methoxymethylenoxy)phenyl)ethoxy)octadec-9-ene (**17a**)

This compound was synthesized as already described for **1** starting with **13**. The product was obtained as colorless oil in 30.0% yield. IR (KBr): $\nu = 2925, 2853, 1613, 1511, 1465, 1233, 1153, 1114, 1080, 1010, 924 \text{ cm}^{-1}$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 6.45 \text{ Hz}$, 3H), 1.20-1.41 (m, 22H), 1.48-1.68 (m, 2H), 1.93-2.11 (m, 4H), 2.83 (t, $J = 7.27 \text{ Hz}$, 2H), 3.42 (t, $J = 6.70 \text{ Hz}$, 2H), 3.47 (s, 3H), 3.58 (t, $J = 7.34 \text{ Hz}$, 2H), 5.15 (s, 2H), 5.27-5.43 (m, 2H), 6.96 (d, $J = 8.56 \text{ Hz}$, 2H), 7.14 (d, $J = 8.46 \text{ Hz}$, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.11, 22.67, 26.15, 27.19, 29.24, 29.31, 29.45, 29.48, 29.51, 29.71, 29.74, 31.89, 35.49, 55.88, 71.06, 71.95, 94.50, 116.14, 129.82, 129.90, 132.44, 155.60. Anal. Calcd. for $C_{28}H_{48}O_3$: C 77.72, H 11.18. Found: C 77.65, H 11.20.

(9Z,12Z)-1-(2-(4-(methoxymethylenoxy)phenyl)ethoxy)octadeca-9,12-diene (**17b**)

This compound was synthesized as already described for **1** starting with **13** and **15b**. The product was obtained as colorless oil in 20.0% yield. IR (KBr): $\nu = 3008, 2927, 2854, 1511, 1233, 1153, 1113, 1080, 1010 \text{ cm}^{-1}$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 6.53 \text{ Hz}$, 3H), 1.18-1.44 (m, 20H), 1.50-1.62 (m, 2H), 1.98-2.11 (m, 4H), 2.77 (t, $J = 6.19 \text{ Hz}$, 2H), 2.83 (t, $J = 7.26 \text{ Hz}$, 2H), 3.42 (t, $J = 6.67 \text{ Hz}$, 2H), 3.47 (s, 3H), 3.58 (t, $J = 7.32 \text{ Hz}$, 2H), 5.15 (s, 2H), 5.27-5.46 (m, 4H), 6.96 (d, $J = 8.48 \text{ Hz}$, 2H), 7.14 (d, $J = 8.23 \text{ Hz}$, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.08, 22.57, 25.61, 26.16, 27.19, 27.22, 29.25, 29.34, 29.45, 29.49, 29.65, 29.72, 31.52, 35.50, 55.91, 71.06, 71.96, 94.51, 116.15, 127.90, 127.93, 129.83, 130.13, 130.18, 132.44, 155.60. Anal. Calcd. for $C_{28}H_{48}O_3$: C 78.09, H 10.77. Found: C 77.97, H 10.78.

(Z)-1-(2-(3,4-(dimethylmethylenedioxy)phenyl)ethoxy)octadec-9-ene (**17c**)

This compound was synthesized as already described for **1** starting with **11**. The product was obtained as colorless oil in 30.0% yield. IR (KBr): $\nu = 2927, 2854, 1736, 1653, 1498, 1445, 1375, 1253, 1234, 1113 \text{ cm}^{-1}$. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 6.21 \text{ Hz}$, 3H), 1.20-1.39 (m, 22H), 1.47-1.62 (m, 2H), 1.66 (s, 6H), 1.96-2.07 (m, 4H), 2.79 (t, $J = 7.28 \text{ Hz}$, 2H), 3.42 (t, $J = 6.72 \text{ Hz}$, 2H), 3.57 (t, $J = 7.32 \text{ Hz}$, 2H), 5.30-5.40 (m, 2H), 6.57-6.68 (m, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.12, 22.66, 25.84, 26.16, 27.21, 28.98, 29.25, 29.46, 29.49, 29.73, 31.79, 36.05, 71.06, 72.06, 107.90, 109.14, 117.52, 121.02, 129.84, 129.91, 132.09, 145.69, 147.30. Anal. Calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_3$: C 78.33, H 10.88. Found: C 78.10, H 10.90.

(9Z,12Z)-1-(2-(3,4-(dimethylmethylenedioxy)phenyl)ethoxy)octadeca-9,12-diene (**17d**)

This compound was synthesized as already described for **1** starting with compounds **15b** and **11**. The product was obtained as colorless oil in 53.0% yield. IR (KBr): $\nu = 3009, 2927, 2855, 1499, 1253, 1234, 1113, 980 \text{ cm}^{-1}$. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.89 (t, $J = 6.51 \text{ Hz}$, 3H), 1.22-1.42 (m, 20H), 1.50-1.62 (m, 2H), 1.66 (s, 6H), 2.00-2.11 (m, 4H), 2.72-2.85 (m, 4H), 3.42 (t, $J = 6.51 \text{ Hz}$, 2H), 3.57 (t, $J = 7.31 \text{ Hz}$, 2H), 5.26-5.48 (m, 4H), 6.58-6.67 (m, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.07, 22.57, 25.61, 25.82, 26.16, 26.18, 27.18, 27.21, 29.25, 29.34, 29.45, 29.49, 29.65, 29.71, 29.77, 31.51, 36.04, 70.95, 71.04, 72.05, 107.89, 109.13, 117.49, 121.00, 127.93, 130.11, 130.16, 132.08, 145.69, 147.29. Anal. Calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_3$: C 78.33, H 10.88. Found: C 78.52, H 10.85.

(Z)-1-(2-(4-hydroxyphenyl)ethoxy)octadec-9-ene (**2**)

In a round bottom flask equipped with a magnetic stirrer, compound **17a** (0.17 mmol), isopropanol (5 mL) and aqueous HCl 6N (2 mL) were added at room temperature and the reaction was stirred for 24 hours. The organic phase was

separated and washed with distilled water (x2) and brine and then evaporated until dryness. The product was purified by flash chromatography using ethyl acetate/hexane as eluent. The product was obtained as colorless oil in a 97.8% yield. IR (KBr): $\nu = 3373, 2924, 2854, 1614, 1516, 1464, 1236, 1190, 829 \text{ cm}^{-1}$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 6.13 \text{ Hz}$, 3H), 1.20-1.42 (m, 22H), 1.50-1.65 (m, 2H), 1.94-2.09 (m, 4H), 2.82 (t, $J = 7.24 \text{ Hz}$, 2H), 3.45 (t, $J = 6.75 \text{ Hz}$, 2H), 3.60 (t, $J = 7.32 \text{ Hz}$, 2H), 5.29-5.38 (m, 2H), 5.40 (bs, 1H), 6.73 (d, $J = 8.45 \text{ Hz}$, 2H), 7.07 (d, $J = 8.32 \text{ Hz}$, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.12, 22.67, 26.10, 27.19, 29.23, 29.31, 29.42, 29.47, 29.51, 29.60, 29.74, 29.75, 31.89, 35.33, 71.12, 72.06, 115.16, 129.83, 129.93, 130.80, 154.05. Anal. Calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{O}_2$: C, 80.35, H 11.41. Found: C 80.19, H 11.43.

(Z)-1-(2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethoxy)octadec-9-ene (**3**)

In a round bottom flask equipped with a magnetic stirrer, compound **17c** (0.26 mmol) and aqueous HCl 6N (5 mL) were added and the reaction was heated under reflux for 24 hours. The organic phase was separated and washed with distilled water (x2) and brine and then evaporated until dryness. The product was purified by flash chromatography using ethyl acetate/hexane as eluent. The product was obtained as colorless oil in 50.7% yield. IR (KBr): $\nu = 3394, 2922, 2854, 1606, 1520, 1465, 1446, 1279, 1193, 1113, 1092 \text{ cm}^{-1}$. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 6.91 \text{ Hz}$, 3H), 1.18-1.38 (m, 20H), 1.51-1.62 (m, 2H), 1.97-2.04 (m, 4H), 2.76 (t, $J = 7.14 \text{ Hz}$, 2H), 3.46 (t, $J = 6.83 \text{ Hz}$, 2H), 3.62 (t, $J = 7.16 \text{ Hz}$, 2H), 5.30-5.41 (m, 2H), 5.63 (bs, 1H), 5.86 (bs, 1H), 6.59-6.63 (m, 1H), 6.68 (d, $J = 1.66 \text{ Hz}$, 1H), 6.72 (d, $J = 8.03 \text{ Hz}$, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.12, 22.68, 26.07, 27.19, 29.23, 29.31, 29.42, 29.48, 29.51, 29.74, 29.75, 31.89, 35.41, 71.18, 71.93, 115.20, 115.85, 121.00, 129.82, 129.93, 131.57, 142.03, 143.58. Anal. Calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{O}_3$: C 77.18, H 10.96. Found: C 77.15, H 10.94.

(9Z,12Z)-1-(2-(4-hydroxyphenyl)ethoxy)-octadeca-9,12-diene (**6**)

This compound was synthesized as already described for compound **2** starting with **17b**. The product was obtained as colorless oil in 80.0% yield. IR (KBr): $\nu = 3361, 2927, 2855, 1516, 1111, 829 \text{ cm}^{-1}$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.89 (t, $J = 6.30 \text{ Hz}$, 3H), 1.20-1.42 (m, 20H), 1.51-1.63 (m, 2H), 1.99-2.09 (m, 4H), 2.73-2.87 (m, 4H), 3.44 (t, $J = 6.75 \text{ Hz}$, 2H), 3.59 (t, $J = 7.33 \text{ Hz}$, 2H), 5.26-5.46 (m, Hz, 4H), 6.74 (d, $J = 8.46 \text{ Hz}$, 2H), 7.07 (d, $J = 8.43 \text{ Hz}$, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.08, 22.56, 25.60, 26.10, 27.18, 27.21, 29.23, 29.33, 29.42, 29.47, 29.62, 29.64, 31.51, 35.35, 71.09, 72.06, 115.15, 127.89, 127.93, 129.93, 130.12, 130.18, 130.83, 154.05. Anal. Calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_2$: C 80.77, H 10.95. Found: C 80.90, H 10.94.

(9Z,12Z)-1-(2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethoxy)-octadeca-9,12-diene (**7**)

This compound was synthesized as already described for compound **3** starting with **17d**. The product was obtained as colorless oil in 27.0% yield. IR (KBr): $\nu = 3386, 3009, 2935, 2856, 1606, 1520, 1446, 1375, 1279, 1113, 811, 723 \text{ cm}^{-1}$. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.89 (t, $J = 6.96 \text{ Hz}$, 3H), 1.22-1.42 (m, 20H), 1.50-1.62 (m, 2H), 1.96-2.12 (m, 4H), 2.72-2.82 (m, 4H), 3.42 (t, $J = 6.71 \text{ Hz}$, 2H), 3.58 (t, $J = 7.21 \text{ Hz}$, 2H), 4.99 (bs, 1H), 5.13 (bs, 1H), 5.27-5.45 (m, 4H), 6.61-6.70 (m, 1H), 6.71-6.81 (m, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.07, 22.56, 25.60, 26.04, 27.17, 27.20, 29.23, 29.33, 29.40, 29.47, 29.63, 31.50, 35.37, 71.17, 71.93, 115.19, 115.84, 120.94, 127.89, 127.95, 130.12, 130.19, 131.44, 142.09, 143.63. Anal. Calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_3$: C 77.56, H 10.51. Found: C 77.50, H 10.52.

Biology

Feeding Experiments

Feeding experiments were carried out using Wistar male rats with a 200-450 g weight range. Animals were housed in individual cages in a room with controlled

temperature (23 °C) and relative humidity (50%) with 12/12 hours light and dark cycle. Water and food were available ad libitum except in specific experimental proceedings. The animals were handled twice in the days prior to the experimental sessions. All products were dissolved in a mixture of DMSO 5% / Tween 60 5 % / saline 90 % and administered intraperitoneally. The experiments performed in this study are in compliance with Spanish regulations concerning the protection of experimental animals (Real Decreto 1201/2005, October 21, 2005, BOE nº 252), as well as with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

The feeding experiments were carried out using animals that had been deprived of food for 24 hours but with free access to water. Thirty minutes after the injection, the previously weighed food was placed in the cage. The food was weighed 30, 60, 120, and 240 minutes after initiation of the test. All the feeding experiments were performed with groups of eight animals (n=8).

In Vitro Experiments

Rat Cerebellum and Cortex Membranes Homogenization

The rats were anaesthetized with Dolethal® (pentobarbital) and killed with a guillotine. The cortex and cerebellum were extracted and stored separately in dry ice. The cerebellum and cortex were homogenized with buffer Tris 50 mmol pH 7.4 using an Ultraturrax®. The homogenate was centrifuged at 25000 g for 15 minutes at 4 °C. The supernatant was discarded. The pellet was again washed with 5 mL of buffer and centrifuged. The supernatant was again discarded. The protein concentration of the pellet was measured using the Bradford test.

Binding Assay

The binding assay was performed using the labeled CB₁ antagonist [³H]-SR141716. In each tube were added 450 µL of buffer A (50 mmol Tris pH=7.4 with 0.5 % bovine serum albumin (BSA)), 100-200 µg of rat brain membranes (cerebellum), the diluted product and the tracer [³H]-SR141716. The mixture

was incubated while shaking at 37 °C for 60 minutes and the reaction was stopped with 1 mL of buffer A. The resultant mixture was centrifuged at 5000 rpm for 5 minutes. The supernatant was discarded and the pellet washed with 1 mL of buffer A, centrifuged and again the supernatant was discarded. Scintillation liquid was added and the samples were read at a beta scintillator (Liquid scintillation analyzer, Tri-Carb 2100 TR, PACKARD, a Packard Bioscience Company). All the products were diluted in buffer B (50 mmol Tris pH=7.4 with 0.5 % bovine serum albumin (BSA) and 0.3% DMSO) in the concentrations of 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} and 10^{-11} mol. All data points were performed in triplicate

Bibliography

- [1] World Health Organization (WHO), "Obesity and overweight" to be found under <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>, **2006**.
- [2] D. Withrow, D. A. Alter, *Obes. Rev.*, **2010** no. doi:10.1111/j.1467-789X.2009.00712.x (11 pages).
- [3] M. J. Bishop, *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 3999-4000.
- [4] G. A. Bray, *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 4001-4007
- [5] F. Rodríguez de Fonseca, M. Navarro, R. Gómez, L. Escuredo, F. Nava, J. Fu, E. Murillo-Rodríguez, A. Giuffrida, J. LoVerme, S. Gaetani, S. Kathuria, C. Galk, D. Piomelli, *Nature* **2001**, *414*, 209-212.
- [6] F. Visioli, G. Bellomo, G. Montedoro, C. Galli, *Atherosclerosis* **1995** *117*, 25-32.
- [7] M. H. Gordon, F. P. Martins, M. Almeida, *J. Agr. Food Chem.* **2001** *49*, 2480-2485.
- [8] R. Mateos, M. M. Domínguez, J. L. Espartero, A. Cert, *J. Agr. Food Chem.* **2003** *51*, 7170-7175.
- [9] M. Trujillo, R. Mateos, L. C. de Teran, J. L. Espartero, R. Cert, M. Jover, F. Alcudia, J. Bautista, A. Cert, J. Parrado, *J. Agr. Food Chem.* **2006**, *54*, 3779-3785.

- [10] A. Madrona, G. Pereira-Caro, R. Mateos, G. Rodríguez, M. Trujillo, J. Fernández-Bolaños, J. L. Espartero, *Molecules* **2009**, *14*, 1762-1772
- [11] A. Gambacorta, D. Tofani, R. Bernini, A. Migliorini, *J. Agr. Food Chem.*, **2007**, *55*, 3386-3391.
- [12] F. R. van Heerden, J. J. van Zyl, G. J. H. Rall, E. V. Brandt, D. G. Roux, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *7*, 661-662
- [13] C. Harcken, R. Brückner, *New J. Chem*, **2001**, *25*, 40-54
- [14] H. H. Freedman, R. A. Dubois, *Tetrahedron Lett.*, **1975**, *16*, 3251-4.
- [15] A. F. Rosenthal, L. A. Vargas, J. F. Dixon, *Chem. Phys. Lipids*, **1977**, *20*, 205-9.
- [16] B. Almeida, J. Joglar, M. J. Luque-Rojas, J. M. Decara, F. J. Bermúdez-Silva, M. Macias-Gonzalez, M. Fitó, M. Romero, M. Farré, M. Covas, F. R. de Fonseca, R. de la Torre, *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1781-7.
- [17] G. Griffin, E.J. Wray, B.R. Martin, M.E. Abood, *Brit. J. Pharmacol.* **1999**, *128*, 684-688.

Acknowledgements

Centro de Investigación Biomédica en Red-Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBN, which is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain). Bruno Almeida is a recipient of a fellowship from the Alban Program, the European Union Program of High Level Scholarships for Latin America, (E06D101051BR, B.A.). FRF, MJL, JMD and MRC are supported by the 7th Framework Programme of European Union [grant number HEALTH-F2-2008-223713, REPROBESITY]; Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Ciencia e Innovación [grant numbers PI07/1226.]; Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Ciencia e Innovación, UE-ERDF, Red de Trastornos Adictivos [grant number RD06/0001].

Supporting Information for:

Unsaturated Fatty Alcohol Derivatives of Olive Oil Phenolic Compounds with Potential Antiobesity Properties.

Almeida B, Joglar J, Luque Rojas MJ, Decara JM, Romero-Cuevas M, Covas MI,
Farré M, Rodríguez de Fonseca F, de la Torre R.

Contents:

Figure S1 – Relative food intake compounds **2, 3, 5** and **6**

Figure S2 – CB₁ binding assay for compound SR141716

Figure S3 – CB₁ binding assay for compound **1**

Figure S4 – CB₁ binding assay for compound **4**

S 1

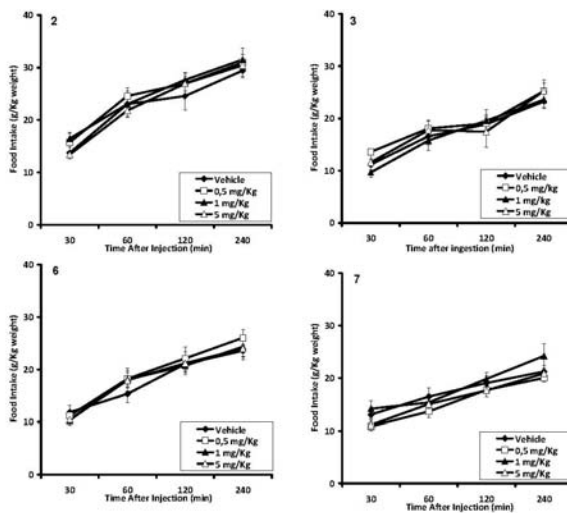
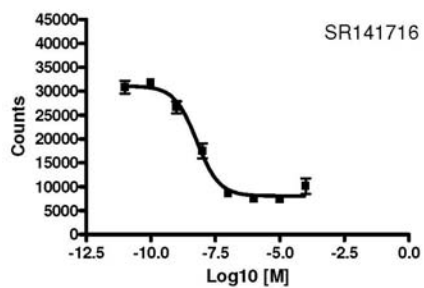


Figure S1 - Relative food intake compounds 2, 3, 5 and 6



Ki 1.153e-009
 pKi 8.93820836

Figure S2 – CB₁ binding assay for compound SR141716

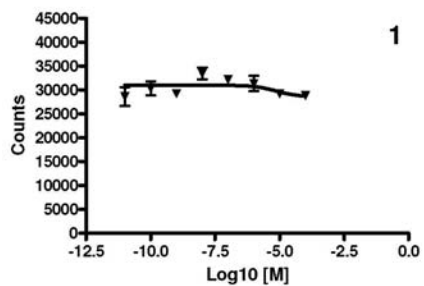


Figure S3 – CB₁ binding assay for compound 1

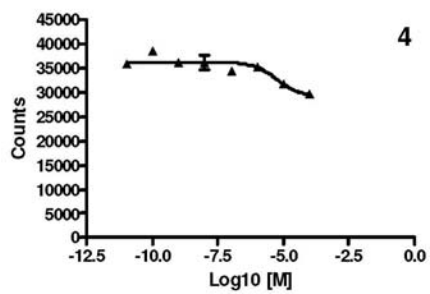


Figure S4 – CB₁ binding assay for compound 4

6.2 – Patent #2

Éteres Derivados de Alcoholes Grasos y Compuestos Fenólicos del Aceite de Oliva para el Tratamiento de Trastornos Alimentarios

**ÉTERES DERIVADOS DE ALCOHOLES GRASOS Y COMPUESTOS
FENÓLICOS DEL ACEITE DE OLIVA PARA EL TRATAMIENTO DE
TRASTORNOS ALIMENTARIOS**

Almeida B,^[a,b,e] Joglar J,^[c] Luque Rojas MJ,^[d] Decara JM,^[d] Romero-Cuevas M,^[d] Covas MI,^[f] Farré M,^[a,g] Rodríguez de Fonseca F,^[d,e] de la Torre R.^[a,b,e]

[a] Almeida B, Farré M, de la Torre R
Human Pharmacology and Clinical Neurosciences Research Group
Neuropsychopharmacology Research Program
IMIM-Hospital del Mar Research Institute
Dr. Aiguader 88, Barcelona 08003 (Spain)
Fax: (+34) 933160467
E-mail: rtorre@imim.es

[b] Almeida B, de la Torre R
Universitat Pompeu Fabra, CEXS-UPF
Dr. Aiguader 88, Barcelona 08003 (Spain)

[c] Joglar J
Departamento de Química Biológica y Modelización Molecular
Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC-CSIC)
Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona (Spain)
E-mail: joglar@iqac.csic.es

[d] Luque Rojas MJ, Decara JM, Romero-Cuevas M, Rodríguez de Fonseca F
Fundación IMABIS, Hospital Carlos Haya de Málaga
Avda. Carlos Haya 82. Pabellón de Gobierno.
29010 Málaga, Spain

[e] Almeida B, Covas MI, Rodríguez de Fonseca F, de la Torre R
CIBEROBN, Instituto de Salud Carlos III, Madrid (Spain)

[f] Covas MI
Oxidative Stress and Nutrition Research Group
Inflammation and Cardiovascular Research Program
IMIM-Hospital del Mar, Dr. Aiguader 88, Barcelona 08003 (Spain)

[g] Farré M
Universitat Autònoma de Barcelona, UDIMAS-UAB Dr. Aiguader 80, Barcelona
08003 (Spain)

ÉTERES DERIVADOS DE ALCOHOLES GRASOS Y COMPUESTOS FENÓLICOS DEL ACEITE DE OLIVA PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS ALIMENTARIOS

La presente invención se refiere a una nueva serie de éteres derivados de alcoholes grasos y compuestos fenólicos del aceite de oliva y sus sales, solvatos e hidratos, que muestran afinidad por receptores cannabinoides tipo 1 (CB₁) y son capaces de prevenir la oxidación de la Lipoproteína de Baja Densidad (LDL). Estos compuestos pueden modular las acciones reguladas por el citado receptor, como la inducción de la saciedad y control de ingesta y la disminución de la grasa corporal

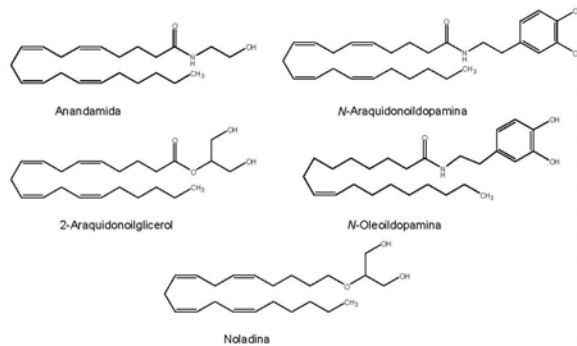
ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

El sistema endocannabinoide está compuesto por los receptores cannabinoides, ligandos endógenos (endocannabinoides) y los sistemas enzimáticos necesarios para su biosíntesis y degradación (Annu. Rev. Pharmacol. **2006** 46:101). Hasta el momento han sido identificados dos tipos de receptores cannabinoides: CB₁ y CB₂. Los dos receptores cannabinoides se encuentran acoplados a la proteína G a través de la cual modulan la actividad de las adenilato ciclasas (AC) y proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), y eventos intracelulares que llevan a la regulación en la expresión de diversos genes. La activación de los receptores CB₁ también regula los canales de Ca²⁺ dependientes del voltaje y de potasio. Los receptores CB₁ se encuentran distribuidos en el sistema nervioso central y en otros órganos como tejido adiposo, páncreas endocrino, músculo, pulmones, hígado y riñones, mientras que los receptores CB₂ se expresan principalmente en el sistema inmunológico y células hematopoyéticas (Nat. Rev. Drug Discov. **2004** 3:771).

El sistema endocannabinoide parece estar relacionado con un gran número de condiciones fisiológicas y patológicas a nivel neurológico, psiquiátrico, cardiovascular, desarrollo del cáncer, trastornos reproductivos y alimentarios. Un mejor conocimiento de las vías de biosíntesis de los endocannabinoides y los mecanismos de regulación a nivel celular de dichas vías se consideran las

principales prioridades en la investigación de los cannabinoides (Nat. Rev. Drug Discov. **2004** 3:771).

Todos los compuestos endocannabinoides descritos hasta la fecha son derivados de ácidos grasos con cabezas polares. Esta cabeza polar puede estar unida al ácido graso a través de un enlace tipo amida (anandamida, *N*-araquidonil-dopamina (NADA), *N*-oleil-dopamina (OLDA)), éster (2-AG), o éter (noladina) (Nat. Rev. Drug Discov. **2004** 3:771).

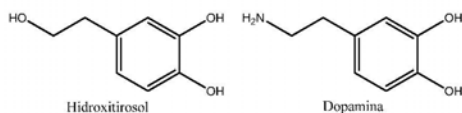


Estructura química de algunos endocannabinoides

El receptor CB₁ ha sido, dentro del sistema endocannabinoide, la diana terapéutica que inicialmente recibió mayor atención en las investigaciones para el tratamiento de la obesidad. Es bien conocido que sustancias agonistas cannabinoides aumentan el apetito y por tanto se postuló que bloqueando este receptor se podría disminuir la ingesta de comida llevando a una pérdida de peso. El Rimonabant, también conocido como SR141716 o Acomplia®, fue el primer antagonista CB₁ en ser descrito y uno de los primeros en ser estudiado clínicamente para el tratamiento de obesidad (Annu. Rev. Pharmacol. **2006** 46:101, Nat. Rev. Drug Discov. **2004** 3:771). Los ensayos clínicos llamados RIO (Rimonabant In Obesity) (Lancet **2005** 365:1389; J. Am. Med. Assoc. **2006**

295:761; Lancet **2006** 368:1160) mostraron la eficacia del Rimonabant como agente anti-obesidad. Desafortunadamente algunos datos de los estudios clínicos han asociado el uso crónico del Rimonabant con un aumento de la depresión, ansiedad y un aumento de tendencias suicidas (Lancet **2007** 370:1706; Lancet **2008** 371:556; Lancet **2008** 371:555). Así, en octubre de 2008, la Agencia Europea del Medicamento decidió la suspensión temporal del mismo.

El hidroxitirosol es un compuesto fenólico que se encuentra de forma natural en el aceite de oliva virgen. Es un potente inhibidor *in vitro* de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), siendo capaz de interrumpir reacciones peroxidativas en cadena (Atherosclerosis **1995** 117:25, 1995). El hidroxitirosol es también un metabolito natural de la dopamina y comparte con ésta una similitud estructural (J. Agr. Food Chem. **2001** 49:2480; J. Agr. Food Chem. **2003** 51:7170)



Estructuras de la dopamina y del hidroxitirosol

Algunos derivados ésteres y éteres del hidroxitirosol con ácidos grasos ya han sido sintetizados en un intento de aumentar su biodisponibilidad y, en los dos casos, los derivados del hidroxitirosol presentaron una actividad antioxidante en matrices lipídicas equivalentes o superiores al hidroxitirosol libre (J. Agr. Food Chem. **2006**, 54, 3779; Molecules **2009** 14:1762). En el caso de los éteres, solamente se describe la preparación de los derivados saturados, ya que la ruta presentada (Molecules **2009** 14:1762) no permite la síntesis de los derivados insaturados porque es necesaria una hidrogenación en la última etapa para desproteger el grupo catecol. En cualquier caso, ninguno de los derivados sintetizados (éteres o ésteres) fue evaluado como inhibidor de la ingesta de comida o como ligando del receptor CB₁.

Las dislipemias son alteraciones del metabolismo de los lípidos, con su consecuente alteración de las concentraciones de lípidos (ej. colesterol y triglicéridos) y lipoproteínas en la sangre: lipoproteínas de baja densidad (LDL), de muy baja densidad (VLDL) y de densidad intermediaria (IDL). Normalmente, las moléculas de colesterol son transportadas unidas a las lipoproteínas LDL. Un incremento en las concentraciones de LDL-colesterol está directamente relacionada con el riesgo de enfermedad coronaria. Un porcentaje más pequeño de las moléculas de colesterol es transportado a través de las lipoproteínas de alta densidad, las HDL, cuya función principal es extraer el colesterol depositado en las paredes arteriales y transportarlo hasta el hígado para su eliminación vía intestinal. Se ha descrito que un nivel elevado de HDL colesterol está asociado con la disminución del riesgo de enfermedad coronaria. Por tanto, en el tratamiento de las dislipemias es igualmente importante reducir las concentraciones de LDL-colesterol como aumentar las de HDL-colesterol (Am. J. Med. **1977** 62:707; N. Engl J. Med. **1991** 325:373; Ann. Intern. Med. **1979** 90:85) En la actualidad se están utilizando clínicamente los derivados del fibrato para el control de las dislipemias (Am J Med. **2009** 122:962), dando lugar a distintas terapias con derivados como el clofibrato y el fenofibrato (WO2007047880 **2007**; WO2007047724 **2007**), que se unen al receptor PPAR-alfa y regulan distintos factores de transcripción implicados en algunos de los procesos anteriormente descritos (Curr. Atheroscler. Rep. **2000** 2:327). Además del tratamiento de las dislipemias, se han descrito agentes agonistas duales de PPAR-alfa/gamma con potencial uso para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (J. Med. Chem. **2004** 30 47:4118).

La enfermedad coronaria es la principal causa de mortalidad en los países industrializados. La oxidación de los lípidos presentes en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) es un marcador del desarrollo de arteriosclerosis y enfermedad coronaria (Cell **2001** 104:503). Se postula que la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) está implicada en la patogénesis de la arteriosclerosis y la hipertensión (Physiol. Rev. **2002** 82:47). La oxidación de la LDL por las ROS es uno de los primeros eventos en el desarrollo de la enfermedad. La arteriosclerosis puede ser considerada como una forma de inflamación crónica resultante de la interacción entre

lipoproteínas modificadas, macrófagos, células T y elementos celulares naturales de la pared arterial. El proceso inflamatorio puede conducir al desarrollo de lesiones complejas o placas. La ruptura de las placas y la trombosis conduce al infarto de miocardio (Cell **2001** 104:503).

Proponemos una nueva ruta sintética para la síntesis de éteres derivados del hidroxitirosol con alcoholes grasos insaturados como los alcoholes oleico y linoleico. Teniendo en cuenta la estructura química de los endocannabinoides (p.e. OLDA y NADA) y la similitud estructural del hidroxitirosol con la dopamina, proponemos una posible actividad de estos compuestos sobre la ingesta que pueda derivarse de la una interacción con el receptor CB₁. El hecho de que estos compuestos, además de regular la saciedad puedan tener un efecto protector sobre la oxidación de la LDL, ya que tanto los éteres como los esteres del hidroxitirosol fueron caracterizados como potentes antioxidantes en matrices lipídicas (J. Agr. Food Chem. **2006** 54:3779; Molecules **2009** 14:1762), puede ser interesante porque que esta actividad se relaciona con una reducción del riesgo de problemas cardiovasculares que, muchas veces, están asociados a la obesidad.

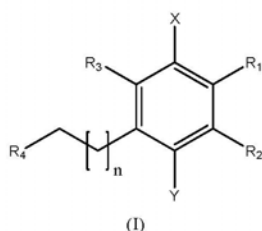
DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a una nueva clase de moléculas, concretamente éteres derivados de alcoholes grasos insaturados conjugados con compuestos fenólicos del aceite de oliva como ligandos del receptor CB₁ e inhibidores de la oxidación de la LDL, así como su procedimiento de preparación y su utilización.

La presente invención describe derivados de alcoholes grasos con compuestos fenólicos del aceite de oliva para el tratamiento de trastornos alimentarios. Estos compuestos pueden ser utilizados para la preparación de un medicamento para la inducción de saciedad y control de ingesta, modulación de la grasa corporal y regulación del metabolismo lipídico así como la preparación de un medicamento para el tratamiento diabetes, obesidad, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares.

Por lo tanto, la presente invención está referida a una nueva familia de compuestos derivados de ácidos grasos con compuestos fenólicos del aceite de oliva de fórmula general (I) que tienen una clara actividad inhibitoria del apetito y que muestran afinidad por el receptor CB₁. Es conocido el papel fundamental que tienen los receptores anteriores en enfermedades y condiciones de muy diversa naturaleza, especialmente alimentaria.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un nuevo compuesto de fórmula general (I) (también referido como el compuesto de la invención):



donde

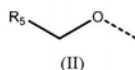
X e Y pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H, halógeno y metilo;

n es un número entero desde 1 a 4;

R₁ y R₂ pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H, OH y alquiloxi C₁-C₆ o los dos (R₁ y R₂) pueden formar parte de un segundo ciclo donde R₁,R₂ = O-Z-O donde Z puede ser un puente de 1 o más átomos de carbono (C₁-C₆) lineal o ramificado.

R₃ se selecciona entre H, alquilo C₁-C₆ y alquenilo C₁-C₄;

R₄ es un compuesto de fórmula general (II):



donde:

R₅ es un-alqueno de C₈-C₃₀ o alquino de C₈-C₃₀;

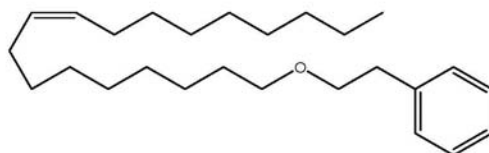
y sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, solvatos y prodrogas del mismo.

El término "alqueno" se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas que contienen uno o más dobles enlaces carbono-carbono, por ejemplo, vinilo, 1-propenilo, alilo, isoprenilo, 2-butenilo, 1,3-butadienilo, etc. Los radicales alquenos pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcóxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquilitio.

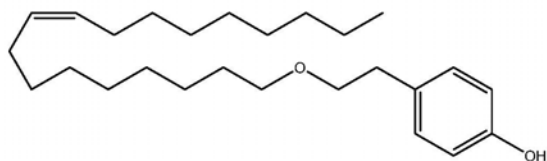
El término "alquino" se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas que contienen uno o más triples enlaces carbono-carbono, por ejemplo, etinilo, 1-propinilo, 2-propinilo, etc. Los radicales alquinos pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcóxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquilitio.

Halógeno se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

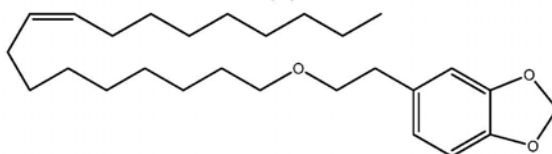
En una realización preferida el compuesto de fórmula general (I) se refiere a un compuesto que se selecciona del siguiente grupo:



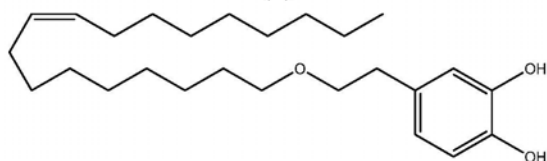
(Ia)



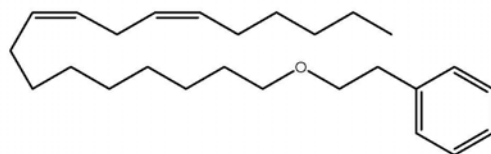
(Ib)



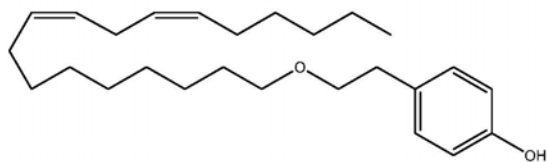
(Ic)



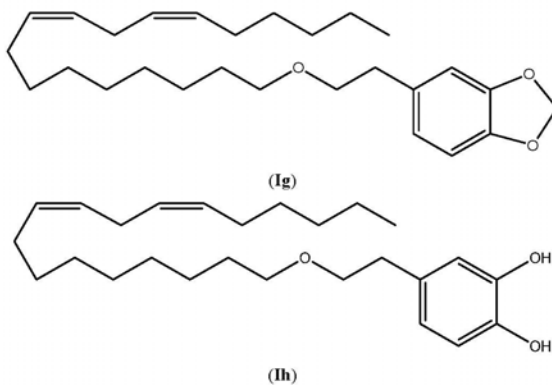
(Id)



(Ie)



(If)



o un isómero, una sal farmacéuticamente aceptable, un pro-fármaco o un solvato del mismo.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples, incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el término isómero también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros, racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente activos o las mezclas en distintas proporciones de los mismos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos de los compuestos de fórmula (I). El término "prodroga" o "profármaco" tal como aquí se utiliza incluye cualquier compuesto derivado de un compuesto de fórmula (I) -por ejemplo y no limitativamente: ésteres (incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc.), carbamatos, amidas, etc.- que al ser

administrado a un individuo puede ser transformado directa o indirectamente en dicho compuesto de fórmula (I) en el mencionado individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico del individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos. En este sentido, el término "solvato", tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación conocidos por los expertos en la materia.

Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I), sus sales, profármacos o solvatos, se encontrarán, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, y todavía más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% de compuesto de fórmula (I), o de sus sales, solvatos o profármacos.

En otra realización preferida el compuesto se fórmula general (I) se usa como medicamento.

En otro aspecto, la presente invención también se refiere a las composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto de la invención, o un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, un derivado o un profármaco del mismo, junto con un transportador o carrier farmacéuticamente aceptable, un excipiente o un vehículo, para la administración a un paciente.

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende además otro principio activo.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

Los compuestos descritos en la presente invención, sus sales, profármacos y/o solvatos así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos, o principios activos, adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o una sal, profármaco o solvato del mismo.

En una realización preferida de la presente invención, las composiciones farmacéuticas son adecuadas para la administración oral, en forma sólida o líquida. Las posibles formas para la administración oral son tabletas, cápsulas, siropes o soluciones y pueden contener excipientes convencionales conocidos en el ámbito farmacéutico, como agentes agregantes (p.e. sirope, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinil pirrolidona), rellenos (p.e. lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina), disgregantes (p.e. almidón, polivinil pirrolidona o celulosa microcristalina) o un surfactante farmacéuticamente aceptable como el lauril sulfato de sodio.

Las composiciones para administración oral pueden ser preparadas por métodos los convencionales de Farmacia Galénica, como mezcla y dispersión. Las tabletas se pueden recubrir siguiendo métodos conocidos en la industria farmacéutica.

Las composiciones farmacéuticas se pueden adaptar para la administración parenteral, como soluciones estériles, suspensiones, o liofilizados de los productos de la invención, empleando la dosis adecuada. Se pueden emplear excipientes adecuados, como agentes tamponadores del pH o surfactantes.

Las formulaciones anteriormente mencionadas pueden ser preparadas usando métodos convencionales, como los descritos en las Farmacopeas de diferentes países y en otros textos de referencia.

La administración de los compuestos o composiciones de la presente invención puede ser realizada mediante cualquier método adecuado, como la infusión intravenosa y las vías oral, intraperitoneal o intravenosa. La administración oral es la preferida por la conveniencia de los pacientes y por el carácter crónico de las enfermedades a tratar.

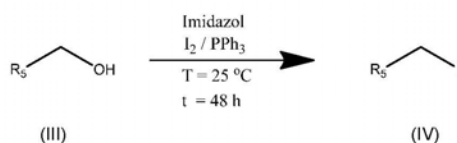
La cantidad administrada de un compuesto de la presente invención dependerá de la relativa eficacia del compuesto elegido, la severidad de la enfermedad a tratar y el peso del paciente. Sin embargo, los compuestos de esta invención

serán administrados una o más veces al día, por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 veces diarias, con una dosis total entre 0.1 y 1000 mg/Kg/día. Es importante tener en cuenta que puede ser necesario introducir variaciones en la dosis, dependiendo de la edad y de la condición del paciente, así como modificaciones en la vía de administración.

Los compuestos y composiciones de la presente invención pueden ser empleados junto con otros medicamentos en terapias combinadas. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o de otra composición diferente, para su administración al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un compuesto de fórmula (I) que comprende las siguientes etapas:

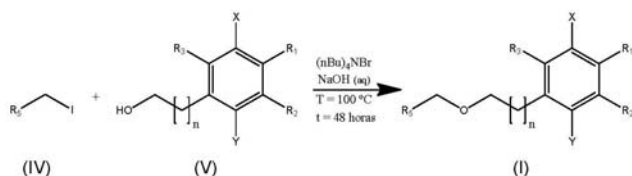
- Obtención del compuesto de fórmula general (IV) a partir del compuesto de fórmula general (III) a través de su reacción con iodo, trifeníl fosfina e imidazol.



donde

R₅ se selecciona entre alqueno C₈-C₃₀ y alquilo C₈-C₃₀

- conjugación entre un compuesto de fórmula general (IV) y un compuesto de fórmula general (V), para dar lugar al compuesto de fórmula general (I) usando un sistema bifásico de agua / tolueno con un agente de transferencia de fase del tipo sal de amonio cuaternario, como por ejemplo, pero no exclusivamente bromuro de tetrabutilamonio (nBu)₄NBr.



donde

X e Y pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H, halógeno y metilo;

n es un número entero desde 1 a 4;

R₁ y R₂ pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H, OH y alquiloxi C₁-C₆ o los dos (R₁ y R₂) pueden formar parte de un segundo ciclo donde R₁,R₂ = O-Z-O donde Z puede ser un puente de 1 o más átomos de carbono (C₁-C₆) lineal o ramificado.

R₃ se selecciona entre H, alquilo C₁-C₆ y alqueno C₁-C₄;

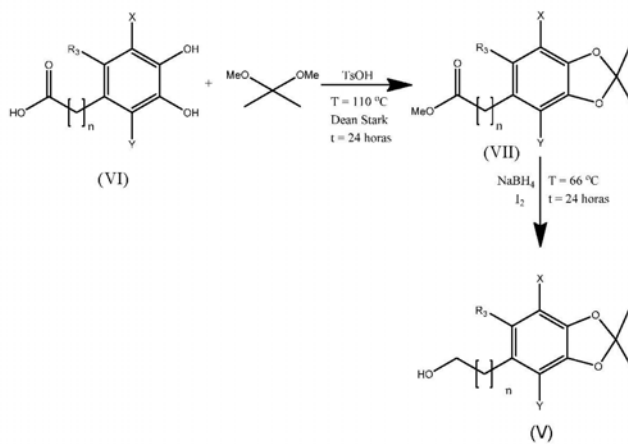
- separación de las fases;

- extracción de la fase orgánica dos veces con agua destilada y una vez con salmuera;

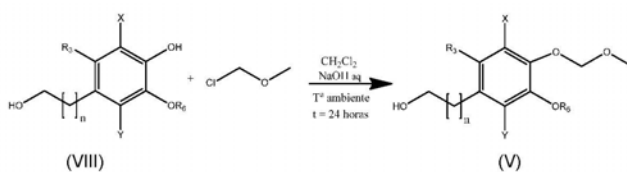
- tratamiento de la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro y evaporación del disolvente;

- purificación del compuesto de fórmula (I) por cromatografía en columna de gel de sílice FLASH.

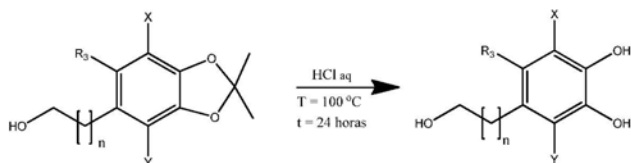
El compuesto de fórmula general (V) donde R₁,R₂ = -OC(CH₃)₂O- es sintetizado en dos etapas a partir de la protección del compuesto de fórmula general (VI) originando el compuesto de fórmula general (VII) y posterior reducción de este con NaBH₄/I₂ de manera similar al descrito por Gambacorta *et al.* (J. Agr. Food Chem. **2007** 55:3386).



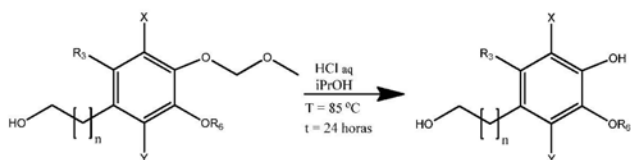
El compuesto de fórmula general (V), donde $R_1 = -O-CH_2-O-CH_3$, $R_2 = H$ o OR_6 donde R_6 es un grupo alquilo C_1-C_6 , es sintetizado a partir de la protección del compuesto de fórmula general (VIII) con MOMCl de acuerdo con (Tetrahedron Lett. **1978** 7:661)



En el caso del compuesto de fórmula general (I) donde $R_1, R_2 = -OC(CH_3)_2O-$ se puede realizar la desprotección del grupo catecol a través de hidrólisis ácida con ácido clorhídrico en medio acuoso para la obtención del compuesto de fórmula general (I) $R_1=R_2=OH$



En el caso de un compuesto de fórmula general (I) donde $R_1 = -O-CH_2-O-CH_3$, $R_2 = H$ o OR_6 donde R_6 es un grupo alquilino C1-C6, se puede realizar la desprotección del grupo fenol a través de hidrólisis ácida con ácido clorhídrico en una mezcla de agua/isopropanol para la obtención del compuesto de fórmula general (I) $R_1 = OH$, $R_2 = H$ o OR_6 donde R_6 es un grupo alquilino C1-C6.



En otro aspecto la presente invención se refiere al uso de al menos un compuesto de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad o trastorno alimentario.

En otro aspecto la presente invención se refiere al uso de al menos un compuesto de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad mediada por el receptor cannabinoide CB_1 y/o para la inhibición de la oxidación de LDL.

Preferiblemente los desórdenes o trastornos de la alimentación se seleccionan de la lista que comprende: obesidad, anorexia, disfunción lipídica, diabetes, enfermedades cardiovasculares y síndrome metabólico.

Adicionalmente el compuesto de fórmula (I) se usa para reducir la grasa subcutánea y/o para la inducción de saciedad y control de la ingesta.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1 – Experimento de ingesta aguda con (Z)-1-(2-feniletoksi)octadec-9-eno (Ia).

Figura 2 – Experimento de ingesta aguda con (Z)-1-(2-(4-hidroxifenil)etoksi)octadec-9-eno (Ib).

Figura 3 – Experimento de ingesta aguda con ((Z)-1-(2-(3,4-metilendioxfenil)etoksi)octadec-9-eno (Ic).

Figura 4 – Experimento de ingesta aguda con (Id) (Z)-1-(2-(3,4-dihidroxifenil)etoksi)octadec-9-eno (Id).

Figura 5 – Experimento de ingesta aguda con (9Z,12Z)-1-(2-feniletoksi)-octadeca-9,12-dieno (Ie).

Figura 6 – Experimento de ingesta aguda con (9Z,12Z)-1-(2-(4-hidroxifenil)etoksi)-octadeca-9,12-dieno (If).

Figura 7 – Experimento de ingesta aguda con (9Z,12Z)-1-(2-(3,4-metilendioxfenil)etoksi)-octadeca-9,12-dieno (Ig).

Figura 8 – Experimento de ingesta aguda con (9Z,12Z)-1-(2-(3,4-dihidroxifenil)etoksi)-octadeca-9,12-dieno (Ih).

Figura 9 – Ensayo ligando receptor con (Z)-1-(2-feniletoksi)octadec-9-eno (Ia).

Figura 10 – Ensayo ligando receptor con (Z)-1-(2-(3,4-dihidroxifenil)etoksi)octadec-9-eno (Id).

Figura 11 – Ensayo ligando receptor con (9Z,12Z)-1-(2-(3,4-metilendioxfenil)etoksi)-octadeca-9,12-dieno (Ih).

Figura 12 – Ensayo ligando receptor con (9Z,12Z)-1-(2-(3,4-dihidroxifenil)etoksi)-octadeca-9,12-dieno (Ii).

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

A continuación se muestran una serie de ejemplos que en todo momento se exponen para ilustrar la síntesis de algunos compuestos particulares de la presente invención y para ejemplificar los procedimientos generales. De acuerdo con lo anterior, la siguiente sección de ejemplos no tiene, en ningún modo, la intención de limitar el alcance de la invención contemplada en la presente memoria descriptiva.

En esta memoria descriptiva los símbolos y convenciones usados en estos procedimientos, esquemas y ejemplos son consistentes con los usados en el Sistema Internacional y la bibliografía científica contemporánea, por ejemplo, el Journal of Medicinal Chemistry. Salvo que se indique otra cosa, todos los materiales de partida se obtuvieron de proveedores comerciales y se usaron sin purificación adicional. Específicamente, se pueden usar las siguientes abreviaturas en los ejemplos y a lo largo de toda la memoria descriptiva: g (gramos); mg (miligramos); kg (kilogramos); μ g (microgramos); L (litros); mL (mililitros); μ L (microlitros); mmol (milimoles); mol (moles); °C (grados Celsius); Hz (hertzio); MHz (megahertzio); δ (desplazamiento químico); s (singlete); d (doblete); t (triplete); q (cuartete); m (multiplete); RMN (resonancia magnética nuclear); M (molar); DMSO (dimetilsulfóxido); PBS (solución reguladora de pH fosfato salino), MOMCl (metil clorometiléter).

Todos los reactivos y disolventes usados, salvo cuando se ha indicado, se obtuvieron de proveedores comerciales y fueron utilizados sin ninguna purificación previa. Todos los análisis de RMN de ^1H y ^{13}C fueron realizadas con espectrómetros Varian Anova 500 y Varian Mercury 400. El progreso de todas las reacciones fue monitorizado por CCF (cromatografía de capa fina) en hojas de aluminio con una capa de gel de sílice 60 (HF-254, Merck), con un grosor de 0,25 mm.

Ejemplo 1. Preparación del yoduro de oleilo.

En un balón de reacción equipado con agitador magnético se adicionó yodo (11.8 mmol), trifenilfosfina (12.6 mmol), imidazol (26.5 mmol) y THF (20 mL). Sobre la mezcla a 4 °C se adicionó lentamente alcohol oleico (11.2 mmol) en THF (5 mL) y se mantuvo la reacción agitando a temperatura ambiente por 48 horas. La reacción fue monitorizada por CCF. El THF fue eliminado a presión reducida y el producto fue purificado por cromatografía de columna flash usando hexano como eluyente.

El producto fue obtenido como un aceite transparente con un rendimiento de 83%. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 6.84$ Hz, 3H), 1.19-1.46 (m, 22H), 1.76-1.88 (m, 2H), 1.97-2.05 (m, 4H), 3.19 (t, $J = 7.05$ Hz, 2H), 5.29-5.41 (m, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.35, 14.13, 22.69, 27.15, 27.21, 28.51, 29.17, 29.31, 29.32, 29.52, 29.69, 29.76, 30.49, 31.90, 33.54, 129.74, 129.99. IR (KBr): $\nu = 3003, 2924, 2853, 1464, 722$ cm^{-1} .

Ejemplo 2. Preparación del yoduro de linoleilo.

Este compuesto fue sintetizado como se ha descrito en el **ejemplo 1** utilizando los mismos reactivos de partida y las mismas cantidades molares sustituyendo el alcohol oleico por alcohol linoleico.

El producto fue obtenido como un aceite transparente con un rendimiento del 71%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 6.53$ Hz, 3H), 1.20-1.47 (m, 16H), 1.74-1.88 (m, 2H) 1.98-2.12 (m, 4H), 2.77 (t, $J = 6.36$ Hz, 2H), 3.19 (t, $J = 7.05$ Hz, 2H), 5.27-5.44 (m, 4H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.36, 14.09, 22.58, 25.62, 27.18, 28.50, 29.17, 29.30, 29.34, 29.59, 30.48, 31.53, 33.53, 127.88, 128.02, 130.05, 130.21. IR (KBr): $\nu = 3008, 2926, 2854, 1464, 1179, 730, 631\text{ cm}^{-1}$.

Ejemplo 3. Preparación del éster metílico del ácido 3,4-(dimetilmetilendioxi)fenilacético.

En un balón de reacción equipado con un aparato de Dean-Stark y agitador magnético se adicionó ácido dihidroxifenilacético (11,9 mmols), ácido *p*-toluensulfónico (1,2 mmol), 2,2-dimetoxipropano (69,2 mmol) y tolueno (30 mL). La mezcla fue agitada durante 24 horas a temperatura de reflujo. La fase orgánica fue lavada con agua destilada (x2) y salmuera y evaporada hasta sequedad. El producto fue purificado por cromatografía de columna flash usando como eluyente acetato de etilo/hexano.

El producto fue obtenido como un aceite transparente con un rendimiento del 94%. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.66 (s, 6H), 3.52 (s, 2H), 3.69 (s, 3H), 6.64-6.71 (m, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 25.85, 40.80, 52.01, 108.04, 109.44, 117.94, 121.70, 146.51, 147.55, 172.25. IR (KBr): $\nu = 2990, 2952, 1740, 1498, 1255, 981, 838\text{ cm}^{-1}$.

Ejemplo 4. Preparación de 2-(3,4-(dimetilmetilendioxi)fenil)etanol.

En un balón de reacción equipado con agitador magnético y con refrigeración a 4 °C se adicionó el éster metílico del ácido 3,4-(dimetilmetilendioxi)fenilacético (5,6 mmol), NaBH_4 (13,2 mmol) y THF (100 mL) y sobre esta mezcla se añadió lentamente yodo (5,6 mmol) disuelto en THF (20 mL). La mezcla fue agitada durante 24 horas a temperatura de reflujo. La reacción fue monitorizada por CCF. El THF fue eliminado a presión reducida y el residuo disuelto en acetato

de etilo. La fase orgánica fue lavada con agua destilada (x2) y salmuera y evaporada a sequedad. El producto fue purificado por cromatografía de columna flash usando como eluyente acetato de etilo/hexano.

El producto fue obtenido como un aceite amarillo con un rendimiento del 72%. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.69 (s, 6H), 2.77 (t, $J = 6.47$ Hz, 2H), 3.81 (t, $J = 6.07$ Hz, 2H), 6.62-6.74 (m, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 25.83, 38.85, 63.75, 108.08, 109.06, 117.71, 121.23, 131.36, 145.99, 147.57. IR (KBr): $\nu = 3370, 2989, 2937, 2872, 1739, 1498, 1445, 1255, 1046, 981, 839, 807$ cm^{-1} .

Ejemplo 5. Preparación de 2-(4-(metoximetoxi)fenil)etanol.

En un balón de reacción equipado con agitador magnético se adicionó tirosol (0,26 mmol), MOMCl (3,51 mmol), bromuro de tetrabutilamonio (0,15 mmol), diclorometano (6 mL) y NaOH 30% aq. (6 mL). La mezcla fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente. La reacción fue monitorizada por CCF. La fase orgánica fue separada y lavada con agua destilada (x29) y salmuera y evaporada a sequedad. El producto fue purificado por cromatografía de columna flash usando como eluyente acetato de etilo/hexano.

El producto fue obtenido como un sólido blanco con un rendimiento del 65%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.79 (s, 1H), 2.80 (t, $J = 6.57$ Hz, 2H), 3.47 (s, 3H), 3.80 (t, $J = 6.60$ Hz, 2H), 5.15 (s, 2H), 6.99 (d, $J = 8.48$ Hz, 2H), 7.14 (d, $J = 8.40$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 38.24, 55.85, 63.66, 94.39, 116.33, 129.92, 131.77, 155.75. IR (KBr): $\nu = 3404, 2937, 2827, 1612, 1513, 1233, 1199, 1152, 1110, 1079, 1008, 922, 825$ cm^{-1} .

Ejemplo 6. Preparación de (Z)-1-(2-(3,4-(dimetilmetilendioxi)fenil)etoxi)octadec-9-eno.

En un balón de reacción equipado con agitador magnético se adicionó 2-(3,4-(dimetilmetilendioxi)fenil)-etanol (0,6 mmol), yoduro de oleilo (1,32 mmol), bromuro de tetrabutilamonio (0,16 mmol), KOH 30% aq. (10 mL) y tolueno (10 mL) y la mezcla fue calentada a reflujo durante 48 horas. La reacción fue

monitorizada por CCF. La fase orgánica fue separada y lavada con agua destilada (x2) y salmuera y evaporada a sequedad. El producto fue purificado por cromatografía de columna cromatográfica usando como eluyente acetato de etilo/hexano.

El producto fue obtenido como un aceite transparente con un rendimiento del 30%. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 6.21$ Hz, 3H), 1.20-1.39 (m, 22H), 1.47-1.62 (m, 2H), 1.66 (s, 6H), 1.96-2.07 (m, 4H), 2.79 (t, $J = 7.28$ Hz, 2H), 3.42 (t, $J = 6.72$ Hz, 2H), 3.57 (t, $J = 7.32$ Hz, 2H), 5.30-5.40 (m, 2H), 6.57-6.68 (m, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.12, 22.66, 25.84, 26.16, 27.21, 28.98, 29.25, 29.46, 29.49, 29.73, 31.79, 36.05, 71.06, 72.06, 107.90, 109.14, 117.52, 121.02, 129.84, 129.91, 132.09, 145.69, 147.30. IR (KBr): $\nu = 2927, 2854, 1736, 1653, 1498, 1445, 1475, 1253, 1234, 1113$ cm^{-1} .

Ejemplo 7. (Z)-1-(2-(3,4-metilendioxi)fenil)etoxi)octadec-9-eno.

Este compuesto fue sintetizado como se ha descrito en el **ejemplo 6** utilizando los mismos reactivos de partida y las mismas cantidades molares sustituyendo el 2-(3,4-(dimetilmetilendioxi)fenil)etanol por 2-(3,4-metilendioxi)fenil)etanol.

El producto fue obtenido como un aceite transparente con un rendimiento del 35%. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 5.79$ Hz, 3H), 1.19-1.40 (m, 22H), 1.49-1.65 (m, 2H), 1.95-2.07 (m, 4H), 2.80 (t, $J = 7.12$ Hz, 2H), 3.42 (t, $J = 6.63$ Hz, 2H), 3.57 (t, $J = 7.16$ Hz, 2H), 5.27-5.42 (m, 2H), 5.92 (s, 2H), 6.66 (d, $J = 7.99$ Hz, 1H), 6.70-6.77 (m, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.12, 22.68, 26.16, 29.19, 29.25, 29.32, 29.45, 29.49, 29.52, 29.70, 29.76, 31.90, 36.04, 71.08, 71.93, 100.74, 108.10, 109.35, 121.66, 129.83, 129.91, 132.88, 145.81, 147.45. IR (KBr): $\nu = 2924, 2854, 1506, 1490, 1246, 1113, 1042, 940, 639$ cm^{-1} .

Ejemplo 8. Preparación de (Z)-1-(2-feniletoksi)octadec-9-eno.

Este compuesto fue sintetizado como se ha descrito en el **ejemplo 6** utilizando los mismos reactivos de partida y las mismas cantidades molares sustituyendo el 2-(3,4-(dimetilmetilendioxi)fenil)etanol por 2-feniletanol.

El producto fue obtenido como un aceite transparente con un rendimiento del 20%. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.89 (t, $J = 6.09$ Hz, 3H), 1.21-1.40 (m, 22H), 1.51-1.64 (m, 2H), 1.95-2.13 (m, 4H), 2.89 (t, $J = 7.28$ Hz, 2H), 3.43 (t, $J = 6.68$ Hz, 2H), 3.63 (t, $J = 7.34$ Hz, 2H), 5.29-5.42 (m, 2H) 7.15-7.36 (m, 5H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.12, 22.68, 26.15, 27.19, 29.24, 29.32, 29.45, 29.49, 29.52, 29.71, 29.76, 31.90, 36.37, 71.07, 71.79, 126.09, 128.27, 128.87, 129.82, 129.90, 139.03. IR (KBr): $\nu = 2924, 2854, 2358, 1699, 1113, 747, 639$ cm^{-1} .

Ejemplo 9. Preparación de (9Z,12Z)-1-(2-(3,4-(dimetilmetilendioxi)fenil)etoksi)octadec-9,12-dieno.

Este compuesto fue sintetizado como se ha descrito en el **ejemplo 6** utilizando los mismos reactivos de partida y las mismas cantidades molares sustituyendo el yoduro de oleilo por yoduro de linoleilo.

El producto fue obtenido como un aceite transparente con rendimiento del 53%. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.89 (t, $J = 6.51$ Hz, 3H), 1.22-1.42 (m, 20H), 1.50-1.62 (m, 2H), 1.66 (s, 6H), 2.00-2.11 (m, 4H), 2.72-2.85 (m, 4H), 3.42 (t, $J = 6.51$ Hz, 2H), 3.57 (t, $J = 7.31$ Hz, 2H) 5.26-5.48 (m, 4H), 6.58-6.67 (m, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.07, 22.57, 25.61, 25.82, 26.16, 26.18, 27.18, 27.21, 29.25, 29.34, 29.45, 29.49, 29.65, 29.71, 29.77, 31.51, 36.04, 70.95, 71.04, 72.05, 107.89, 109.13, 117.49, 121.00, 127.93, 130.11, 130.16, 132.08, 145.69, 147.29. IR (KBr): $\nu = 3009, 2927, 2855, 1499, 1253, 1234, 1113, 980$ cm^{-1} .

Ejemplo 10. Preparación de (9Z,12Z)-1-(2-(3,4-metilendioxifenil)etoxi)-octadeca-9,12-dieno

Este compuesto fue sintetizado como se ha descrito en el **ejemplo 6** utilizando los mismos reactivos de partida y las mismas cantidades molares sustituyendo el 2-(3,4-(dimetilmetilendioxifenil)etanol por 2-(3,4-metilendioxifenil)etanol y el yoduro de oleilo por yoduro de linoleilo.

El producto fue obtenido como un aceite transparente con rendimiento del 23%. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.89 (t, $J = 6.42$ Hz, 3H), 1.22-1.42 (m, 20H), 1.49-1.64 (m, 2H), 1.98-2.12 (m, 2H), 2.72-2.85 (m, 4H), 3.42 (t, $J = 6.65$ Hz, 2H), 3.57 (t, $J = 7.21$ Hz, 2H), 5.26-5.46 (m, 4H), 5.92 (s, 2H), 6.62-6.78 (m, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.08, 22.57, 25.61, 26.15, 27.19, 28.58, 29.25, 29.34, 29.45, 29.49, 29.66, 31.52, 36.04, 38.34, 71.08, 71.93, 100.74, 108.10, 109.35, 121.66, 127.90, 127.94, 130.13, 130.18, 132.88, 145.81, 147.57. IR (KBr): $\nu = 2927, 2855, 1741, 1489, 1246, 1113, 1043$ cm^{-1} .

Ejemplo 11. Preparación de (9Z,12Z)-1-(2-feniletoksi)-octadeca-9,12-dieno.

Este compuesto fue sintetizado como se ha descrito en el **ejemplo 6** utilizando los mismos reactivos de partida y las mismas cantidades molares sustituyendo el 2-(3,4-(dimetilmetilendioxifenil)etanol por 2-feniletanol y el yoduro de oleilo por yoduro de linoleilo.

El producto fue obtenido como un aceite transparente con rendimiento del 27,0%. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.89 (t, $J = 6.80$ Hz, 3H), 1.15-1.44 (m, 20H), 1.49-1.67 (m, 2H), 1.99-2.10 (m, 4H), 2.78 (t, $J = 6.10$ Hz, 2H), 2.89 (t, $J = 7.30$ Hz, 2H), 3.34-3.52 (m, 2H), 3.62 (t, $J = 7.30$ Hz, 2H), 5.27-5.46 (m, 4H), 7.14-7.41 (m, 5H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.06, 22.57, 25.61, 26.17, 27.19, 27.22, 29.25, 29.34, 29.44, 29.49, 29.66, 29.71, 31.52, 36.37, 71.07, 71.80, 126.10, 127.90, 127.94, 128.28, 128.87, 130.13, 130.18, 139.03. IR (KBr): $\nu = 3009, 2927, 2855, 2361, 1738, 1455, 1115, 698$ cm^{-1} .

Ejemplo 12. Preparación de (Z)-1-(2-(4-(metoximetoxi)fenil)etoxi)octadec-9-eno.

Este compuesto fue sintetizado como se ha descrito en el **ejemplo 6** utilizando los mismos reactivos de partida y las mismas cantidades molares sustituyendo el 2-(3,4-(dimetilmetilendioxi)fenil)etanol por 2-(4-(metoximetoxi)fenil)etanol.

El producto fue obtenido como un aceite transparente con rendimiento del 30%. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.88 (t, J = 6.45 Hz, 3H), 1.20-1.41 (m, 22H), 1.48-1.68 (m, 2H), 1.93-2.11 (m, 4H), 2.83 (t, J = 7.27 Hz, 2H), 3.42 (t, J = 6.70 Hz, 2H), 3.47 (s, 3H), 3.58 (t, J = 7.34 Hz, 2H), 5.15 (s, 2H), 5.27-5.43 (m, 2H), 6.96 (d, J = 8.56 Hz, 2H), 7.14 (d, J = 8.46 Hz, 2H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.11, 22.67, 26.15, 27.19, 29.24, 29.31, 29.45, 29.48, 29.51, 29.71, 29.74, 31.89, 35.49, 55.88, 71.06, 71.95, 94.50, 116.14, 129.82, 129.90, 132.44, 155.60. IR (KBr): ν = 2925, 2853, 1613, 1511, 1465, 1233, 1153, 1114, 1080, 1010, 924 cm⁻¹.

Ejemplo 13. Preparación de (9Z,12Z)-1-(2-(4-(metoximetoxi)fenil)etoxi)octadeca-9,12-dieno.

Este compuesto fue sintetizado como se ha descrito en el **ejemplo 6** utilizando los mismos reactivos de partida y las mismas cantidades molares sustituyendo el 2-(3,4-(dimetilmetilendioxi)fenil)etanol por 2-(4-(metoximetoxi)fenil)etanol y el yoduro de oleilo por yoduro de linoleilo.

El producto fue obtenido como un aceite transparente con un 20,0% de rendimiento. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.88 (t, J = 6.53 Hz, 3H), 1.18-1.44 (m, 20H), 1.50-1.62 (m, 2H), 1.98-2.11 (m, 4H), 2.77 (t, J = 6.19 Hz, 2H), 2.83 (t, J = 7.26 Hz, 2H), 3.42 (t, J = 6.67 Hz, 2H), 3.47 (s, 3H), 3.58 (t, J = 7.32 Hz, 2H), 5.15 (s, 2H), 5.27-5.46 (m, 8H), 6.96 (d, J = 8.48 Hz, 2H), 7.14 (d, J = 8.23 Hz, 2H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.08, 22.57, 25.61, 26.16, 27.19, 27.22, 29.25, 29.34, 29.45, 29.49, 29.65, 29.72, 31.52, 35.50, 55.91, 71.06, 71.96, 94.51, 116.15, 127.90, 127.93, 129.83, 130.13, 130.18, 132.44,

155.60. IR (KBr): $\nu = 3008, 2927, 2854, 1511, 1233, 1153, 1113, 1080, 1010$ cm^{-1} .

Ejemplo 14. Preparación de (Z)-1-(2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi)octadec-9-eno.

En un balón de reacción equipado con agitador magnético se adicionó (Z)-1-(2-(3,4-(dimetilmetilendioxi)fenil)etoxi)octadec-9-eno (0,26 mmol) y HCl 6N aq. (5 mL) y la mezcla fue calentada a reflujo durante 24 horas. La reacción fue monitorizada por CCF. La fase orgánica fue separada y lavada con agua destilada (x2) y salmuera y evaporada a sequedad. El producto fue purificado por cromatografía de columna flash usando como eluyente acetato de etilo/hexano.

El producto fue obtenido como un aceite transparente con rendimiento del 50,7%. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 6.91$ Hz, 3H), 1.18-1.38 (m, 20H), 1.51-1.62 (m, 2H), 1.97-2.04 (m, 4H), 2.76 (t, $J = 7.14$ Hz, 2H), 3.46 (t, $J = 6.83$ Hz, 2H), 3.62 (t, $J = 7.16$ Hz, 2H), 5.30-5.41 (m, 2H), 5.63 (bs, 1H), 5.86 (bs, 1H), 6.59-6.63 (m, 1H), 6.68 (d, $J = 1.66$ Hz, 1H), 6.72 (d, $J = 8.03$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.12, 22.68, 26.07, 27.19, 29.23, 29.31, 29.42, 29.48, 29.51, 29.74, 29.75, 31.89, 35.41, 71.18, 71.93, 115.20, 115.85, 121.00, 129.82, 129.93, 131.57, 142.03, 143.58. IR (KBr): $\nu = 3394, 2922, 2854, 1606, 1520, 1465, 1446, 1279, 1193, 1113, 1092$ cm^{-1} .

Ejemplo 15. Preparación de (9Z,12Z)-1-(2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi)-octadeca-9,12-dieno.

Este compuesto fue sintetizado como se ha descrito en el **ejemplo 14** utilizando los mismos reactivos de partida y las mismas cantidades molares sustituyendo el (Z)-1-(2-(3,4-(dimetilmetilendioxi)fenil)etoxi)octadec-9-eno por (9Z,12Z)-1-(2-(3,4-(dimetilmetilendioxi)fenil)etoxi)octadec-9,12-dieno.

El producto fue obtenido como un aceite transparente con rendimiento del 27,0%. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.89 (t, $J = 6.96$ Hz, 3H), 1.22-1.42

(m, 20H), 1.50-1.62 (m, 2H), 1.96-2.12 (m, 4H), 2.72-2.82 (m, 4H), 3.42 (t, $J = 6.71$ Hz, 2H), 3.58 (t, $J = 7.21$ Hz, 2H), 4.99 (bs, 1H), 5.13 (bs, 1H), 5.27-5.45 (m, 4H), 6.61-6.70 (m, 1H), 6.71-6.81 (m, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.07, 22.56, 25.60, 26.04, 27.17, 27.20, 29.23, 29.33, 29.40, 29.47, 29.63, 31.50, 35.37, 71.17, 71.93, 115.19, 115.84, 120.94, 127.89, 127.95, 130.12, 130.19, 131.44, 142.09, 143.63. IR (KBr): $\nu = 3386, 3009, 2935, 2856, 1606, 1520, 1446, 1375, 1279, 1113, 811, 723\text{ cm}^{-1}$.

Ejemplo 16. Preparación de (Z)-1-(2-(4-hidroxifenil)etoxi)octadec-9-eno.

En un balón de reacción equipado con agitador magnético se adicionó (Z)-1-(2-(4-(metoximethoxi)fenil)etoxi)octadec-9-eno (0,17 mmol), isopropanol (5 mL) y HCl 6N aq. (2 mL). La mezcla fue calentada a reflujo durante 24 horas. La reacción fue monitorizada por CCF. La fase orgánica fue separada y lavada con agua destilada (x2) salmuera y evaporada a sequedad. El producto fue purificado por cromatografía de columna flash usando como eluyente acetato de etilo/hexano.

El producto fue obtenido como un aceite transparente con rendimiento del 97,8%. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 6.13$ Hz, 3H), 1.20-1.42 (m, 22H), 1.50-1.65 (m, 2H), 1.94-2.09 (m, 4H), 2.82 (t, $J = 7.24$ Hz, 2H), 3.45 (t, $J = 6.75$ Hz, 2H), 3.60 (t, $J = 7.32$ Hz, 2H), 5.29-5.38 (m, 2H), 5.40 (s, 1H), 6.73 (d, $J = 8.45$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 8.32$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.12, 22.67, 26.10, 27.19, 29.23, 29.31, 29.42, 29.47, 29.51, 29.60, 29.74, 29.75, 31.89, 35.33, 71.12, 72.06, 115.16, 129.83, 129.93, 130.80, 154.05. IR (KBr): $\nu = 3373, 2924, 2854, 1614, 1516, 1464, 1236, 1190, 829\text{ cm}^{-1}$.

Ejemplo 17. Preparación de (9Z,12Z)-1-(2-(4-hidroxifenil)etoxi)-octadeca-9,12-dieno.

Este compuesto fue sintetizado como se ha descrito en el **ejemplo 16** utilizando los mismos reactivos de partida y las mismas cantidades molares

sustituyendo el (Z)-1-(2-(4-(metoximetoxi)fenil)etoxi)octadec-9-eno por (9Z,12Z)-1-(2-(4-(metoxymetoxi)fenil)etoxi)octadeca-9,12-dieno.

El producto fue obtenido como un aceite transparente con rendimiento del 89,0%. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.89 (t, $J = 6.30$ Hz, 3H), 1.20-1.42 (m, 20H), 1.51-1.63 (m, 2H), 1.99-2.09 (m, 4H), 2.73-2.87 (m, 4H), 3.44 (t, $J = 6.75$ Hz, 2H), 3.59 (t, $J = 7.33$ Hz, 2H), 5.26-5.46 (m, 4H), 6.74 (d, $J = 8.46$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 8.43$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.08, 22.56, 25.60, 26.10, 27.18, 27.21, 29.23, 29.33, 29.42, 29.47, 29.62, 29.64, 31.51, 35.35, 71.09, 72.06, 115.15, 127.89, 127.93, 129.93, 130.12, 130.18, 130.83, 154.05. IR (KBr): $\nu = 3361, 2927, 2855, 1516, 1111, 829$ cm^{-1} .

Ejemplo 18. Ensayo de ligando receptor.

El ensayo ligando receptor para el receptor CB_1 , evalúa la capacidad de los compuestos sintetizados de desplazar al [^3H] SR141716 (conocido ligando con afinidad por receptor CB_1) en un homogenizado de cerebelo de rata.

La prueba de ensayo ligando receptor fue realizada usando el antagonista CB_1 marcado [^3H] SR141716. En cada tubo fueron adicionados 450 μL de solución reguladora de pH A (50 mM Tris pH=7.4 con 0.5 % de albúmina de suero bovino (BSA)), 100-200 μg de membranas de cerebelo de ratas, el producto diluido y el antagonista CB_1 marcado [^3H] SR141716. Después de 60 minutos de incubación a 37 $^\circ\text{C}$, la reacción fue parada con 1 mL de solución reguladora de pH A. La mezcla fue centrifugada a 5000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet lavado con 1 mL más de solución reguladora de pH A, centrifugado y, una vez más, el sobrenadante fue descartado. Se adicionó líquido de centelleo y las muestras fueron leídas en un contador de partículas beta (Liquid Scintillation Analyzer, Tri-Carb 2100 TR, PACKARD, a Packard Bioscience Company). Todos los productos fueron diluidos en solución reguladora de pH B (50 mM Tris pH=7,4 con 0,5 % de 10 albúmina de suero bovino (BSA) y 0,3% de DMSO) en las concentraciones de 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} y 10^{-11} M. Todas las concentraciones de cada

producto fueron leídas por triplicado (Figuras 9 a 12). Los valores calculados de Ki y pKi de los compuestos probados se encuentran en la Tabla 1.

Compuesto	CB1 Ki (M)	CB1 pKi
SR171716	1,15E-009	8,94
Anandamida	1,7E-07 ^a	6,55 ^a
Win55212-2	1,11E-08 ^a	7,95 ^a
la	no hubo afinidad	no hubo afinidad
lc	no hubo afinidad	no hubo afinidad
lg	2,25E-05	4,65
lh	7,49E-06	5,12

Tabla 1

^a valores recogidos en la literatura (*Brit. J. Pharmacol.* **1999** 128:684)

Ejemplo 19. Experimentos *in vivo*.

Todos los experimentos *in vivo* fueron realizados usando ratas Wistar macho de 200-500 g de peso. Los animales fueron alojados en jaulas individuales en una habitación con temperatura (23 °C) y humedad (50 %) controladas con ciclo de luz y oscuridad de 12/12. Los animales disponían de agua y comida *ad libitum* excepto en procedimientos experimentales específicos. Los animales fueron manipulados una vez al día durante los dos días anteriores a las sesiones experimentales. Todos los productos fueron disueltos en una mezcla de DMSO (5%), Tween 60 (5%) / salina (90%) y administrados intraperitonealmente.

Ejemplo 20 - Experimento de ingesta

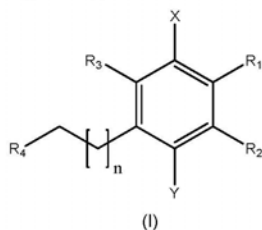
El efecto agudo sobre la ingesta de todos los productos fue ensayado en animales en ayuno de 24 horas.

Treinta minutos después de la inyección la comida previamente pesada fue puesta en la jaula. La comida fue pesada a los 30, 60, 120 y 240 minutos

después del inicio de la prueba. Todos los experimentos de ingesta fueron realizados con grupos de 8 animales (n=8) (Figuras 1 a 8).

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I):



donde

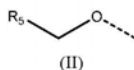
X e Y pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H, halógeno y metilo;

n es un número entero desde 1 a 4;

R₁ y R₂ pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H, OH y alquiloxi C₁-C₆ o los dos (R₁ y R₂) pueden formar parte de un segundo ciclo donde R₁,R₂ = O-Z-O donde Z puede ser un puente de 1 o más átomos de carbono (C₁-C₆) lineal o ramificado.

R₃ se selecciona entre H, alquilo C₁-C₆ y alqueno C₁-C₄;

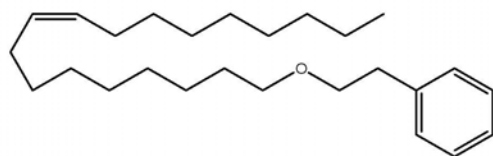
R₄ es un compuesto de fórmula general (II):



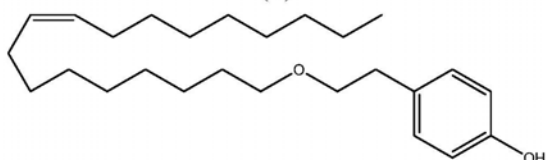
donde:

R₅ es un-alqueno de C₈-C₃₀ o alquilo de C₈-C₃₀; y sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, solvatos y prodrogas del mismo.

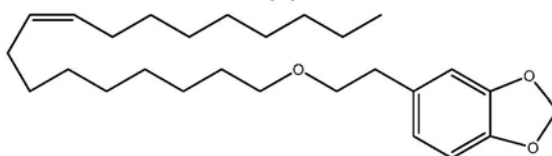
2. Compuesto según la reivindicación 1, seleccionado entre:



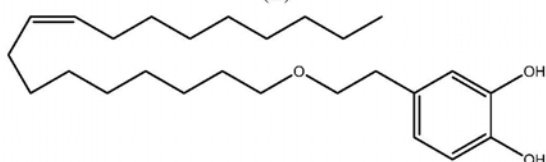
(Ia)



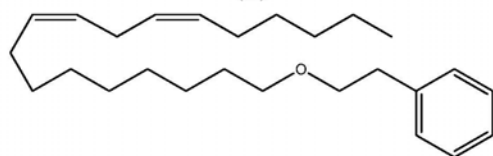
(Ib)



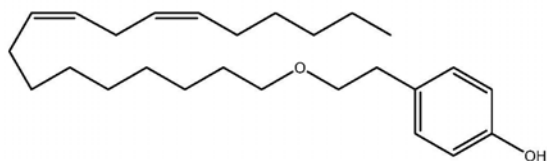
(Ic)



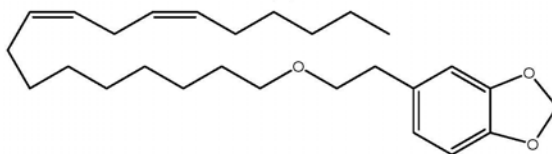
(Id)



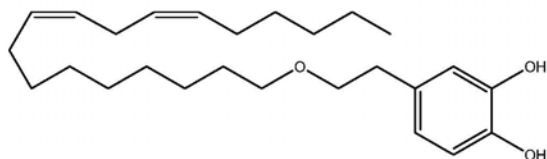
(Ie)



(If)



(Ig)



(Ih)

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para su uso como medicamento.

4. Composición farmacéutica que comprende al menos uno de los compuestos de fórmula (I) como se define en las reivindicaciones 1 a 3, o sus sales, solvatos o prodrogas del mismo, y al menos un transportador farmacéuticamente aceptable, adyuvante y/o vehículo.

5. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, que comprende además otro principio activo.

6. Uso del compuesto de fórmula (I) según reivindicación 1, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad o trastorno de la alimentación.

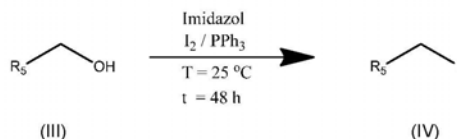
7. Uso del compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 6, para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad mediada por el receptor cannabinoide CB₁ y/o por la inhibición de la oxidación de la LDL.

8. Uso del compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7 donde la enfermedad o trastorno de la alimentación se selecciona de la lista que comprende: obesidad, anorexia, disfunción lipídica, diabetes, enfermedades cardiovasculares y síndrome metabólico.

9. Uso del compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 6 para reducir la grasa subcutánea y/o para la inducción de saciedad y control de la ingesta.

10. Procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula general (I) según la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:

- Obtención del compuesto de fórmula general (IV) a partir del compuesto de fórmula general (III) a través de su reacción con yodo molecular, trifetil fosfina e imidazol.

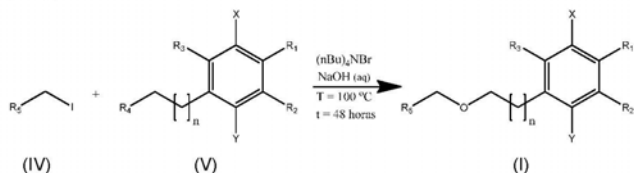


donde

R₅ se selecciona entre alqueno C₈-C₃₀ y alquilo C₈-C₃₀

a. conjugación entre un compuesto de fórmula general (IV) y un compuesto de fórmula general (V), para dar lugar al compuesto de fórmula general (I) usando un sistema bifásico de agua / tolueno con un agente de

transferencia de fase como, por ejemplo, el bromuro de tetrabutilamonio $(nBu)_4NBr$.



donde

X e Y pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H, halógeno y metilo;

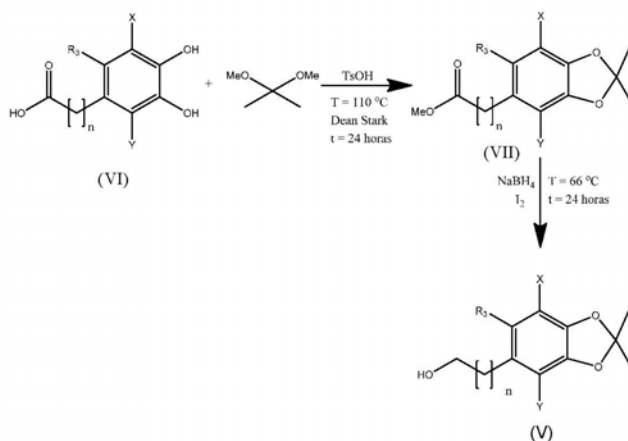
n es un número entero desde 1 a 4;

R_1 y R_2 pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H, OH y alquiloxi C_1-C_6 o los dos (R_1 y R_2) pueden formar parte de un segundo ciclo donde $R_1, R_2 = O-Z-O$ donde Z puede ser un puente de 1 o más átomos de carbono (C_1-C_6) lineal o ramificado.

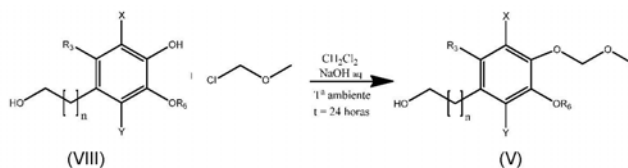
R_3 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_6 y alquenoilo C_1-C_4 ;

- b. separación de las fases;
- c. lavado de la fase orgánica con agua destilada (x2) y con salmuera;
- d. tratamiento de la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro y evaporación del disolvente;
- e. purificación del compuesto de fórmula (I) por cromatografía en columna de gel de sílice flash.

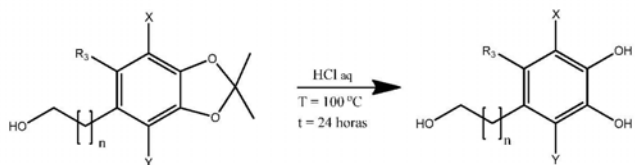
Síntesis del compuesto de fórmula general (V) donde $R_1, R_2 = -OC(CH_3)_2O-$ a partir de la protección del compuesto de fórmula general (VI) originando el compuesto de fórmula general (VII) y posterior reducción de este con $NaBH_4/I_2$ de manera similar al descrito por Gambacorta *et al.* (J Agr. Food Chem. **2007** 55:3386).



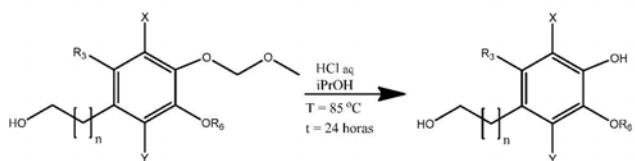
Síntesis de compuesto de fórmula general (V), donde $R_1 = -\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$ o OR_6 donde R_6 es un grupo alquínilo C_1-C_6 , a partir de la protección del compuesto de fórmula general (VIII) con MOMCl en medio bifásico agua / diclorometano usando bromuro de tetrabutilamonio como catalizador de transferencia de fase de manera similar con lo descrito en la literatura (Tetrahedron Lett. **1978** 7:661)



Desprotección del grupo catecol del compuesto de fórmula general (I) donde $R_1, R_2 = -\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$ mediante hidrólisis ácida con ácido clorhídrico en medio acuoso para la obtención del compuesto de fórmula general (I) $R_1=R_2=\text{OH}$



Desprotección del grupo fenol del compuesto de fórmula general (I), donde $R_1 = -O-CH_2-O-CH_3$, o OR_6 donde R_6 es un grupo alquínilo C1-C6, mediante hidrólisis ácida con ácido clorhídrico en una mezcla de agua/isopropanol para la obtención del compuesto de fórmula general (I) $R_1=OH$, $R_2=H$ o OR_6 donde R_6 es un grupo alquínilo C1-C6.



FIGURAS

(1a)

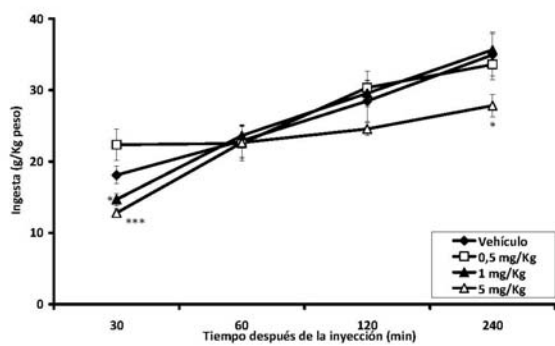


Figura 1

(1b)

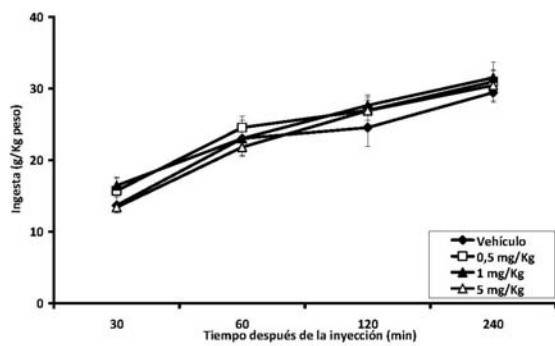


Figura 2

(lc)

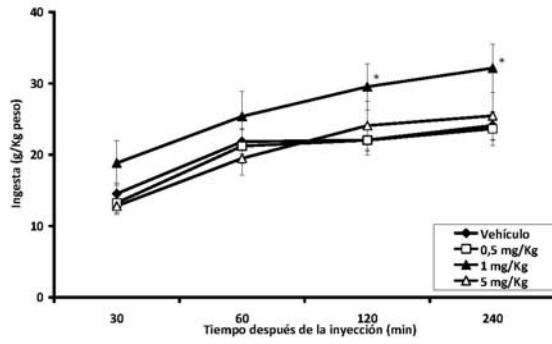


Figura 3

(ld)

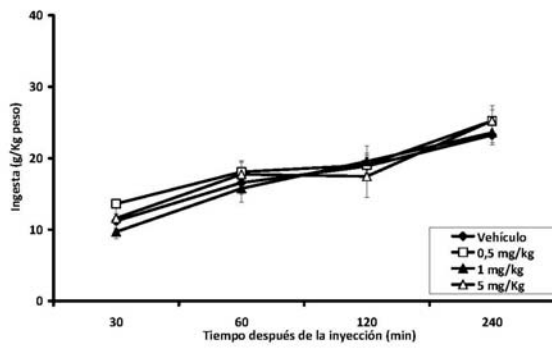


Figura 4

(Ie)

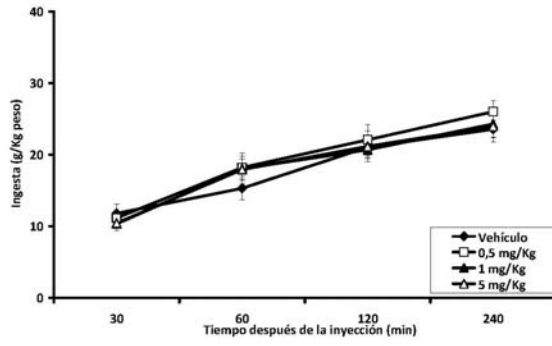


Figura 5

(If)

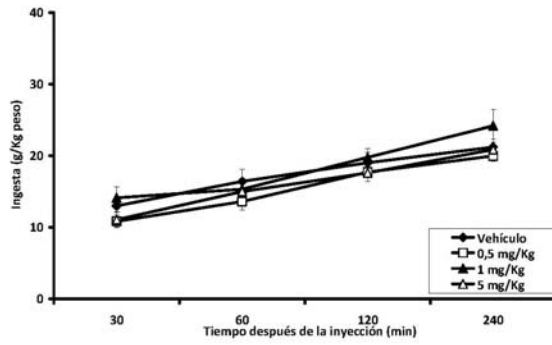


Figura 6

(lg)

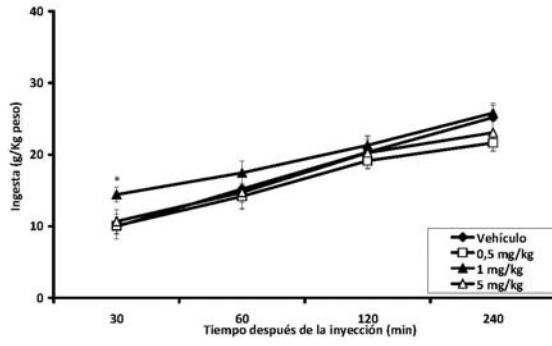


Figura 7

(lh)

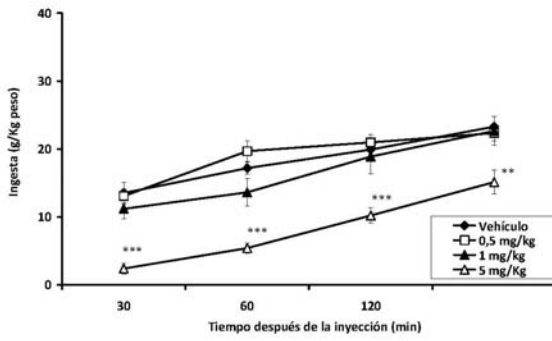


Figura 8

(1a)

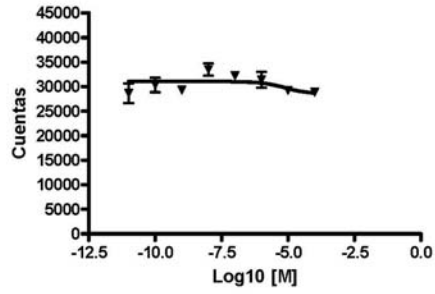


Figura 9

(1c)

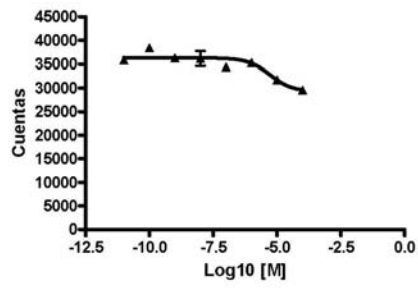


Figura 10

(lg)

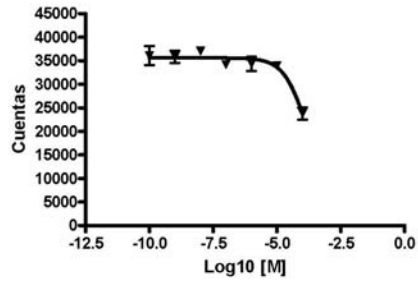


Figura 11

(lg)

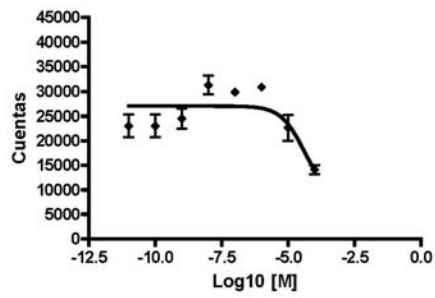


Figura 12

7– DISCUSSION

Chemistry

Three series of fatty acid derivatives of catechol compounds were synthesized:

Group 1

Fatty acid amides of MDMA catechol metabolites were synthesised in “one pot”: The fatty acid carboxylic group was activated with benzyl chloroformate and this intermediate was subsequently treated with the MDMA metabolites.

Group 2

Fatty acid esters of tyrosol, hydroxytyrosol and homovanillic alcohol were synthesised by an already described methodology using lipase Cal B

Group 3

Fatty alcohol ether derivatives of olive oil phenolic compounds. The synthesis of the ethers was done through a conjugation of the iodine derivative of the fatty alcohol and the protected phenolic compounds. As the direct protection of the

catechol with an acetonide group was not feasible due to the formation of an isochromane (Gambacorta **2007**), the protected hydroxytyrosol was prepared in two steps through the reaction of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid with 2,2-dimethoxypropane and subsequent reduction with LiAlH₄ similarly as described by Gambacorta et al (Gambacorta **2007**). The protection of the tyrosol hydroxyl group was done directly through the reaction with MOMCl. The fatty alcohol iodide was prepared through the reaction of the fatty acid alcohol using I₂/PPh₃.

Biology

Several compounds of the synthesised series had LDL antioxidant activity and were acute food intake modulators in 24 hour food-deprived rats and their pharmacodynamics was studied.

Group 1

All products induced a significant decrease in food intake. The most active products displayed an acute food intake modulation profile and potency similar to that of oleoyl ethanolamide (OEA) (a known PPAR- α selective endogenous agonist). The OEA activity is, however, longer lasting (de Fonseca **2001**, Fu **2003**) *meta-O*-methylation of the catechol ring and the *N*-methylation of the amide group are deleterious

with respect to food intake activity. This is an indicative of the importance of the catechol group as pharmacophore. In an open field test using the most potent product it was also observed that it does not affect the locomotion of animals.

A study on the affinity of compounds for the CB₁ receptor and PPAR- α was performed to further evaluate the biological activity of synthesized compounds. The four most active compounds were evaluated for CB₁ and only the HHMA derivative had no activity, indicating that the *N*-methylation is deleterious for the CB₁ receptor affinity. This fact corresponds with the decrease of activity in the food intake test for that compound. When testing the affinity of the compounds for PPAR- α it was observed that one of the most active compounds on food intake did not present PPAR- α activity indicating that, in this case, its food intake modulation activity may be due only to CB₁ receptor interaction. The tested compounds were not inhibitors of FFAH activity.

Group 2

Almost all the compounds showed an increase in the lag time if compared with native LDL. The compounds with greatest improvement in the lag time were the hydroxytyrosol and homovanillyl derivatives. The fact that these compounds presented higher LDL antioxidant activity than hydroxytyrosol could be due to the fact that, having a lipidic chain and

consequently being more lipophilic, could interact better with the lipoprotein than hydroxytyrosol.

The activity of hydroxytyrosol fatty acid esters was expected because those compounds have a catechol group that, in general, is the chemical group considered responsible for the antioxidant activity. The catechol could receive electrons from free radicals and can be converted to a quinone. On the other hand homovanillic derivatives have one hydroxyl of the catechol group protected with a methyl group and, therefore, can not be converted to the quinone. It is hypothesised that the LDL antioxidant activity of homovanillyl derivatives may be mediated by other mechanisms.

The nature of the fatty acid group could be important for the antioxidant activity as the oleic fatty ester of tyrosol presented an activity similar to free hydroxytyrosol but the arachidonic derivative showed no activity.

We can observe that for hydroxytyrosol oleate the LDL antioxidant activity is dose dependent. The increase of the activity among the 0.15, 0.30, 0.5 and 1 μM concentrations being proportionally smaller when compared to the increased activity seen between the 1 and 5 μM .

Group 3

Four of the eight tested compounds had significant activity in the food intake modulation test. Two compounds presented hypophagic effect and the most active had a food intake modulation profile and potency similar to that of oleyl ethanolamide (OEA). In contrast, the two compounds which carry methylenedioxy groups presented a hyperphagic effect at the 1 mg/kg dose but not at 5 mg/kg.

The CB₁ affinity of the four active compounds in the food ingestion test was evaluated. The linoleic alcohol derivatives had CB₁ receptor affinity although with a smaller pKi if compared with endogenous anandamide and synthetic CB₁ ligands as WIN55212-2 and SR141716. Oleic alcohol derivatives had not activity at all.

We can say that both the alkenyl chain and the head group are important pharmacophores for the biological activity of the synthesized compounds. The change of the oleic to linoleic alcohol increased significantly the activity of the hydroxytyrosol derivatives. Furthermore, comparing the linoleic hydroxytyrosol and the linoleic tyrosol ethers, it was observed that the change of the catechol group to a phenol one caused a total lack of biological activity.

8 – CONCLUSIONS

Synthesis

- The fatty amides of MDMA metabolites and the fatty esters of olive oil phenolic compounds were synthesized with simple methodologies and a new methodology was developed for the synthesis of olive oil phenolic compounds fatty alcohol ethers that allows the synthesis of long chain unsaturated compounds.

Biological activity

- Both the fatty acid amides and the fatty alcohol ethers series of compounds presented food intake modulation activity in animal model predominantly as food intake inhibitors.
- The fatty amides and the fatty acid esters series were also good LDL oxidation inhibitors with a similar activity as free hydroxytyrosol.

Pharmacodynamics Study

- Within the fatty acid amide series a number of them displayed affinity for CB₁ receptor similar to the

endocannabinoid anandamide, and some of them for PPAR- α . Thus, the pharmacodynamics of the biologically active compounds could be explained by interactions with those receptors.

- Possibly the pharmacodynamic of the synthesized fatty alcohol derivatives of olive oil phenolic compounds goes through other mechanisms than CB₁ interaction as among the four compounds with modulated food activity, only two displayed CB₁ activity. This CB₁ activity does not justify its whole *in vivo* activity. Further studies should be performed to elucidate the synthesized compounds mechanism of action, as for example studying its PPAR- α affinity and/or TRPV₁ activity.

9 - BIBLIOGRAPHY

Abhiram S; Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance; *Front neuroendocrin* **2004** 24:225-53.

Abood M E, Ditto K E, Noel M A, Showalter V M, Tao Q; Isolation and expression of a mouse CB₁ cannabinoid receptor gene. Comparison of binding properties with those of native CB₁ receptors in mouse brain and N18TG2 neuroblastoma cells; *Biochem Pharmacol* **1997** 53:207-14.

Abourbih S, Filion K B, Joseph L, Schiffrin E L, Rinfret S, Poirier P, Pilote L, Genest J, Eisenberg M J; Effect of fibrates on lipid profiles and cardiovascular outcomes: A systematic review; *Am J Med* **2009** 122:962.e1-8.

Akbas F, Gasteyger C, Sjödin A, Astrup A, Larsen T M; A critical review of the cannabinoid receptor as a drug target for obesity management; *Obes Rev* **2009** 10:58-67.

Alvarado M, Goya P, Macías-González M, Pavón F J, Serrano A, Jagerovic N, Elguero J, Gutiérrez-Rodríguez A, García-Granda S, Suardíaz M, de Fonseca F R; Antiobesity designed multiple ligands: Synthesis of pyrazole fatty acid amides and evaluation as hypophagic agents; *Bioorgan Med Chem* **2008** 16:10098-105.

Andrew D. Watson A D; Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems; *J Lipid Res* **2006** 47:2101-111.

Antel J, Gregory P C, Nordheim U; CB₁ cannabinoid receptor antagonists for treatment of obesity and prevention of comorbid metabolic disorders; *J Med Chem* **2006** 49:4008-16.

Avraham Y, Menachema A B, Okuna A, Zlotarav O, Abel N, Mechoulam R, Berry E M; Effects of the endocannabinoid

noladin ether on body weight, food consumption, locomotor activity, and cognitive index in mice; *Brain Res Bull* **2005** 65:117-23.

Batterham R L, Cowley M A, Small C J, Herzog H, Cohen M A, Dakin C L, Wren A M, Brynes A E, Low M J, Ghatei M A, Cone R D, Bloom S R; Gut hormone PYY3-36 physiologically inhibits food intake; *Nature* **2002** 418:650-654.

Batterham R L, Ffytche D H, Rosenthal J M, Zelaya F O, Barker G J, Withers D J, Williams S C R; PYY modulation of cortical and hypothalamic brain areas predicts feeding behaviour in humans; *Nature* **2007** 450:106-11.

Bezuglov V, Bobrov M, Gretskaya N, Gonchar A, Zinchenko G, Melck D, Bisogno T, Di Marzo V, Kuklev D, Rossi J C, Vidal J P, Durand T; Synthesis and biological evaluation of novel amides of polyunsaturated fatty acids with dopamine; *Bioorg Med Chem Lett* **2001** 11:447-9.

Bishop M J; Approaches to antiobesity therapy. An introduction; *J Med Chem* **2006** 49:3999-4000.

Bisogno T, Melck D, Bobrov M Y, Gretskaya M N, Bezuglov V V, *N*-acyl dopamines : novel synthetic CB₁ cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo *Biochem J* **2000** 351:817-24.

Blüher M; Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant; *Lancet* **2008** 371:555-6.

Blundell J E, Stubbs R J, Golding C, Croden F, Alam R, Whybrow S, Le Noury J, Lawton C L; Resistance and susceptibility to weight gain: Individual variability in response to a high-fat diet; *Physiol Behav* **2005** 86:614-22.

Boggiano, M M, Chandler P C, Oswald K D, Rodgers R J, Blundell J E, Ishii Y, Beattie A H, Holch P, Allison D B, Schindler M, Arndt K, Rudolf K, Mark M, Schoelch C, Joost H G, Klaus S, Thöne-Reineke C, Benoit S C, Seeley R J, Beck-

Sickinger A G, Koglin N, Raun K, Madsen K, Wulff B S, Stidsen C E, Birringer M, Kreuzer O J, Deng X Y, Whitcomb D C, Halem H, Taylor J, Dong J, Datta R, Culler M, Ortmann S, Castañeda T R, Tschöp M; Appetite regulatory peptides. PYY3-36 as an anti-obesity drug target; *Obes Rev* **2005** 6:307-22.

Bramblett R D, A.M. Panu A M, J.A. Ballesteros J A, P.H. Reggio P H; Construction of a 3D model of the cannabinoid CB₁ receptor: Determination of helix ends and helix orientation; *Life Sci* **1995** 56 1971-82.

Bray G A; Obesity: The disease; *J Med Chem* **2006** 49:4001-7.

Bray G A; Use and abuse of appetite-suppressant drugs in the treatment of obesity; *Ann Intern Med* **1993** 119:707-13.

Broberger C; Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks; *J Intern Med* **2005** 258:301-27.

Brüning J C, Gautam D, Burks D J, Gillette J, Schubert M, Orban P C, Klein R, Krone W, Müller-Wieland D, Kahn C R; Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction; *Science* **2000** 289:2122-5

Christensen R, Kristensen P K, Bartels E M, Bliddal H, Astrup A; Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials; *Lancet* **2007** 370:1706-13.

Chu C J, Huang S M, De Petrocellis L, Bisogno T, Ewing S A, Miller J D, Zipkin R E, Daddario N, Appendino G, Di Marzo V, Walker J M; *N*-Oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia; *J. Biol. Chem* **2003** 278:13633-39.

Clark D W J, Harrison-Woolrych M; Sibutramine may be associated with memory impairment; *Brit Med J* **2004** 329:1316.

Colombo G, Agabio R, Diaz G, Lobina C, Reali R, Gessa G L; Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716; *Life Sci* **1998** 63:PL113-PL117.

Cummings D E, Purnell J Q, Frayo R S, Schmidova K, Wisse B E, Weigle D S; A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans; *Diabetes* **2001** 50:1714-19.

Dansinger M L, Gleason J A, Griffith J L, Selker H P, Schaefer E J; Comparison of the Atkins, Ornish, Weight Watchers, and Zone Diets for weight loss and heart disease risk reduction. A randomized trial; *J Am Med Assoc* **2005** 293:43-53.

de Fonseca F R; Navarro M; Gómez R; Escuredo L; Nava F; Fu J; Murillo-Rodríguez E; Giuffrida A; LoVerme J; Gaetani S; Kathuria S; Galk C; Piomelli D; An anorexic lipid mediator regulated by feeding; *Nature* **2001** 414:209-12.

de la Torre R, Farré M; Neurotoxicity of MDMA (ecstasy): the limitations of scaling from animals to humans; *Trends Pharmacol Sci* **2004** 25:505-8.

de la Torre R, Farré M, N, Roset P N, Pizarro N, Abanades S, Segura M, Segura J, Camí J ;Human pharmacology of MDMA. Pharmacokinetics, metabolism, and disposition; *Ther Drug Monit* **2004b** 26:137-44.

Devane W A, Hanus L, Breuer A, Pertwee R G, Stevenson L A, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R; Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor; *Science* **1992** 258:1946-49.

Di Marzo V, Bifulco M, Petrocellis L, The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation; *Nat Rev Drug Discov* **2004** 3:771-84.

Di Marzo V; Matias I; Endocannabinoid control of food intake and energy balance; *Nat Neurosci* **2005**:585-9.

Dodd G T, Mancini G, Lutz B, Luckman S M; The peptide hemopressin acts through CB₁ cannabinoid receptors to reduce food intake in rats and mice; *J Neurosci* **2010** 30:7369–76.

Drewnowski A, Krahn D D, Demitrack M A, Nairn K, Gosnell B A; Naloxone, an opiate blocker, reduces the consumption of sweet high-fat foods in obese and lean female binge eaters; *Am J Clin Nutr* **1995** 61:1206-12.

English P J, Ghatei M A, Malik I A, Bloom S R, Wilding J P H; Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans; *J Clin Endocr Metab* **2002** 87:2984-7.

Evans R M, Barish G D; Wang Y; PPARs and the complex journey to obesity; *Nat Med* **2004** 10:355-61.

Fawcett K A, Barroso I; The genetics of obesity: FTO leads the way; *Trends Genet* **2010** 26:266–74.

Field B C, Chaudhri O B, Bloom S R; Obesity treatment: novel peripheral targets; *Brit J Clin Pharmacol* **2009** 68:830-43.

Fitó M, Cladellas M, de la Torre R, Martí J, Alcántara M, Pujadas-Bastardes M, Marrugat J, Bruguera J, López-Sabater M C, Vila J, Covas M I; members of the SOLOS Investigators; Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial; *Atherosclerosis* **2005** 181:149-58.

Forman B M, Chen J, Evans R M; Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ ; *P Natl Acad Sci USA* **1997** 94:4312-17.

Fu J, Oveisi F, Gaetani S, Lin E, Piomelli D; Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR- α agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats; *Neuropharmacology* **2005** 48:1147-53.

Fu J, Gaetani S, Oveisi F, LoVerme J, Serrano A, de Fonseca F R, Rosengarth A, Lueke H, Giacomo B D, Tarzia G, Piomelli D; Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- α . *Nature* **2003** 425:90-3.

Gambacorta A, Tofani D, Bernini R, Migliorini A; High-yielding preparation of a stable precursor of hydroxytyrosol by total synthesis and from the natural glycoside oleuropein; *J Agr Food Chem*, **2007** 55:3386-91.

Garfield A S, Heisler L K; Pharmacological targeting of the serotonergic system for the treatment of obesity; *J Physiol* **2009** 587:49-60.

Gordon M H, Paiva-Martins F, Almeida M; Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols; *J Agr Food Chem* **2001** 49:2480-5.

Guzmán M; Cannabinoids: Potential anticancer agents; *Nat Rev Cancer* **2003** 3:745-55.

Halford J C G, Boyland E J, Blundell J E, Kirkham T C, Harrold J A; Pharmacological management of appetite expression in obesity; *Nat Rev Endocrinol* **2010** 6:255-69.

Handlon A L, Zhou H; Melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonists for the treatment of obesity; *J Med Chem* **2006** 49:4017-22.

Hansen K B, Knop F K, Holst J J, Vilsbøll T; Treatment of type 2 diabetes with glucagon-like peptide-1 receptor agonists; *Int J Clin Pract* **2009** 63:1154-60.

Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R; 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB₁ receptor; *P Natl Acad Sci USA* **2001** 98:3662-5.

Henke B R; Peroxisome proliferator-activated receptor α/γ dual agonists for the treatment of type 2 diabetes; *J Med Chem* **2004** 47:4118-27.

Hillard C J, Edgemond W S, Jarrahan A, Campbell W B; Accumulation of *N*-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion; *J Neurochem* **1997** 69:631–8.

Huang S M, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayany A, De Petrocellis L; An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR₁ receptors; *P Natl Acad Sci USA* **2002** 99:8400-5

James WP, Caterson ID, Coutinho W, Finer N, Van Gaal LF, Maggioni AP, Torp-Pedersen C, Sharma AM, Shepherd GM, Rode RA, Renz CL; SCOUT Investigators; Effect of sibutramine on cardiovascular outcomes in overweight and obese subjects; *N Engl J Med.* **2010** 363:905-17

Kaczochaa M, Glaserb S T, Deutsch D G; Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide; *P Natl Acad Sci USA* **2009** 106:6375-80.

Kaya A, Aydın N, Topsever P, Filiz M, Öztürk A, Dağar A, Kılınç E, Ekmekcioglu C; Efficacy of sibutramine, orlistat and combination therapy on short-term weight management in obese patients; *Biomed Pharmacother* **2004** 58:582-7.

Kershaw E E, Flier J S; Adipose tissue as an endocrine organ; *J Clin Endocr Metab* **2004** 89:2548-56.

Khymenets O, Fitó M, Touriño S, Muñoz-Aguayo D, Pujadas M, Torres J L, Joglar J, Farré M, Covas M. I, de la Torre R; Antioxidant activities of hydroxytyrosol main metabolites do not contribute to beneficial health effects after olive oil ingestion; *Drug Metab Dispos* **2010** 38:1417-21.

Khymenets O, Joglar J, Clapés P, Parella T, Covas M I, de la Torre R; Biocatalyzed Synthesis and Structural Characterization of Monoglucuronides of Hydroxytyrosol,

Tyrosol, Homovanillic Alcohol, and 3-(4'-Hydroxyphenyl)propanol; *Adv Synth Catal* **2006** 348:2155-62.

Kota B P, Huang T H, Roufogalis B D; An overview on biological mechanisms of PPARs; *Pharmacol Res* **2005** 51:85-94.

Kral T V E, Roe L S, Rolls B J; Combined effects of energy density and portion size on energy: intake in women; *Am J Clin Nutr* **2004** 79:962-8.

Laessle R G, Sonja Lehrke S, Sabine Dückers S; Laboratory eating behavior in obesity; *Appetite* **2009** 49:399-404

le Roux C W, Batterham R L, Aylwin S J B, Patterson M, Borg C M, Wynne K J, Kent A, Vincent R P, Gardiner J, Ghatei M A, Bloom S R; Attenuated peptide YY Release in obese subjects is associated with reduced satiety; *Endocrinology* **2006** 147:3-8.

Luque C A, Rey J A; Sibutramine: a serotonin-norepinephrine reuptake-inhibitor for the treatment of obesity; *Ann Pharmacother* **1999** 33:968-78.

Mackie K; Cannabinoid receptors as therapeutic targets; *Annu Rev Pharmacol* **2006** 46:101-22.

Mateos R, Domínguez M M, Espartero J L, Cert A; Antioxidant effect of phenolic compounds, α -tocopherol, and other minor components in virgin olive oil; *J Agr Food Chem* **2003** 51:7170-5.

Matsuda L A, Lolait S J, Brownstein M J, Young A C, Bonner T I; Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA; *Nature* **1990** 346:561-564.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski N E, Schatz A R, Gopher A, Almog S, Martin B R, Compton D R, Pertwee R G, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z; Identification of an endogenous 2-monoglyceride,

present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors; *Biochem Pharmacol* **1995** 50:83-90.

Miro-Casas E, Covas M I, Farré M, Fito M, Ortuño J, Weinbrenner T, Roset P, de la Torre R; Hydroxytyrosol disposition in humans; *Clin Chem* **2003** 49:945-52.

Ministerio de Sanidad y Política Social – Gobierno de España; "Indicadores Clave del sistema nacional de salud – España" to be found under http://www.msps.es/estadEstudios/estadisticas/sisInfSanSNS/pdf/nivelNacINCLASNS_Diciembre2007.pdf; **2007**.

Morley J E, Flood J F; An investigation of tolerance to the actions of leptogenic and anorexigenic drugs in mice; *Life Sci* **1987** 41:2157-65.

Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S; A role for ghrelin in the central regulation of feeding; *Nature* **2001** 409:194-8.

Nargund R P, Strack A M, Fong T M; Melanocortin-4 receptor (MC4R) agonists for the treatment of obesity; *J Med Chem* **2006** 49:4035-43.

Näslund E, Hellström P M, Kral J G; The gut and food intake: An update for surgeons; *J Gastrointest Surg* **2001** 5:556-67.

Nilsson, B M; 5-Hydroxytryptamine 2C (5-HT_{2C}) receptor agonists as potential antiobesity agents; *J Med Chem* **2006** 49:4023-34.

O'Sullivan S; Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors; *Brit J Pharmacol* **2007** 152:576-82.

Obici S, Feng Z, Karkanias G, Baskin D G, Rossetti L; Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats; *Nat Neurosci* **2002** 5:566-72.

Onaga T, Zabielski R, Kato S; Multiple regulation of peptide YY secretion in the digestive tract; *Peptides* **2002** 23:279-90.

Perfetti X, O'Mathúna B, Pizarro N, Cuyàs E, Khymenets O, Almeida B, Pellegrini M, Pichini S, Lau S S, Monks T J, Farré M, Pascual J A, Joglar J, de la Torre R; Neurotoxic thioether adducts of MDMA identified in human urine after ecstasy ingestion; *Drug Metab Dispos* **2009** 27:1448-55.

Piomelli D, Astarita G, Rapaka R; A neuroscientist's guide to lipidomics; *Nat Rev Neurosci* **2007** 8:743-54.

Piomelli, D; The challenge of brain lipidomics; *Prostag Oth Lipid M* **2005** 77:23-34.

Pi-Sunyer F X, Aronne L J, Heshmati H M, Devin J, Rosenstock J, RIO-North America Study Group; Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial; *J Am Med Assoc* **2006** 295:761-75.

Pizarro N, Ortuño J, Farré M., Hernández-López C, Pujadas, Llebaria A, Joglar J., Roset P N, Mas M, Segura J, Camí J, de la Torre R; Determination of MDMA and its metabolites in blood and urine by gas chromatography–mass spectrometry and analysis of enantiomers by capillary electrophoresis; *J Anal Toxicol*; **2002** 26:157-65.

Plutzky J; Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology and atherosclerosis: Emerging insights for evolving paradigms; *Curr Atheroscler Rep* **2000** 2:327-35

Pournaras D J, Le Roux C W; The effect of bariatric surgery on gut hormones that alter appetite; *Diabetes Metab* **2009** 35:508-12.

Pyper S R, Viswakarma N, Yu S, Reddy J K; PPARalpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer; *Nucl Recept Signal* **2010** 8:DOI:10.1621/nrs.08002 (21 pages).

Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Néliat G, Caput D, Ferrarab P, Soubri P, Brelike J C, Le Fur G; SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor; *FEBS Lett* **1994** 350:240-4.

Sargent B J, Moore N A; New central targets for the treatment of obesity; *Brit J Clin Pharmacol* **2009** 68:852-60.

Schwartz G J, Fu J, Astarita G, Li X, Gaetani S, Campolongo P, Cuomo V, Piomelli D; The lipid messenger OEA links dietary fat intake to satiety; *Cell Metab* **2008** 8:281-288.

Serrano A, Arco I, Pavón F J, Macías M, Perez-Valero V, de Fonseca F R; The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A (Rimonabant) enhances the metabolic benefits of long-term treatment with oleoylethanolamide in Zucker rats; *Neuropharmacology* **2008** 54:226-34.

Smith B M, Smith J M, Tsai J H, Schultz J A, Gilson C A, Estrada S A, Chen R R, Park D M, Prieto E B, Gallardo C S, Sengupta D, Thomsen W J, Saldana H R, Whelan K T, Menzaghi F, Webb R R, Beeley N R A; Discovery and SAR of new benzazepines as potent and selective 5-HT_{2C} receptor agonists for the treatment of obesity; *Bioorg Med Chem Lett* **2005** 15:1467-70

Smith P B, Compton D R, Welch S P, Razdan R K, Mechoulam R, Martin B R; The pharmacological activity of anandamide, a putative endogenous cannabinoid, in mice; *J Pharmacol Exp Ther* **1994** 270:219-27.

Smith S R, Prosser W A, Donahue D J, Morgan M E, Anderson C M, Shanahan W R; APD356-004 Study Group; Lorcaserin (APD356), a selective 5-HT_{2C} agonist, reduces body weight in obese men and women; *Obesity* **2008** 17:494-503.

Stienstra R, Duval C, Müller M, Kersten S; PPARs, obesity, and inflammation; *PPAR Res* **2007** 2007:ID95974 (10 pages).

Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K; 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain; *Biochem Bioph Res Co* **1995** 215 89-97.

Sun Y, Alexander S P H, Kendall D A, Bennett A J; Cannabinoids and PPAR α signaling; *Biochem Soc T* **2006** 34:1095-7.

Suzuki K, Simpson K A, Minnion J S, Shillito J C, Bloom S R; The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation; *Endocr J* **2010** 57:359-72.

Tan B, Bradshaw H B, Rimmerman N, Srinivasan H, Yu Y W, Jocelyn F, Krey J F, Monn M F, Chen J S, Hu S S, Pickens S R, Walker J M; Targeted lipidomics: Discovery of new fatty acyl amides; *AAPS J* **2006** 8:pE461-5 (article54).

Thorleifsson G, Walters G B, Gudbjartsson D F, Steinthorsdottir V, Sulem P, Helgadóttir A, Styrkarsdóttir U, Gretarsdóttir S, Thorlacius S, Jonsdóttir I, Jonsdóttir T, Olafsdóttir E J, Olafsdóttir G H, Jonsson T, Jonsson F, Borch-Johnsen K, Hansen T, Andersen G, Jorgensen T, Lauritzen T, Aben K K, Verbeek A L M, Roeleveld N, Kampman E, Yanek L R, Becker L C, Tryggvadóttir L, Rafnar T, Becker D M, Gulcher J, Kiemeneý L A, Pedersen O, Kong A, Thorsteinsdóttir U, Stefansson K; Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity; *Nat Genet* **2009** 41:18-23

Tschöp M, Smiley D L, Heiman M L; Ghrelin induces adiposity in rodents; *Nature* **2000** 407:908-13.

Van Gaal L F, Rissanen A M, Scheen A J, Ziegler O, Rössner S; RIO-Europe Study Group; Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study; *Lancet* **2005** 365:1389-97.

Visioli F, Bellomo G, Montedoro G, Galli C; Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents; *Atherosclerosis* **1995** 117:25-32.

Vissers M N, Zock P L, Katan M B; Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: A review; *Eur J Clin Nutr* **2004** 58:955-65.

Wenk M R; The emerging field of lipidomics; *Nat Rev Drug Discov* **2005** 4:594-610.

Willer C J, Speliotes E K, Loos R J F, Li S, Lindgren C M, Heid I M, Berndt S I, Elliott A L, Jackson A U, Lamina C, Lettre G, Lim N, Lyon H N, McCarroll S A, Papadakis K, Qi L, Randall J C, Roccascocca R M, Sanna S, Scheet P, N Weedon M N, Wheeler E, Zhao J H, Jacobs L C, Prokopenko I, Soranzo N, Tanaka T, Timpson N J, Almgren P, Bennett A, Bergman R N, Bingham S A, Bonnycastle L L, Brown M, Burtt N P, Chines P, Coin L, Collins F S, Connell J M, Cooper C, Smith G D, Dennison E M, Deodhar P, Elliott P, Erdos M R, Estrada K, Evans D M, Gianniny L, Gieger C, Gillson C J, Guiducci C, Hackett R, Hadley D, Hall A S, Havulinna A S, Hebebrand J, Hofman A, Isomaa B, Jacobs K B, Johnson T, Jousilahti P, Jovanovic Z, Khaw K, Kraft P, Kuokkanen K, Kuusisto J, Laitinen J, Lakatta E G, Luan J, Luben R N, Mangino M, McArdle W L, Meitinger T, Mulas A, Munroe P B, Narisu N, Ness A R, Northstone K, O'Rahilly S, Purmann C, Rees M G, Ridderstrale M, Ring S M, Rivadeneira F, Ruokonen A, Sandhu M S, Saramies J, Scott L J, Scuteri A, Silander K, Sims M A, Song K, Stephens J, Stevens S, Stringham H M, Tung Y C L, Valle T T, Duijn C M V, Vimalaswaran K S, Vollenweider P, Waeber G, Wallace C, Watanabe R M, Waterworth D M, Watkins N, The Wellcome Trust Case Control Consortium, Witteman J C M, Zeggini E, Zhai G, Zillikens M C, Altshuler D, Caulfield M J, Chanock S J, Farooqi I S, Ferrucci L, Guralnik J M, Hattersley A T, Hu F B, Jarvelin M, Laakso M, Mooser V, Ong K K, Ouwehand W H, Salomaa V, Samani N J, Spector T D, Tuomi T, Tuomilehto J, Uda M, Uitterlinden A G, Wareham N J, Deloukas P, Frayling T M, Groop L C, Hayes R B, Hunter D J, Mohlke K L, Peltonen L, Schlessinger D, Strachan D P,

Wichmann H E, McCarthy M I, Boehnke M, Barroso I, Abecasis G R, Hirschhorn J N for the GIANT Consortium; Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation; *Nat Genet* **2009** 41:25-34

Willson T M, Brown P J, Sternbach D D, Henke B R; The PPARs: from orphan receptors to drug discovery; *J Med Chem* **2000** 43:527-50.

Withrow D, Alter D A; The economic burden of obesity worldwide: a systematic review of the direct cost of obesity; *Obesity Reviews* **2010** [Epub ahead of print] doi: 10.1111/j.1467-789X.2009.00712.x.

Woods S C, Lotter E C; McKay L D, Porter Jr D.; Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons; *Nature* **1979** 282:503-5.

World Health Organization (WHO); "Obesity and overweight" to be found under <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>; 2006.

