

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 967 076**

51 Int. Cl.:

C07C 403/02 (2006.01)
C07C 403/10 (2006.01)
C07C 403/20 (2006.01)
C07C 403/24 (2006.01)
A61K 31/07 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2017** **PCT/HU2017/050047**
87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2018** **WO18091937**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2017** **E 17837894 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2023** **EP 3541783**

54 Título: **Compuestos precursores para proporcionar retinoides de la vía de la vitamina a5 y sus usos**

30 Prioridad:

17.11.2016 HU 1600629
05.05.2017 HU 1700196

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.04.2024

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF DEBRECEN (33.3%)
Egyetem tér 1.
4032 Debrecen, HU;
UNIVERSITÉ DE STRASBOURG (33.3%) y
UNIVERSIDADE DE VIGO (33.3%)

72 Inventor/es:

KREZEL, WOJCIECH;
RÜHL, RALPH y
DE LERA, ANGEL R

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 967 076 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos precursores para proporcionar retinoides de la vía de la vitamina a5 y sus usos

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al campo de la señalización del receptor de retinoides X (RXR) y a una nueva vía de la vitamina A denominada vía de la vitamina A5. Se reivindican compuestos útiles para proporcionar ácido (R)-9-*cis*-13,14-dihidro-retinoico (9CDHRA), un ligando endógeno del RXR, así como sus usos y el método para su preparación. Los com-
10 puestos de la invención son útiles para usos farmacéuticos y nutricionales.

Más concretamente, los precursores del 9CDHRA son, entre otros, el 9-*cis*-13,14-dihidroretinol (9CDHROL, vitamina A5) y el 9-*cis*-13,14-dihidro-beta, beta-caroteno (9CDHBC, pro-vitamina A5), que son, respectivamente, nuevos tipos de precursores de retinoides y carotenoides ligandos del RXR. Sorprendentemente, se ha encontrado en el presente
15 documento que dichos precursores pueden ser metabolizados directa o indirectamente a 9CDHRA. La invención también se relaciona con el uso preventivo/farmacéutico de esos compuestos y, en particular, en el tratamiento de comportamientos similares a la depresión en el modelo animal de estrés crónico de la depresión y en diversas enfermedades en las que la señalización mediada por RXR se ve afectada o se ha propuesto como objetivo terapéutico. Tales enfermedades incluyen las neurodegenerativas y metabólicas, las disfunciones cutáneas e inmunológicas (incluida la inflamación), así como las enfermedades cardiovasculares y otras aplicaciones de estilo de vida como los efectos de
20 mejora de la memoria.

Estado de la invención

La vitamina A, en paralelo a la vitamina C y la D, se encontraba entre el primer grupo de compuestos que se asociaron a síntomas de deficiencia. Este lípido activo se denominó posteriormente "vitamina A". En 1931, Karrer et al. identificaron este derivado nutritivo liposoluble en el aceite de hígado de bacalao (1, 2). Paul Karrer, que dilucidó la estructura del retinol (es decir, la vitamina A1), recibió el Premio Nobel de Química por la investigación básica sobre la vitamina A en 1937. Paralelamente, Edisbury et al. (3) y Gilliam et al. (4) encontraron en 1937-38 un factor alimentario presente
30 principalmente en los peces marinos. Utilizaron el término vitamina A2 para denominar a esta segunda categoría de vitamina A, ya que presenta un espectro de absorción diferente al del retinol debido a la presencia de un doble enlace adicional en las posiciones C3-C4 del anillo.

En la década de 1980, la acción molecular de la vitamina A fue ampliada principalmente por los grupos de Pierre Chambon y Ronald Evans a través de la identificación del ácido todo-*trans*-retinoico (ATRA) como el mediador bioactivo de una gran variedad de efectos de la vitamina A. Identificaron el ATRA como una hormona lipídica derivada de los nutrientes y, por tanto, la asociación del ATRA con los RAR (receptores del ácido retinoico) para mediar en la actividad transcripcional (5) y los propios RAR como nuevos miembros de la superfamilia de receptores de hormonas nucleares (6). Además de los RAR, también los receptores de retinoides X (RXRs) (7-9) se identificaron como mediadores de una función importante y se establecieron como la pareja obligatoria de unión al heterodímero para una gran
40 variedad de receptores de hormonas nucleares. En 1992 se identificó el ácido 9-*cis*-retinoico, 9CRA, como el supuesto ligando "endógeno" para los RXR (10, 11). Paralelamente, el derivado de la vitamina A2, el ácido todo-*trans*-3,4-didehidro-retinoico (ATDDRA; ácido de la vitamina A2) fue identificado de forma endógena en humanos (12) y posteriormente se demostró que mostraba una actividad similar a la del ATRA en la activación de la transcripción génica mediada por el RAR (13). Sin embargo, el 9CRA, a pesar de ser un potente ligando del RXR, sólo ha sido identificado de manera endógena de forma rigurosa tras la administración farmacológica (toxicológica) de retinoides o tras intervenciones nutricionales artificiales con alimentos ricos en vitamina A (14-16). Además, se han encontrado derivados de la "vitamina A" en los invertebrados, concretamente el 3-hidroxiretinal ("vitamina A3") en los artrópodos y el 4-hidroxiretinal ("vitamina A4") en algunos crustáceos (17).
50

El retinol (vitamina A1) desempeña un papel esencial en la visión, sobre todo la nocturna, en el desarrollo normal de los huesos y los dientes, en la reproducción y la salud de la piel y en las mucosas (la capa que segrega mucosidad y que recubre regiones del cuerpo como las vías respiratorias). La vitamina A también actúa en el organismo como antioxidante, una sustancia química protectora que puede reducir el riesgo de ciertos cánceres.
55

En cuanto a los usos médicos de estos compuestos, el ácido todo-*trans*-retinoico (ATRA, también llamado Tretinoína) es el agente activo en varias formulaciones medicinales y se utiliza, entre otros, en aplicaciones cosméticas y tópicas contra, por ejemplo, el acné y en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda.

El isómero ácido 9-*cis*-retinoico (9CRA) también se utiliza como medicamento bajo el nombre de Alitretinoína. La formulación oral del 9CRA (Alitretinoína) se comercializa con el nombre comercial de Tactino.

La indicación principal de la isotretinoína (cuyo agente activo es el ácido 13-*cis*-retinoico) es el tratamiento del acné vulgar quístico grave, y también está indicada para el tratamiento de las lesiones cutáneas del sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA.
65

Bajo el nombre comercial de Tactino, el compuesto ha recibido derechos de prescripción en el Reino Unido para su uso oral en el eczema crónico de las manos; sin embargo, las directrices sugieren prescribirlo sólo en casos graves.

Así, en cierto modo, a diferencia de la función múltiple de los retinoides, sólo algunos de ellos se utilizan como medicamentos en un número relativamente reducido de enfermedades específicas.

Todas estas variantes que forman parte de los medicamentos están presentes en la forma ácida y contienen un doble enlace en las posiciones C13=C14.

El grupo de Palczewski descubrió la presencia endógena de 13,14-dihidroretinoides, en los que el doble enlace 13,14 está hidrogenado, e identificó el ácido todo-*trans*-13,14-dihidroretinoico (ATDHRA) como un ligando de baja afinidad para los RAR y un activador más débil que el ATRA de los genes controlados por los RAR en ensayos celulares (18).

Además de los RAR, otra clase de receptores, los receptores retinoides X que forman heterodímeros con los RAR, desempeñan un papel importante en la señalización de los receptores nucleares [D. A. Mangelsdorf, R. M. Evans, Cell 1995, 83, 841-850.]. Como se ha mencionado anteriormente, el ácido 9-*cis*-retinoico (9CRA) es un potente activante de los RXR, que son mediadores de importantes funciones y componentes obligatorios de heterodímeros para una gran variedad de receptores hormonales nucleares.

Además del 9CRA, una segunda clase de derivados que se han encontrado para activar la señalización mediada por el RXR son varios ácidos grasos como el ácido fitánico (PHYA), el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido oleico (19-21). Sin embargo, varios hallazgos indican que los niveles endógenos de estos derivados son demasiado bajos para unirse al RXR y provocar la activación transcripcional.

Recientemente, se ha confirmado la presencia endógena del ácido 9-*cis*-13,14-dihidroretinoico (9CDHRA) junto con el isómero todo-*trans* en varios órganos (hígado, suero, cerebro) de ratones mediante una configuración analítica combinada de LC-MS-MS y UV y la comparación con muestras estándar sintéticas. Las cantidades medidas se consideraron suficientes para mantener las actividades dependientes del RXR. De hecho, se descubrió que el 9CDHRA mostraba actividades biológicas similares a las de los agonistas sintéticos del RXR y coordinaba las actividades transcripcionales de varias vías de señalización de los receptores nucleares, posiblemente a través de los correspondientes heterodímeros permisivos (22).

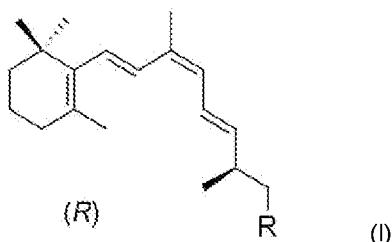
Sin embargo, las vías metabólicas que conducen a este compuesto aún no están claras y se requieren más trabajos para caracterizar este ligando y determinar sus presumiblemente múltiples funciones en los sistemas biológicos (23). En resumen, la investigación sobre la vitamina A ha establecido hasta ahora los principios fundamentales para conectar la dieta con la activación de los receptores de la vitamina A y de las hormonas lipídicas y la señalización mediada posteriormente que resulta en la regulación de varias vías (pato)fisiológicas. Desgraciadamente, la presencia endógena y la relevancia nutricional del ligando de RXR y, especialmente, el estatus del 9CRA en ese sentido, han resultado muy controvertidos.

Los presentes inventores han identificado ahora una serie de compuestos que incluyen miembros de una nueva vía independiente de la vitamina A (Vitamina A5), más notablemente el 9-*cis*-13,14-dihidroretinol (9CDHROL), y que son precursores del ligando endógeno real del receptor RXR. Sorprendentemente, también han descubierto que estos precursores producen un aumento inesperado de 9CDHRA en el cerebro (con preferencia a en el hígado), y son vectores útiles para dirigir la señalización cerebral de los RXR, mientras que también se ha demostrado su producción sistémica. Además, a partir de 9CDHROL se han generado niveles extremadamente altos de 9CDHRA en los tejidos y, entre otros, en el cerebro.

Estos descubrimientos hacen que los compuestos de la invención sean buenos candidatos como medicamentos y como nutracéuticos.

Breve descripción de la invención

La invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I)

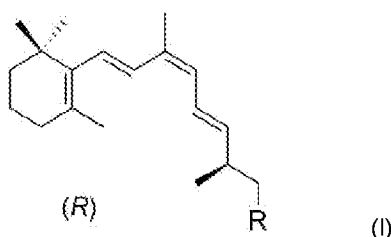


donde R es -CH₂OR₂ donde

R_2 es H o un grupo acilo $-C(O)R_3$ en el que R_3 es un grupo que se elimina por hidrólisis en un tejido u órgano de mamífero para dar lugar a (*R*)-*cis*-13,14-dihidroretinol y a un compuesto tolerable biológicamente aceptable

- 5 Dicho compuesto se convierte en ácido (*R*)-9-*cis*-13,14-dihidroretinoico en un tejido, órgano o células de mamífero, una vez administrado.

Preferentemente, en el compuesto de fórmula general (I)

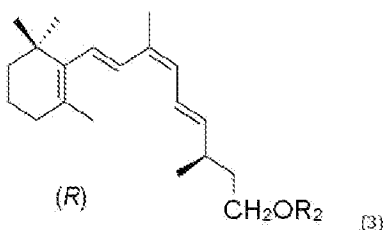


- 20 R es $-CH_2OR_2$, donde

R_2 es H o un grupo acilo $-C(O)R_3$ en el que R_3 es un alquilo C_{1-25} o un alquenilo C_{2-25} ,

- 25 en el que dicho compuesto se convierte en 9-*cis*-13,14-dihidroretinol en un tejido u órgano de mamífero o en células, y luego en ácido (*R*)-9-*cis*-13,14-dihidroretinoico en un tejido u órgano de mamífero, una vez administrado.

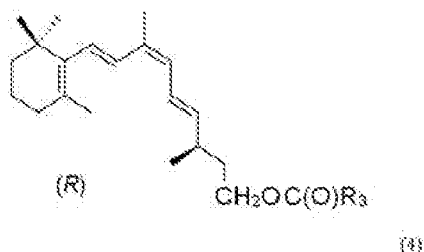
Preferentemente el compuesto de la invención es un compuesto de fórmula general (3)



- 40 en el que R_2 es H o un grupo acilo $C(O)R_3$ en el que R_3 se selecciona entre un C_{1-23} alquilo, preferentemente un C_{1-6} alquilo y un C_{9-23} alquilo, más preferentemente un C_{1-4} alquilo y un C_{11-21} alquilo y un

- 45 C_{2-25} alquenilo, preferentemente un C_{2-6} alquenilo y un C_{1-23} alquenilo, más preferentemente un C_{13-23} alquenilo.

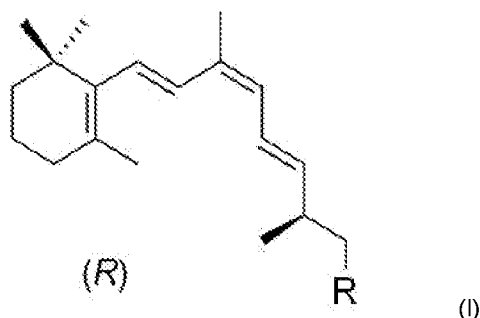
En otra realización preferida, el compuesto de la invención es un compuesto de fórmula general (4)



en el que R_3 se selecciona entre

- 60 - un alquilo de C_{1-4} , preferentemente metilo, etilo, propilo o isopropilo,
 - un alquilo de C_{11-21} , preferentemente un alquilo de C_{13-19} y
 65 - un alquenilo de C_{11-23} , preferentemente un alquenilo poliinsaturado de C_{13-23}

La invención también se refiere a un compuesto de fórmula general (I) para su uso en la terapia en un mamífero

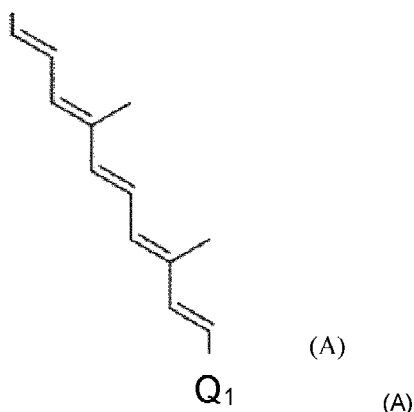


en el que R se selecciona entre COOR₁ y CH₂OR₂ y un grupo de fórmula general (A) en el que

R₁ es un grupo que se elimina por hidrólisis en un tejido u órgano de mamífero para dar lugar a (R)-9-*cis*-13,14-dihidrorretinoico y a un compuesto tolerable biológicamente aceptable y/o

R₂ es H o un grupo acilo C(O)R₃ en el que C(O)R₃ es un grupo que se elimina por hidrólisis en un tejido u órgano de mamífero para dar lugar a (R)-9-*cis*-13,14-dihidrorretinol y a un compuesto tolerable biológicamente aceptable, y/o

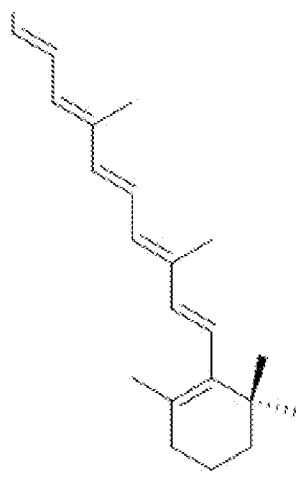
R es un grupo de fórmula general A



donde Q₁ es un alqueno o cicloalqueno C₆₋₁₀ sustituido o no sustituido, preferiblemente un trimetilcicloalqueno sustituido o no sustituido o más preferentemente un 2,6,6-trimetilciclohexeno sustituido o no sustituido, incluso más preferentemente un 2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-ilo o un 2,6,6-trimetilciclohex-2-en-1-ilo no sustituido. Si el grupo trimetilciclohexeno, por ejemplo 2,6,6-trimetilciclohexeno, está sustituido, es preferentemente hidroxilo-sustituido u oxosustituido, preferentemente oxosustituido;

en el que dicho compuesto se convierte en 9-*cis*-13,14-dihidro-retinol en los tejidos, órganos o células de los mamíferos, una vez administrado.

Muy preferentemente el grupo de fórmula general A es un grupo de fórmula a



(a)

donde dicho compuesto es un 9-*cis*-13,14-dihidro-beta, beta-caroteno (9CDHBC).

Dicho compuesto se convierte en ácido 9-*cis*-13,14-dihidroretinoico de configuración *R* en un tejido u órgano o células de mamífero, una vez administrado. Por tejido u órgano o células de mamífero se entiende aquí al menos un tipo de tejido u órgano o cultivo celular o población de células o múltiples tejidos u órganos o cultivos celulares o población de células, incluyendo el caso en que diferentes pasos de la conversión tengan lugar en diferentes tejidos u órganos o tipos de células.

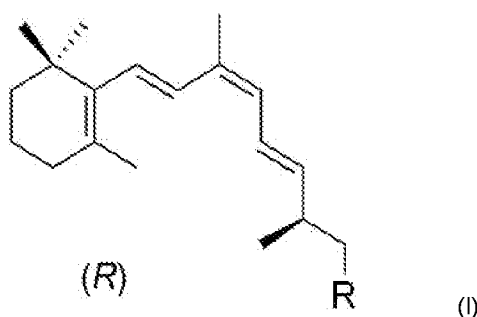
Preferentemente, dicho compuesto es para su uso en terapia en humanos.

Preferentemente dicho compuesto es para uso en la terapia de una enfermedad en la que se trata una enfermedad relacionada con el receptor de retinoides X.

Opcionalmente, en particular, la invención se refiere a los propios compuestos en los que R_1 es diferente de etilo, en particular en los casos definidos anteriormente.

La configuración absoluta del compuesto se indica en la fórmula. Preferentemente, el compuesto o cualquier composición que lo incluya está enriquecido en este enantiómero (normalmente indicado como (*R*)) o preferentemente enantiopuro, tal como se define en el presente documento.

La invención también se refiere a un compuesto de fórmula general (I)

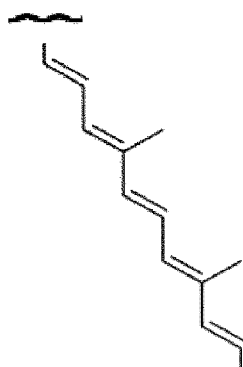


en el que R se selecciona entre COOR_1 y CH_2OR_2 y un grupo de fórmula (A), en el que

R_1 es un alquilo de C_{1-25} o un alquenilo de C_{2-25} y/o

R_2 es H o un grupo acilo $\text{C}(\text{O})\text{R}_3$ en el que R_3 es un alquilo C_{1-25} o un alquenilo C_{2-25} y/o

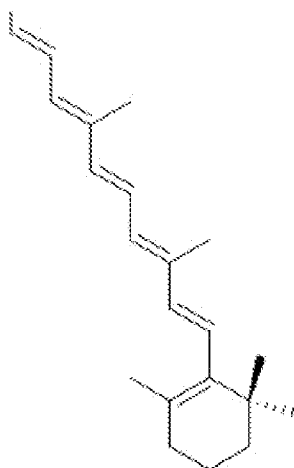
R es un grupo de fórmula general A

Q₁ (A)

en el que Q₁ es un 2,6,6-trimetilciclohexenilo sustituido o no sustituido, incluso más preferentemente 2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-ilo o 2,6,6-trimetilciclohex-2-en-1-ilo no sustituido; si el grupo trimetilciclohexenilo, por ejemplo, el grupo 2,6,6-trimetilciclohexenilo está sustituido, es preferentemente hidroxilo-sustituido u oxosustituido, preferentemente oxosustituido;

en el que dicho compuesto se convierte en 9-*cis*-13,14-dihidroretinol en los tejidos, órganos o células de los mamíferos, una vez administrado.

Muy preferentemente el grupo de fórmula general A es un grupo de fórmula a



(a)

donde dicho compuesto es un 9-*cis*-13,14-dihidro-beta,beta-caroteno (9CDHBC).

Dicho compuesto es capaz de convertirse en ácido 9-*cis*-13,14-dihidroretinoico de configuración *R* en un tejido u órgano de mamífero, una vez administrado.

En una realización preferida en el compuesto de la invención de fórmula general I R₁ o R₂ es como se ha definido anteriormente o el compuesto es un compuesto 9-*cis*-carotenoide que es un derivado 9-*cis*-13,14-dihidro-beta,beta-caroteno o un 9-*cis*-13,14-dihidro-beta,beta-caroteno, preferentemente un 9-*cis*-13,14-dihidro-beta,beta-caroteno, como compuesto precursor, en el que dicho compuesto se convierte en ácido 9-*cis*-13,14-dihidroretinoico de configuración *R* en un tejido u órgano o células de mamífero, una vez administrado.

Las opciones preferidas para la longitud de la cadena de alquilo o alquenilo en el caso de R₁ o R₂ son las definidas en el presente documento.

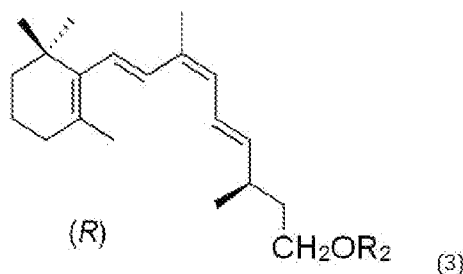
Preferiblemente, dicho compuesto es para su uso en la terapia, como se define en el presente documento, en un mamífero, preferentemente en humanos.

Opcionalmente, en particular cuando la invención se refiere a los propios compuestos, R₁ es diferente del etilo. La “invención se refiere a los propios compuestos” significa que los compuestos se reivindican como productos y no están

limitados por un uso o propósito médico o de diagnóstico llevado a cabo en el cuerpo humano o animal. Además, significa que el compuesto no se reivindica como parte de un uso o método en una reivindicación de uso o método.

La configuración absoluta del compuesto se indica en la fórmula. Preferentemente, el compuesto o cualquier composición que lo comprenda está enriquecido en este enantiómero (normalmente indicado como *(R)*) o preferentemente enantiopuro, tal como se define en el presente documento.

En un primer aspecto el compuesto es un compuesto de fórmula general (3)



en el que R₂ es H o un grupo acilo C(O)R₃ en el que R₃ se selecciona entre un

C₁₋₂₅ alquilo o un C₁₋₂₃ alquilo, preferentemente un C₁₋₈ alquilo o un C₁₋₆ alquilo y un C₉₋₂₃ alquilo, más preferentemente C₁₋₄ alquilo y un C₁₁₋₂₁ alquilo y un

C₂₋₂₅ alquenilo, preferentemente un C₂₋₈ alquenilo o C₂₋₆ alquenilo y un C₂₋₂₃ alquenilo, más preferentemente un C₁₃₋₂₃ alquenilo.

En una disposición preferente R₃ es un alquilo de C₁₋₈, preferentemente un alquilo de C₁₋₆, más preferentemente un alquilo de C₁₋₄.

En una disposición preferente R es un alquilo C₃₉₋₂₃, preferentemente un alquilo C₁₁₋₂₁, más preferentemente un alquilo C₁₃₋₁₉. En una disposición preferente R₃ es C₂₋₈ alquenilo, preferentemente C₂₋₆ alquenilo, más preferentemente C₂₋₄ alquenilo.

En una disposición preferente, R₃ es un alquenilo de C₉₋₂₅, preferentemente un alquenilo de C₁₁₋₂₃, más preferentemente un alquenilo de C₁₃₋₂₃.

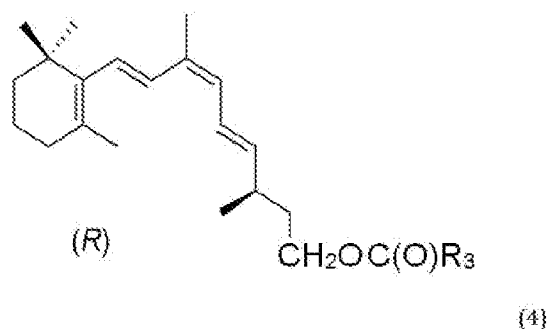
En una disposición R₂ es H y el compuesto es (*R*)-9-*cis*-13,14-dihidroretinol.

En otra disposición, R₂ es un grupo acilo C(O)R₃ y R₃ es un compuesto como el definido anteriormente y C(O)R₃ es un grupo que se elimina por hidrólisis del éster en un tejido u órgano de mamífero para dar lugar al correspondiente alcohol (*R*)-9-*cis*-13,14-dihidroretinol. Así, el éster se convierte en un alcohol y en un compuesto biológicamente tolerable y/o aceptable. Dicho compuesto con funcionalidad de alcohol se convierte en el ácido 9-*cis*-13,14-dihidroretinoico de configuración *R* en un tejido u órgano de mamífero, una vez administrado. Esto significa que el compuesto tiene esta capacidad, es decir, “es” también significa “ser capaz de” dependiendo de si el compuesto se administra realmente.

Preferentemente dicho compuesto es para uso en terapia en mamíferos, preferentemente en humanos.

La configuración absoluta del compuesto se indica en la fórmula. Preferentemente, el compuesto o cualquier composición que lo comprenda está enriquecido en este enantiómero (normalmente indicado como *(R)*) o preferentemente enantiopuro, tal como se define en el presente documento.

En una disposición preferente de este aspecto de la invención dicho compuesto es de fórmula general (4)



en la que R_3 es como se define en el caso de la fórmula general (3) o R_3 se selecciona entre

- un alquilo de C_{1-4} , preferentemente metilo, etilo, propilo o isopropilo,
- un alquilo de C_{11-21} , preferentemente de C_{13-19} y
- un alquenilo de C_{11-23} .

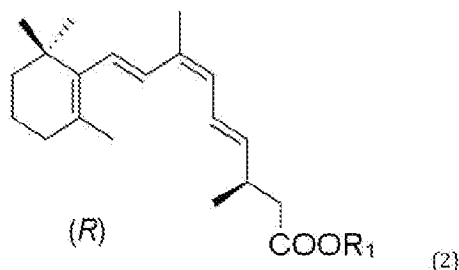
Preferentemente el alquenilo es un alquenilo poliinsaturado C_{13-23} .

En una disposición preferente, dicho compuesto se convierte en el enantiómero de configuración (R) -9-*cis*-13,14-dihidrorretinol en un tejido u órgano de mamífero, una vez administrado.

Más preferentemente el tejido de mamífero es un tejido nervioso o el tejido u órgano es el del sistema nervioso central o el del sistema nervioso periférico. Las células de mamífero son preferentemente células nerviosas (neurocitos), preferentemente o, en particular, oligodendrocitos.

En otra disposición preferente, el tejido de mamífero es la sangre. En otra disposición preferente, el tejido de mamífero es el hígado.

En un aspecto adicional de la invención, dicho compuesto es de fórmula general (2)



en el que R_1 se selecciona entre un

C_{1-25} alquilo o C_{1-23} alquilo, preferentemente un C_{1-6} alquilo y un C_{9-23} alquilo, más preferentemente C_{1-4} alquilo y un C_{11-21} alquilo y un

C_{2-25} alquenilo o C_{2-24} alquenilo, preferentemente un C_{2-6} alquenilo y un C_{9-23} alquenilo, más preferentemente un C_{13-23} alquenilo.

Opcionalmente, en particular cuando la invención se refiere a los propios compuestos, R_1 es distinto de etilo.

La configuración absoluta del compuesto se indica en la fórmula. Preferentemente, el compuesto o cualquier composición que lo comprenda está enriquecido en ese enantiómero (normalmente indicado como (R)) o es preferentemente enantiopuro, tal como se define en el presente documento.

En una disposición preferente, R_1 se selecciona entre un alquilo de C_{1-8} y un alquilo de C_{9-23} , más preferentemente un alquilo de C_{1-4} y un alquilo de C_{11-21} y un

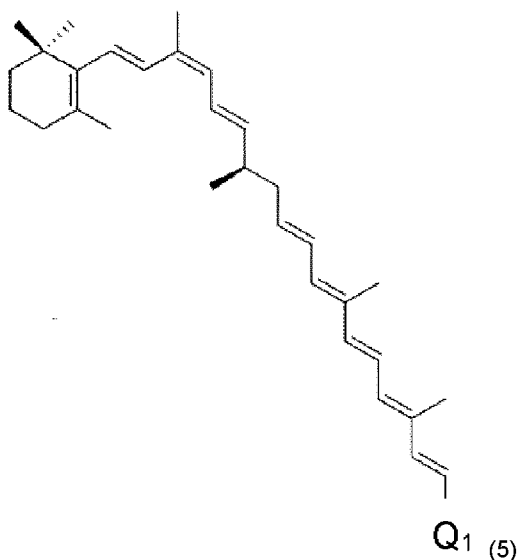
C_{2-25} alquenilo o C_{2-24} alquenilo, preferentemente un C_{2-6} alquenilo y un C_{9-23} alquenilo, más preferentemente un C_{13-23} alquenilo.

En una disposición preferente R_1 es un alquilo de C_{1-8} , preferentemente un alquilo de C_{1-6} , más preferentemente un alquilo de C_{1-4} .

En una disposición preferente R_1 es C_{2-8} alquenilo, preferentemente C_{2-6} alquenilo, más preferentemente C_{2-4} alquenilo.

En una disposición preferente, R_1 se selecciona entre metilo, etilo, propilo o isopropilo, opcionalmente metilo, propilo o isopropilo.

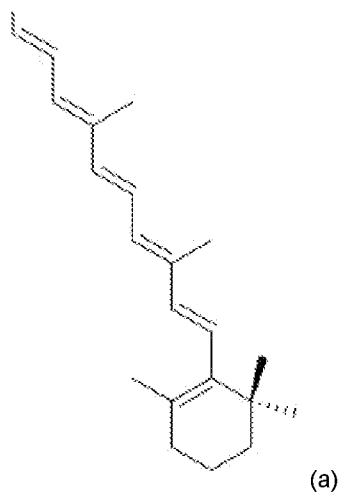
En otro aspecto, la invención también se refiere a un compuesto de fórmula general (5)



en el que Q_1 es un alquenilo o cicloalquenilo C_{6-10} sustituido o no sustituido, preferentemente un trimetil-cicloalquenilo sustituido o no sustituido, o más preferentemente un 2,6,6-trimetilciclohexenilo sustituido o no sustituido, incluso más preferentemente un 2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-ilo no sustituido o un 2,6,6-trimetilciclohex-2-en-1-ilo, en el que si el grupo trimetilciclohexenilo, por ejemplo, el grupo 2,6,6-trimetilciclohexenilo está sustituido, es preferentemente hidroxilo-sustituido u oxosustituido, preferentemente oxosustituido;

en el que dicho compuesto se convierte en 9-*cis*-13,14-dihidroretinol en los tejidos, órganos o células de los mamíferos, una vez administrado.

Muy preferentemente, el grupo de fórmula general A es un grupo de fórmula a



En una disposición preferente, la invención también se refiere a un compuesto 9-*cis*-carotenoide que es un derivado 9-*cis*-13,14-dihidro-beta,beta-caroteno o un 9-*cis*-13,14-dihidro-beta,beta-caroteno, por ejemplo un 9-*cis*-13,14-dihidro-beta,beta-caroteno o un 9-*cis*-13,14-dihidro-beta-alfa-caroteno, preferentemente un 9-*cis*-13,14-dihidro-beta,beta-caroteno, como compuesto precursor, en el que dicho compuesto se convierte en ácido 9-*cis*-13,14-dihidroretinoico

de configuración *R* en un tejido u órgano de mamífero o en células, una vez administrado. En particular, el compuesto 9-*cis*-carotenoide es un compuesto tolerable biológicamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto como se ha definido anteriormente para un compuesto de fórmula general (3); dicha composición también comprende uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, aditivo(s) y/o excipiente(s).

Preferentemente, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto como se ha definido anteriormente para un compuesto de fórmula general (4); dicha composición también comprende uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, aditivo(s) y/o excipiente(s).

Preferentemente, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto como se ha definido anteriormente para el 9-*cis*-carotenoide y/o un compuesto de fórmula general (5), en particular un 9-*cis*-13,14-dihidro-beta, beta-caroteno como compuesto precursor; dicha composición también comprende uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, aditivo(s) y/o excipiente(s).

La invención también se refiere a una composición nutracéutica que comprende el compuesto como se ha definido anteriormente para un compuesto de fórmula general (3), o preferentemente para un compuesto de fórmula general (4), o de fórmula general (5), o el compuesto 9-*cis*-carotenoide, preferentemente 9-*cis*-13,14-dihidro-beta, beta-caroteno como compuesto precursor; dicha composición también comprende uno o más aditivos y/o excipientes nutracéuticamente aceptables. Preferentemente, dicha composición es un suplemento dietético, un alimento funcional, un alimento médico o un alimento con una declaración de salud. Preferiblemente, dicha composición nutracéutica comprende dicho compuesto en una cantidad o concentración superior a la que está presente en la matriz alimentaria natural y/o comprende una cantidad adicional del compuesto, preferiblemente un compuesto adicional aislado o preparado artificialmente.

La invención da a conocer una novedosa síntesis química de 9-*cis*-13,14-dihidretinol y formas de ésteres, a través del 9-*cis*-13,14-dihidretinoato de alquilo. El método comprende

i) reducción del 9-*cis*-13,14-dihidretinoato de alquilo a 9-*cis*-13,14-dihidretinol y, opcionalmente, ii) la acilación del 9-*cis*-13,14-dihidretinol en la forma de éster correspondiente. Los ésteres se ejemplifican a continuación.

En una disposición preferente, la reducción se lleva a cabo mediante un hidruro, como la reducción con hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL-H) en un disolvente orgánico, preferentemente un heterociclo pequeño como el THF.

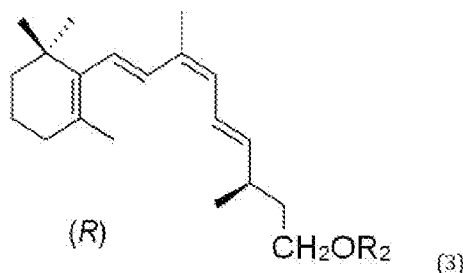
La esterificación de los alcoholes se lleva a cabo preferentemente con reactivos alquílicos e hidruros. Preferentemente, se emplean heterociclos de anillo único que contienen nitrógeno básico, como la piridina y/o sus derivados. En una disposición preferente, la reacción se lleva a cabo en presencia de dimetilaminopiridina (DMAP).

Los disolventes orgánicos aplicados preferentemente son, por ejemplo, CH₂Cl₂, cloroformo, CCl₄, etc.

Otros ésteres del ácido 9-*cis*-13,14-dihidretinoico y del 9-*cis*-13,14-dihidretinol (como el palmitato y otros) pueden prepararse fácilmente utilizando la misma secuencia.

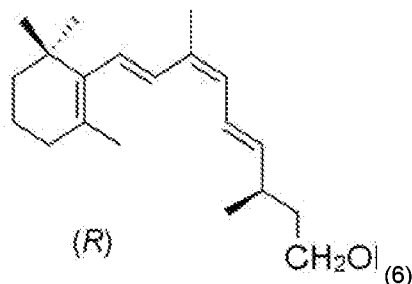
En una disposición adicional, la invención también se refiere a una síntesis química novedosa de un compuesto de fórmula general (5) como se ha definido anteriormente, preferentemente un compuesto 9-*cis*-carotenoide que es un derivado 9-*cis*-13,14-dihidro-beta, beta-caroteno, preferentemente un 9-*cis*-13,14-dihidro-beta,beta-caroteno; dicho método comprende

- conversión de un compuesto de fórmula general (3)

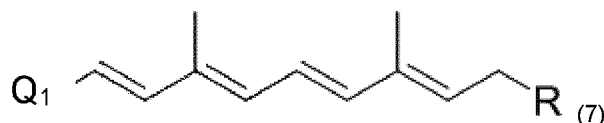


donde R₂ es H o un grupo protector de OH;

en el correspondiente aldehído de fórmula (6) como intermedio



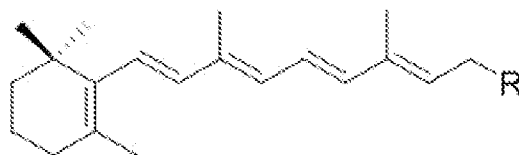
- hacer reaccionar dicho aldehído intermedio con el reactivo de Wittig (7)



en el que Q_1 es un alquenilo o cicloalquenilo C_{6-10} sustituido o no sustituido, preferentemente un trimetilcicloalquenilo sustituido o no sustituido, o más preferentemente un 2,6,6-trimetilciclohexenilo sustituido o no sustituido, incluso más preferentemente un 2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-ilo no sustituido o un 2,6,6-trimetilciclohex-2-en-1-ilo. Si el grupo trimetilciclohexenilo, por ejemplo 2,6,6-trimetilciclohexenilo, está sustituido, es preferentemente hidroxilo-sustituido u oxosustituido, preferentemente oxosustituido;

y R es un grupo que forma un iluro de fósforo, preferentemente un grupo fosfonio, preferentemente un grupo trifenilfosfonio, para dar el compuesto deseado según la fórmula (5).

En una disposición preferente, se prepara 9-*cis*-13,14-dihidro-beta, beta-caroteno en el que la fórmula general (7) es un compuesto de fórmula general (8)



R es un grupo que forma un iluro de fósforo, preferentemente un grupo fosfonio, preferentemente un grupo trifenilfosfonio, para dar 9-*cis*-13,14-dihidro-beta, beta-caroteno.

En otro aspecto, la invención también se refiere a un uso de un compuesto como el definido anteriormente para un compuesto de fórmula general (3) o, preferentemente, para un compuesto de fórmula general (4), o para un compuesto de fórmula general (5), o el 9-*cis*-carotenoide, o las opciones particulares, como ingrediente alimentario o suplemento alimentario. Preferentemente, el ingrediente alimentario es un ingrediente de un alimento funcional o un alimento médico.

En una disposición de la invención, el compuesto como se ha definido anteriormente para un compuesto de fórmula general (3) o, preferentemente para un compuesto de fórmula general (4), o un compuesto de fórmula general (5), o el 9-*cis*-carotenoide, o las opciones particulares, es para su uso en la terapia en un mamífero.

En una disposición preferente, el compuesto está en forma de composición farmacéutica.

En otra disposición preferente, el compuesto se presenta en forma de una composición nutracéutica que requiere una autorización para ser comercializada para la indicación prevista en el presente documento.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica o a su uso en la terapia de un mamífero; dicha composición comprende el compuesto como se ha definido anteriormente para el compuesto general (2), y dicha composición también comprende uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, aditivo(s) y/o excipiente(s).

La invención también se refiere a una composición nutracéutica que comprende el compuesto como se ha definido anteriormente para el compuesto general (2); dicha composición también comprende uno o más aditivos y/o

excipientes nutracéuticamente aceptables. Preferentemente, dicha composición es un suplemento dietético, un alimento funcional, un alimento médico, o un alimento con una declaración de salud.

5 En otro aspecto, la invención también se refiere a un uso de un compuesto como el definido anteriormente para el compuesto general (2) como ingrediente alimentario. Preferentemente, el ingrediente alimentario es un ingrediente de un alimento funcional o un alimento médico.

10 En una disposición de la invención, el compuesto como se ha definido anteriormente para el compuesto general (2), es para su uso en la terapia en un mamífero.

En una disposición preferente, el compuesto está en forma de composición farmacéutica.

15 En otra disposición preferente, el compuesto se presenta en forma de una composición nutracéutica que requiere una autorización para ser comercializada para la indicación prevista en el presente documento.

En una disposición preferente, el compuesto o la composición farmacéutica o la composición nutracéutica es para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una disfunción de señalización mediada por RXR.

20 En una disposición preferente, el compuesto o la composición farmacéutica o la composición nutracéutica es para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad relacionada o debida a la alteración de la señalización del receptor de retinoides X. Dicha enfermedad preferentemente puede ser tratada o prevenida o aliviada por un ligando selectivo del receptor de retinoides X.

25 En una disposición preferente, el compuesto o la composición farmacéutica o la composición nutracéutica es para su uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad seleccionada entre las enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central y las enfermedades relacionadas con el sistema nervioso periférico.

30 En una disposición preferente, el compuesto o la composición farmacéutica o la composición nutracéutica es para su uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades mentales.

En una disposición preferente, el compuesto o la composición farmacéutica o la composición nutracéutica es para su uso en la prevención y/o el tratamiento del deterioro de la memoria o para su uso en la mejora del rendimiento de la memoria, donde preferentemente dicha memoria es la memoria de trabajo.

35 En una disposición preferente, el compuesto o la composición farmacéutica o la composición nutracéutica es para su uso en la prevención y/o el tratamiento de las funciones cognitivas deterioradas o del aprendizaje deteriorado.

40 En una disposición preferente, el compuesto o la composición farmacéutica, o la composición nutracéutica es para su uso en la prevención y/o tratamiento de la depresión.

En una disposición preferente, el compuesto o la composición farmacéutica, o la composición nutracéutica es para su uso en la prevención y/o tratamiento de un trastorno neurodegenerativo.

45 En una disposición preferente, el compuesto o la composición farmacéutica, o la composición nutracéutica es para su uso en la prevención y/o tratamiento de un trastorno neurodegenerativo seleccionado entre la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, el deterioro cognitivo leve (DCL), la enfermedad de Parkinson con DCL, la enfermedad de Huntington, la demencia con cuerpos de Lewy (DCL), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y otras demencias relacionadas con la neurodegeneración debidas a cambios en el cerebro causados por el envejecimiento, la enfermedad o un traumatismo; o lesiones de la médula espinal y ataxias, esclerosis diseminada y esclerosis múltiple u otras afecciones neurológicas, preferentemente de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

50 En las disposiciones de indicación médica anteriores, el compuesto se selecciona preferentemente entre los compuestos definidos anteriormente para el compuesto general (2), (3) o (4). En las disposiciones de indicación médica anteriores, el compuesto se selecciona preferentemente entre los compuestos definidos anteriormente para el compuesto general (3) o preferentemente (4).

La invención también señala el uso de cualquiera de los compuestos anteriores en la preparación de un preparado farmacéutico o de un medicamento como se define aquí o anteriormente.

60 La invención también señala el uso de cualquiera de los compuestos anteriores en la preparación de un preparado nutracéutico, preferentemente un alimento médico o un alimento con una declaración de propiedades saludables como se define en el presente documento o anteriormente.

65 La invención también se refiere al compuesto de la invención o a una composición farmacéutica de la invención o a una composición nutracéutica para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad tal como se ha definido anteriormente, en el que dicho compuesto o composición se administra a un mamífero, preferentemente a un ser

humano que lo necesite, en una dosis eficaz. En una disposición preferente, la administración es regular, por ejemplo, diaria.

La invención también se refiere a los compuestos definidos en el presente documento para su uso en el mantenimiento de la salud, preferentemente como ingrediente alimentario, suplemento dietético, por ejemplo, como vitamina o precursor de la misma o como ingrediente nutracéutico. En una realización preferida la invención se refiere a un uso para mantener la salud al prevenir una condición como la que se ha definido anteriormente. En una disposición, dicho uso es para el mantenimiento de la visión normal, el mantenimiento de la piel y las membranas mucosas normales, y el mantenimiento del cabello normal.

Preferentemente, dicho uso es para el mantenimiento de la función cerebral normal, o el mantenimiento de la salud mental, o el mantenimiento del rendimiento mental, o el mantenimiento de la función psicológica normal, o la función cognitiva, o para la contribución al funcionamiento del sistema nervioso. En una disposición, dichos usos se definen en una declaración de salud.

La invención también se refiere a los compuestos o composiciones de la invención para su uso en un método para mantener una condición saludable de un sujeto como se ha definido anteriormente, en el que un compuesto de la invención o una composición nutracéutica de la invención se administra a un mamífero, preferiblemente un humano, que lo necesita como parte de una dieta. En una disposición preferente, la administración es regular, por ejemplo, diaria.

La invención también se refiere a compuestos según cualquiera de las fórmulas generales (3), (4) y/o (5) definidas anteriormente para su uso como suplemento dietético como vitamina A5 (9CDHROL) o precursor de la misma. En una disposición particular, el precursor es 9CDHBC. En otra disposición particular, el precursor se selecciona entre los ésteres de 9CDHROL.

La invención también se refiere a compuestos según cualquiera de las fórmulas generales (3), (4) y/o (5) definidas anteriormente para su uso como suplemento dietético como precursor de 9CDHRA, y ligando de RXR. En una disposición particular, el precursor de 9CDHRA se selecciona entre 9CDHBC, 9CDHROL, ésteres de 9CDHROL y ésteres de 9CDHRA.

Preferiblemente, los precursores se administran por vía intravenosa, tópica u oral. Los precursores pueden administrarse por vía sistémica o local.

Estos precursores pueden administrarse para su conversión metabólica selectiva en 9CDHRA, el ligando endógeno del RXR para permitir la señalización mediada por el receptor RXR.

En una disposición particular, la invención se refiere al uso de 9CDHBC para prevenir, tratar o mejorar cualquier condición definida anteriormente. En una disposición preferente la condición se selecciona del grupo que consiste en: (a) anomalías afectivas en trastornos asociados al estrés incluyendo (pero no limitado a) trastornos psiquiátricos como la depresión y la esquizofrenia (b) déficits de memoria asociados con la demencia, y en particular la enfermedad de Alzheimer.

En una disposición particular, el 9CDHBC se utiliza para mejorar la memoria.

En una disposición particular, la invención se refiere al 9CDHROL o a cualquier éster de este, tal como se define en el presente documento, para su uso en un método para prevenir, tratar o mejorar cualquier afección, tal como se ha definido anteriormente. En una disposición preferida, la condición se selecciona del grupo que consiste en: (a) anomalías afectivas en trastornos asociados al estrés incluyendo (pero no limitado a) trastornos psiquiátricos como la depresión y la esquizofrenia; (b) déficits de memoria asociados con la demencia y, en particular, la enfermedad de Alzheimer.

En una disposición particular, el 9CDHROL o cualquier éster de este, se utiliza para mejorar la memoria.

En una disposición particular, la invención se refiere al 9CBC para su uso como precursor carotenoide del 9CDHBC.

En una disposición particular, la invención se refiere a 9CBC para su uso como suplemento alimenticio para aumentar el nivel de 9CDHBC en el cuerpo humano en una aplicación no terapéutica.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: El tratamiento con 9CDHROL mejora el rendimiento de la memoria de trabajo en la tarea de no coincidencia con el lugar (DNMTP). (a) una curva de aprendizaje creciente para ratones macho C57BL6N de tipo salvaje (n=5) ilustra la adquisición de la tarea de memoria de trabajo. El rendimiento de la memoria puntuado para el aumento de los intervalos entre ensayos (ITI) se muestra en el campo gris y corresponde a un ITI de 3 min y a un ITI medio en el que los ratones mostraron un déficit de memoria y que para todo el grupo alcanzó un valor medio de 13 min (indicado

como gr13). (b) El tratamiento con 9CDHROL, pero no con el vehículo, mejoró el rendimiento de la memoria de trabajo entre 7 y 9 horas después del tratamiento cuando se evaluó en un ITI medio de gr13 min. Las diferencias estadísticas identificadas con la prueba t de uno o dos grupos se indicaron respectivamente como: *, $p < 0,05$ cuando se compara con el rendimiento del 50 % a nivel de azar y #, $p < 0,05$, para la comparación con el rendimiento del último día de la fase de adquisición (día 10).

Figura 2: Mezcla estándar de 9CDHROL (cromatograma superior) y niveles endógenos en el hígado de los ratones tras el tratamiento con vehículo (cromatograma inferior).

Figura 3: 9CDHROL en ratones después del tratamiento con un vehículo que representa los niveles endógenos (azul) y después del tratamiento con 9CDHROL (rojo) en ratones.

Figura 4: Niveles de 9CDHRA tras el tratamiento con vehículo que representan los niveles endógenos (azul) y tras el tratamiento con 9CDHROL (rojo) en ratones.

Figura 5: Niveles de 9CDHRA tras el tratamiento con un vehículo que representa los niveles endógenos (azul) y tras el tratamiento con 9CDHROL (rojo) en el hígado del ratón. Figura superior: rango normal (fijado en el máximo); figura inferior: rango ampliado para el rango máximo de retinoides endógenos.

Figura 6: Tratamiento de control con 9CDHRA (niveles endógenos) y tras la suplementación de retinoides a las células oligodendroglarias. Arriba: endógeno (azul), 9CDHROL (naranja) y acetato de 9CDHROL (rosa); abajo: 9CDHRA-acetato (rosa).

Figura 7: Resumen de los posibles precursores nutricionales del nuevo grupo de vitamina A5. Los retinoides aún no identificados como retinoides endógenos están marcados con letras azules. Abreviaturas: 9-*cis*-13,14-dihidroretinol (9CDHROL), 9-*cis*-13,14-dihidroretinal (9CDHROL), y ácido 9-*cis*-13,14-dihidroretinoico (9CDHRA); todo-*trans*-13,14-dihidroretinal (ATDHROL), todo-*trans*-13,14-dihidroretinol (ATDHROL), ácido todo-*trans*-13,14-dihidroretinoico (ATDHRA).

Figura 8: Dosis crecientes de (*R*)-9CDHRA revirtieron los déficits de la memoria de trabajo en los ratones Rbp1-/- y mostraron una actividad pro-mnemónica en los ratones WT ($n=8$ /grupo) en la tarea DNMTp cuando se probó con un ITI mínimo, en el que los ratones rindieron al nivel del azar (50 %) y que fue de 6min para los ratones Rbp1-/- o de 12min para los ratones WT. ttt: El ATRA a la concentración 10^{-5} M fue citotóxico. *, $p < 0,05$. #, $p < 0,05$; ##, $p < 0,01$ en comparación con el tratamiento con vehículo en el mismo grupo; \$, $p < 0,05$; \$\$, $p < 0,01$; prueba t de student de un grupo para la comparación con un nivel de azar del 50 %. Todas las barras de error representan la E.S.M.

Figura 9: El (*R*)-9CDHRA muestra actividades similares a las del RXR *in vivo*. Inversión de los déficits conductuales tras los tratamientos con UVI2108 y (*R*)-9CDHRA.

Dosis crecientes de (*R*)-9CDHRA (0,1, 1, 2 mg/kg) reducen el comportamiento de desesperación en los ratones Rbp1-/- en la prueba de natación forzada ($n=26$ para los grupos con vehículo y $n=6-8$ para cada grupo restante); las diferencias estadísticas reveladas por la prueba PLSD Fisher se indicaron como: ***, $p < 0,001$ para la comparación con los controles WT tratados con vehículo en el grupo respectivo. Todas las barras de error representan la E.S.M.

Figura 10: El (*R*)-9CDHRA muestra efectos antidepresivos en el modelo de estrés de derrota social crónica.

Figura 10a: El estrés de la derrota social aumentó significativamente el tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada en los ratones que recibieron (vehículo; $n=12$) en comparación con los ratones de control no estresados (ctr; $n=17$). Los tratamientos con (*R*)-9CDHRA disminuyeron dicha inmovilidad en los ratones estresados de forma dependiente de la dosis ($n=8$ para 1 mg/kg y $n=6$ para 3 mg/kg de 9CDHRA) y en una medida similar a la del agonista sintético de RXR UVI2108 ($n=12$).

Figura 10b: El déficit de preferencia por la sacarosa inducido por el estrés de la derrota social se evitó con los tratamientos con UVI2108 o con 9CDHRA. Las diferencias estadísticas reveladas por la prueba PLSD Fisher se indicaron como: *, $p < 0,1$ en comparación con los ratones de control; #, $p < 0,1$ en comparación con los ratones estresados tratados con vehículo; \$\$, $p < 0,01$, \$, $p < 0,1$ en comparación con la ausencia de preferencia por la sacarosa correspondiente al valor del 50 % del consumo de sacarosa. Todas las barras de error representan la E.S.M.

Figura 11: Medición de retinol en el cultivo celular tras la aplicación de retinol: ROL estándar (línea negra), ATROL aplicado (línea azul), 9CROL aplicado (línea roja).

Figura 12: Medición de DH-RA en cultivo celular tras la aplicación de retinol: ROL estándar (línea negra), ATROL aplicado (línea azul), 9CROL aplicado (línea roja).

Figura 13: Medición de RA en cultivo celular tras la aplicación de retinol: ROL estándar (línea negra), ATROL aplicado (línea azul), 9CROL aplicado (línea roja).

Figura 14: A. Mezcla estándar de 9CDHROL (cromatograma superior) y niveles endógenos en el cerebro de ratón (cromatograma central) y después del tratamiento con 9CDHROL (cromatograma inferior). Ambas escalas del eje y de las muestras de cerebro eran idénticas, mientras que el eje y del estándar no es similar y se ajustó al máximo de los picos relevantes. B. 9CDHROL en suero humano (cromatograma superior) y mezcla estándar 9CDHROL / ATDHROL (cromatograma inferior). Ambas escalas del eje y no son similares y se ajustaron al máximo de los picos relevantes. C. 9CDHROL en la cadena alimentaria humana / hígado de vaca (cromatograma superior) y mezcla estándar de 9CDHROL / ATDHROL (cromatograma inferior). Ambas escalas del eje y no son similares y se ajustaron al máximo de los picos relevantes. D. Conversión de 9CDHBC y 9CBC en 9CDHROL en la línea celular de oligodendrocitos humanos *in vitro* tras la administración de CTRL, 9CBC, 9CDHBC y 9CDHROL. Las escalas del eje Y de los tres cromatogramas superiores son similares y se ajustaron al máximo de los picos relevantes, mientras que el cromatograma inferior tiene una escala mucho mayor.

Figura 15: 9CDHBC en la cadena alimentaria humana, estándar 9CDHBC eluyendo a 25,0 min (figura superior) y melocotón extraído de una lata (figura inferior) con un pico coeluyendo a 25,0 min y espectros UV /VIS comparables (datos no mostrados).

Figura 16: Intraconversión de carotenoides: A. Conversión de 9CBC administrado a 9CDHBC en la línea celular de oligodendrocitos humanos *in vitro*. El pico con un tiempo de retención de 25,1 min está presente después del tratamiento con 9CDHBC, así como en niveles más bajos después del tratamiento con 9CBC. B. No hay conversión de ATBC a 9CBC o 9CDHBC en la línea celular humana de oligodendrocitos *in vitro*. El ATBC eluye a los 27,2 min (detectable a 411 nm, aunque tiene una UVmax de 450 nm) y está presente a niveles muy altos después del tratamiento con ATBC (segunda figura desde arriba en el panel derecho). El 9CBC está presente como un pico principal en el hombro tras el tratamiento con 9CBC, mientras que no es detectable tras el tratamiento con CTRL o los tratamientos alternativos.

Figura 17: A. Conversión de 9CDHROL, 9CDHROL-éster y 9CDHRA-éster en 9CDHRA en la línea celular de oligodendrocitos humanos *in vitro*. Se observó un tiempo de retención ligeramente diferente de los derivados debido a que se utilizó un sistema de HPLC y un procedimiento de extracción diferentes, como se explica en la sección de materiales y métodos, gradiente de retinoides. B. Conversión de 9CDHBC a 9CDHRA: niveles estándar de 9CDHRA y ATDHRA tras el tratamiento de control / endógeno (cromatograma superior) y la suplementación con 9CDHBC (cromatogramas inferiores) en el hígado de ratón utilizando la misma dimensión de escala del eje y. C. Conversión de 9CDHROL a 9CDHRA: niveles estándar de 9CDHRA y ATDHRA en suero, cerebro e hígado tras el tratamiento de control / endógeno (cromatogramas superiores) y tras la suplementación con 9CDHROL (cromatogramas inferiores) en ratones utilizando la misma dimensión de escala del eje y por órgano relevante (suero, cerebro, hígado).

Figura 18: Actividades antidepresivas de 9CDHROL y 9CDHBC en el modelo de estrés de derrota social crónica. (a) El estrés por derrota social aumentó significativamente el tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada en los ratones que recibieron (veh; n=6) en comparación con los ratones de control no estresados (CTR; n=6). El tratamiento con 9CDHROL (n=5) disminuyó dicha inmovilidad en los ratones estresados de forma similar a 9CDHBC (n=4). (b) El déficit de preferencia por la sacarosa inducido por el estrés de la derrota social se evitó con los tratamientos con 9CDHROL o 9CDHBC. Las diferencias estadísticas reveladas por la prueba t de student se indicaron como: **, p<0,01 en comparación con los ratones control; #, p<0,05 en comparación con los ratones estresados tratados con vehículo; \$, p<0,05 en comparación con el valor del 50 % del consumo de sacarosa correspondiente a la ausencia de preferencia por la sacarosa. Todas las barras de error representan la E.S.M.

Definiciones

Debe entenderse que esta invención no se limita a los ejemplos específicos y a las realizaciones proporcionadas en el presente documento, y que deben incluirse alternativas que estén dentro de las habilidades de un experto en la materia. También debe entenderse que la terminología empleada en el presente documento tiene por objeto describir únicamente las realizaciones particulares y no pretende ser limitativa.

Tal y como se utiliza en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “uno”, “una” y “el”, “la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Típicamente, los compuestos según la invención se refieren a enantiómeros (enantiómeros puros o mezcla, siempre que sean obtenidos por el método de la invención), hidratos y solvatos de los mismos, formas sólidas de los mismos, así como mezclas de dichas formas.

Un “enantiómero” es uno de los pares de compuestos de isómeros ópticos que son compuestos diferentes y son imágenes especulares el uno del otro.

“Enantiómero” se entiende aquí preferentemente como un compuesto de la invención que se puede obtener por un método enantioselectivo, preferentemente un método de preparación enantioselectivo, muy preferentemente como un compuesto enantiopuro o enantioméricamente puro. “Enantiopuro” o “enantioméricamente puro” es un compuesto en

el que las moléculas tienen (en la medida en que se puede obtener por el método de la invención) la misma quiralidad. Preferentemente, enantiopuro o enantioméricamente puro significa ópticamente puro, más preferentemente con una pureza óptica de al menos el 90 %, preferentemente de al menos el 95 %, más preferentemente de al menos el 98 % o el 99 %. Muy preferentemente, las moléculas “enantiopuras” o “enantioméricamente puras” tienen la misma quiralidad dentro de los límites de detección.

“Alquilo” se refiere en el presente documento a un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificado compuesto únicamente por átomos de carbono e hidrógeno, que está saturado, y que tiene hasta 25 (preferentemente 23 o 21 o 19) átomos de carbono. En ciertas realizaciones un alquilo puede comprender de 1 a 25 átomos de carbono (denominado C₁₋₂₅ alquilo), o preferentemente puede ser un C₁₃₋₂₅ alquilo, un C₁₃₋₂₃ alquilo, un C₁₃₋₂₁ alquilo, un C₁₃₋₁₉ alquilo o un C₁₃₋₁₇ alquilo; alternatively, puede ser un alquilo de cadena corta, p. ej. un alquilo de C₁₋₃, un alquilo de C₁₋₄, un alquilo de C₁₋₅, un alquilo de C₁₋₆, un alquilo de C₁₋₇ o un alquilo de C₁₋₈; alternatively, en algunas realizaciones puede ser un alquilo de C₈₋₁₇, un alquilo de C₈₋₁₅ o un alquilo de C₈₋₁₃. El alquilo está unido al resto de la molécula por un único enlace covalente. El alquilo es preferentemente una cadena hidrocarbonada lineal y no ramificada. Alternativamente, puede ser una cadena hidrocarbonada ramificada; sin embargo, las cadenas laterales ramificadas son típicamente grupos metilo, etilo o propilo, preferentemente grupos metilo o etilo. La cadena de alquilo puede estar opcionalmente sustituida por uno o más de los siguientes sustituyentes: halógeno (incluyendo -F, -Br, -Cl o -I), ciano, nitro, oxo, C₁₋₃ alcoxilo o hidroxilo. Preferiblemente, el grupo alquilo no está sustituido.

“Alqueno” se refiere en el presente documento a un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificada compuesta únicamente por átomos de carbono e hidrógeno, que es insaturado, es decir, que contiene al menos un doble enlace (es decir, C=C), y que tiene al menos 2 y hasta 25 (preferiblemente 23 o 21 o 19) átomos de carbono. En ciertas realizaciones, un alquilo puede contener de 2 a 25 átomos de carbono (denominado alquilo C₂₋₂₅); *mutatis mutandis*, la longitud de la cadena puede ser la misma que la de los grupos alquilo, aunque la cadena más corta contiene al menos 2 átomos de carbono. Con respecto a la ramificación y la sustitución, se aplica lo mismo que en el caso de la cadena de grupos alquilo.

Los ésteres de (*R*)-9-*cis*-13,14-dihidroretinol de la presente invención pueden ser ésteres de ácidos grasos. Aquí, el término “ácido graso” se refiere a un ácido carboxílico que tiene una cadena alifática (no aromática) larga que puede ser saturada (alquilo) o insaturada (alqueno). Preferiblemente, las cadenas de alquilo de los ácidos grasos utilizados en la invención son compuestos de cadena abierta, rectos o ramificados. Normalmente, las cadenas de alquilo de los ácidos grasos contienen al menos 11 y como máximo 25, preferiblemente 23, 22 o 21 carbonos.

Los compuestos de la invención tienen también usos farmacéuticos (medicinales) y nutricionales.

Una “composición farmacéutica” se refiere a una composición para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal para restaurar o mantener la salud; dicha composición comprende un (uno o más) agente activo y una o más sustancias adicionales útiles como portador. El término “portador” se refiere a un diluyente, adyuvante, relleno, excipiente, estabilizador o vehículo con el que se formula el agente para su administración.

“Nutracéutico” se refiere a un alimento que proporciona beneficios para la salud además de su valor nutricional básico. Un nutracéutico tiene un beneficio fisiológico o proporciona protección contra trastornos o molestias fisiológicas. Una composición nutracéutica comprende una composición de la invención y al menos una sustancia adicional, por ejemplo, un portador nutracéutico o un componente alimentario.

El término “suplemento dietético” se refiere a un nutracéutico, por ejemplo, una composición nutracéutica destinada a proporcionar nutrientes que, de otro modo, podrían no consumirse en cantidades suficientes.

“Alimento funcional” es también un nutracéutico, por ejemplo, una composición nutracéutica, y se refiere a cualquier alimento o ingrediente alimentario modificado que puede aportar un beneficio o proporcionar protección contra un trastorno o malestar fisiológico, más allá de los nutrientes tradicionales que contiene.

Una “declaración de propiedades saludables” define un beneficio para la salud de un nutracéutico y está sujeta a una aprobación reglamentaria (análoga a una indicación en el caso de un medicamento) según una legislación nacional o equivalente. Una “declaración de propiedades saludables” debe figurar en las etiquetas de los alimentos y en su comercialización.

La palabra “que comprende”, tal como se utiliza aquí, significa que contiene, es decir, que permite la presencia de otras entidades o miembros. El término puede limitarse a “compuesto esencialmente por”, lo que significa que comprende los componentes o ingredientes esenciales enumerados y, opcionalmente, otros componentes o ingredientes no esenciales; o a “compuesto por”, lo que significa que se excluye cualquier componente adicional.

La “terapia” puede incluir la prevención y/o el tratamiento.

“Prevenir el” o “prevención del” desarrollo de una enfermedad o afección se refiere al menos a la reducción de la probabilidad del riesgo o la susceptibilidad de adquirir una enfermedad o trastorno, o preferentemente a hacer que al

menos uno de los síntomas clínicos de la enfermedad o trastorno no se desarrolle en un paciente que puede estar expuesto o predispuesto a la enfermedad pero que aún no experimenta o muestra síntomas de esta.

“Tratar” o “tratamiento” de cualquier enfermedad o trastorno se refiere, en algunas realizaciones, a la mejora de al menos una enfermedad, trastorno o condición o, preferentemente, a la reducción del desarrollo de la enfermedad o trastorno o de, al menos, uno de sus síntomas clínicos. En algunas realizaciones, “tratar” o “tratamiento” se refieren a la mejora de, al menos, un parámetro físico de la enfermedad. En ciertas realizaciones, “tratar” o “tratamiento” se refiere a inhibir la enfermedad o el trastorno o la condición, ya sea física o fisiológicamente. En ciertas realizaciones, “tratar” o “tratamiento” se refiere a prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad o el trastorno.

Específicamente en el caso de las enfermedades del sistema nervioso central o periférico, el tratamiento, en particular en el caso de los trastornos degenerativos o en el caso de los trastornos mentales, según sea el caso, puede incluir la ralentización de la tasa de degeneración o deterioro; hacer que la degeneración sea menos debilitante; mejorar el bienestar físico o mental del sujeto; mejorar o preservar la memoria y/o las funciones cognitivas; restaurar y/o mejorar el estado de alerta y la capacidad de concentración o, en algunas situaciones, prevenir la aparición de la demencia.

Por lo tanto, los términos “prevención” y “tratamiento” pueden solaparse, como se desprende de la definición anterior, en la medida en que este último incluya la prevención o el retraso de la aparición de la enfermedad o el trastorno.

Un sujeto es cualquier sujeto animal o humano, en particular un sujeto vertebrado, más particularmente un sujeto de sangre caliente o un mamífero.

Un “mamífero”, tal como se utiliza aquí, puede ser cualquier mamífero, preferentemente un animal de laboratorio, un animal de compañía, un animal de ganado o un animal doméstico. Un mamífero puede ser, por ejemplo, un roedor, un primate, un mono o un humano. Preferentemente, los mamíferos son cualquier vertebrado de la clase Mammalia que tenga neocórtex (una región del cerebro), pelo y glándulas mamarias.

Los compuestos y las composiciones farmacéuticas según la invención pueden utilizarse en un método terapéutico.

Los compuestos y las composiciones farmacéuticas según la invención se utilizan en un método terapéutico para el tratamiento de enfermedades en las que están implicados los receptores de ácido retinoico (RAR) y los receptores de retinoides X (RXR). Preferiblemente, la enfermedad implica a los receptores de retinoides X y el ligando de la invención es selectivo para los mismos. Dicha enfermedad puede ser una enfermedad debida a una alteración de la señalización de los RXR.

Los compuestos y las composiciones farmacéuticas según la invención se utilizan en un método terapéutico, en particular para el tratamiento de un trastorno/enfermedad mental.

El término “enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central” son enfermedades o trastornos que afectan al sistema nervioso central (SNC), es decir, al cerebro o a la médula espinal, y que dan lugar a trastornos neurológicos o mentales, preferentemente relacionados con el complejo de RXR con RAR u otros receptores nucleares. Las causas de las enfermedades del SNC pueden ser, por ejemplo, traumatismos, infecciones, degeneración, trastornos autoinmunes, defectos estructurales, tumores y accidentes cerebrovasculares. Aquí nos centramos en las enfermedades neurodegenerativas, los trastornos del estado de ánimo, la esquizofrenia y el autismo.

El término “enfermedades relacionadas con el sistema nervioso periférico” son enfermedades que afectan al sistema nervioso periférico, preferentemente vinculadas al complejo de RXR con RAR u otros receptores nucleares. Sin embargo, el ligando de la invención es preferentemente selectivo de RXR.

El término “trastorno mental” incluye, entre otros, el trastorno obsesivo-compulsivo, el trastorno de estrés postraumático, la ansiedad, los ataques de pánico, la esquizofrenia, los trastornos esquizoafectivos, la depresión, la manía, la maniacodepresión (trastorno bipolar), la apatía, el delirio, las fobias, la amnesia, los trastornos alimentarios (por ejemplo, la bulimia, la anorexia), y otros similares. En una realización, los trastornos mentales incluyen el trastorno obsesivo-compulsivo, el trastorno de estrés postraumático, los ataques de pánico, la esquizofrenia, los trastornos esquizoafectivos, la depresión, la manía, el trastorno maniacodepresivo (trastorno bipolar), la apatía, el delirio, las fobias, la amnesia y los trastornos alimentarios (por ejemplo, la bulimia, la anorexia). En otra realización, los trastornos psiquiátricos incluyen el trastorno obsesivo-compulsivo, la esquizofrenia, los trastornos esquizoafectivos, la depresión, la manía, la maniacodepresión (trastorno bipolar), la apatía, el delirio y las fobias. En otra realización, los trastornos psiquiátricos incluyen el trastorno obsesivo-compulsivo, la esquizofrenia, los trastornos esquizoafectivos, la depresión, la manía y la maniacodepresión (trastorno bipolar). Preferentemente o en particular, el término “trastorno psiquiátrico”, tal como se utiliza aquí, se refiere y será entendido por el experto como “trastornos mentales”, tal como se describen en las secciones F06-F50 de la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas de Salud Relacionados de la OMS 10ª Revisión. En una realización, los trastornos neurodegenerativos se excluyen del ámbito de los trastornos mentales o de los trastornos mentales.

“La memoria de trabajo o sinónimo de memoria a corto plazo” caracteriza la adquisición, el almacenamiento, la retención y el recuerdo de la información durante un breve intervalo de tiempo que va de algunos minutos a varias horas, opcionalmente días, y que se utiliza para modificar el comportamiento del sujeto.

- 5 “La pérdida de memoria” se refiere a la reducción de la capacidad de adquirir, almacenar, retener y/o recordar información, incluyendo experiencias pasadas, conocimientos y pensamientos.

El término “depresión” o “trastorno depresivo” o “trastorno del estado de ánimo” se refiere a un campo médico que puede ser comprendido por el profesional experto. Un “trastorno del estado de ánimo” se refiere a la alteración del
10 tono de los sentimientos o del estado emocional que experimenta un individuo durante un periodo extenso de tiempo. Los trastornos del estado de ánimo incluyen el trastorno de depresión mayor (es decir, el trastorno unipolar), la manía, la disforia, el trastorno bipolar, la distimia, la ciclotimia y muchos otros. Véase, por ejemplo, el Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, cuarta edición (DSM IV). Un “trastorno depresivo mayor”, “trastorno por depresión mayor” o “trastorno unipolar” se refiere a un trastorno del estado de ánimo que implica cualquiera de los siguientes
15 síntomas: estado de ánimo persistentemente triste, ansioso o “vacío”; sentimientos de desesperanza o pesimismo; sentimientos de culpa, inutilidad o impotencia; pérdida de interés o placer en aficiones y actividades que antes se disfrutaban, incluidas las relaciones sexuales; disminución de la energía, fatiga, estar “ralentizado”; dificultad para concentrarse, recordar o tomar decisiones; insomnio, despertares tempranos o dormir en exceso; pérdida de apetito y/o peso o comer en exceso y aumentar de peso; pensamientos de muerte o suicidio o intentos de suicidio; inquietud o irritabilidad; o síntomas físicos persistentes que no responden al tratamiento, como dolores de cabeza, trastornos digestivos y dolor crónico. Varios subtipos de depresión se describen, por ejemplo, en el DSM IV.

El término “enfermedad o trastorno neurodegenerativo”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una enfermedad o trastorno caracterizado por la disfunción progresiva del sistema nervioso o por la pérdida progresiva de
25 la estructura o la función del tejido neural, preferentemente de las neuronas, incluida la muerte de estas. La “enfermedad o trastorno neurodegenerativo” se selecciona preferentemente del grupo formado por la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la degeneración lobar frontotemporal asociada a la proteína TDP-43 (FTLD-TDP, la demencia con cuerpos de Lewy (DLB), la demencia vascular, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), del deterioro cognitivo leve (DCL), la enfermedad de Parkinson con DCL y otras demencias relacionadas con la neurodegeneración debidas a cambios en el cerebro causados por el envejecimiento, la enfermedad o
30 los traumatismos; o lesiones medulares y ataxias, esclerosis diseminada y esclerosis múltiple, u otras afecciones neurológicas.

Los compuestos y las composiciones farmacéuticas según la invención se utilizan en un método terapéutico, en particular para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

El término “enfermedad de Alzheimer” se refiere a la forma más común de demencia, que está bien reconocida clínicamente. La pérdida de memoria también desempeña un papel importante en esta enfermedad.

40 Descripción detallada de la invención

La vitamina A es una sustancia que puede revertir completamente el síndrome de deficiencia de vitamina A (24-26). La vitamina A1, utilizada aquí como término aplicado al retinol, los ésteres de retinilo y el retinal, y los derivados de la provitamina A, como el β -caroteno, el α -caroteno y la β -criptoxantina, y los derivados comparables de la vitamina A2
45 (3,4-didehidro-retinoides y el carotenoide anhidro-luteína), que se encuentran principalmente en las especies aviares y de peces (27, 28) pertenecen a esta categoría. La importancia para el ser humano de los pigmentos visuales del grupo de vitaminas A3 y A4, que hasta ahora no se han relacionado con los vertebrados, también puede ser considerada de forma crítica (17).

50 En los animales adultos, los heterodímeros de RXR, principalmente RXR-VDR, RXR-PPAR, RXR-FXR y RXR-LXR, junto con RXR-RAR, regulan el metabolismo lipídico homeostático y la inflamación (revisado en (29-34)). Los cambios en esta señalización mediada por el receptor dan lugar a graves enfermedades metabólicas e inmunológicas (revisadas en ((35) y (34)). Varios de estos efectos fisiológicos dependen de los procesos mediados por el receptor RXR, como la respuesta inflamatoria y la señalización de los lípidos, por lo que están relacionados con varios efectos fisiopatológicos identificados en animales adultos con deficiencia de vitamina A (36-41).

Un ligando endógeno del RXR sirve como interruptor principal para permitir la señalización mediada por los heterodímeros de RXR en el organismo de los mamíferos. Diversos efectos observados en animales con deficiencia de vitamina A fueron comparables a los efectos encontrados en animales RXR-KO (42, 43). Los presentes inventores creen
60 que, además de los efectos mediados por los receptores hormonales no nucleares en la visión, las vías mediadas por RAR y especialmente por RXR son las principales vías para la actividad de la vitamina A y que éstas dependen de los ligandos endógenos de RAR y/o RXR.

Está ampliamente aceptado que el ATRA es el ligando endógeno relevante del RAR, pero también se han descrito otros ligandos (22, 44-49). Los 9-*cis*-retinoides pueden convertirse en todo-*trans*-retinoides y servir como precursores adicionales del ligando endógeno de RAR, el ATRA.

Shirley M A y col. en 1996 (Shirley M A y col. 1996) han encontrado que en las ratas el 9-*cis*-RA se reduce a 13,14-dihidro-9-*cis*-RA y este último se conjuga con la taurina para formar un nuevo metabolito, considerado, sin embargo, como una etapa inicial que conduce a la beta-oxidación.

Recientemente se ha identificado el ácido 9-*cis*-13,14-dihidrorretinoico (9CDHRA) como un retinoide endógeno en ratones. Los actuales inventores han llegado a la conclusión de que el 9CDHRA es el ligando endógeno relevante para el receptor de retinoides X (RXR), un receptor hormonal nuclear que participa en la regulación de varias vías fisiológicas relevantes en el cerebro, el metabolismo de los lípidos, la inflamación, la diferenciación, la proliferación y el ciclo celular. Se ha descubierto que la señalización mediada por el RXR está desregulada en varias enfermedades que van desde disfunciones neurológicas, enfermedades cardiovasculares y enfermedades relacionadas con la piel o el sistema inmunitario, en las que está implicada una desregulación de la homeostasis lipídica y la inflamación relacionada con la señalización del RXR. Los inventores han identificado además el ligando endógeno del RXR, 9CDHRA, como una molécula lipídica de señalización posiblemente relacionada con las disfunciones del RXR debido a niveles reducidos del ligando. De este modo, se ha identificado una nueva vía de la vitamina A, denominada vía de la vitamina A5.

La presente invención se refiere a precursores fisiológicos y nutricionales del 9CDHRA. El principal precursor es el 9-*cis*-13,14-dihidrorretinol (9CDHROL), es decir, la vitamina A5 y sus ésteres, los ésteres de 9-*cis*-13,14-dihidrorretinilo (ésteres de 9CDHROL), así como los ésteres del ácido 9-*cis*-13,14-dihidrorretinoico (ésteres de 9CDHRA). Además de estas moléculas, hay nuevos carotenoides como precursores de la provitamina A(5), como el 9-*cis*-13,14-dihidro- β,β -caroteno (9CDHBC). Se contemplan otros precursores de la 9CDHBC (como el 9-*cis*- β,β -caroteno (9CBC)).

El objetivo del presente estudio fue encontrar y sintetizar mediante síntesis orgánica estos derivados adicionales y probar ejemplos representativos de estos precursores en modelos animales para la depresión en modelos de ratón.

En el conjunto de experimentos descritos en los Ejemplos, los presentes inventores han desarrollado una nueva síntesis química de 9-*cis*-13,14-dihidrorretinol y 9-*cis*-13,14-dihidrorretinil-acetato a través del 9-*cis*-13,14-dihidrorretinoato de etilo. Otros ésteres del ácido 9-*cis*-13,14-dihidrorretinoico y del 9-*cis*-13,14-dihidrorretinol (como el palmitato y otros) pueden prepararse fácilmente utilizando básicamente el mismo método.

También se han desarrollado nuevos métodos de síntesis del 9-*cis*-13,14-dihidro- β,β -caroteno y del 9-*cis*- β,β -caroteno.

Otra opción es la síntesis quimioenzimática de ésteres de retinilo de cadena larga. Una parte de estas síntesis utilizan el retinol como material de partida [O'Connor et. al. Aust. J. Chem. 1992, 45, 641; Maugard et. al. Biolechnol. Prog. 2002, 18, 424]. Algunos autores han utilizado ésteres de retinilo, como el acetato de retinilo, como material de partida para una preparación biocatalítica de ésteres de retinilo de cadena larga (véase, por ejemplo, la solicitud de patente japonesa no examinada JP 62-248495, 1987). El documento US7566795B2 describe un método mejorado para la preparación de ésteres de retinol de cadena larga mediante procesamiento quimioenzimático a partir de ésteres de retinilo de cadena corta y un ácido o éster de cadena larga apropiado en presencia de una enzima y un disolvente orgánico y, opcionalmente, en presencia de, al menos, un tamiz molecular y/o, al menos, una resina de intercambio iónico para formar el éster de retinilo.

Varias solicitudes de patentes se han dirigido a varios precursores de la forma de la vitamina A y sus variantes.

En cuanto a los ésteres de formas ácidas, el documento **WO 95/04018 A1** se refiere a la preparación de ésteres de ácido 9-*cis*-retinoico. Los compuestos comprenden dobles enlaces entre los carbonos 11 y 12, así como entre los átomos de carbono 13 y 14 y pueden tener configuraciones *cis* o *trans*. Mientras que los métodos pueden ser utilizados aquí, los compuestos no pueden ser necesariamente derivados de 13,14 dihidrorretinoides. El documento **WO 95/32946 A1** también se refiere a la preparación de ésteres del ácido 9-*cis*-retinoico. Los compuestos deben comprender dobles enlaces entre los carbonos 11-12 y 13-14, que pueden ser tanto isómeros *cis* como *trans*.

En cuanto a los ésteres de retinol, el documento **WO2013134867 A1** describe el tratamiento de la retinosis pigmentaria con ésteres de retinilo de configuración 9-*cis* o 11-*cis* (véase la reivindicación 17). La descripción menciona el ácido 9-*cis*-13,14-dihidrorretinoico como metabolito, pero no hay ninguna sugerencia sobre los derivados del 9-*cis*-13,14-dihidrorretinol. ("Los análisis farmacocinéticos mostraron que los metabolitos predominantes eran el oleato de 9-*cis*-retinilo o el palmitato de 9-*cis*-retinilo y el ácido 9-*cis*-13,14-dihidrorretinoico. A las 4 horas de la dosis, la concentración de estos compuestos era mayor que la del acetato de 9-*cis*-retinilo y el 9-*cis*-retinol". Véase la página 70, penúltimo párrafo).

El documento **WO 2011/034551 A2** describe formulaciones farmacéuticas que comprenden uno o más ésteres de 9-*cis*-retinilo (acetato, palmitato, etc.) en un vehículo lipídico y sus usos para fines oftálmicos. La descripción no menciona el uso de derivados de 9-*cis*-13,14-dihidrorretinol.

Por lo tanto, aparentemente no aparece ningún documento que describa el uso médico o, en particular, el uso nutricional del 9-*cis*-13,14-dihidroretinol o de sus derivados de éster. Además, no se han encontrado datos relativos a los derivados de ésteres del 9-*cis*-13,14-dihidroretinol.

5 La unión del ligando RXR es un mecanismo muy importante responsable de los efectos mediados por la vitamina A.

La vía de los precursores del RXR es diferente de la vía de los precursores del RAR que conduce al ATRA y a la señalización selectiva mediada por el RAR. Alternativamente, los carotenoides pro-vitamina A1, como se ha demostrado para el ATBC, no pueden convertirse en el organismo humano en sus derivados 9-*cis* y, por tanto, no son pre-
10 cursores de los ligandos selectivos del RXR. El alcohol de la vitamina A1, el todo-*trans*-retinol (ATROL), se convierte débilmente y de forma no selectiva en 9CDHROL, por lo que es un precursor débil y no selectivo de los ligandos selectivos del RXR. El ATROL puede servir principalmente como precursor multifuncional que se almacena como éster de retinilo y está estrechamente controlado por las proteínas de unión en el suero y las células para la homeostasis general y para permitir la síntesis de los ligandos de RAR y RXR y la posterior señalización mediada por RAR y RXR
15 sin selectividad RXR.

Se contempla aquí que los 9-*cis*-13,14-dihidroretinoides pueden considerarse como precursores específicos y/o selectivos de los ligandos del RXR. Basándose en la información expuesta anteriormente, los posibles ligandos del RXR procedentes de las vías de la vitamina A1 y A2 parecen tener una relevancia endógena nula o muy limitada. Sin
20 embargo, los presentes inventores han demostrado que esta nueva vía de señalización, que es relevante para la activación del RXR, debería incluirse también como criterio crucial para las funciones generales de la vitamina A (Figura 7). En la figura no se identifica la presencia de 9CDHRA y ATDHRAL. Esta ruta parece ser específica de la vía de la vitamina A, ya que las estructuras de alcohol análogas 9CROL y ATROL no se convierten esencialmente en los ácidos correspondientes en los cultivos celulares, por ejemplo, en los oligodendrocitos. En resumen, dado que el 9CRA
25 no endógeno procedente de la vía de la vitamina A1 debe excluirse como activador endógeno relevante del receptor RXR, los 9-*cis*-13,14-dihidroretinoides y sus precursores nutricionales representan una nueva vía de señalización de la vitamina A que se denomina vía de la vitamina A5.

Los presentes inventores han dilucidado la conversión metabólica de los compuestos de esta vía de la vitamina A5 en
30 experimentos de suplementación en el organismo de los mamíferos en sistemas celulares *in vitro*, los han identificado en el organismo de los ratones y de los humanos como derivados endógenos, y han identificado estos derivados directa o indirectamente dentro de la cadena alimentaria humana. Además, se ha investigado y encontrado sorprendentemente que 9CDHROL y 9CDHBC muestran actividades antidepresivas en el protocolo de derrota del estrés social como un proceso mediado por el receptor RXR. Por lo tanto, la invención se refiere a nuevos métodos de
35 tratamiento de la depresión mediante la administración de ligandos de RXR o vitamina A5 (9CDHROL), así como de pre-precursores de ligandos RXR o precursores de la vitamina A5 (derivados de la pro-vitamina A5) como 9CDHBC.

Como ejemplo para mostrar el efecto de la señalización de los RXR, entre las enfermedades con desregulación de la señalización de los RXR, se ha elegido la depresión como un grupo heterogéneo de trastornos psiquiátricos con una
40 etiología no claramente identificada. Se caracteriza por una serie de síntomas afectivos básicos, como la anhedonia y los sentimientos de desesperación, así como por síntomas cognitivos menos específicos, como el déficit de la memoria de trabajo. Se ha demostrado que la reducción de la biodisponibilidad del 9CDHRA en ratones portadores de una mutación nula para la proteína celular de unión al retinol 1 (Rbp1) conduce a comportamientos de tipo depresivo, mientras que el tratamiento farmacológico con 9CDHRA restablece el comportamiento normal en estos ratones. En el
45 caso de la depresión, la administración de ligandos RAR selectivos no conduce a ninguna mejora y esta disfunción parece ser una disfunción selectiva relacionada con la señalización RXR. Los tratamientos con precursores de 9CDHRA, tal y como se presenta aquí, son de relevancia directa para la investigación de la depresión, ya que el 9CDHRA y los precursores de 9CDHRA, de manera similar a los ligandos de RXR sintéticos, fueron eficaces para prevenir comportamientos de tipo depresivo en modelos animales de estrés crónico de comportamientos depresivos.
50

En concreto, los presentes inventores han determinado que el precursor de la 9CDHRA, el 9CDHROL, cuando se administra por vía oral a los ratones, también puede inducir efectos positivos en el rendimiento de la memoria en los ratones. Además, han determinado que el 9CDHROL es un precursor del 9CDHRA cuando se administra por vía oral a los ratones.
55

Se trata de un hallazgo sorprendente, ya que los análogos 9-*cis*-retinol (9CROL) y todo-*trans*-retinol (ATROL) no se convierten en ácido 9-*cis*-retinoico (9CRA) y en ácido todo-*trans*-retinoico (ATRA), o lo hacen de forma débil, en experimentos *in vitro* (véase la figura 13), por lo que no son buenos sustratos precursores de las formas ácidas corres-
60 pondientes.

Del mismo modo, los análogos 9-*cis*-retinol (9CROL) y todo-*trans*-retinol (ATROL) no se convierten en ácido 9-*cis*-13,14-dihidroretinoico (9CDHRA) y ácido todo-*trans*-13,14-dihidroretinoico (ATDHRAL), o lo hacen de forma débil, en experimentos *in vitro* (véase la figura 13), por lo que tampoco son buenos sustratos precursores de los ligandos de RAR y RXR activos.
65

Así, los presentes inventores han encontrado una inesperada y novedosa vía de la vitamina A al demostrar que el precursor de la 9CDHRA, el 9CDHROL, así como sus ésteres, son precursores especiales de los ligandos activos del RAR y del RXR.

5 Los presentes resultados permiten concluir que el 9CDHROL es un nuevo retinoide endógeno en los ratones y que los derivados que, una vez administrados, dan lugar al 9CDHROL en el organismo animal o humano, pueden considerarse como una fuente de este nuevo tipo de vitamina A.

10 Los presentes inventores también han determinado que el éster de 9CDHROL y el éster de 9CDHRA son alternativos al 9CDHROL como precursores del 9CDHRA.

Así pues, el 9CDHROL y el éster de 9CDHROL y el éster de 9CDHRA son precursores fisiológicos y nutricionales del 9CDHRA, y pueden utilizarse como tratamientos alternativos para alcanzar mayores niveles de 9CDHRA en tejidos (específicos).

15 En estudios adicionales con animales en un conjunto de modelos de enfermedades mentales, se han aportado más pruebas de que el (*R*)-9CDHRA muestra actividades similares a las del agonista RXR *in vivo* y revierte los déficits de comportamiento en los ratones.

20 Junto con la evidencia de que los ésteres de 9CDHRA y 9CDHROL, así como sus ésteres, aumentan los niveles de 9CDHRA de manera sorprendente en el cerebro y en los oligodendrocitos, mostrando la reversión de los déficits de comportamiento en ratones Rbp1-/-, la mejora del rendimiento cognitivo en ratones de tipo salvaje, y la reversión de los efectos antidepresivos en el modelo de estrés de derrota social crónica, apoyan aún más la utilidad de los compuestos de la invención en una amplia gama de enfermedades del sistema nervioso central y periférico. Se utilizaron ratones Rbp1-/- porque muestran el mismo tipo de déficits que RXR γ -/-, lo que sugiere que la señalización de RXR γ está regulada a la baja. La normalización de su memoria es una prueba de que a estos ratones les falta un ligado de RXR y no el propio receptor (o la funcionalidad del receptor). El uso de ratones RXR γ -/- es un control negativo para demostrar que 9CDHRA actúa en RXR γ para mejorar la memoria - en consecuencia, en ausencia de RXR γ no puede mejorar la memoria. Los resultados se confirmaron en animales de tipo salvaje.

30 La activación de RXR por 9CDHRA da lugar a vías de activación selectiva de RXR y a la señalización mediada por RXR-LXR, RXR-NR4A, RXR-VDR, RXR-FXR y RXR-PPAR. Estas vías de señalización mediadas por RXR pueden ser modificadas únicamente por un ligando RXR y no por un ligando RAR.

35 Los presentes inventores han encontrado el ligando endógeno del RXR 9CDHRA y su precursor eficaz 9CDHROL (vitamina A5), así como precursores biogénicos anteriores. Esta vía de la vitamina A5 / pro-vitamina A5 implica aplicaciones farmacéuticas o nutricionales o tópicas de nuestros precursores RXR selectivos reivindicados.

40 La prevención y el uso de estos compuestos de vitamina A5 / pro-vitamina A5 para enfermedades en las que la señalización mediada por el RXR está aumentada, como en el caso de varias enfermedades neurodegenerativas y otras enfermedades de la piel y del sistema cardiovascular que implican una homeostasis lipídica y una regulación inmunitaria alteradas por el RXR, como la aterosclerosis, la obesidad y la diabetes. Estas enfermedades con una señalización disfuncional mediada por el RXR pueden ser prevenidas y/o tratadas por nuestros precursores selectivos del ligando del receptor RXR.

45 Como ejemplo utilizado en este estudio, se trató la depresión como una disfunción de la señalización mediada por el RXR y el 9CDHRA, así como el 9CDHROL y el 9CDHBC como precursores del 9CDHRA, como estrategia activa de tratamiento/prevenición. Sin embargo, se han descrito muchas otras enfermedades en las que existe un fenotipo RXR-KO, que van principalmente desde enfermedades neurodegenerativas hasta disfunciones en el sistema cardiovascular como la obesidad, la diabetes, la arteriosclerosis y la regulación del apetito.

50 Afirmamos que hemos encontrado un importante mecanismo interruptor fisiológico en los organismos humanos que puede ser activado selectivamente por a) un ligando fisiológico selectivo (9CDHRA) o, b) por precursores nutricionales presentes en los alimentos, que también pueden ser administrados como suplementos / productos farmacéuticos, 9CDHROL y 9CDHBC. Este interruptor puede permitir la señalización mediada por el receptor RXR y, por tanto, prevenir las disfunciones y enfermedades dependientes del receptor RXR.

También se ha encontrado, sorprendentemente, que el precursor selectivo de 9CDHRA, 9CDHBC, es un carotenoide pro-vitamina A5 para permitir la señalización mediada por el receptor RXR.

60 Como se muestra aquí, sólo el 9CDHBC y no el 9CBC es un excelente precursor del 9CDHROL (vitamina A5). El carotenoide 9CDHBC es un buen precursor del 9CDHRA en el suero, el hígado y el cerebro de los ratones, cuando se administra por vía oral a los ratones *en* ensayos de suplementación *in vivo*. En los seres humanos, los carotenoides son transportados (mientras que en los ratones no) y almacenados dentro del cuerpo, mientras que esto no ocurre en los ratones. Se ha demostrado que el 9CDHBC, pero no el 9CBC y especialmente no el ATBC, es un excelente precursor de 9CDHROL y también de 9CDHRA.

El 9CBC (ya conocido) y el 9CDHBC están presentes en la cadena alimentaria humana (se muestra para el melocotón y adicionalmente para el brócoli), así como un precursor general en la cadena alimentaria presente en las algas. El plancton, que contiene principalmente algas, es el material de partida de todos los alimentos de nuestro planeta, empezando por el plancton/algas, los peces, los animales acuáticos más grandes y más tarde los terrestres y, por último, los seres humanos, como final de la cadena alimentaria global con relevancia evaluada selectivamente desde la perspectiva humana.

Según la presente invención se reivindica un alimento funcional que comprende vitamina A5 aislada añadida o cualquier precursor de esta como el 9CDHBC u otros compuestos, o compuestos de uso según la invención. Preferentemente, el alimento funcional según la invención es un alimento procesado y, preferentemente, un alimento conservado.

Los ligandos precursores de RXR selectivos de la invención son sorprendentemente más eficaces que los compuestos no selectivos. Por ejemplo, el conocido alcohol de vitamina A1 retinoide endógeno, ATROL, es sólo un precursor débil y no selectivo de 9CDHROL y no es precursor de 9CDHRA en el cultivo de células de oligodendrocitos humanos *in vitro*. En ratones suplementados se convierte débilmente y, en parte, no significativamente, en 9CDHRA: factor 2 en el suero (no significativamente), factor 2,7 en el hígado (significativamente) y factor 7 en el cerebro del ratón (significativamente) examinado en el ratón después de la suplementación oral, con lo que no presenta o sólo presenta un potencial ineficiente para su uso como un precursor selectivo del ligando de RXR. En comparación, el 9CDHROL, como nuestro novedoso alcohol de vitamina A5, se convierte en 9CDHRA en un cultivo de células de oligodendrocitos humanos *in vitro* de forma excelente y altamente eficiente (factor 98 en el suero y factor 76 en el hígado y factor 1294 en el cerebro del ratón, todos ellos de forma significativa), cuando se administra la misma cantidad de estos retinoides suplementados a los ratones. Como se muestra aquí, se ha confirmado que el 9CDHROL está presente en el suero humano, así como en la cadena alimentaria humana examinada en el hígado de vacuno disponible comercialmente.

El 9CDHROL es, por tanto, un excelente precursor fisiológico y nutricional del 9CDHRA y puede utilizarse como tratamiento alternativo para alcanzar selectivamente mayores niveles de 9CDHRA y una señalización selectiva mediada por el RXR, como se ha demostrado en estudios de comportamiento en ratones. El 9CDHROL se convierte muy eficientemente en 9CDHRA, como se ha demostrado en ensayos de suplementación *in vitro* e *in vivo*. Los ésteres del 9CDHROL (9CDHROL-éster) y del 9CDHRA (9CDHRA-éster) son también derivados excelentes y aún más estables y pueden administrarse alternativamente y producir una conversión aún mayor en 9CDHRA. En definitiva, el 9CDHROL pertenece a una nueva familia selectiva de la vitamina A que proporciona precursores selectivos del ligando RXR, denominada familia de la vitamina A5.

El 9CDHBC es un nuevo derivado endógeno identificado en altas cantidades en la cadena alimentaria humana a varios niveles. Por lo tanto, el 9CDHBC es una nueva pro-vitamina selectiva, denominada pro-vitamina A5 como precursor selectivo del ligando selectivo de RXR, el 9CDHRA.

Por otra parte, el 9CBC es un pre-precursor de un ligando RXR y una pro-vitamina A5. El 9CBC puede utilizarse alternativamente como ingrediente alimentario o como derivado nutracéutico con un derivado muy débil y no selectivo para prevenir la deficiencia de VA5 y para la suplementación general de VA5 para prevenir las disfunciones dependientes de RXR de nuestros organismos, aquí mostradas de forma representativa en la depresión como un ligando selectivo de RXR / enfermedad neurodegenerativa mediada por RXR.

Los 13,14-dihidrocarotenoides no se han descrito hasta la fecha, salvo en el caso de los carotenoides acíclicos como el licopeno, el fitoeno y el fitoflueno. La hidrogenación formal del doble enlace C13,C14 podría ser el resultado de la acción de la retinol-saturasa (RETSAT) sobre el precursor insaturado retinol o de un metabolismo alternativo de los retinoides clásicos conocidos (Moise et al., 2004). Los grupos de investigación de los presentes inventores han identificado el ácido todo-*trans*-13,14-dihidrorretinoico en altas concentraciones en el suero, el hígado y el cerebro de ratones jóvenes de tipo salvaje no suplementados con vitamina A (respectivamente, 96 ng/ml; 352 ng/mg; 38 ng/g).

En resumen, la vía a partir de 9-*cis*-dihidrocarotenoides, preferentemente 9-*cis*-13,14-dihidrocarotenoides, tiene una relevancia fisiológica para la síntesis endógena de 9CDHRA a partir de carotenoides dietéticos. Así, se contempla que el 9CDHROL y el 9CDHBC son precursores nutricionales y endógenos relevantes del ligando RXR endógeno 9CDHRA.

Por lo tanto, la invención también se relaciona con el uso de 9-*cis*-dihidro-carotenoides (9CDHBC) para los propósitos aquí divulgados.

Los experimentos muestran que los compuestos de la invención son capaces de proporcionar 9CDHRA y podrían funcionar para mantener la salud, en particular la del sistema nervioso central o periférico y/o para mantener la salud contra las enfermedades aquí mencionadas o prevenir o tratar dichas enfermedades prácticamente en cualquier persona. En particular, la enfermedad es una enfermedad del sistema nervioso central o periférico como se menciona en el presente documento.

A continuación, se detallan ciertos aspectos y realizaciones de la invención, y también se ilustra la invención mediante Ejemplos que forman parte de la invención; sin embargo, el experto entenderá que, basándose en las enseñanzas específicas y generales proporcionadas en el presente documento, existen otras variantes y realizaciones que pueden llevarse a cabo.

- 5 Preparación de los compuestos de la invención
- Los compuestos de partida pueden obtenerse comercialmente o pueden sintetizarse según métodos estándar.
- 10 Preparación del ácido 9-*cis*-13,14-dihidroretinoico y sus ésteres
- En la realización presentada en los Ejemplos, la preparación del éster etílico (*R*)-4 del ácido (*R*)-9-*cis*-13,14-dihidroretinoico [(*R*)-1] se basó en el acoplamiento de Suzuki del yoduro de trienilo enantiopuro **3** y el ácido borónico **2** (véase el Esquema 1 del Ejemplo 1). La síntesis de **3** comenzó con el (*Z*)-stannildienol **5**, que se transformó en el benzotiazolil sulfuro de alilo **6** por reacción de Mitsunobu con el tiol correspondiente y posteriormente se oxidó a la sulfona **7** con H₂O₂ y un reactivo de peroximolibdato (VI). La olefinación de Julia-Kocienski se llevó a cabo utilizando un ligero exceso de base y un exceso del aldehído enantiopuro (*R*)-**8** que es un etil-éster. Como se anticipó a partir de los hallazgos anteriores sobre el resultado estereoquímico de las reacciones de alilsulfonas y aldehídos, la olefina recién formada del éster trienílico (*R*)-**9** es de geometría *Z*. El tratamiento del estannano precursor con una solución de yodo en CH₂Cl₂ generó el yoduro (*R*)-**3** mediante el intercambio Sn-I y la isomerización promovida por el yodo del dieno (9*Z*,11*Z*) al isómero geométrico (9*Z*,11*E*) deseado. La estructura de los isómeros geométricos pudo confirmarse mediante experimentos de NOE.
- 15 La reacción de Suzuki del ácido borónico **2** recién preparado y el yoduro de dienilo (*R*)-**3**, seguida de una elaboración inmediata, dio como resultado el (*R*)-9-*cis*-13,14-dihidroretinoato de etilo (*R*)-**4**. La saponificación de (*R*)-**4** proporcionó el ácido carboxílico deseado (*R*)-**1** sin pérdida detectable de la integridad estereoquímica. (Véase el esquema de reacción 1).
- 20 Siguiendo el esquema general, también se preparó el enantiómero (*S*)-**1** con una eficacia similar.
- 25 La preparación de los compuestos de la invención se describe con más detalle en el Ejemplo 1.
- Pueden prepararse ésteres alternativos del ácido 9-*cis*-13,14-dihidroretinoico con las correspondientes variantes de éster del compuesto (*R*)-**8**.
- 30 Además, el ácido carboxílico 9-*cis*-13,14-dihidroretinoico puede esterificarse con otros alcoholes que contengan alquilo o alquenilo mediante procedimientos estándar, como el tratamiento de una mezcla de ambos compuestos con diclohexilcarbodiimida (DCC) y dimetilaminopiridina (DMAP).
- 35 Además, se pueden preparar otros ésteres a partir del correspondiente aldehído (*R*)-**8** con un éster diferente al etílico.
- Preparación de 9-*cis*-13,14-dihidroretinol y los ésteres de 9-*cis*-13,14-dihidroretinilo
- El 9-*cis*-13,14-dihidroretinol se ha preparado como se describe en el presente documento mediante la reducción con DIBAL-H (hidruro de diisobutilaluminio) del 13,14-dihidroretinoato de etilo.
- 40 La reducción de ésteres también puede realizarse con hidruro de aluminio y litio (LiAlH₄) en tetrahidrofurano (THF) o éter dietílico, o con borohidruro de litio y un alcohol (EtOH, MeOH) en THF/éter dietílico como disolvente.
- 45 Se preparó el acetato de 9-*cis*-13,14-dihidroretinilo a partir de 9-*cis*-13,14-dihidroretinol añadiendo un exceso de Ac₂O y piridina en presencia de DMAP. El éster obtenido se aisló y purificó.
- El método de síntesis mantuvo la configuración absoluta de los estereocentros y proporcionó los enantiómeros.
- 50 Por este método se pueden preparar ésteres alternativos con un anhídrido de ácido carboxílico R₂O, como reactivo, siendo R un ácido carboxílico, o utilizando los correspondientes cloruros derivados de los ácidos carboxílicos, o utilizando el ácido carboxílico activado preparado, por ejemplo, con DCC y DMAP.
- 55 Los ésteres de 9-*cis*-13,14-dihidroretinol pueden prepararse mediante reacciones de transesterificación de ésteres, con lo que se puede sustituir el grupo acilo.
- 60 Alternativamente, los ésteres de retinilo pueden prepararse a partir del 9-*cis*-13,14-dihidroretinol utilizando agentes esterificantes adecuados.
- 65 Otro método puede ser el de las reacciones enzimáticas selectivas.

Por ejemplo, la lecitina:retinol aciltransferasa (LRAT) cataliza una transesterificación, transfiriendo los fragmento de acilo de cadena larga (principalmente los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico) presentes en la posición *sn*-1 de la fosfatidilcolina de la bicapa de membrana al retinol, formando ésteres de retinilo (O'Byrne, Sheila M. et al. 2013). Las lipasas forman otro grupo de enzimas adecuadas para la síntesis de ésteres, como el éster de ácido graso (Kai Z J 2011, Yin Chunhua 2006). Como alternativa, se puede utilizar un método quimioenzimático combinado (Liu ZQ 2015).

Tales enzimas pueden prepararse mediante técnicas recombinantes y utilizarse para preparar selectivamente el éster deseado. Alternativamente, la enzima puede clonarse en una célula huésped apropiada, sobreexpresarse en forma activa, y esta célula recombinante puede utilizarse para preparar el éster deseado.

Algunos ésteres preferidos de la invención

Ésteres preferidos del ácido 9-*cis*-13,14-dihidroretinoico

Los ésteres preferidos del ácido 9-*cis*-13,14-dihidroretinoico son típicamente ésteres de grupos alquilo de pequeño tamaño, como los ésteres de metilo, etilo o propilo del ácido 9-*cis*-13,14-dihidroretinoico. Los ésteres del ácido 9-*cis*-13,14-dihidroretinoico con alcoholes saturados de cadena larga son menos preferidos que los ésteres de ácidos grasos de cadena larga del 9-*cis*-13,14-dihidroretinol.

Otros compuestos preferidos de ésteres de 9-*cis*-13,14-dihidroretinilo

Otros compuestos preferidos de ésteres de 9-*cis*-13,14-dihidroretinilo incluyen ésteres de formiato (metanoato), etanoato y propionato, así como, aunque menos preferidos, ésteres de butirato y valerato.

Los ácidos grasos de cadena larga (LCFA) también pueden formar ésteres con el 9-*cis*-13,14-dihidroretinol.

Los ácidos grasos de cadena larga incluyen ácidos grasos con una cadena alifática de 13 a 21 carbonos.

Los ácidos grasos de cadena larga pueden seleccionarse entre los ácidos grasos saturados e insaturados, estos últimos incluyendo los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados.

Ácidos grasos saturados

Los ésteres típicos con ácidos grasos saturados pueden formarse, por ejemplo, con los siguientes ácidos grasos de cadena larga:

Ácido mirístico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	14:0
Ácido palmítico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	16:0
Ácido esteárico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	18:0
Ácido araquídico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	20:0.

Aunque a menudo se afirma que los ácidos grasos saturados no son ventajosos en la dieta, aún pueden ser componentes útiles de los ésteres de la invención como precursores del 9CDHROL en los tejidos humanos.

Ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs)

Los ácidos grasos monoinsaturados tienen un doble enlace carbono-carbono, que puede estar presente en diferentes posiciones. Los monoenoos más comunes tienen una longitud de cadena de 16-22 y un doble enlace con la configuración *cis*, que es la preferida.

Los MUFAs preferidos que son aplicables en la presente invención son el ácido oleico $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7(\text{HC}=\text{CH})(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ y el ácido palmitoleico $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5(\text{HC}=\text{CH})(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$.

Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

En los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) el primer doble enlace puede encontrarse entre el tercer y el cuarto átomo de carbono a partir del primer carbono del ácido carboxílico; son los llamados ácidos grasos ω -3. Si el primer doble enlace se encuentra entre el sexto y el séptimo átomo de carbono, entonces se denominan ácidos grasos ω -6.

Los PUFAs preferidos que son aplicables en la presente invención son, por ejemplo, los ácidos grasos ω -3 y ω -6.

Entre los PUFAs, el ácido araquidónico (ARA) y el ácido docohexanoico (DHA) son útiles en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (véase, por ejemplo, el documento EP1419780B1).

En este caso, los PUFAs, una vez hidrolizados, también pueden ejercer su efecto ventajoso en el órgano en cuestión.

En una realización, se prefieren los ésteres de ácidos grasos esenciales. Dos ácidos grasos esenciales son el ácido linoleico (LA) y el ácido alfa-linolénico (ALA). El cuerpo humano tiene una capacidad limitada para convertir el ALA en los ácidos grasos omega-3 de cadena más larga, el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), que también se prefieren.

Ácidos grasos de cadena ramificada (BCFA)

Los ácidos grasos ramificados (BCFA) son componentes bioactivos de los alimentos [Ran-Ressler RR et al. "Branched-chain fatty acid content of foods and estimated intake in the USA". Br J Nutr. 2014 Aug 28;112(4):565-72], que están presentes en la leche y la soja y, en algunos casos (como el ácido fitánico), en las grasas animales de rumiantes, y en ciertos pescados. Los ácidos grasos de cadena ramificada de origen natural muestran propiedades potenciales para la salud y son componentes preferidos de los ésteres de la invención.

Estos BCFAs preferidos son, por ejemplo, el ácido 13-metiltetradecanoico, el ácido 15-metilpalmítico y el ácido fitánico (ácido 3,7,11,15-tetrametil hexadecanoico).

Los ácidos grasos y su papel en la Biología pueden encontrarse, por ejemplo, en los siguientes libros:

(Ching Kuang Chow "Fatty Acids in Foods and their Health Implications" 2007; Arild C y col. Fatty Acids: Structures and Properties ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES 2005)

Los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas según la invención pueden utilizarse en un método terapéutico. Una terapia preferida se refiere a las enfermedades del sistema nervioso.

Los compuestos de la invención en el sistema y el tejido nervioso

Los compuestos de la invención pueden convertirse en su forma activa en el tejido nervioso o en el sistema nervioso. Preferentemente, si los compuestos se administran a un animal o a un sujeto humano, esta conversión en el sistema nervioso o en el tejido nervioso (en una realización preferida en el cerebro) es preferente.

En la realización preferida de la invención los compuestos se convierten por hidrólisis en 9CDHROL. Alternativamente, el compuesto es 9CDHROL. En el sistema nervioso, el 9CDHROL se convierte en 9CDHRA, que ejerce su efecto agonista del receptor RXR.

El sistema nervioso, tal y como se utiliza aquí, está formado por el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP). El sistema nervioso central (SNC) está compuesto por el cerebro y la médula espinal.

El sistema nervioso periférico (SNP) incluye todos los nervios periféricos (ramificados) y regula y controla las funciones y la actividad del organismo.

Según la invención, el 9CDHRA formado *in situ* ejerce su efecto agonista del RXR en el tejido nervioso para prevenir o tratar enfermedades del SNC o del SNP (como se detalla en el presente documento, donde se discuten dichas enfermedades).

El tejido nervioso (o tejido del nervio) es el principal componente tisular de las dos partes mencionadas del sistema nervioso: el SNC y el SNP. Está compuesto por neuronas, o células nerviosas, que reciben y transmiten los impulsos, y por neuroglía, también conocida como células (neuro)gliales (glía), que ayudan a la propagación del impulso nervioso, además de proporcionar nutrientes a la neurona.

Las células neurogliales son, por ejemplo, las siguientes:

Células microgliales, astrocitos, oligodendrocitos, glía NG2, células de Schwann, célula glial satélite, glía entérica

Por mencionar algunos con algo más de detalle, los oligodendrocitos son estructuras del sistema nervioso central que forman vainas de mielina en los axones de una neurona, que son un aislamiento a base de lípidos que promueve una conducción eficiente de los impulsos nerviosos por el axón. La glía NG2 son células del SNC que sirven como precursoras del desarrollo de los oligodendrocitos. Las células de Schwann son el equivalente del SNP de los oligodendrocitos, y ayudan a mantener los axones y forman vainas de mielina en el SNP.

Los experimentos con células oligodendrocitarias, junto con los datos que informan del papel de los agonistas sintéticos del RXR en el control de la remielinización, apoyan el papel y la utilidad de los compuestos descritos en la patente para el control de la oligodendrogénesis y la función de la vaina de mielina en las CNS y el SNP, así como para la glía NG2.

Así, las enfermedades del SNC y del SNP que pueden ser tratadas, prevenidas o aliviadas por un agonista del RXR, pueden ser tratadas con los ésteres de 9CDHRA, con 9CDHROL y los ésteres de este último.

La señalización por RAR/RXR, RXR/PPAR o RXR/LXR en el cerebro se revisa o menciona, por ejemplo, en las siguientes publicaciones: (van Neerven 2008; Shudo K y col. 2009; Skerrett R y col. 2015).

5 Existen tres receptores X retinoicos (RXR): RXR-alfa, RXR-beta y RXR-gamma, codificados por los genes RXR α , RXR β y RXR γ , respectivamente. La unión del ligando a RXR es un mecanismo muy importante responsable de los efectos mediados por la vitamina A. El RXR ocupa una posición central en la señalización de los receptores nucleares (NR), ya que sirve como socio común de heterodimerización de múltiples NR. Estos heterodímeros se denominan permisivos o no permisivos dependiendo de si el papel del RXR es como socio de transcripción activo o silencioso, respectivamente. Los heterodímeros RXR-NR permisivos son activados por el ligando del RXR o por el ligando de su pareja, y suelen observarse efectos sinérgicos si ambos socios del heterodímero están unidos a sus ligandos. Uno de los heterodímeros es el heterodímero RXR-RAR.

15 Los presentes inventores demostraron que el 9CDHRA como agonista del receptor RXR coordina las actividades transcripcionales de varias vías de señalización de los receptores nucleares, posiblemente a través de los correspondientes heterodímeros permisivos (22).

20 Los compuestos de la invención son particularmente útiles como agonistas del receptor RXR y en condiciones en las que los agonistas del receptor RXR, en particular a través de los heterodímeros RXR-RAR, pero también RXR-PPAR o RXR-LXR son útiles para mantener o restaurar la salud.

En una realización preferida, los compuestos pueden utilizarse para el tratamiento de las funciones cognitivas deterioradas y/o el aprendizaje deteriorado.

25 Los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas según la invención pueden utilizarse en un método terapéutico, en particular para el tratamiento del deterioro de la memoria (pérdida de memoria), en particular el deterioro de la memoria de trabajo, por ejemplo, defectos y pérdida, o el deterioro de la memoria a corto plazo, por ejemplo, defectos y pérdida, como la amnesia, etc. El deterioro de la memoria, el deterioro de la capacidad de aprendizaje y el deterioro de las funciones cognitivas pueden estar asociados a un trastorno mental, como el trastorno cognitivo leve, el síndrome amnésico, las deficiencias de memoria y cognitivas en la esquizofrenia y los trastornos del estado de ánimo, como el trastorno afectivo bipolar y la depresión, los trastornos relacionados con el estrés y la ansiedad, como la amnesia parcial y completa y la amnesia disociativa.

35 Se sabe que varias sustancias y medicamentos psicoactivos provocan pérdida de memoria, deterioro de la capacidad de aprendizaje y de las funciones cognitivas, como los antidepresivos tricíclicos, los agonistas de la dopamina, los antihistamínicos, las benzodiacepinas, las estatinas, los betabloqueantes, los barbitúricos, los opiáceos, el THC, el alcohol, etc.

40 Los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas según la invención son especialmente útiles para revertir dicho deterioro de la memoria provocado por una enfermedad o un medicamento mencionado anteriormente.

45 Los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas según la invención son especialmente útiles en la prevención y/o el tratamiento del deterioro de la memoria a corto plazo. Los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas según la invención son especialmente útiles para mejorar el rendimiento de la memoria de trabajo o reducir la pérdida de memoria de trabajo.

50 Los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas según la invención son útiles en el tratamiento de la depresión, como los episodios depresivos leves, moderados y graves, así como la fase depresiva de la enfermedad bipolar, la ciclotimia o la distimia, el trastorno mixto ansioso-depresivo, la depresión o el episodio depresivo asociado a otras enfermedades, como la esquizofrenia, el cáncer, las enfermedades metabólicas, etc.

55 Los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas según la invención son útiles para prevenir y/o tratar trastornos neurodegenerativos. Preferentemente, un trastorno neurodegenerativo se selecciona entre la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, el deterioro cognitivo leve (DCL), la enfermedad de Parkinson con DCL, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la demencia con cuerpos de Lewy (DCL), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y otras demencias relacionadas con la neurodegeneración debidas a cambios en el cerebro causados por el envejecimiento, la enfermedad o el trauma; o lesiones medulares y ataxias, esclerosis diseminada y esclerosis múltiple u otras afecciones neurológicas.

60 Según una realización específica, la invención también se refiere a un kit que es adecuado para el tratamiento por los métodos descritos anteriormente.

65 En una realización, estos kits comprenden una composición que contiene el compuesto de la invención en dosis adecuadas y una segunda composición que contiene un estabilizador del estado de ánimo, un antidepresivo, un ansiolítico, etc.

En otra realización, el kit comprende una composición que contiene el compuesto de la invención en dosis apropiadas y una segunda composición que contiene un agente activo contra un trastorno neurodegenerativo tal como se define o enumera en el presente documento.

- 5 La invención también se refiere a una combinación que comprende componentes de los kits mencionados anteriormente.

El ensayo de los compuestos de la invención es posible en modelos animales (y en modelos no animales), por ejemplo, el modelo de estrés crónico de derrota social de los comportamientos depresivos, los modelos animales de amiloidosis o de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

Usos nutricionales

15 Los compuestos de la invención pueden utilizarse como suplemento nutricional o dietético, en una composición alimentaria funcional, en una composición de suplemento dietético o en una composición nutracéutica. Dicho suplemento nutricional o dietético, composición de alimentos funcionales, composiciones de suplementos dietéticos o composiciones nutracéuticas, tienen el beneficio de prevenir, revertir y/o aliviar una condición como la divulgada en el presente documento. En una realización preferida, la afección es la pérdida de memoria, en particular el deterioro de la memoria de trabajo o a corto plazo, en particular la pérdida de memoria sin la administración de un producto farmacéutico, es decir, de forma no médica y/o tienen el beneficio de prevenir, revertir y/o aliviar el deterioro del aprendizaje y/o el declive de las funciones cognitivas. Por tratamiento no médico se entiende, a los efectos de la solicitud, que las funciones corporales normales deben mantenerse cuando la condición aquí definida no es patológica o no ha alcanzado un nivel patológico. Preferentemente, en el tratamiento no médico se utiliza un suplemento nutricional o dietético, una composición alimentaria funcional, una composición de suplemento dietético o una composición nutracéutica para prevenir, revertir y/o aliviar la pérdida de memoria, el deterioro del aprendizaje y/o el declive de las funciones cognitivas en una condición que todavía no es o no puede considerarse como una enfermedad.

30 Las composiciones nutracéuticas pueden comprender un “portador nutracéuticamente aceptable”, lo que significa que el portador es aceptable para el consumo humano y conserva o mejora las propiedades biológicas del agente activo.

Por analogía con otras composiciones dietéticas de vitamina A basadas en la invención, las cantidades de retinoides de la vía de la vitamina A5 pueden medirse en equivalentes de 9CDROL.

35 Las composiciones de la invención son adecuadas para su uso en composiciones nutracéuticas, por ejemplo, suplementos dietéticos, alimentos funcionales, alimentos médicos o alimentos con una declaración de salud.

Como se muestra en este documento, las formas solubles en grasa se almacenarían en el hígado y el suministro del cuerpo podría producirse desde allí.

40 Formulaciones

Las composiciones comprenden, además del agente activo, al menos un portador.

45 El portador puede ser, por ejemplo, un diluyente, adyuvante, excipiente, estabilizador o vehículo con el que se formula el agente para su administración. Los portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como el agua y los aceites, incluidos los de origen petrolero, animal, vegetal o sintético, como el aceite de cacahuete, el aceite de soja, el aceite mineral, el aceite de sésamo y similares. El agua es un portador típico cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como portadores líquidos, especialmente para las soluciones inyectables.

50 En una realización, el agente se formula según procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a mamíferos o seres humanos. Normalmente, las composiciones para la administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición puede incluir también un agente solubilizante.

55 En las formulaciones sólidas, los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio; leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede contener también pequeñas cantidades de agentes humectantes o emulsionantes, como los lípidos.

60 Las composiciones farmacéuticas o nutracéuticas pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.

65 En particular, en el caso de los ésteres de cadena alquílica más largos, es ventajoso un vehículo lipídico. Los compuestos de la invención son sensibles a la luz y al oxígeno. Por lo tanto, la selección de un vehículo apropiado puede depender de su capacidad para estabilizar el compuesto de la invención. Tales formulaciones se describen, por

ejemplo, en el documento WO2011034551A2 (Boch y col., Pharmaceutical formulations comprising 9-*cis*-retinyl esters in a lipid vehicle). En el documento WO2011034551A2 y en el WO2013134867A1 se describen formulaciones y dosis ejemplares.

Las formas de dosificación oral adecuadas incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, sobres o cápsulas de gelatina dura o blanda, metilcelulosa u otro material adecuado que se disuelva fácilmente en el tracto digestivo. Pueden utilizarse portadores sólidos no tóxicos adecuados que incluyen, por ejemplo, cantidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares. (Véase, por ejemplo, Remington "Pharmaceutical Sciences", 17 Ed., Gennaro (ed.), Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1985).

Los métodos de introducción incluyen, entre otros, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, intraocular, epidural y oral. Los agentes pueden administrarse por cualquier vía conveniente como, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, rectal e intestinal), y similares, y pueden administrarse junto con otros agentes funcionalmente activos.

Dosificaciones

Las dosis de los agentes pueden seleccionarse cuidadosamente en función del estado clínico, la condición y la edad del sujeto, la forma de dosificación y similares.

Por ejemplo, la dosis efectiva en humanos puede calcularse a partir de la dosis en animales, como se describe, por ejemplo, en el capítulo V (PASO 2: Cálculo de la dosis equivalente en humanos) y en la tabla 1 de unas directrices de la FDA de julio de 2005. En ella se indica que, para obtener un valor de dosis de partida en humanos, las dosis en animales se dividirán por un factor calculado en función de la superficie corporal, por ejemplo, por un factor de 6,2 en las dosis en kilogramos de peso corporal entre ratas y humanos, y un factor de 12,3 en las dosis en kilogramos de peso corporal entre ratones y humanos.

Por lo tanto, se puede dar con seguridad al menos un límite superior basado en modelos animales según las especies.

Los efectos secundarios dependen de las dosis, y los compuestos de la invención se contemplan como favorables en este sentido.

Sólo para dar un ejemplo ilustrativo, y sujeto a ensayos, en el caso de las gotas para los ojos, un agente puede administrarse, por ejemplo, desde aproximadamente 0,01 mg, aproximadamente 0,1 mg, o aproximadamente 1 mg, hasta aproximadamente 25 mg, hasta aproximadamente 50 mg, hasta aproximadamente 90 mg por dosis única. Las gotas oculares pueden administrarse una o más veces al día, según sea necesario. En el caso de las inyecciones, las dosis adecuadas pueden ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,0001 mg, aproximadamente 0,001 mg, aproximadamente 0,01 mg, o aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg, a aproximadamente 25 mg, a aproximadamente 50 mg, o a aproximadamente 90 mg del agente, de una a cuatro veces por semana. En otras realizaciones, pueden administrarse de 1,0 a 30 mg del agente, de una a tres veces por semana, o más en caso de necesitarlo con mayor frecuencia, por ejemplo, diariamente. Las dosis orales pueden entrar en el mismo orden de magnitud, por ejemplo, de aproximadamente 1 mg o 5 mg a aproximadamente 10 mg, a aproximadamente 25 mg, a aproximadamente 50 mg, o a aproximadamente 100 mg del agente en un sujeto, diariamente o de una a seis veces por semana.

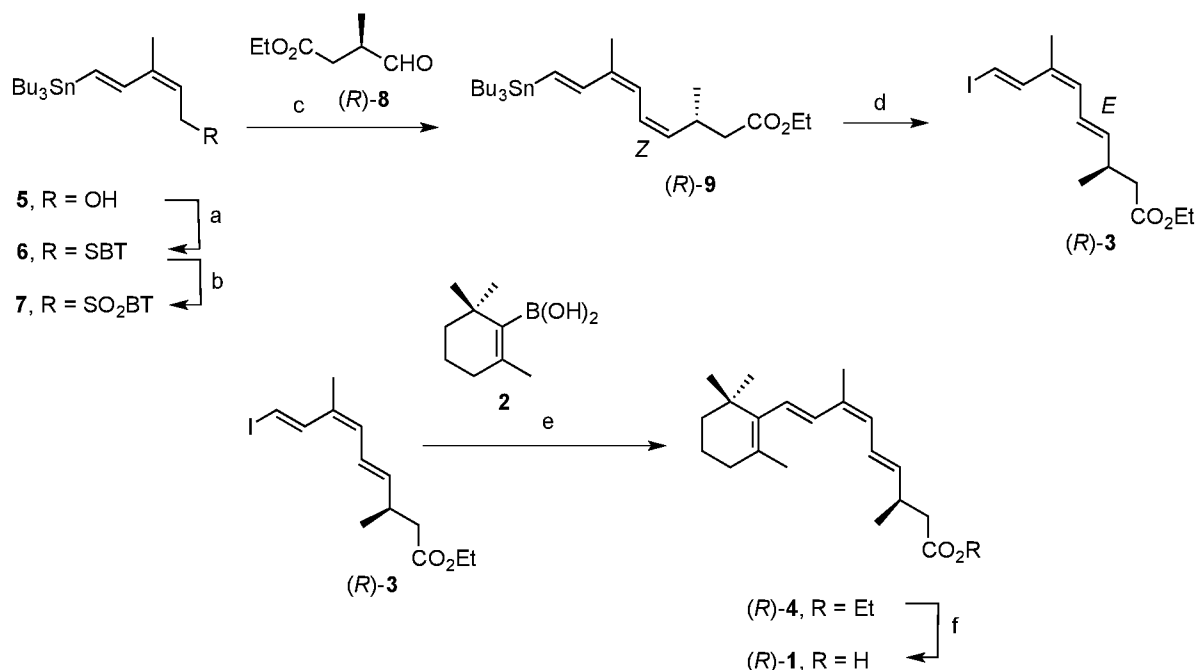
Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis química - síntesis de dihidroretinoides:

Para confirmar si la señal relativa de MS-MS detectada a 303>207 *m/z* corresponde a 9CDHRA, se llevó a cabo la síntesis estereoselectiva de ambos enantiómeros del ácido 9-*cis*-13,14-dihidroretinoico siguiendo la estrategia previamente descrita basada en un acoplamiento de Suzuki Csp2-Csp2 catalizado por paladio (Pazos Y y col. 2001). A continuación, se describen los detalles de la síntesis, purificación y caracterización estereocontrolada de los enantiómeros (*R*)- y (*S*)- del ácido 9-*cis*-13,14-dihidroretinoico.

La preparación del éster etílico del ácido (*R*)-9-*cis*-13,14-dihidroretinoico (*R*)-**4** se basó en el acoplamiento de Suzuki del yoduro de trienilo enantiopuro **3** y el ácido borónico **2** (Esquema 1). La síntesis de **3** comenzó con el (*Z*)-estannil-dienol **5** (Domínguez B. et al. 2000, Pazos Y et al. 1999) que se transformó en el benzotiazolil sulfuro de alilo **6** por reacción de Mitsunobu con el tiol correspondiente, y posteriormente se oxidó a la sulfona **7** con H₂O₂ y un reactivo de peroximolibdato (VI) (Schultz HS et al. 1963) a -10 °C. La olefinación de Julia-Kocienski (Blakemore PR. 2002; Aïssa C 2009) se llevó a cabo utilizando un ligero exceso de base (NaHMDS, 1,15 equiv.) y 1,7 equivalentes de aldehído enantiopuro (*R*)-**8**. (Moise AR et al. 2008, Leonard J. et al. 1995) Como se anticipó a partir de los resultados anteriores sobre la estereoquímica de las reacciones de alilsulfonas y aldehídos (Sorg A et al. 2005, Vaz B et al., 2005), la olefina recién formada del éster de trienilo (*R*)-**9** es de geometría *Z* (lo que se confirmó mediante experimentos de NOE). El tratamiento del estannano precursor con una disolución de yodo en CH₂Cl₂ produjo el yoduro (*R*)-**3** mediante el

intercambio Sn-I y la isomerización promovida por el yodo del dieno (9Z,11Z) al isómero geométrico (9Z,11E) deseado (tal y como se confirmó mediante experimentos de NOE).



Esquema 1. Reactivos y condiciones:

- (a) PPh₃, BTSH, DIAD, CH₂Cl₂, 2 h (98 %).
(b) (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O, 30 % H₂O₂, EtOH, -10 °C, 17 h (66 %).
(c) NaHMDS, THF, -78 °C, 30 min (93 %).
(d) I₂, CH₂Cl₂, 25 °C, 30 min.
(e) Pd(PPh₃)₄, 10 % aq. TIOH, THF, 25 °C, 3 h (42 %).
(f) 2M KOH, MeOH, 80 °C, 45 min (84 %).

La reacción de Suzuki del ácido borónico **2** recién preparado y el yoduro de dienilo (**R**)-**3** utilizando Pd(PPh₃)₄ como catalizador y un 10 % de TIOH acuoso como base en THF a temperatura ambiente, seguida de la elaboración inmediata, permitió obtener el (**R**)-9-*cis*-13,14-dihidroetinoato de etilo (**R**)-**4** en un 78 % de rendimiento.

(A partir de (**R**)-**4** puede obtenerse el correspondiente ácido carboxílico (**R**)-**1** en un 84 % de rendimiento sin pérdida detectable de la integridad estereoquímica.

Siguiendo el esquema general, el enantiómero (**S**)-**4** también puede prepararse con una eficacia similar.

Preparación y caracterización de compuestos - Procedimientos generales

Los disolventes se secaron según los métodos publicados y se destilaron antes de su uso. Todos los demás reactivos son compuestos comerciales de la máxima pureza disponible. A menos que se indique lo contrario, todas las reacciones se llevaron a cabo bajo atmósfera de argón, y las que no incluyen reactivos acuosos se realizaron en material de vidrio secado al horno. La cromatografía en capa fina (TLC) analítica se realizó en placas de aluminio con Merck Kieselgel 60F254 y se visualizó mediante irradiación de UV (254 nm) o mediante tinción con una disolución etanólica de ácido fosfomolibdico. La cromatografía en columna *flash* se llevó a cabo utilizando Merck Kieselgel 60 (malla 230-400) bajo presión. Los espectros de masas de impacto electrónico (EI) se obtuvieron en un instrumento Hewlett-Packard HP59970 que funcionaba a 70 eV. Alternativamente, se utilizó un MS FT-ICR APEX III (Bruker Daltonics), equipado con un imán de blindaje activo de 7T, y se generaron iones utilizando una fuente de ionización por electrospray (ESI) Apollo API, con un voltaje entre 1800 y 2200 V (para optimizar la eficiencia de la ionización) aplicado a la aguja, y un contravoltaje de 450 V aplicado al capilar. Para los espectros ESI, las muestras se prepararon añadiendo una solución de pulverización de 70:29,9:0,1 (v/v/v) CH₃OH/agua/ácido fórmico a una solución de la muestra en una proporción v/v de 1 a 5 % para obtener la mejor relación señal/ruido. Los espectros de masas de alta resolución se

adquirieron en un instrumento VG Autospec. Los espectros de RMN se registraron en C_6D_6 y acetona- d_6 a temperatura ambiente en un espectrómetro Bruker AMX-400 con disolvente prótico residual como referencia interna.

(2Z,4E)-1-(Benzotiazol-2-il)sulfanil-5-(tri-*n*-butilestanil)-3-metilpenta-2,4-dieno (6).

Se agitó una disolución de (2Z,4E)-3-metil-5-(tributil)penta-2,4-dien-1-ol (1,0 g, 2,58 mmol), 2-mercaptobenzotiazol (0,65 g, 3,87 mmol) y PPh_3 (1,10 g, 4,21 mmol) en THF (14 mL) durante 5 min a 0 °C. Se añadió gota a gota una disolución de DIAD (0,77 mL, 3,87 mmol) en THF (5 mL) y la mezcla se agitó durante 30 min a 25 °C. Se eliminó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía en columna (C18-silica gel, CH_3CN) para obtener 1,11 g (78 %) de un aceite incoloro identificado como (2Z,4E)-1-(benzotiazol-2-il)sulfanil-5-(tri-*n*-butil-estanol)-3-metilpenta-2,4-dieno **6**. 1H RMN (400 MHz, C_6D_6): δ 8,04 (d, J = 8,2 Hz, 1H, CH), 7,46 (d, J = 19,2 Hz, $^3J_{SnH}$ = 71,2 Hz, 1H, CH), 7,34 (d, J = 8,0 Hz, 1H, CH), 7,21 (ddd, J = 8,3, 7,3, 1,2 Hz, 1H, CH), 7,01 (ddd, J = 8,3, 7,4, 1,1 Hz, 1H, CH), 6,66 (d, J = 19,2 Hz, $^2J_{SnH}$ = 71,2 Hz, 1H, CH), 5,65 (t, J = 8,1 Hz, 1H, CH), 4,37 (d, J = 8,2 Hz, 2H, CH_2), 1,86 (s, 3H, CH_3), 1,8-1,6 (m, 6H, CH_2), 1,5-1,4 (m, 6H, CH_2), 1,1-1,0 (m, 15H, CH_3 + CH_2) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, C_6D_6): δ 166,4 (s), 153,7 (s), 142,6 (d), 138,6 (s), 135,7 (s), 132,0 (d), 125,9 (d), 124,1 (d), 122,1 (d), 121,7 (d), 121,0 (d), 30,2 (t), 29,3 (t, 3x), 27,6 (t, 3x), 19,8 (q), 13,8 (q, 3x), 9,7 (t, 3x) ppm; IR (NaCl): ν 2955 (s, C-H), 2923 (s, C-H), 2870 (m, C-H), 2850 (m, C-H), 1460 (s), 1427 (s) cm^{-1} . HRMS (ESI⁺): m/z calcd para $C_{25}H_{40}NS_2^{120}Sn$: 538.1620; encontrado: 538.1621.

(2Z,4E)-1-(Benzotiazol-2-il)sulfonil-5-(tri-*n*-butilestanil)-3-metilpenta-2,4-dieno (7).

A una disolución de (2Z,4E)-1-(benzotiazol-2-il)sulfanil-5-(tri-*n*-butilstanil)-3-metilpenta-2,4-dieno **6** (0,48 g, 0,89 mmol) en EtOH (9 mL), a -10 °C, se añadió una solución de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ (0,44 g, 0,36 mmol) en peróxido de hidrógeno acuoso (35 %, 7,7 mL, 89,1 mmol). Tras agitar durante 17 h a -10 °C, la mezcla se trató con H_2O y se extrajo con Et_2O (3x). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (3x) y se secaron (Na_2SO_4), y se eliminó el disolvente. El residuo se purificó por cromatografía (C18-silica gel, MeOH) para obtener 0,33 g (66 %) de un aceite incoloro identificado como (2Z,4E)-1-(benzotiazol-2-il)sulfonil-5-(tri-*n*-butilestanil)-3-metilpenta-2,4-dieno **7**. 1H RMN (400 MHz, C_6D_6): δ 8,10 (d, J = 8,2 Hz, 1H, CH), 7,18 (d, J = 19,2 Hz, 1H, CH), 7,16 (t, J = 7,5 Hz, 1H, CH), 7,12 (t, J = 8,1 Hz, 1H, CH), 6,98 (t, J = 7,7 Hz, 1H, CH), 6,59 (d, J = 19,2 Hz, $^2J_{SnH}$ = 68,2 Hz, 1H, CH), 5,43 (t, J = 8,0 Hz, 1H, CH), 4,32 (d, J = 8,1 Hz, 2H, CH_2), 1,8-1,6 (m, 9H, CH_3 + CH_2), 1,6-1,4 (m, 6H, CH_2), 1,1-1,0 (m, 15H, CH_3 + CH_2) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, C_6D_6): δ 167,1 (s), 152,9 (s), 143,1 (s), 141,7 (d), 136,9 (s), 134,4 (d), 127,3 (d), 127,1 (d), 125,0 (d), 122,1 (d), 112,0 (d), 53,3 (t), 29,3 (t, 3x), 27,5 (t, 3x), 20,0 (q), 13,8 (q, 3x), 9,6 (t, 3x) ppm; IR (NaCl): ν 2955 (s, C-H), 2923 (s, C-H), 2850 (m, C-H), 1467 (m), 1333 (s), 1151 (s) cm^{-1} . HRMS (ESI⁺): m/z calcd para $C_{25}H_{39}NNaO_2S_2^{120}Sn$: 592.1338; encontrado: 592.1334. UV (MeOH) λ_{max} 239 nm.

(3S,4Z,6Z,8E)-3,7-Dimetil-9-(tri-*n*-butilestanil)nona-4,6,8-trienoato de Etilo ((S)-9).

Una disolución enfriada (-78 °C) de (2Z,4E)-1-(benzotiazol-2-il)sulfonil-5-(tri-*n*-butilestanil)-3-metilpenta-2,4-dieno (0,115 g, 0,20 mmol) en THF (9 mL) se trató con NaHMDS (0,23 mL, 1M en THF, 0,23 mmol). Después de agitar durante 30 min a esta temperatura, se añadió una disolución de 3-metil-4-oxobutanoato de etilo (0,044 g, 0,30 mmol) en THF (4,5 mL), y la mezcla resultante se agitó durante 1 h a -78 °C y durante 3 h se dejó que llegara a temperatura ambiente. Se añadieron Et_2O y agua a baja temperatura y la mezcla se calentó hasta la temperatura ambiente. A continuación, se diluyó con Et_2O y se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con Et_2O (3x), las fases orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4) y se eliminó el disolvente. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice C-18, MeOH) para proporcionar 0,94 g (93 %) de un aceite amarillo pálido identificado como (3S,4Z,6Z,8E)-3,7-dimetil-9-(tri-*n*-butilestanil)nona-4,6,8-trienoato de etilo (S)-9. $[\alpha]^{28}_D +11,5^\circ$ (c 1,22, MeOH). 1H RMN (400 MHz, C_6D_6): δ 7,60 (d, J = 19,1 Hz, $^3J_{SnH}$ = 65,1 Hz, 1H, CH), 6,85 (t, J = 11,4 Hz, 1H, CH), 6,64 (d, J = 19,2 Hz, $^2J_{SnH}$ = 71,9 Hz, 1H, CH), 6,58 (d, J = 11,9 Hz, 1H, CH), 5,31 (t, J = 10,4 Hz, 1H, CH), 4,03 (q, J = 7,1 Hz, 2H, CH_2), 3,5-3,3 (m, 1H, CH), 2,4-2,2 (m, 2H, CH_2), 2,02 (s, 3H, CH_3), 1,8-1,6 (m, 6H, CH_2), 1,6-1,4 (m, 6H, CH_2), 1,2-0,9 (m, 18H, CH_3 + CH_2) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, C_6D_6): δ 171,3 (s), 143,2 (d), 135,8 (d), 135,4 (s), 130,7 (d), 123,8 (d), 122,9 (d), 59,8 (t), 41,8 (t), 29,3 (t, 3x), 29,2 (d), 27,5 (t, 3x), 20,7 (q), 20,3 (q), 14,0 (q), 13,7 (q, 3x), 9,6 (t, 3x) ppm. IR (NaCl): ν 2957 (s, C-H), 2924 (s, C-H), 2871 (m, C-H), 2851 (m, C-H), 1737 (s, C=O), 1459 (m), 1160 (m) cm^{-1} . HRMS (ESI⁺): m/z calcd para $C_{25}H_{46}NaO_2^{120}Sn$: 521.2416; encontrado: 521.2408. UV (MeOH): λ_{max} 285 nm.

(3R,4Z,6Z,8E)-3,7-Dimetil-9-(tri-*n*-butilestanil)nona-4,6,8-trienoato de Etilo ((R)-9). $[\alpha]^{29}_D -10,3^\circ$ (c 1,25, MeOH).

(3R,4E,6Z,8E)-3,7-Dimetil-9-yodo-nona-4,6,8-trienoato de Etilo ((R)-3).

A una disolución de (3R,4Z,6Z,8E)-3,7-dimetil-9-(tri-*n*-butilestanil)nona-4,6,8-trienoato de etilo (R)-9 (0,060 g, 0,121 mmol) en CH_2Cl_2 (5,3 mL) se añadió gota a gota yodo (0,046 g, 0,182 mmol) en CH_2Cl_2 (2,8 mL) y la mezcla resultante se agitó durante 30 min a 25 °C. Se añadió una solución saturada de $Na_2S_2O_3$ y la mezcla de reacción se extrajo con Et_2O (3x), las capas orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4) y se eliminó el disolvente. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, 97:3 hexano/ Et_3N) para proporcionar 0,037 g (92 %) de un aceite amarillo pálido identificado como (3R,4E,6Z,8E)-3,7-dimetil-9-yodo-nona-4,6,8-trienoato de etilo (R)-3. $[\alpha]^{24}_D +14,8^\circ$ (c 0,74, MeOH). 1H RMN (400 MHz, C_6D_6): δ 7,65 (d, J = 14,5 Hz, 1H, CH), 6,28 (dd, J = 14,9, 11,3 Hz, 1H, CH), 6,05 (d, J = 14,5 Hz, 1H, CH), 5,64 (d, J = 11,1 Hz, 1H, CH), 5,44 (dd, J = 15,0, 7,8 Hz, 1H, CH), 3,95 (q, J = 7,1 Hz, 2H, CH_2), 2,64 (dt, J = 14,1, 7,0 Hz, 1H, CH), 2,15 (dd, J = 14,9, 7,1 Hz, 1H, CH), 2,06 (dd, J = 14,9, 7,3 Hz,

1H, CH), 0,97 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H, CH₃), 0,88 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H, CH₃, ppm. ¹³C RMN (100 MHz, C₆D₆): δ 171,9 (s), 142,7 (d), 140,4 (d), 132,7 (s), 130,9 (d), 124,6 (d), 78,5 (d), 60,5 (t), 41,8 (t), 34,5 (d), 20,4 (q), 19,9 (q), 14,7 (q) ppm. IR (NaCl): ν 2972 (m, C-H), 2932 (m, C-H), 1731 (s, C=O), 1666 (m), 1180 (m) cm⁻¹. HRMS (ESI⁺): m/z calcd para C₁₃H₁₉INaO₂: 357.0322; encontrado: 357.0316. UV (MeOH): λ_{max} 275 nm.

(3*S*,4*E*,6*Z*,8*E*)-3,7-Dimetil-9-yodo-nona-4,6,8-trienoato de Etilo ((*S*)-3). $[\alpha]^{23}_D -16,7^\circ$ (c 0,72, MeOH).

(9*Z*,13*R*)-13,14-Dihidroretinoato de Etilo ((*R*)-4). A una disolución de (3*R*,4*E*,6*Z*,8*E*)-3,7-dimetil-9-yodo-nona-4,6,8-trienoato de etilo (*R*)-3 (0,036 g, 0,107 mmol) en THF (2,3 mL) se añadió Pd(PPh₃)₄ (0,013 g, 0,011 mmol). Después de 5 min a temperatura ambiente, se añadió el ácido 2,6,6-trimetilciclohex-1-enilborónico **2** (0,027 g, 0,161 mmol) en una porción seguido de TIOH (solución acuosa al 10 %, 0,75 mL, 0,407 mmol). Después de agitar durante 3 h a 25 °C, se añadió Et₂O y la mezcla de reacción se filtró a través de una capa corta de Celita®. El filtrado se lavó con disolución acuosa saturada de NaHCO₃ y la fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y se eliminó el disolvente. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, 97:3 hexano/Et₃N) para proporcionar 0,028 g (78 %) de un aceite amarillo pálido identificado como (9*Z*,13*R*)-13,14-dihidroretinoato de etilo (*R*)-4. $[\alpha]^{23}_D +14,2^\circ$ (c 0,48, MeOH). ¹H RMN (400 MHz, C₆D₆): δ 6,90 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, CH), 6,71 (dd, $J = 14,9, 11,2$ Hz, 1H, CH), 6,28 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, CH), 5,96 (d, $J = 11,1$ Hz, 1H, CH), 5,51 (dd, $J = 15,0, 7,8$ Hz, 1H, CH), 3,94 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H, CH₂), 2,77 (dt, $J = 14,1, 7,1$ Hz, 1H, CH), 2,21 (dd, $J = 14,8, 7,3$ Hz, 1H, CH), 2,11 (dd, $J = 14,8, 7,2$ Hz, 1H, CH), 1,95 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H, CH₂), 1,90 (s, 3H), 1,79 (s, 3H), 1,66 - 1,52 (m, 2H), 1,52 - 1,41 (m, 2H), 1,11 (s, 6H), 0,95 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, CH₃), 0,94 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H, CH₃) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, C₆D₆): 171,4 (s), 138,3 (s), 137,6 (d), 132,7 (s), 130,6 (d), 129,1 (d), 129,0 (s), 127,9 (d), 124,8 (d), 59,8 (t), 41,6 (t), 39,6 (t), 34,2 (s), 34,1 (d), 33,0 (t), 28,9 (q, 2x), 21,8 (q), 20,4 (q), 20,1 (q), 19,5 (t), 14,1 (q) ppm. IR (NaCl): ν 2961 (s, C-H), 2929 (s, C-H), 2866 (m, C-H), 1737 (s, C=O), 1455 (m), 1372 (m), 1167 (m) cm⁻¹. HRMS (ESI⁺): m/z calcd para C₂₂H₃₅O₂: 331.2632; encontrado: 331.2625. UV (MeOH): λ_{max} 287 nm (ε = 20000 L·mol⁻¹·cm⁻¹).

(9*Z*,13*S*)-13,14-Dihidroretinoato de Etilo ((*S*)-4). $[\alpha]^{22}_D -15,5^\circ$ (c 0,51, MeOH).

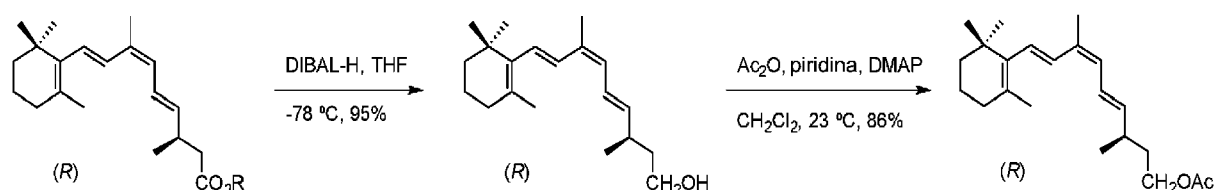
Ácido (9*Z*,13*R*)-13,14-Dihidroretinoico ((*R*)-1). A una disolución de (9*Z*,13*R*)-13,14-dihidroretinoato de etilo (*R*)-4 (0,023 g, 0,069 mmol) en MeOH (4,7 mL) se añadió KOH (solución acuosa 2M, 1,1 mL, 2,27 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 45 min a 80 °C. Tras dejar que la reacción se enfriara a temperatura ambiente, se añadieron CH₂Cl₂ y salmuera y se separaron las fases. La capa acuosa se lavó con H₂O (3x). Las fases acuosas combinadas se acidificaron con HCl al 10 % y se extrajeron con CH₂Cl₂ (3x). Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄) y se eliminó el disolvente. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, gradiente de 95:5 a 90:10 CH₂Cl₂/MeOH) para proporcionar 0,017 g (84 %) de un aceite amarillo pálido identificado como ácido (9*Z*,13*R*)-13,14-dihidroretinoico (*R*)-1. $[\alpha]^{22}_D +7,1^\circ$ (c 0,67, MeOH). ¹H RMN (400 MHz, acetona-d₆): δ 6,66 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H), 6,60 (dd, $J = 15,0, 11,2$ Hz, 1H), 6,18 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H), 5,93 (d, $J = 11,1$ Hz, 1H), 5,65 (dd, $J = 15,0, 7,5$ Hz, 1H), 2,73 (dt, $J = 13,9, 7,0$ Hz, 1H), 2,4 - 2,2 (m, 2H), 2,1 - 2,0 (m, 1H), 1,91 (s, 3H), 1,72 (s, 3H), 1,7 - 1,6 (m, 2H), 1,5 - 1,4 (m, 2H), 1,08 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 1,03 (s, 6H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, acetona-d₆): δ 173,5 (s), 138,9 (s), 138,8 (d), 133,4 (s), 131,1 (d), 129,8 (s), 129,7 (d), 128,5 (d), 125,4 (d), 41,8 (t), 40,3 (t), 34,9 (s), 34,6 (d), 33,6 (t), 29,4 (q), 22,1 (q), 20,7 (q), 20,6 (q), 20,0 (t) ppm. IR (NaCl): ν 2957 (s, C-H), 2923 (s, C-H), 2855 (m, C-H), 1709 (s, C=O), 1446 (m), 1290 (m) cm⁻¹. HRMS (ESI⁺): m/z calcd para C₂₀H₃₁O₂: 303.2319; encontrado: 303.2313. UV (MeOH): λ_{max} 289 nm (ε = 17600 L·mol⁻¹·cm⁻¹).

Ácido (9*Z*,13*S*)-13,14-Dihidroretinoico ((*S*)-1). $[\alpha]^{24}_D -6,9^\circ$ (c 0,26, MeOH).

Ejemplo 2.1: Síntesis de (*R*)-*cis*-13,14-dihidroretinol y acetato de (*R*)-*cis*-13,14-dihidroretinol

El (*R*)-9-*cis*-13,14-dihidroretinol se sintetizó mediante la reducción con DIBAL-H del (9*Z*,13*R*)-13,14-Dihidroretinoato de Etilo ((*R*)-4) en THF a -78 °C en un rendimiento del 95 % (Esquema 1).

El acetato de (*R*)-*cis*-13,14-dihidroretinilo se preparó con un rendimiento del 86 % por acetilación del (*R*)-*cis*-13,14-dihidroretinol con anhídrido acético y piridina en presencia de dimetilaminopiridina (DMAP).



Esquema 2

(3R,4E,6Z,8E)-3,7-Dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-4,6,8-trien-1-ol ((R)-10)

A una disolución enfriada (-78 °C) de (3R,4E,6Z,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-4,6,8-trienoato de etilo [(R)-9-*cis*-13,14-dihidrorretinoato de etilo, (R)-4] (32,0 mg, 0,097 mmol) en THF (1,0 mL), se añadió DIBAL-H (0,242 mL, 0,242 mmol, 1,0 M en hexanos) y la mezcla resultante se agitó durante 30 min a -78 °C. La mezcla se dejó calentar hasta -20 °C durante 2,5 h. Se añadió H₂O y la mezcla se extrajo con Et₂O (3x). Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄) y se eliminó el disolvente. La cromatografía *flash* del residuo (gel de sílice, primero neutralizado con 98:2 hexano/Et₃N, luego gradiente de 95:5 hexano/EtOAc hasta EtOAc) proporcionó (3R,4E,6Z,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-4,6,8-trien-1-ol (26,5 mg, 95 %) como un aceite incoloro. ¹H RMN (400,13 MHz, C₆D₆): δ 6,93 (d, J = 16,0 Hz, 1H), 6,69 (dd, J = 14,9, 11,1 Hz, 1H), 6,29 (d, J = 16,0 Hz, 1H), 6,01 (d, J = 11,1 Hz, 1H), 5,46 (dd, J = 15,0, 8,3 Hz, 1H), 3,35 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 2,27 (dt, J = 14,0, 6,7 Hz, 1H), 1,98 - 1,92 (m, 2H), 1,93 (s, 3H), 1,79 (s, 3H), 1,63 - 1,52 (m, 2H), 1,51 - 1,43 (m, 2H), 1,36 (c, J = 6,7 Hz, 2H), 1,11 (s, 6H), 0,91 (d, J = 6,7 Hz, 3H) ppm. ¹³C RMN (100,62 MHz, C₆D₆): δ 140,0 (d), 138,6 (s), 132,5 (s), 130,9 (d), 129,6 (d), 129,2 (s), 128,1 (d), 124,9 (d), 60,9 (t), 40,2 (t), 39,9 (t), 34,5 (s), 34,3 (d), 33,2 (t), 29,21 (c), 29,18 (c), 22,0 (c), 20,9 (c), 20,7 (c), 19,7 (t) ppm. HRMS (ESI⁺): Calcd. para C₂₀H₃₃O [M+H]⁺, 289,2526; encontrado, 289,2526. IR (NaCl): ν 3338 (m, O-H), 2957 (s, C-H), 2926 (s, C-H), 2861 (m, C-H), 1454 (m), 1375 (m), 965 (m) cm⁻¹.

Acetato de (3R,4E,6Z,8E)-3,7-Dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-4,6,8-trien-1-ilo ((R)-11)

A una disolución de (3R,4E,6Z,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-4,6,8-trien-1-ol (5,7 mg, 0,020 mmol) en CH₂Cl₂ (0,5 mL) se añadieron secuencialmente Ac₂O (0,009 mL, 0,099 mmol), piridina (0,008 mL, 0,099 mmol) y DMAP (0,5 mg, 0,004 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 1 h a 25 °C. Después se añadió Et₂O y la disolución resultante se lavó con una disolución acuosa saturada de CuSO₄ (2x). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y se evaporó. La cromatografía *flash* del residuo (gel de sílice, gradiente de hexano a 85:15 hexano/EtOAc) proporcionó el acetato de (3R,4E,6Z,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-4,6,8-trien-1-ilo (5,6 mg, 86 %) como un aceite incoloro. ¹H RMN (400,13 MHz, C₆D₆): δ 6,92 (d, J = 16,0 Hz, 1H), 6,67 (dd, J = 15,0, 10,8 Hz, 1H), 6,29 (d, J = 16,0 Hz, 1H), 5,98 (d, J = 11,1 Hz, 1H), 5,39 (dd, J = 15,0, 8,2 Hz, 1H), 4,11 - 3,92 (m, 2H), 2,16 (dq, J = 14,4, 7,2 Hz, 1H), 1,99 - 1,90 (m, 2H), 1,93 (s, 3H), 1,79 (d, J = 1,0 Hz, 3H), 1,67 (s, 3H), 1,62 - 1,53 (m, 2H), 1,50 - 1,41 (m, 4H), 1,11 (s, 6H), 0,86 (d, J = 6,8 Hz, 3H) ppm. ¹³C RMN (100,62 MHz, C₆D₆): δ 170,0 (s), 138,9 (d), 138,6 (s), 132,8 (s), 130,9 (d), 129,4 (d), 129,3 (s), 128,2 (d), 125,2 (d), 62,7 (t), 39,9 (t), 36,0 (t), 34,5 (s), 34,4 (d), 33,2 (t), 29,19 (c), 29,18 (c), 22,0 (c), 20,74 (c), 20,70 (c), 20,6 (c), 19,7 (t) ppm. HRMS (ESI⁺): Calcd. para C₂₂H₃₅O₂ [M+H]⁺, 331,2632; encontrado, 331,2621. IR (NaCl): ν 2957 (s, C-H), 2926 (s, C-H), 2860 (m, C-H), 1741 (s, C=O), 1455 (m), 1365 (m), 1238 (s), 966 (m) cm⁻¹.

Ejemplo 2.2: Síntesis de 9-*cis*-β,β-caroteno (Esquema 3, con numeración añadida)

9-*cis*-Retinoato de etilo (III). A una solución fría (0 °C) de (E)-4-(dietoxifosforil)-3-metilbut-2-enoato (II) (0,227 g, 1,10 mmol) en THF (2,0 mL) se añadieron *n*BuLi (0,63 mL, 1,00 mmol, 1,6 M en hexano) y DMPU (0,15 mL, 1,24 mmol). Tras agitar durante 1 h, la reacción se enfrió a -78 °C y se añadió una solución de (2Z,4E)-3-metil-5-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)penta-2,4-dienal (I) (0,100 g, 0,46 mmol) en THF (2,5 mL) y se agitó durante 2 h. Se añadió agua y la mezcla se extrajo con Et₂O (3x). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄) y el disolvente se evaporó. El crudo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, 95:5 hexano/EtOAc) para obtener 0,144 g (96 %) de un sólido amarillo identificado como 9-*cis*-retinoato de etilo (III).

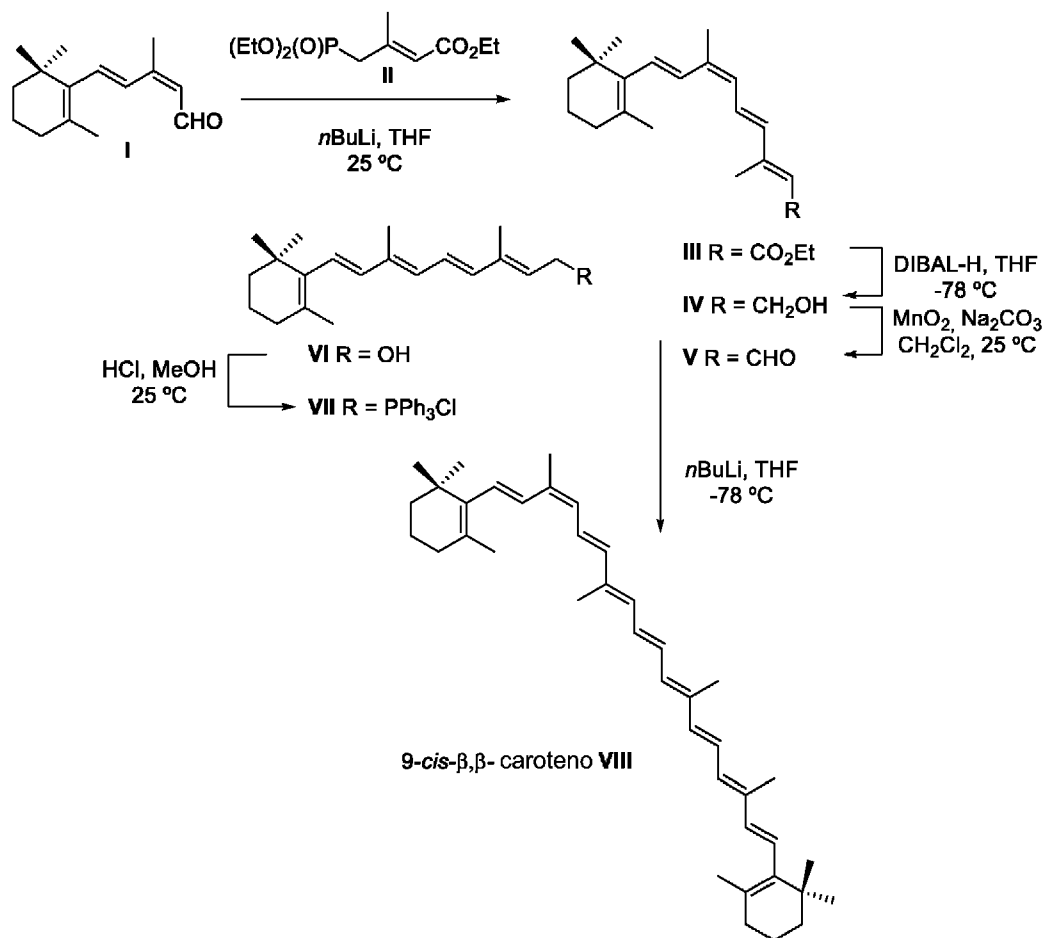
9-*cis*-Retinol (IV). A una solución fría (-78 °C) de 9-*cis*-retinoato de etilo (III) (0,154 g, 0,47 mmol) en THF (2,3 mL) se añadió DIBAL-H (1,08 mL, 1,08 mmol, 1,0 M en tolueno) y la reacción se agitó durante 2 h. Después se añadió agua y la mezcla se extrajo con EtOAc (3x). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄) y el disolvente se evaporó. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, gradiente de 95:5 a 80:20 hexano/EtOAc) para obtener 0,080 g (60 %) de un aceite amarillo identificado como 9-*cis*-retinol (IV).

9-*cis*-Retinal (V). A una solución de 9-*cis*-retinol (IV) (65 mg, 0,23 mmol) en CH₂Cl₂ (9,1 mL) se añadieron MnO₂ (197 mg, 2,27 mmol) y Na₂CO₃ (240 mg, 2,27 mmol) y la reacción se agitó durante 1,5 h a 25 °C. La mezcla se filtró a través de un lecho de Celita® lavando con CH₂Cl₂. El disolvente se evaporó, obteniéndose 38 mg (58 %) de un aceite amarillo identificado como 9-*cis*-retinal (V).

(2E,4E,6E,8E)-Bromo-(3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraen-1-il)trifenilfosfano (VII). A una solución de vitamina A / todo-*trans*-retinol (VI) (1,370 g, 4,78 mmol) en MeOH (2,7 mL) se añadieron PPh₃ (1,443 g, 5,5 mmol) y una solución de HCl (1,4 mL, 4 M en dioxano) y la reacción se agitó durante 2 h a 25 °C. Después, la mezcla se vertió en agua y se extrajo con Et₂O (2x). La capa acuosa se extrajo con AcOEt (3x) y las capas orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄) y se evaporó el disolvente. El residuo de color naranja claro se trituró tres veces con EtOAc para obtener 1,39 g (52 %) de una espuma amarilla identificada como (2E,4E,6E,8E)-bromo-(3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraen-1-il)trifenilfosfano VII. ¹H RMN (400,16 MHz, CDCl₃): δ 7,88 (m, 6H), 7,78 (m, 3H), 7,69 (m, 6H), 6,56 - 6,42 (m, 1H), 6,24 - 5,94 (m, 4H), 5,39 (d, J = 10,6 Hz, 1H), 4,99 (m, 2H), 2,01 (m, 2H), 1,92 (s, 3H), 1,69 (s, 6H), 1,55 - 1,40 (m, 4H), 1,01 (s, 6H) ppm. ¹³C RMN (101,63 MHz, CDCl₃): δ 143,7 (s), 137,7 (s), 137,5 (s), 137,4 (d), 134,9 (d), 134,8 (d), 132,0 (d), 129,5 (d), 128,45 (d), 127,5 (d), 126,4 (d), 118,7

(s), 117,8 (s), 114,1 (d), 39,6 (t), 34,2 (s), 33,0 (t), 28,9 (q, 2x), 25,4 (t), 24,9 (t), 19,2 (q), 13,1 (q), 12,8 (q) ppm. HRMS (ESI⁺): Calcd. para C₃₈H₄₄P⁺ ([M-Cl]⁺), 531.3175; encontrado, 531.3166.

9-*cis*-β,β-Caroteno (VIII). A una solución de sal de fosfonio (VII) (24,9 mg, 0,044 mmol) en THF (0,20 mL) a -78 °C se añadió *n*BuLi (0,027 mL, 0,044 mmol, 1,6 M en hexano) y la mezcla se agitó durante 30 min. Después se añadió una solución de 9-*cis*-retinal V (9,0 mg, 0,031 mmol) en THF (0,13 mL) y la mezcla se agitó durante 1 h a -78 °C y 30 min a 25 °C. Se añadió agua y la mezcla se extrajo con Et₂O (3x). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2x) y se secaron (Na₂SO₄) y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (C18-gel de sílice, CH₃CN) para obtener 11,3 mg (67 %) de una espuma roja identificada como 9-*cis*-β,β-caroteno (VIII). Los datos espectroscópicos son idénticos a los publicados anteriormente.



Esquema 3

Ejemplo 2.3: Síntesis de (*R*)-9-*cis*-13,14-dihidro-β,β-caroteno (Esquema 4 con numeración)

(*Z*)-3-Methyl-3-yodoprop-2-en-1-ol (X). Se añadió CuI (0,34 g, 1,78 mmol) a una solución de alcohol propargílico (IX) (1,00 g, 11,84 mmol) en Et₂O (13,2 mL). Se añadió una solución de MeMgBr (17,8 mL, 53,51 mmol, 3 M en Et₂O) a -20 °C. Después de agitar a esta temperatura durante 2 h, se dejó que la solución alcanzara los 25 °C y se siguió agitando durante 12 h. Se añadió una solución de I₂ (9,10 g, 35,67 mmol) en Et₂O (40,0 mL) a 0 °C y se retiró el baño de refrigeración. Tras agitar a 25 °C durante 24 h, la mezcla resultante se enfrió a 0 °C y se añadió agua helada. La fase orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de Na₂SO₄ (3x) y luego se filtró a través de una capa de Celita®. El residuo se purificó por destilación (0,2 mm Hg, 60 °C) para obtener 2,10 g (60 %) de un aceite amarillo identificado como (*Z*)-3-iodo-3-metilprop-2-en-1-ol (X). ¹H RMN (400,16 MHz, C₆D₆): δ 5,49 (s, 1H), 3,90 (s, 2H), 1,55 (s, 3H) ppm. ¹³C RMN (101,63 MHz, C₆D₆): δ 146,6 (s), 74,1 (d), 67,5 (t), 20,9 (q) ppm. HRMS (ESI⁺): Calcd. para C₄H₈IO ([M+H]⁺), 198.9609; encontrado, 198.9614.

(*Z*)-2-Metil-3-yodoacrilaldehído (XI). A una disolución de (*Z*)-2-metil-3-yodoprop-2-en-1-ol (IX) (0,21 g, 1,06 mmol) en CH₂Cl₂ (53,0 mL) se añadió MnO₂ (0,93 g, 10,65 mmol) y Na₂CO₃ (1,13 g, 10,65 mmol) y la reacción se agitó durante 1 h a 25 °C. A continuación, la mezcla se filtró a través de un lecho de Celita® lavando con CH₂Cl₂. El

disolvente se evaporó para obtener 0,15 g (73 %) de un aceite amarillo identificado como (Z)-2-metil-3-yodoacrilaldehído (**XI**).

2-(1E,3Z)-3-Metil-4-yodo-buta-1,3-dien-1-yl)-1,3,3-trimetilciclohex-1-ene (XIII). A una disolución fría (-30 °C) de la sal de fosfonio (**XII**) (150 mg, 0,31 mmol) en THF (2,5 mL), se añadió *n*BuLi (2,5 mL, 0,36 mmol, 2,36 M en hexanos) y la mezcla se agitó a 0 °C durante 45 min. Tras enfriar a -30 °C, se añadió una disolución de (Z)-2-metil-3-yodoacrilaldehído (**XI**) (70 mg, 0,36 mmol) en THF (2,5 mL) y la mezcla de reacción se agitó durante 1,5 h. Se añadió agua (5 mL) y la mezcla se extrajo con hexano (3x). Los extractos orgánicos se secaron (Na₂SO₄) y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en columna (C18-gel de sílice, CH₃CN) para obtener 65 mg (64 %) de un aceite amarillo identificado como 2-(1E,3Z)-3-metil-4-yodo-buta-1,3-dien-1-yl)-1,3,3-trimetilciclohex-1-eno (**XIII**). ¹H RMN (400 MHz, C₆D₆): δ 6,80 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H), 6,32 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H), 5,80 (s, 1H), 1,88 (m, 2H), 1,78 (s, 3H), 1,66 (s, 3H), 1,57 - 1,48 (m, 2H), 1,44 - 1,39 (m, 2H), 1,07 (s, 6H) ppm. ¹³C RMN (101 MHz, C₆D₆): δ 142,3 (s), 137,5 (s), 135,1 (d), 132,1 (d), 130,8 (s), 78,6 (d), 39,7 (t), 34,0 (s), 33,1 (t), 29,1 (c, 2x), 22,0 (c), 20,9 (c), 19,3 (t) ppm. UV (MeOH): λ_{max} 266 nm. IR (NaCl): ν 2925 (m, C-H), 2862 (m, C-H), 962 (m), 771 (s) cm⁻¹. HRMS (ESI⁺): Calcd. para C₁₄H₂₁I ([M+H]⁺), 316.0688; encontrado, 316.0684.

Sililéter (XV). A una disolución de 2-(1E,3Z)-3-metil-4-yodo-buta-1,3-dien-1-yl)-1,3,3-trimetilciclohex-1-eno **XIII** (161 mg, 0,510 mmol) en THF (0,2 mL) se añadió Pd(PPh₃)₄ (45 mg, 0,039 mmol). Después de agitar durante 5 min a 25 °C, se añadió una solución del (*R*)-borolano **XIV** (150 mg, 0,392 mmol) en THF (1,0 mL) y una disolución acuosa al 10 % de TIOH (4,26 mL), y la mezcla de reacción se agitó durante 2 h. La mezcla se extrajo con Et₂O (3x) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (3x) y se secaron (Na₂SO₄), y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, 95:5 hexano/EtOAc) para obtener 120 mg (71 %) de un aceite incoloro identificado como (3*R*,4*E*,6*Z*,8*E*)-[3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-yl)nona-4,6,8-trien-1-il]oxi}trisisopropilsilano (**XV**). ¹H RMN (400,16 MHz, C₆D₆): δ 6,93 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 6,69 (dd, *J* = 14,9, 11,1 Hz, 1H), 6,29 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 6,01 (d, *J* = 11,1 Hz, 1H), 5,46 (dd, *J* = 15,0, 8,3 Hz, 1H), 3,35 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 2,34 - 2,19 (m, 1H), 1,99 - 1,89 (m, 2H), 1,93 (s, 3H), 1,79 (s, 3H), 1,62 - 1,53 (m, 2H), 1,50 - 1,44 (m, 2H), 1,36 (c, *J* = 6,7 Hz, 2H), 1,11 (s, 6H), 0,91 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H) ppm. HRMS (ESI⁺): Calcd. para C₂₉H₅₃OSi ([M+H]⁺), 445.3848; encontrado, 445.3806.

(*R*)-9-*cis*-13,14-Dihidro-retinol (XVI). A una disolución fría (0 °C) del silil éter (**XV**) (91,2 mg, 0,212 mmol) en THF (3,5 mL) se añadió *n*Bu₄NF (0,32 mL, 0,32 mmol) y la mezcla se agitó durante 0,5 h a 25 °C. Se añadió una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ y la mezcla se extrajo con Et₂O (3x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (3x) y se secaron (Na₂SO₄) y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gradiente de 95:5 a 70:30 hexano/EtOAc) para obtener 41 mg (67 %) de un aceite incoloro identificado como (*R*)-9-*cis*-13,14-dihidro-retinol (**XVI**). ¹H RMN (400 MHz, C₆D₆): δ 6,93 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 6,69 (dd, *J* = 14,9, 11,1 Hz, 1H), 6,29 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 6,01 (d, *J* = 11,1 Hz, 1H), 5,46 (dd, *J* = 15,0, 8,3 Hz, 1H), 3,35 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 2,34 - 2,19 (m, 1H), 1,99 - 1,89 (m, 2H), 1,93 (s, 3H), 1,79 (s, 3H), 1,62 - 1,53 (m, 2H), 1,50 - 1,44 (m, 2H), 1,36 (q, *J* = 6,7 Hz, 2H), 1,11 (s, 6H), 0,91 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H) ppm. ¹³C RMN (101 MHz, C₆D₆): δ 140,0 (d), 138,6 (s), 132,5 (s), 130,9 (d), 129,6 (d), 129,2 (s), 128,0 (d), 124,9 (d), 60,9 (t), 40,2 (t), 39,9 (t), 34,5 (s), 34,3 (d), 33,2 (t), 29,21 (c), 29,19 (c), 22,0 (c), 20,9 (c), 20,7 (c), 19,7 (t) ppm. IR (NaCl): ν 3326 (br, O-H), 2966 (m, C-H), 2865 (m, C-H), 965 (s) cm⁻¹. HRMS (ESI⁺): Calcd. para C₂₀H₃₃O ([M+H]⁺), 289.2584; encontrado, 289.2525.

(*R*)-9-*cis*-13,14-Dihidro-β,β-caroteno (XIX). A una disolución de alcohol (**XVI**) (25 mg, 0,087 mmol) en CH₂Cl₂ (3,7 mL) a 0 °C se añadieron el peryodinano de Dess-Martin (73,5 mg, 0,173 mmol) y piridina (0,014 mL, 0,173 mmol) y la reacción se agitó durante 30 min a 0 °C y 2 h a 25 °C. A continuación, se añadió Et₂O (5 mL), una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (3 mL) y una disolución acuosa saturada de Na₂S₂O₃ (3 mL). Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con Et₂O (3x) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (2x) y salmuera (2x), se secaron (Na₂SO₄) y se evaporó el disolvente. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, gradiente de 95:5 a 70:30 hexano/EtOAc) para obtener 14 mg (57 %) de un aceite incoloro identificado como (*R*)-9-*cis*-13,14-dihidro-retinal (**XVII**). Se observó que este producto era muy inestable e isomerizaba fácilmente. IR (NaCl): ν 2927 (m, C-H), 2864 (m, C-H), 1461 (s), 1105. HRMS (ESI⁺): Calcd. para C₂₀H₃₁O ([M+H]⁺), 287.2362; encontrado, 287.2369. A una disolución de la sal de fosfonio **VII** (24,9 mg, 0,044 mmol) en THF (0,2 mL) a -78 °C se añadió *n*BuLi (0,027 mL, 0,044 mmol, 1,6 M en hexanos) y la reacción se agitó durante 30 min. Después se añadió una disolución de (*R*)-9-*cis*-13,14-dihidro-retinal **XVII** (9,0 mg, 0,031 mmol) en THF (0,13 mL) y la mezcla se agitó durante 1 h a -78 °C y 30 min a 25 °C. Se añadió agua y la mezcla se extrajo con Et₂O (3x). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa saturada de NaCl (2x) y se secaron (Na₂SO₄). El disolvente se evaporó y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (C18-gel de sílice, CH₃CN) para obtener 11,3 mg (67 %) de una espuma roja identificada como (*R*)-9-*cis*-13,14-dihidro-β,β-caroteno (**XIX**). ¹H RMN (400 MHz, C₆D₆): δ 6,80-6,63 (m, 2H), 6,57-5,90 (m, 7H), 5,80-5,35 (m, 4H), 2,32-2,10 (m, 3H), 1,94 (s, 3H), 1,91 (s, 3H), 1,89-1,82 (m, 4H), 1,78 (s, 9H), 1,67-1,43 (m, 8H), 1,33 (s, 6H), 1,10 (s, 12H), 0,96 (m, 3H) ppm. HRMS (ESI⁺): Calcd. para C₄₀H₅₉ ([M+H]⁺), 539.2528; encontrado, 539.4611.

Referencias utilizadas en los procedimientos de síntesis que se incorporan al presente documento:

Okitsu, T. *Chem. Comm.* **2008**, 47, 6330-6332.

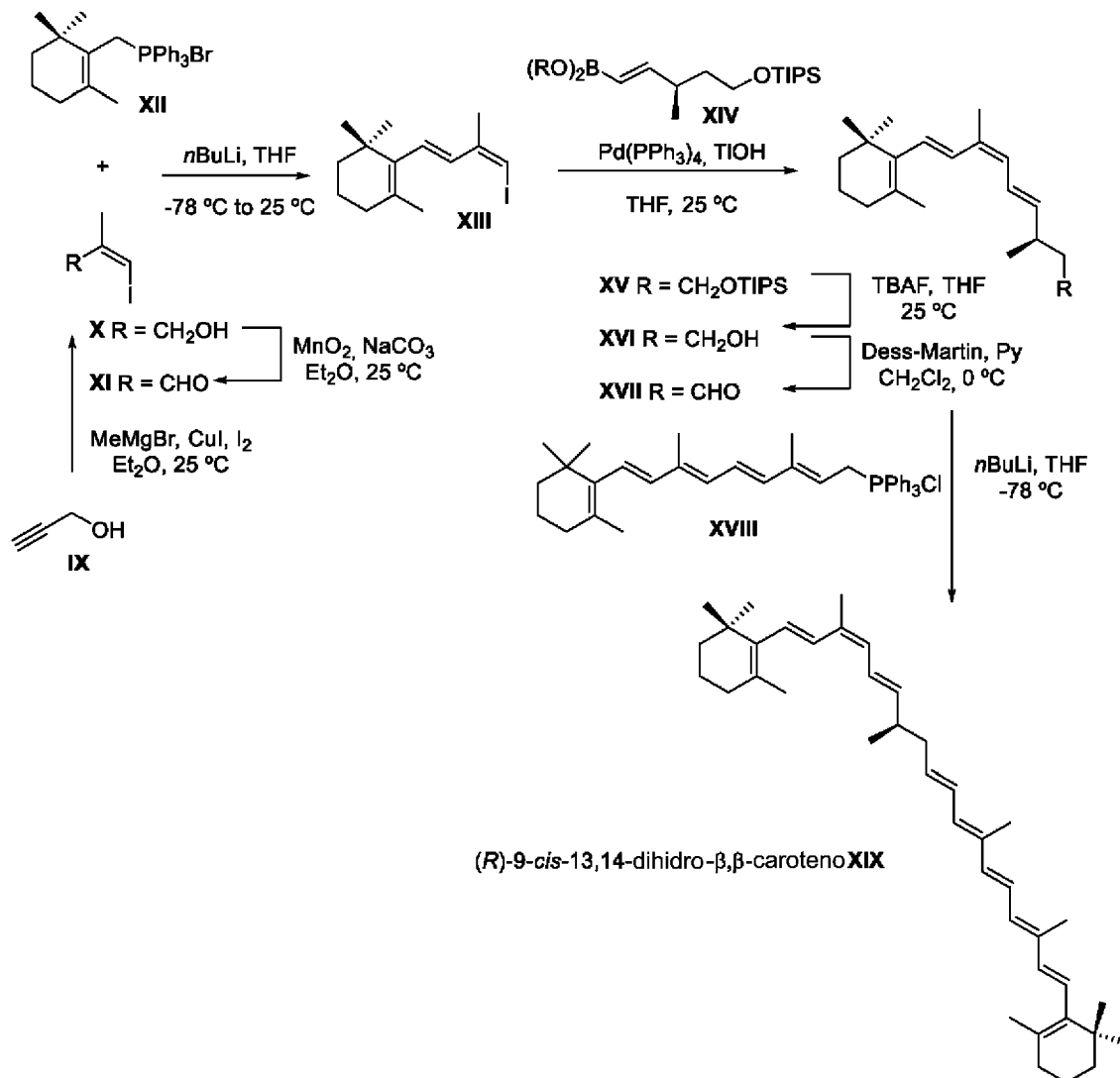
Englert, G. *Helv. Chim. Acta* **1975**, 58(8), 2367-2390.

Zanoun, A. *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **2006**, 777(1-3), 113-120.

5 Koyama, Y.; Hosomi, M.; Hashimoto, H. Shimamura, T. *J. Mol. Struct.* **1989**, 193, 185-201.

Koukal, P.; Ulc, J.; Necas, D.; Kotor, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 2110-2114.

10 (a) Isler, O.; Gutmann, H.; Lindlar, H.; Montaron, M.; Riiegg, R.; Ryser, G.; Zeller, P. *Helv. Chim. Acta* **1956**, 39, 463.
(b) Broek, A. D.; Muradin-Szweykowska, M.; Courtin, J. M. L.; Lugtenburg, J. *Red. Trav. Chim. Pays-Bas* **1983**, 102, 46.



Ejemplo 3: Experimentos con animales

55 Animales:

Los ratones macho (Charles River, Francia) se alojaron en grupos de 3 ratones por jaula en un ciclo de luz/oscuridad de 7 de la mañana a 7 de la tarde en jaulas ventiladas individualmente (Techniplast, Italia). La comida (dieta estándar, D04 de SAFE, Francia) y el agua estaban disponibles. Todos los experimentos se llevaron a cabo según las Directivas del Consejo de la Comunidad Europea de 24 de noviembre de 1986 (86/609/CEE) y de conformidad con las directrices del CNRS y del Ministerio de Agricultura y Silvicultura francés (decreto 87848).

65 Para el protocolo de estrés por derrota social se utilizaron ratones C57BL/6N (Charles River, Francia) de 6-7 semanas de edad. Todos los ratones se alojaron en grupos de 4-5 ratones por jaula en un ciclo de luz/oscuridad de 7 de la mañana a 7 de la tarde en jaulas ventiladas individualmente (Techniplast, Italia) hasta el protocolo de estrés que se

llevó a cabo en jaulas MICE adaptadas para el estrés de derrota social (véase más adelante). En esta prueba se utilizaron ratones macho CD1 adquiridos en Charles River (Francia) como agresores (véase más adelante).

La comida y el agua estaban disponibles libremente. Todos los experimentos se llevaron a cabo según las Directivas del Consejo de la Comunidad Europea de 24 de noviembre de 1986 (86/609/CEE) y de conformidad con las directrices del CNRS y del Ministerio de Agricultura y Silvicultura francés (decreto 87848) y la autorización del Ministerio de Investigación francés.

Procedimientos de comportamiento y recogida de muestras de tejido:

Se probaron grupos de ratones conductualmente ingenuos en el DNMT en el laberinto T según un protocolo descrito previamente (50), con modificaciones para facilitar las pruebas farmacológicas (51). Específicamente, en el presente protocolo, los animales fueron entrenados primero durante 10 días consecutivos con intervalos mínimos entre ensayos (ITI) de unos 15 segundos, lo cual era necesario para alcanzar el criterio del 90 % o más de elecciones correctas durante cuatro días consecutivos (días 9-10). Después de este periodo, el ITI se incrementó de forma semialeatoria en bloques de 6 minutos durante 5 días consecutivos (días 11-15 indicados) para determinar el "ITI de prueba" para cada animal, que se definió como el ITI más corto en el que los ratones rinden al nivel de azar. A partir del día 16, los ratones se sometieron a pruebas utilizando los correspondientes retrasos del "ITI de prueba" tras la inyección del vehículo el día 16 (para comprobar el efecto del vehículo solo) y tras la inyección de 9CDHROL (40 mg/kg) el día 17. Se excluyeron tres ratones de las pruebas porque su latencia para elegir el brazo durante la fase de retención superó los 3 minutos en más de un ensayo/día en tres días consecutivos (criterio de exclusión). El día 18 los ratones fueron inyectados de nuevo con 9CDHROL (40 mg/kg) y 9 horas después fueron sacrificados para los análisis químicos. Los ratones que recibieron inyecciones de vehículo en tres días consecutivos se utilizaron como controles tratados con vehículo para los análisis del metabolismo del 9CDHROL. También se inyectó 9CDHROL (40 mg/kg) a un grupo adicional de 3 ratones ingenuos para comprobar el metabolismo de 9CDHROL tras el tratamiento agudo.

Prueba de natación forzada: El paradigma de natación forzada se llevó a cabo entre las 13:00 y las 16:00 horas en un vaso de cristal de 3 litros medio lleno de agua a 22-23 °C (la profundidad del agua era de 17 cm). Todos los ratones fueron sometidos a esta tarea una sola vez. Para ello, se bajó suavemente a cada ratón al agua y se anotó el tiempo de inmovilidad durante un periodo de prueba de 6 minutos. Se consideró que el ratón estaba inmóvil cuando flotaba en posición vertical y sólo hacía pequeños movimientos para mantener la cabeza por encima del agua. Después de 6 minutos, se sacaba al ratón del agua, se le dejaba secar bajo una lámpara de luz roja y se le devolvía a su jaula. Las puntuaciones de inmovilidad de cada animal se utilizaron como índice del comportamiento de desesperación.

Prueba de preferencia por la sacarosa: Esta tarea, diseñada para medir los comportamientos hedónicos de los ratones, se basa en la naturaleza palatable de la sacarosa observada en varias cepas de ratones. El primer día de la prueba, los ratones sin sacarosa fueron colocados en jaulas individuales a las 11 de la mañana y se les dejó allí con agua y comida para el periodo de habituación. A las 17:00 horas se sustituyó una botella de agua por dos botellas: una con agua y otra con una solución de sacarosa al 0,8 %. Tres horas después (20:00 horas) se pesaron las botellas para medir el consumo de líquido y se volvieron a colocar en las jaulas hasta la mañana siguiente. Las medidas de consumo nocturno se realizaron entonces durante un día más para evaluar la preferencia por la sacarosa. Los ratones no fueron privados de agua en ningún momento, para medir la preferencia espontánea por la sacarosa y excluir cualquier confusión emocional potencial inducida por el estrés de la privación de agua. La preferencia por la sacarosa se expresó como el porcentaje de disolución de sacarosa consumida con respecto al consumo total de líquido.

Estrés de derrota social: El procedimiento de estrés por derrota social fue una versión modificada del protocolo descrito anteriormente (Berton, McClung et al. 2006). Los ratones C57BL/6N fueron sometidos a derrota crónica durante 10 días consecutivos. Cada día fueron expuestos al contacto físico con un agresor CD1 no familiar en su jaula de origen durante un tiempo máximo de interacción de 5 minutos. Después de cada sesión de estrés físico, los ratones C57BL/6N y CD1 fueron separados por una pared perforada y se mantuvieron en contacto sensorial durante 24 horas. Tras la última sesión de estrés, los ratones fueron trasladados a nuevas jaulas y alojados por separado durante todo el periodo de pruebas de comportamiento. Los ratones de control C57BL/6N, de forma similar a los animales experimentales, fueron alojados dos por jaula separados por una pared metálica perforada. Cada día, se los expuso al contacto físico durante 5 minutos.

Tratamientos con animales

Para el análisis del comportamiento, el 9CDHROL y el 9CDHBC se disolvieron en etanol y luego se mezclaron con aceite de girasol, de modo que la solución final contenía un 3 % de etanol. Los tratamientos con vehículos consistían en una disolución de etanol al 3 % en aceite de girasol. Los tratamientos se administraron mediante inyecciones intraperitoneales con una relación volumen/peso de 3 ml/kg entre las 7 y las 7 horas antes del comienzo de las pruebas. Los tratamientos se administraron a 10 mg/kg para cada sustancia y relación volumen/peso de 3 ml/kg entre las 5-6 pm cada segundo día del protocolo de estrés inmediatamente después de la sesión de estrés empezando por el día 1 del protocolo de estrés.

Para los análisis metabólicos se prepararon ATROL, 9CDHROL, 9CDHBC y disoluciones de control como se ha descrito anteriormente. Se utilizó una aplicación única por vía oral de la dosis de 40 mg/kg de cada sustancia para tratar a los ratones por la noche y las muestras se recogieron 11 h después en condiciones de protección de la luz, se pesaron, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta los análisis. Se preparó el suero y se almacenó inmediatamente en viales marrones a -80 °C, hasta su posterior análisis.

Análisis estadístico

Las comparaciones del rendimiento conductual durante la fase de aprendizaje se llevaron a cabo mediante un ANOVA de una vía sobre medidas repetidas con el tiempo como parámetro dependiente y el porcentaje de elecciones correctas como parámetro independiente. Los datos farmacológicos se analizaron comparando el rendimiento de los animales tras el tratamiento con vehículo y con 9CDHROL mediante un ANOVA de una vía sobre medidas repetidas. Se realizaron análisis estadísticos post-hoc para comparar el rendimiento de los animales con un nivel de azar del 50 % utilizando la prueba t de estudiante de un grupo. Las diferencias significativas se indican en la figura correspondiente.

Resultados de los estudios de suplementación en animales

Para comprobar la posibilidad de que el 9CDHROL pueda actuar como sustrato para la producción de 9CDHRA *in vivo*, hemos ensayado la memoria de trabajo en retraso de no coincidencia con el lugar (DNMTP) como paradigma conductual sensible para detectar la actividad del 9CDHRA (22). Para ello, hemos entrenado a una cohorte de ratones macho C57BL6J en la tarea DNMTP para alcanzar el criterio de rendimiento máximo (por encima del 90 %) durante 4 días consecutivos (Fig. 1a). Los ratones macho C57BL6N de tipo salvaje adquirieron la tarea de memoria de trabajo como indica el efecto significativo del día de entrenamiento ($F[9,39]=8,28$; $p<0,001$, ANOVA de una vía sobre medidas repetidas) cuando se entrenaron con intervalos inter-ensayo (ITI) de 15 segundos. El rendimiento de la memoria disminuyó cuando los ratones fueron sometidos a pruebas con un ITI más largo de 3 minutos. Sin embargo, cuando el ITI alcanzó una media de 13 minutos (la media para todo el grupo se indica en el gráfico como gr13) los ratones mostraron una pérdida de memoria completa en la tarea DNMTP, ya que su rendimiento no fue diferente del nivel de azar del 50 % ($p<0,05$, prueba t de un grupo). El ITI en el que cada animal mostró un olvido completo se identificó como "ITI de prueba" para cada animal individual y se utilizó al probar la actividad pro-mnemónica de 9CDHROL (Fig. 1b). Durante estas pruebas, la aplicación del vehículo no mejoró la memoria, ya que el porcentaje de elecciones correctas fue comparable al nivel de azar del 50 % ($p=0,2$, ns; prueba t de un grupo), mientras que el tratamiento con 9CDHROL mejoró significativamente el rendimiento de la memoria ($F[1,4]16$; $p<0,05$, ANOVA de una vía sobre medidas repetidas para el efecto del tratamiento). Los ratones tratados con 9CDHROL mostraron un rendimiento significativamente mejor que el nivel de azar del 50 % ($p<0,05$; prueba t de un grupo).

Ejemplo 4: Procedimientos analíticos y análisis por HPLC y LC-MS

Análisis LC-MS de muestras de tejido

A. Análisis justo de retinoides: Procedimientos analíticos: Los análisis por cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas (sistema Agilent 1260 Infinity LC; Madrid, España) -espectrometría de masas (sistema SCIEX Triple Quad 3500; Sciex, Madrid, España) se realizaron bajo luz amarilla oscura/ámbar utilizando un protocolo previamente validado (22, 52). Para la detección del ácido 13,14-dihidrorretinoico, los ajustes de MS-MS fueron 303 -> 207 *m/z* y para la detección del 13,14-dihidrorretinol, los ajustes de MS-MS fueron 290 -> 69 *m/z*, utilizando el mismo tiempo de permanencia y energía de colisión comparables a los ajustes específicos de MS-MS de los ácidos retinoicos. En consecuencia, para la preparación de la muestra se diluyeron 100 mg del material (si las muestras eran inferiores a 100 mg, se añadió agua hasta el peso estándar utilizado: 100 mg) o 100 µl de suero con un volumen triple de isopropanol, se dividieron los tejidos con tijeras, se agitaron en vórtex durante 10 segundos, se introdujeron en un baño ultrasónico durante 5 minutos, se agitaron durante 6 minutos y se centrifugaron a 13000 rpm en un Heraeus BIOFUGE Fresco a +4 °C. Tras la centrifugación, los sobrenadantes se secaron en un concentrador Eppendorf 5301 (Eppendorf, Alemania) a 30 °C. Los extractos secos se resuspendieron en 60 µl de metanol, se diluyeron con 40 µl de solución acuosa de acetato de amonio 60 mM y se transfirieron al automuestreador para su posterior análisis.

B. Análisis combinado de retinoides y carotenoides: Procedimientos analíticos: Los análisis por cromatografía líquida de alta resolución (sistema Agilent 1260 Infinity LC; Madrid, España) - espectrometría de masas (sistema SCIEX Triple Quad 3500; Sciex, Madrid, España) más un detector de matriz de diodos en línea adicional (Waters 966 DAD, Waters, Santiago de Compostela, España) se realizaron bajo luz amarilla oscura/ámbar utilizando un protocolo previamente validado (LIT) más la adición de un tercer y cuarto eluyente después de 20 min de tiempo de elución. Gradiente lineal de 20 min 20 % (isopropanol: metanol: metil-*tert*-butil-éter (MTBE) / 30:30:40) - 80 % (isopropanol:metanol / 50:50), 25 min 40 % (isopropanol:metanol: metil-*tert*-butil-éter (MTBE) / 30:30:40) - 60 % (isopropanol:metanol / 50:50), 29 min 70 % (isopropanol:metanol:metil-*tert*-butil-éter (MTBE) / 30:30:40) - 30 % (isopropanol:metanol / 50:50), 30 min 0 % (isopropanol: metanol: metil-*tert*-butil-éter (MTBE) / 30:30:40) - 100 % (isopropanol:metanol / 50:50), 30,1 min 20 % (isopropanol: metanol: metil-*tert*-butil-éter (MTBE) / 30:30:40) - 80 % (isopropanol:metanol / 50:50). Para la detección del ácido 13,14-dihidrorretinoico los ajustes de MS-MS fueron 303 -> 207 *m/z*, para la detección del 13,14-dihidrorretinol los ajustes de MS-MS fueron 290 -> 69 *m/z* y para la detección del 9CDHBC 405 -> 405 / 405 -> 95 *m/z*. En consecuencia, para la preparación de la muestra se diluyeron 100 mg del material (si las muestras eran inferiores

a 100 mg, se añadió agua hasta el peso estándar utilizado: 100 mg) o 100 µl de suero con un volumen triple de isopropanol, se picaron los tejidos con tijeras, se agitaron en vórtex durante 10 segundos, se pusieron en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos, se agitaron durante 6 minutos y se centrifugaron a 13000 rpm en un Heraeus BIOFUGE Fresco a +4 °C. Tras la centrifugación, los sobrenadantes se secaron en un concentrador de vacío centrífugo GYROZEN equipado con una bomba de vacío ILMAC MPC 301-Z (CONTROLTECNICA, Madrid, España) a 30 °C. Los extractos secos se resuspendieron con 30 µl de metanol - MTBE (50 - 50) y se transfirieron al automuestreador y posteriormente se analizaron 10 ul.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos para el análisis del comportamiento y el análisis de retinoides/carotenoides se realizaron mediante la prueba t de student para cada una de las comparaciones de dos grupos. Las diferencias significativas se indican en las figuras correspondientes.

Resultados de los análisis HPLC y LC-MS

Identificación inicial de 9CDHROL endógena e identificación de 9CDHROL tras el tratamiento de ratones con 9CDHROL

Inicialmente se analizó un estándar mixto de 9-*cis*-13,14-dihidroretinol (9CDHROL) y todo-*trans*-dihidroretinol (ATDHROL) utilizando la analítica LC-MS (figura superior de la figura 2) y después se analizó una muestra de hígado de ratones tratados con vehículo (figura inferior de la figura 2). Ambos picos de los estándares 9CDHROL y ATDHROL coeluyen con los picos identificados en las muestras de hígado utilizando los mismos canales de fragmentación MS-MS en nuestro sistema LC-MS. Basándonos en la coelución y utilizando los mismos parámetros de LC-MS y los mismos canales de patrón de fragmentación (290 → 69 m/z) utilizados, afirmamos e identificamos el 9CDHROL y el ATDHROL como retinoides endógenos en el organismo de los mamíferos. Además, estos picos coeluyentes también pueden observarse en niveles más bajos en el suero y el cerebro de los ratones y el 9CDHROL aumenta significativamente tras el tratamiento con 9CDHROL (Figura 3).

Identificación del 9CDHROL endógeno en el ratón, en el hombre y en la matriz alimentaria humana:

El **cerebro de los ratones** se preparó según el procedimiento descrito anteriormente. Brevemente, después de la aplicación única per os de la dosis de 40 mg/kg de 9CDHROL (u otras sustancias citadas) durante la noche, los ratones fueron sacrificados después de 11 horas y las muestras de tejidos, incluyendo el cerebro, fueron disecadas en condiciones de protección de la luz, pesadas, congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C hasta los análisis. Se preparó el suero y se almacenó inmediatamente en viales marrones a -80 °C, hasta su posterior análisis.

Las **muestras de suero humano** se obtuvieron de la sangre de voluntarios sanos con el consentimiento informado por escrito de todos los sujetos.

Muestras de alimentos: El hígado de vacuno se compró en una carnicería local de Vigo, España. Las conservas de melocotón en lata (Metades, Pessago em calda, Auchan/Alcampo-marca de la casa / lata de 420g) se compraron en Alcampo, Vigo, España.

Inicialmente se analizó un estándar de 9-*cis*-13,14-dihidroretinol (9CDHROL, cromatograma superior de la Figura 14A) utilizando nuestro análisis LC-MS y después una muestra cerebral de control de ratones tratados con control (cromatograma central de la Figura 14A). El pico del estándar 9CDHROL coeluye con el pico identificado en las muestras cerebrales utilizando los mismos canales de fragmentación MS-MS en nuestro sistema LC-MS.

Además, se identificó el 9CDHROL en suero humano (Figura 14B), así como en alimentos humanos relevantes / hígado de vacuno (Figura 14C). Basándonos en la coelución y utilizando los mismos parámetros de LC-MS y los mismos canales de patrón de fragmentación (290 → 69 m/z) utilizados, afirmamos e identificamos el 9CDHROL como un nuevo retinoide endógeno en el organismo mamífero de ratón y en los seres humanos, además de estar presente en los alimentos humanos representados por el hígado de vacuno, que también es un organismo mamífero.

Identificación de 9CDHBC en la matriz alimentaria humana (Figura 15):

El 9CDHBC se identificó mediante coelución y espectros UV/VIS comparables en melocotones en lata (conserva).

Ejemplo 5: Identificación de compuestos tras el tratamiento en ratones

Identificación de 9CDHRA tras el tratamiento con 9CDHROL en ratones

Recientemente, hemos identificado que el 9CDHRA es un derivado endógeno en ratones (22) y en humanos (datos aún no publicados). El siguiente paso es identificar precursores de 9CDHRA en modelos *in vivo* e *in vitro*.

El tratamiento de los animales, la administración de 9CDHROL, y el análisis de las muestras se llevaron a cabo como se describe en los Ejemplos 3 y 4.

5 Mediante experimentos de suplementación en ratones, se administró por vía oral a n=6 ratones 100 mg/kg p.c. de 9CDHROL i.p., y 9 h después del tratamiento, se sacrificaron los ratones y se extrajo sangre, cerebro e hígado. Tras la centrifugación de la sangre extraída, se obtuvo el suero.

10 En el suero, el cerebro y el hígado se encontró 9CDHRA y ATDHRA de forma endógena en niveles bajos. Además, tras el tratamiento con 9CDHROL se identificó un fuerte aumento de los niveles de 9CDHRA en las muestras analizadas de suero, cerebro e hígado (Figura 4). A modo de comparación, se muestran los niveles de aumento de 9CDHRA en las muestras de hígado en la Figura 5.

Identificación de 9CDHROL en ratones

15 **El 9CDHROL se acumula en los ratones tratados con 9CDHROL y en un metabolito del 9CDHBC en un cultivo celular de oligodendrocitos *in vitro*:** El tratamiento con 9CDHROL en ratones suplementados por vía oral aumenta el nivel del 9CDHROL en el cerebro de los ratones (Figura 14A, cromatograma inferior) en comparación con el cerebro tratado como control (cromatograma central de la Figura 14A). Observamos aquí que la administración de 9CDHBC y 9CDHROL aumenta los niveles de 9CDHROL en el cultivo celular de oligodendrocitos humanos, mientras que el ATBC no mostró ningún aumento. El 9CBC (y el ATROL) no muestran, o sólo muestran un aumento débil y no selectivo de 9CDHROL en el cultivo celular de oligodendrocitos (Figura 14D). **En resumen, el 9CDHBC es un excelente sustrato precursor del 9CDHROL en el cultivo celular de oligodendrocitos humanos *in vitro*.**

Ejemplo 6: Experimentos de cultivo celular

25 Experimentos de cultivo celular

30 La línea normal de oligodendrocitos inmortalizados 158N se cultivó como se informó anteriormente (53). Cuando las células alcanzaron el 70 % de confluencia fueron tratadas con una solución de etanol 10^{-2} M de uno de los siguientes compuestos: 9CDHROL, 9CDHROL-acetato, 9CDHRA-éster etílico. 9CDHRA y etanol como control, tratamiento con vehículo. A las 18 h tras el tratamiento, se recogieron las células en tubos Eppendorf de color ámbar y se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Los tratamientos y la recogida de células se llevaron a cabo en condiciones de luz limitada para evitar la fotoisomerización de los retinoides.

35 La espectrometría de masas por cromatografía líquida de alta resolución (LC-MS) se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 4.

Conversión de ATROL y 9CROL

40 En experimentos análogos se emplearon las siguientes especies de retinol, *mutatis mutandis* en el mismo cultivo celular: ATROL y 9CROL. Como estándar se utilizó el estándar ROL normal (línea negra). Las especies se indican también con flechas (Figura 11).

45 También se siguió la conversión de las especies de retinol. En la figura 12 se muestra la medida de las especies de ácido 13,14-dihidro-retinoico (DH-RA) 9CDHRA y ATDHRA tras la administración de las mismas especies de retinol ATROL y 9CROL (línea azul y roja, respectivamente). Se muestra claramente que, a lo sumo, se produce una cantidad muy pequeña de dihidroácidos o ninguna cantidad (9CROL) en las células.

50 En experimentos análogos, se muestra la medida de las especies de ácido 13-*cis*-retinoico (13CRA), así como de 9CRA y ATRA, tras la administración de las mismas especies de retinol ATROL y 9CROL (línea azul y línea roja, respectivamente). Se muestra claramente que, a lo sumo, una cantidad muy pequeña de estas formas de ácido, si es que hay alguna, se produce en las células, las cuales apenas pueden verse contra un fondo ruidoso. Por lo tanto, la conversión de los alcoholes en las formas ácidas correspondientes es muy débil y por ello son ciertamente inapropiados como precursores.

55 Los procedimientos analíticos se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente.

Identificación de 9CDHRA tras la adición de 9CDHROL, 9CDHRET-acetato o 9CDHRA-etil-éster a los oligodendrocitos

60 Identificamos que el 9CDHRA es un metabolito resultante de la administración de 9CDHROL en el suero, el cerebro y el hígado de los ratones. Además, se trataron líneas de células oligodendrocitarias con concentraciones de 10^{-5} M de 9CDHROL, 9CDHRET-acetato o 9CDHRA-etil-éster durante 18 h. Se observó que, tras la administración de 9CDHROL, 9CDHRET-acetato, se produjo un fuerte aumento de los niveles de 9CDHRA (figura 6 superior). Además, tras la aplicación de 9CDHRA-etil-éster se identificó un fuerte incremento (parte inferior de la Figura 6).

65 Identificación de 9CDHROL tras la administración de 9CDHBC y 9CDHROL

La administración de 9CDHBC y 9CDHROL aumentó los niveles de 9CDHROL en el cultivo celular de oligodendrocitos humanos, mientras que el ATBC no mostró ningún aumento. El 9CBC (y el ATROL) no mostraron ningún incremento o sólo débil y no selectivo de 9CDHROL en el cultivo celular de oligodendrocitos (Figura 14D). En resumen, el 9CDHBC es un excelente sustrato precursor del 9CDHROL en el cultivo celular de oligodendrocitos humanos *in vitro*.

Identificación de 9CDHBC tras la administración de 9CDHBC, 9CBC y ATBC

Identificación de 9CDHBC tras la administración de 9CDHBC y 9CBC, pero no tras la administración de ATBC a un cultivo celular de oligodendrocitos in vitro (Figura 16A y 16B): En el cultivo de células de oligodendrocitos al administrar 9CBC se pudo detectar el 9CBC con un tiempo de retención de 26,1 min a una longitud de onda de detección de 411 nm en estas células tratadas (Figura 16A, detección a 411 nm), mientras que no se pudo detectar 9CBC en los tratamientos de control ni tras los tratamientos con ATBC o 9CDHBC. La existencia también ha sido confirmada por la adquisición de un espectro UV/Vis por el detector de matriz de diodos (datos no mostrados aquí).

En relación al 9CDHBC, con una detección UV a 366 nm (Figura 16B), se detectó un pico muy pequeño del compuesto tras los tratamientos de control o de ATBC, mientras que después de los tratamientos de 9CBC se pudieron detectar un pico algo más alto, y un pico aún más alto después del tratamiento de 9CDHBC (a 25,1 min de tiempo de retención), lo que fue confirmado por la adquisición de un espectro de UV comparable con el detector de matriz de diodos (datos no mostrados aquí).

Identificación de 9CDHRA tras la administración de 9CDHROL, 9CDHROL-éster, 9CDHRA y 9CDHRA-éster a un cultivo de células oligodendrocitarias

En las líneas de células oligodendrocitarias tratadas con 10^{-5} M de 9CDHROL, 9CDHROL-acetato, 9CDHRA o 9CDHRA-etil-éster durante 18 h se observó un fuerte aumento de los niveles de 9CDHRA con 9CDHROL y 9CDHROL-acetato (Figura 17A). Además, tras las aplicaciones de 9CDHRA-etil-éster (y 9CDHRA, datos no mostrados) se observó un incremento muy fuerte de dichos niveles (cromatograma inferior de la Figura 17A). Aunque el 9CDHROL y los ésteres de 9CDHROL son excelentes precursores del 9CDHRA, también se determinó que el ATROL, el 9CDHBC, el 9CBC y el ATBC no se convierten en 9CDHRA (datos no mostrados). En resumen, el 9CDHROL, los ésteres de 9CDHROL y los ésteres de 9CDHRA son precursores excelentes, selectivos y específicos de isómeros del ligando RXR en cultivos de células de oligodendrocitos humanos *in vitro*.

Ejemplo 7 Identificación de 9CDHRA tras la suplementación con 9CDHROL, 9CDHBC en ratones

Los experimentos fueron análogos a los descritos en el ejemplo 5.

Además de los experimentos *in vitro*, también se llevaron a cabo experimentos de suplementación *in vivo* con ratones suplementados oralmente con 9CDHBC y 9CDHROL (Figura 17B y 17C). Se observó un aumento moderado pero significativo de 9CDHRA tras la suplementación con 9CDHBC (Figura 17B) en comparación con el control. También se observaron niveles bajos de 9CDHRA y de su isómero ATDHRA en el suero, el hígado y el cerebro de los ratones de control (cromatogramas superiores de la Figura 17C) y, especialmente, un fuerte aumento del 9CDHRA tras la suplementación con 9CDHROL (cromatogramas inferiores de la Figura 17C).

Ejemplo 8: Procedimiento experimental - prueba de (R)-9CDHRA en ensayos con animales

Ejemplo 8.1: Métodos

Animales:

Los mutantes Rbp1-/- y Rxry -/-, así como sus ratones de control de tipo salvaje (WT), fueron criados en un fondo genético mixto (60 % C57BL/6J y 40 % 129SvEms/j) procedente de cruces heterocigotos, tal y como se ha descrito (Ghyselinck NB 1999; Krezel et al., 1996), y analizados a la edad de 3-6 meses. Todos los ratones se alojaron en grupos de 4-5 ratones por jaula en un ciclo de luz/oscuridad de 7 de la mañana a 7 de la tarde en jaulas ventiladas individualmente (Techniplast, Italia). La comida y el agua estaban disponibles libremente. Todos los experimentos se llevaron a cabo según las Directivas del Consejo de la Comunidad Europea de 24 de noviembre de 1986 (86/609/CEE) y de conformidad con las directrices del CNRS y del Ministerio francés de Agricultura y Silvicultura (decreto 87848).

Para el protocolo de estrés de derrota social utilizamos ratones C57BL/6N que fueron transferidos desde Taconic (Francia) a la edad de 6 semanas y alojados en grupos de 4 por jaula. Tras una semana de habituación, se les sometió al estrés de derrota social. Se utilizaron ratones CD1, comprados a Charles River (Francia), como agresores en esta prueba.

Procedimientos conductuales: Todas las pruebas de comportamiento se llevaron a cabo en el Instituto Clínico de la Souris (<http://www.ics-mci.fr/>) según los procedimientos operativos estándar.

Prueba de natación forzada:

El paradigma de natación forzada (Dalvi y Lucki, 1999) se llevó a cabo entre las 13:00 y las 16:00 horas en un vaso de cristal de 2 litros medio lleno de agua a 22-23 °C (la profundidad del agua era de 17 cm). Todos los ratones fueron sometidos a la prueba una sola vez en esta tarea. Para ello, se bajó suavemente a cada ratón al agua y se anotó el tiempo de inmovilidad durante un periodo de prueba de 6 minutos. Se consideró que el ratón estaba inmóvil cuando flotaba en posición vertical y sólo hacía pequeños movimientos para mantener la cabeza por encima del agua. Después de 6 minutos, se sacaba al ratón del agua, se le dejaba secar bajo una lámpara de luz roja y se le devolvía a su jaula. Las puntuaciones de inmovilidad de cada animal se utilizaron como índice del comportamiento de desesperación.

Prueba de preferencia por la sacarosa: Esta tarea, diseñada para medir los comportamientos hedónicos de los ratones (Moreau, 1997), se basa en la naturaleza palatable de la sacarosa observada en varias cepas de ratones. El primer día de la prueba, los ratones sin sacarosa fueron colocados en jaulas individuales a las 11 de la mañana y se les dejó allí con agua y comida durante el periodo de habituación. A las 17:00 horas se sustituyó una botella de agua por dos botellas: una con agua y otra con una solución de sacarosa al 0,8 %. Tres horas después (8 pm) se pesaron las botellas para medir el consumo de líquido y se volvieron a colocar en las jaulas hasta la mañana. Las medidas de consumo nocturno se realizaron entonces durante un día más para evaluar la preferencia por la sacarosa. Los ratones no fueron privados de agua en ningún momento, para medir la preferencia espontánea por la sacarosa y excluir cualquier confusión emocional potencial inducida por el estrés de la privación de agua. La preferencia por la sacarosa se expresó como el porcentaje de solución de sacarosa consumida con respecto al consumo total de líquido.

Estrés de derrota social: El procedimiento de estrés de derrota social fue una versión modificada del protocolo descrito previamente (Berton et al. 2006). Los ratones C57BL/6N fueron derrotados crónicamente durante 10 días consecutivos. Cada día fueron expuestos al contacto físico con un agresor CD1 no familiar en su jaula de origen durante un tiempo máximo de interacción de 5 minutos. Después de cada sesión de estrés físico, los ratones C57BL/6N y CD1 fueron separados por una pared perforada y se mantuvieron en contacto sensorial durante 24 horas. Tras la última sesión de estrés, los ratones fueron trasladados a nuevas jaulas y alojados por separado durante todo el periodo de pruebas de comportamiento. Los ratones de control C57BL/6N, de forma similar a los animales experimentales, fueron alojados dos por jaula separados por una pared metálica perforada. Cada día, se les expuso al contacto físico durante 5 minutos.

A continuación, los animales fueron sometidos a pruebas de natación forzada y de sacarosa.

Ejemplo 7.2: La suplementación con *R*-9CDHRA revierte los cambios de comportamiento en los ratones *Rbp1*^{-/-}

Con el fin de abordar la relevancia de 9CDHRA en la modulación de las funciones de RXR *in vivo*, los inventores probaron si *R*-9CDHRA puede revertir los déficits de comportamiento en ratones *Rbp1*^{-/-}. El tratamiento agudo con *R*-9CDHRA redujo, de forma dependiente de la dosis, la inmovilidad de los ratones knockout en la prueba de natación forzada, alcanzando el efecto máximo ya a 1 mg/kg, que fue comparable al efecto antidesestino del agonista sintético de RXR UVI2108 a la misma dosis o al tratamiento de 5 mg/kg con ATRA (Figura 9). Los efectos de los tratamientos no fueron evidentes en los ratones WT, lo que puede estar relacionado con la baja inmovilidad de base en esta cepa y, en consecuencia, con el efecto suelo. Dichas actividades fueron mediadas por el RXR γ , ya que el tratamiento de 2 mg con *R*-9CDHRA no mejoró el rendimiento de los ratones *Rxry*^{-/-}, que permanecieron inmóviles durante 120 \pm 25 seg en comparación con 119 \pm 19 seg en los animales *Rxry*^{-/-} tratados con vehículo.

De forma similar a los efectos antidespidos en la prueba de natación forzada, 1 o 2 mg/kg de *R*-9CDHRA también mejoraron el rendimiento de los ratones *Rbp1*^{-/-} en las pruebas de memoria. Dichos tratamientos aumentaron la tasa de elecciones exitosas de los *Rbp1*^{-/-}, que se desempeñaron significativamente mejor que el 50 % del nivel de azar cuando se probó en el intervalo inter-ensayo de 6 min en la prueba DNMT (Figura 8). El tratamiento con 2 mg/kg de *R*-9CDHRA elevó también el rendimiento de los ratones WT a cerca del 70 % de elecciones correctas cuando se probó en intervalos largos entre ensayos de 12 o 18 minutos en los que los mismos ratones WT actuaron al nivel de azar (50 % de elecciones correctas) si se les trató con vehículo. Este tratamiento no mejoró el rendimiento de los ratones *Rxry*^{-/-}, que actuaron con un 57 \pm 7 % de elecciones correctas, proporcionando una prueba más de que la función comprometida de RXR γ , asociada a niveles reducidos de 9CDHRA, es el origen de los déficits observados en los animales *Rbp1*^{-/-}.

Ejemplo 7.3: El *R*-9CDHRA muestra efectos antidepresivos en un modelo de estrés de derrota social crónica.

Los presentes inventores han descubierto que la suplementación con *R*-9CDHRA trata los comportamientos depresivos en el modelo de estrés crónico de la depresión. El estrés es un factor ambiental importante en la etiología de la depresión. Para probar la eficacia de 9CDHRA en el tratamiento de los comportamientos depresivos inducidos por el estrés, utilizamos el modelo animal de estrés por derrota social (Berton et al., 2006, Hollis y Kabbaj, 2014). Diez días de breves contactos físicos diarios con el macho CD1 dominante residente, seguidos de un posterior contacto sensorial, indujeron eficazmente la desesperación en la tarea de natación forzada (Figura 10.a). El tratamiento con 1 o 3 mg/kg de 9CDHRA durante el protocolo de estrés normalizó eficazmente el tiempo de inmovilidad, que fue

comparable al de los ratones de control no estresados. En contraste con la dosis más baja, el tratamiento con 3 mg/kg de 9CDHRA mostró efectos antidesesperación, ya que fue significativamente menor que el tiempo de inmovilidad observado en los ratones estresados y no tratados, indicando así que 9CDHRA muestra un efecto de dosis en el control de este parámetro conductual. El efecto de 9CDHRA fue comparable con la actividad del agonista sintético panRXR UVI2108, lo que sugiere el papel crítico de la activación de RXR en la consecución de la actividad antidesesperación de 9CDHRA. Además de los comportamientos de desesperación, el estrés crónico indujo también anhedonia, reflejada por la ausencia de preferencia por la bebida azucarada, que se consumió a un nivel no significativamente diferente del 50 % que refleja la elección al azar (Figura 10.b). La anhedonia fue abolida en los ratones estresados tratados ya con una dosis baja de 9CDHRA (1 mg/kg), como lo ilustra la preferencia por la sacarosa que excede significativamente el nivel de azar del 50 %, aunque esta preferencia fue aún más marcada después del tratamiento con una dosis más alta de 3 mg/kg de 9CDHRA. El agonista panRXR UVI2108 mostró una actividad similar a la de 9CDHRA, lo que apoya la implicación de la activación de RXR por parte de 9CDHRA en las actividades antidepresivas.

En una patente anterior, el uso de RXR γ -/- fue un control negativo para demostrar que 9CDHRA actúa en RXR γ para mejorar la memoria - en consecuencia, en ausencia de RXR γ no puede mejorar la memoria. Se utilizó Rbp1-/- porque muestran el mismo tipo de déficit que RXR γ -/-, lo que sugiere que la señalización de RXR γ es baja. Al mostrar que 9CDHRA puede normalizar su memoria fue una prueba de concepto de que a estos ratones les falta el ligando RXR y no el receptor en sí (o la funcionalidad del receptor). Incluso en experimentos anteriores demostramos que el 9CDHRA también puede mejorar la memoria de los ratones WT, lo que sugiere que podría funcionar como potenciador de la memoria en sujetos sanos, pero también podría utilizarse como potenciador de la memoria en la EA. Sin embargo, 9CDHRA puede tener un efecto teratogénico, por lo que probamos los precursores que probablemente se derivan de tales actividades teratogénicas.

Ejemplo 7.4: 9CDHROL o 9CDHBC previenen los comportamientos depresivos en el modelo de estrés crónico de la depresión (Figura 18):

El estrés es un factor ambiental importante en la etiología de la depresión. Para comprobar la eficacia de 9CDHROL y 9CDHBC en el tratamiento de los comportamientos depresivos inducidos por el estrés, utilizamos el modelo animal de estrés por derrota social (Berton et al., 2006, Hollis y Kabbaj, 2014). Diez días de breves contactos físicos diarios con el macho CD1 dominante residente, seguidos de un contacto sensorial posterior, indujeron eficazmente la desesperación en la tarea de natación forzada (fig. 18.A). El tratamiento con 10 mg/kg de 9CDHROL o 10 mg/kg de 9CDHBC durante el protocolo de estrés normalizó eficazmente el tiempo de inmovilidad, que fue comparable al de los ratones de control no estresados. Además de la conducta de desesperación, el estrés crónico indujo también anhedonia, reflejada por la ausencia de preferencia por la bebida azucarada, que se consumió a un nivel no significativamente diferente del 50 % que refleja la elección aleatoria (fig. 18.B). La anhedonia fue abolida en los ratones estresados tratados con 10 mg/kg de 9CDHROL o 10 mg/kg de 9CDHBC durante el protocolo de estrés, como lo ilustra la preferencia por la sacarosa que excede significativamente el nivel de azar del 50 %.

Resumen y aplicabilidad industrial

La vitamina A es un conjunto de derivados que pueden convertirse en el organismo en pigmentos visuales y en ligandos para los receptores hormonales nucleares. Se sabe que la vitamina A1 (retinol) es un precursor del ligando del RAR, el ácido todo-*trans*-retinoico (ATRA), mientras que se desconoce la identidad del precursor del ácido 9-*cis*-13,14 dihidroretinoico (9CDHRA), el ligando endógeno del receptor retinoide X (RXR) descubierto recientemente. En este estudio demostramos que los precursores nutricionales del 9CDHRA son el 9-*cis*-13,14-dihidroretinol (9CDHROL) y el 9-*cis*-13,14-dihidro-beta-caroteno (9CDHBC), que son, respectivamente, nuevos tipos de retinoides y carotenoides nunca descritos hasta la fecha, pero presentes en altos niveles en la matriz alimentaria y de forma endógena en los organismos de los mamíferos, incluido el ser humano. Utilizando experimentos in vitro e in vivo demostramos que dichos precursores pueden ser metabolizados directa o indirectamente a 9CDHRA. Por el contrario, los retinoides/carotenoides endógenos conocidos, como el todo-*trans*-retinol, el 9-*cis*-retinol y el todo-*trans*- β -caroteno, sólo son precursores débiles y no selectivos del 9CDHRA. También demostramos que el conocido carotenoide endógeno 9-*cis*- β -caroteno (9CBC) sólo se transforma débilmente en 9CDHBC mediante deshidrogenación. Sin embargo, el 9CDHBC se transforma fácilmente en 9CDHRA, y como tal puede ser propuesto como un precursor indirecto del ligando RXR - 9CDHRA. A través de nuestro cribado metabólico establecimos por primera vez que los ésteres de 9CDHRA, el 9CDHROL, el 9CDHROL-éster, y el 9CDHBC son excelentes precursores selectivos nutricionales y fisiológicamente relevantes del ligando RXR endógeno 9CDHRA para inducir la señalización mediada por RXR. Además, describimos esta nueva clase de sustancias como un nuevo tipo independiente y selectivo de vitamina A, denominado vitamina A5 para el 9CDHROL o pro-vitamina A5 para el 9CDHBC. La prueba de concepto para el uso preventivo/farmacéutico de estos compuestos se muestra en el tratamiento de comportamientos similares a los de la depresión en un modelo animal de estrés crónico. Se puede prever un uso similar de estos compuestos para diversas enfermedades en las que la señalización mediada por el RXR se ve afectada o se ha propuesto como objetivo terapéutico. Estas enfermedades pueden incluir enfermedades neurodegenerativas y metabólicas, disfunciones cutáneas e inmunológicas (incluida la inflamación), así como enfermedades cardiovasculares, pero también pueden referirse a aplicaciones de estilo de vida como los efectos de mejora de la memoria.

References

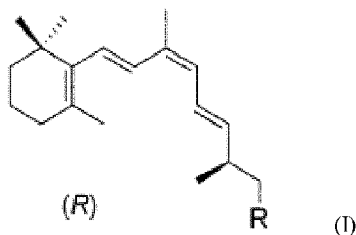
	Gennaro (ed.) Remington "Pharmaceutical Sciences", 17 Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1985.
5	van Neerven S. 2008 RAR/RXR and PPAR/RXR signaling in neurological and psychiatric diseases. <i>Prog Neurobiol.</i> 85(4):433-51.
	Shudo K et al. 2009 Towards Retinoid Therapy for Alzheimer's Disease <i>Curr Alzheimer Res.</i> 6(3): 302–311
10	Skerrett R, Pellegrino MP, Casali BT, Taraboanta L, Landreth GE. 2015 Combined Liver X Receptor/Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Agonist Treatment Reduces Amyloid β Levels and Improves Behavior in Amyloid Precursor Protein/Presenilin 1 Mice. 290(35) 21591-602
	Ching Kuang Chow 2007 Fatty Acids in Foods and their Health Implications., Third Edition Series: Food Science and Technology by CRC Press ISBN 9780849372612
15	Arild C Rustan, and Christian A Drevon, Fatty Acids 2005 Structures and Properties <i>ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES</i> . John Wiley & Sons, doi: 10.1038/npg.els.0003894
	Moise AR, Domínguez M, Alvarez S, Alvarez R, Schupp M, et al. (2008) Stereospecificity of Retinol Saturase: Absolute Configuration, Synthesis, and Biological Evaluation of Dihydroretinoids. <i>J Am Chem Soc</i> 130: 1154-1155.
20	Leonard J, Mohialdin S, Reed D, Ryan G, Swain PA (1995) Stereoselective conjugate addition of organolithium and organocopper reagents to [delta]-oxygenated [alpha],[beta]-unsaturated carbonyl systems derived from glyceraldehyde acetonide. <i>Tetrahedron</i> 51: 12843-12858.
	Aïssa C (2009) Mechanistic Manifold and New Development of the Julia-Kocienski Reaction. <i>Eur J Org Chem</i> : 1831-1844.
25	Schultz HS, Freyermuth HB, Buc SR (1963) New Catalysts for the Oxidation of Sulfides to Sulfones with Hydrogen Peroxide. <i>J Org Chem</i> 28: 1140-1142.
	Blakemore PR (2002) The modified Julia olefination: alkene synthesis via the condensation of metallated heteroarylalkylsulfones with carbonyl compounds. <i>J Chem Soc Perkin Trans 1</i> : 2563-2585.
	Babino, D., M. Golczak, P.D. Kiser, A. Wyss, K. Palczewski, and J. von Lintig. 2016. The Biochemical basis of vitamin A3 production in athopod vision. <i>ACS Chem. Biol.</i> (in press)
30	Berton O. et al. 2006 Essential Role of BDNF in the Mesolimbic Dopamine Pathway in Social Defeat Stress. <i>Science</i> 311(5762) 864-868
	Cama, H.R., P.D. Dalvi, R.A. Morton, and M.K. Salah. 1952. Studies in vitamin A. XXI. Retinene2 and vitamin A2. <i>Biochem J</i> 52:542-7.
35	Cama, H.R., P.D. Dalvi, R.A. Morton, and M.K. Salah. 1952. Studies in vitamin A. XXI. Retinene2 and vitamin A2. <i>Biochem J</i> 52:542-7.
	Chawla, A., J.J. Repa, R.M. Evans, and D.J. Mangelsdorf. 2001. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. <i>Science</i> 294:1866-70.
	Dalvi A, Lucki I (1999) Murine models of depression. <i>Psychopharmacology</i> 147:14–16
40	de Lera AR, Krezel W, Rühl R. 2016. An Endogenous Mammalian Retinoid X Receptor Ligand, At Last! <i>ChemMedChem</i> 11(10):1027-1037.
	de Lera, A.R., W. Krezel, and R. Rühl. 2016. An endogenous mammalian RXR ligand, at last ! <i>ChemMedChem</i> 2016, 11, 1027 – 1037
	Desvergne B. 2007. RXR: from partnership to leadership in metabolic regulations. <i>Vitam Horm</i> 75:1-32.
45	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, (DSM IV) American Psychiatric Association.
	Domínguez B, Pazos Y, de Lera AR (2000) Stereocontrolled Synthesis of 6-s-cis and 6-s-trans-Locked 9Z-Retinoids by Hydroxyl-Accelerated Stille Coupling of (Z)-Tri-n-Butylstannybut-2-en-1-ol and Bicyclic Dienyl Tri- <i>flates</i> . <i>J Org Chem</i> 65: 5917-5925.
50	Edisbury, J.R., M. R.A., and S. G.W. 1937. A possible Vitam A2. <i>Nature</i> 140:234-234.
	Evans, R. M. and Mangelsdorf, D. J. 2014 <i>Cell</i> , 157, 255.
	Evans, R.M., and D.J. Mangelsdorf. 2014. Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. <i>Cell</i> 157:255-66.
	Feutz AC, Pham-Dinh D, Allinquant B, Miehle M, Ghandour MS. 2001. An immortalized jimpy oligodendrocyte cell line: defects in cell cycle and cAMP pathway. <i>Glia</i> 34(4):241-252.
55	Ghyselsinck NB, Bavik C, Sapin V, Mark M, Bonnier D, et al. (1999) Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. <i>Embo J</i> 18: 4903-4914.
	Giguere, V., E.S. Ong, P. Segui, and R.M. Evans. 1987. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. <i>Nature</i> 330:624-9.
60	Gillam, A.E., I.M. Heilbron, W.E. Jones, and E. Lederer. 1938. On the occurrence and constitution of the 693 mu chromogen (Vitamin A2 ?) of fish liver oils. <i>Biochemical Journal</i> 32:405-416.
	Goldstein, J.T., A. Dobrzyn, M. Clagett-Dame, J.W. Pike, and H.F. DeLuca. 2003. Isolation and characterization of unsaturated fatty acids as natural ligands for the retinoid-X receptor. <i>Arch Biochem Biophys</i> 420:185-93.
	Heyman, R.A., D.J. Mangelsdorf, J.A. Dyck, R.B. Stein, G. Eichele, R.M. Evans, and C. Thaller. 1992. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. <i>Cell</i> 68:397-406.
65	Hollis F, Kabbaj M. 2014 Social defeat as an animal model for depression. <i>ILAR J.</i> 55(2) 221-32.

	Kai Z J 2011 Nanosci Nanotechnol. Synthesis of retinyl palmitate catalyzed by Candida sp.99-125 lipase immobilized on fiber-like SBA-15 mesoporous material. 11(9):7593-602.
	Karrer, P., R. Morf, and K. Schöpp. 1931a. Zur Kenntnis des Vitamin A aus Fischtranen II. Helvetica Chimica Acta 14:1431-1436.
5	Kastner, P., M. Mark, N. Ghyselinck, W. Krezel, V. Dupe, J.M. Grondona, and P. Chambon. 1997a. Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. Development 124:313-26.
10	Kastner, P., N. Messaddeq, M. Mark, O. Wendling, J.M. Grondona, S. Ward, N. Ghyselinck, and P. Chambon. 1997b. Vitamin A deficiency and mutations of RXRalpha, RXRbeta and RARalpha lead to early differentiation of embryonic ventricular cardiomyocytes. Development 124:4749-58.
	Kitareewan, S., L.T. Burka, K.B. Tomer, C.E. Parker, L.J. Deterding, R.D. Stevens, B.M. Forman, D.E. Mais, R.A. Heyman, T. McMorris, and C. Weinberger. 1996. Phytol metabolites are circulating dietary factors that activate the nuclear receptor RXR. Mol Biol Cell 7:1153-66.
15	Kliwer, S.A., K. Umeson, D.J. Mangelsdorf, and R.M. Evans. 1992. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. Nature 355:446-9.
	Liu ZQ 2015 Appl Microbiol Biotechnol. Efficient two-step chemo-enzymatic synthesis of all-trans-retinyl palmitate with high substrate concentration and product yield. 99(21):8891-902
	Mangelsdorf, D.J., and R.M. Evans. 1995. The RXR heterodimers and orphan receptors. Cell 83:841-50.
20	Mangelsdorf, D.J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umeson, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, and R.M. Evans. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. Cell 83:835-9.
25	Moise, A.R., A. Isken, M. Dominguez, A.R. de Lera, J. von Lintig, and K. Palczewski. 2007. Specificity of zebrafish retinol saturase: formation of all-trans-13,14-dihydroretinol and all-trans-7,8- dihydroretinol. Biochemistry 46:1811-20.
	Moise, A.R., A. Isken, M. Dominguez, A.R. de Lera, J. von Lintig, and K. Palczewski. 2007. Specificity of zebrafish retinol saturase: formation of all-trans-13,14-dihydroretinol and all-trans-7,8- dihydroretinol. Biochemistry 46:1811-20.
30	Moise, A.R., V. Kuksa, Y. Imanishi, and K. Palczewski. 2004. Identification of all-trans-retinol:all-trans-13,14-dihydroretinol saturase. J Biol Chem 279:50230-42.
	Moise, A.R., V. Kuksa, W.S. Blaner, W. Baehr, and K. Palczewski. 2005. Metabolism and transactivation activity of 13,14-dihydroretinoic acid. J Biol Chem 280:27815-25.
	Moise, A.R., S. Alvarez, M. Dominguez, R. Alvarez, M. Golczak, G.P. Lobo, J. von Lintig, A.R. de Lera, and K. Palczewski. 2009. Activation of retinoic acid receptors by dihydroretinoids. Mol Pharmacol 76:1228-37.
35	Moreau, J. L. 1997 Validation of an animal model of anhedonia, a core symptom of depression. Encephale, vol. 23, no. 4, pp. 280-289,
	Nunez, V., D. Alameda, D. Rico, R. Mota, P. Gonzalo, M. Cedenilla, T. Fischer, L. Bosca, C.K. Glass, A.G. Arroyo, and M. Ricote. 2010. Retinoid X receptor alpha controls innate inflammatory responses through the up-regulation of chemokine expression. Proc Natl Acad Sci U S A 107:10626-31.
40	O'Byrne, Sheila M. and Blaner, William S., 2013 The Journal of Lipid Research, Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology Thematic Review Series: Fat-Soluble Vitamins: Vitamin A 54, 1731-1743
	Pazos Y, de Lera AR (1999) Stereoselective Synthesis of 9-cis-Retinoic Acid Based on Stepwise or Convergent Suzuki Coupling Reactions. Tetrahedron Lett 40: 8287-8290.
45	Pazos Y, Iglesias B, de Lera AR (2001) The Suzuki coupling reaction in the stereocontrolled synthesis of 9-cis-retinoic acid and its ring-demethylated analogues. J Org Chem 66: 8483-8489.
	Petkovich, M., N.J. Brand, A. Krust, and P. Chambon. 1987. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. Nature 330:444-50.
50	Rühl R, Krzyzosiak A, Niewiadomska-Cimicka A, Rochel N, Szeles L, Vaz B, Wietzych-Schindler M, Alvarez S, Szklenar M, Nagy L, de Lera AR, Krezel W. 2015. 9-cis-13,14-dihydroretinoic acid is an endogenous retinoid acting as RXR ligand in mice. PLoS Genet 11(6):e1005213.
	Rühl R. 2006. Method to determine 4-oxo-retinoic acids, retinoic acids and retinol in serum and cell extracts by liquid chromatography/diode-array detection atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 20(16):2497-2504.
55	Shirley M A et al. 1996 Oxidative and reductive metabolism of 9-cis-retinoic acid in the rat. Identification of 13,14-dihydro-9-cis-retinoic acid and its taurine conjugate. Drug Metab Dispos. 24(3):293-302
	Shulman, A.I., and D.J. Mangelsdorf. 2005. Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome. N Engl J Med 353:604-15.
60	Sorg A, Brückner R (2005) Unexpected cis-Selectivity in (Sylvestre) Julia Olefinations with Bu3Sn-Containing Allyl Benzothiazolyl Sulfones: Stereoselective Synthesis of 1,3-Butadienyl- and 1,3,5-Hexatrienylstannanes. Synlett 2005: 289,293.
	Stephensen, C.B., A.D. Borowsky, and K.C. Lloyd. 2007. Disruption of Rxra gene in thymocytes and T lymphocytes modestly alters lymphocyte frequencies, proliferation, survival and T helper type 1/type 2 balance. Immunology 121:484-98.
65	Szanto A, Narkar V, Shen Q, Uray IP, Davies PJ, Nagy L. 2004. Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. Cell Death Differ 11 Suppl 2:S126-143.

	Ulven, S.M., T.E. Gundersen, A.K. Sakhi, J.C. Glover, and R. Blomhoff. 2001. Quantitative axial profiles of retinoic acid in the embryonic mouse spinal cord: 9-cis retinoic acid only detected after all-trans-retinoic acid levels are super-elevated experimentally. <i>Dev Dyn</i> 222:341-53.
5	Vahlquist, A., J.B. Lee, G. Michaelsson, and O. Rollman. 1982. Vitamin A in human skin: II Concentrations of carotene, retinol and dehydroretinol in various components of normal skin. <i>J Invest Dermatol</i> 79:94-7.
	Vaz B, Alvarez R, Souto JA, de Lera AR (2005) γ -Allenyl Allyl Benzothiazole Sulfonyl Anions Undergo cis-Selective (Sylvestre) Julia Olefinations. <i>Synlett</i> 2005: 294,298.
10	Wan, Y.J., G. Han, Y. Cai, T. Dai, T. Konishi, and A.S. Leng. 2003. Hepatocyte retinoid X receptor-alpha-deficient mice have reduced food intake, increased body weight, and improved glucose tolerance. <i>Endocrinology</i> 144:605-11.
	Wietrzych M, Meziane H, Sutter A, Ghyselinck N, Chapman PF, Chambon P, Krezel W. 2005. Working memory deficits in retinoid X receptor gamma-deficient mice. <i>Learn Mem</i> 12(3):318-326.
15	Wietrzych-Schindler M, Szyszka-Niagolov M, Ohta K, Endo Y, Perez E, de Lera AR, Chambon P, Krezel W. 2011. Retinoid x receptor gamma is implicated in docosahexaenoic acid modulation of despair behaviors and working memory in mice. <i>Biol Psychiatry</i> 69(8):788-794.
	Yin Chunhua 2006 Chinese J. Chem. Eng. Synthesis of Vitamin A Esters by Immobilized Candida sp. Lipase in Organic Media 14(1) 81-86
20	Publicaciones de patente:
	WO 95/04018 A1
	WO 95/32946 A1
	WO2011/034551 A2
25	WO2013/134867 A1

REIVINDICACIONES

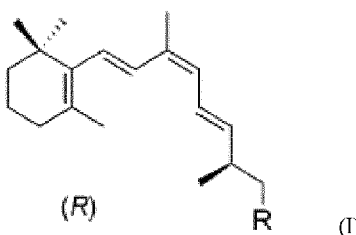
1. Un compuesto de fórmula general (I)



donde R es $-\text{CH}_2\text{O}_2$ donde

R_2 es H o un grupo acilo $-\text{C}(\text{O})\text{R}_3$ donde $-\text{C}(\text{O})\text{R}_3$ es un grupo que se elimina por hidrólisis en un tejido u órgano de mamífero para dar como resultado (*R*)-9-*cis*-13,14-dihidroretinol y un compuesto tolerable biológicamente aceptable
dicho compuesto se convierte en (*R*)-9-*cis*-13,14-ácido dihidroreticoico en tejido u órgano o células de mamífero, una vez administrado.

2. El compuesto de fórmula general (I) según la reivindicación 1

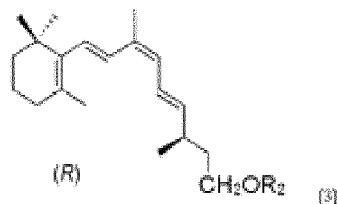


donde R es $-\text{CH}_2\text{O}_2$, donde

R_2 is H o un grupo acilo $-\text{C}(\text{O})\text{R}_3$ donde R_3 es un alquilo C_{1-25} o un alquenilo C_{2-25} , donde dicho compuesto se convierte en 9-*cis*-13,14-dihidroretinol en tejido u órgano o células de mamífero, una vez administrado
dicho compuesto se convierte en (*R*)-9-*cis*-13,14-ácido dihidroreticoico en tejido u órgano de mamífero, una vez administrado.

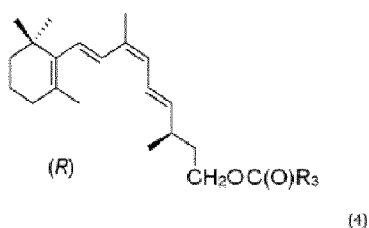
3. El compuesto según la reivindicación 2, donde dicho compuesto es

-un compuesto de fórmula general (3)



donde R_2 es H o un grupo acilo $-\text{C}(\text{O})\text{R}_3$ donde R_3 se selecciona de un alquilo C_{1-23} , preferiblemente un alquilo C_{1-6} y un alquilo C_{9-23} , más preferiblemente un alquilo C_{1-4} y un alquilo C_{11-21} y un alquenilo C_{2-25} , preferiblemente un alquenilo C_{2-6} y un alquenilo C_{13-23} .

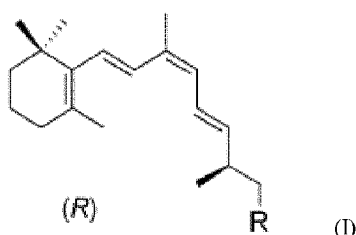
4. El compuesto según la reivindicación 3, donde dicho compuesto es de fórmula general (4)



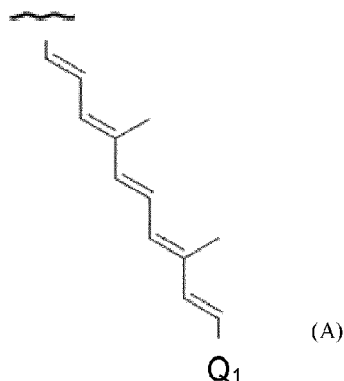
donde R_3 se selecciona de

- un alquilo C_{1-4} , preferiblemente metilo, etilo, propilo o isopropilo,
- un alquilo C_{11-21} , preferiblemente un alquilo C_{13-19} y
- un alquelino C_{11-23} , preferiblemente un alquenilo C_{13-23} poliinsaturado.

5. Un compuesto de fórmula general (I) para su uso en terapia en un sujeto mamífero,



donde R se selecciona de un grupo de fórmula general (A), $-CH_2OR_2$ y $-COOR_1$ donde R es un grupo de fórmula general (A)



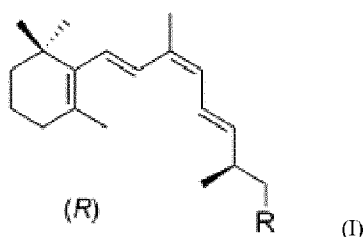
donde Q_1 es un alquenilo o cicloalquenilo C_{6-10} sustituido o no sustituido, preferiblemente un trimetilcicloalquenilo sustituido o no sustituido o más preferiblemente 2,6,6-trimetilciclohexenilo sustituido o no sustituido, incluso más preferiblemente 2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-ilo o 2,6,6-trimetilciclohex-2-en-1-ilo, y/o

R_2 es H o un grupo acilo $-C(O)R_3$ donde $-C(O)R_3$ es un grupo que se elimina por hidrólisis en un tejido u órgano de mamífero para dar como resultado (R)-9-cis-13,14-dihidroretinol y un compuesto tolerable biológicamente aceptable y/o

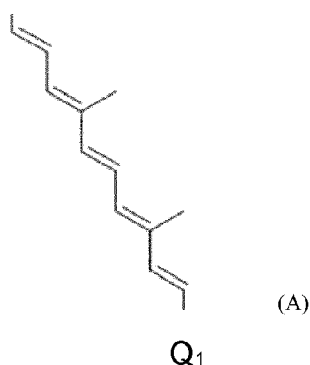
R_1 es un grupo que se elimina por hidrólisis en un tejido u órgano de mamífero para dar como resultado (R)-9-cis-13,14-ácido dihidrorretinoico y un compuesto tolerable biológicamente aceptable,

dicho compuesto se convierte en ligando RXR (R)-9-cis-13,14-ácido dihidrorretinoico en un tejido u órgano o células de mamífero, una vez administrado.

6. El compuesto para su uso según la reivindicación 5, donde el compuesto es de la siguiente fórmula general (I):



donde R se selecciona de un grupo de fórmula general (A), $-\text{CH}_2\text{OR}_2$, y $-\text{COOR}_1$ donde R es un grupo de fórmula general (A):



donde Q₁ es un 2,6,6-trimetilciclohexenilo sustituido o no sustituido, incluso más preferiblemente 2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-ilo o 2,6,6-trimetilciclohex-2-en-1-ilo, donde si el trimetilciclohexenilo, por ejemplo, el grupo 2,6,6-trimetilciclohexenilo está sustituido, es preferiblemente sustituido con hidroxilo o oxosustituido, preferiblemente oxosustituido;

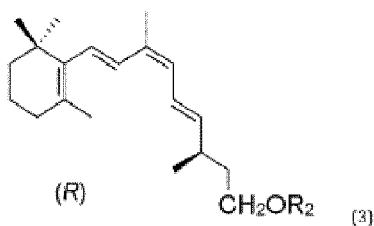
donde dicho compuesto se convierte en (R)-9-*cis*-13,14-dihidroretinol en tejido u órgano o células de mamífero, una vez administrado y/o

R₂ es H o un grupo acilo $-\text{C}(\text{O})\text{R}_3$ donde R₃ es un alquilo C₁₋₂₅ o un alquenilo C₂₋₂₅, donde dicho compuesto se convierte en (R)-9-*cis*-13,14-dihidroretinol en tejido u órgano o células de mamífero, una vez administrado y/o

R₁ es un alquilo C₁₋₂₅ o alquenilo C₂₋₂₅, dicho compuesto se convierte en (R)-9-*cis*-13,14-ácido dihidroreticoico en tejido u órgano de mamífero, una vez administrado.

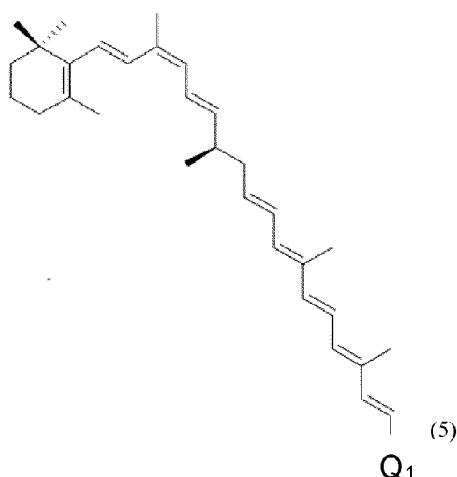
7. El compuesto para su uso según la reivindicación 6, donde dicho compuesto es

-un compuesto de fórmula general (3)



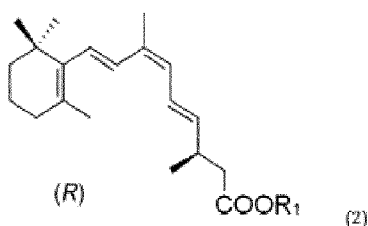
donde R₂ es H o un grupo acilo $-\text{C}(\text{O})\text{R}_3$ donde R₃ se selecciona de un alquilo C₁₋₂₃, preferiblemente un alquilo C₁₋₈ y un alquilo C₉₋₂₃, más preferiblemente un alquilo C₁₋₄ y un alquilo C₁₁₋₂₁ y un alquenilo C₂₋₂₅, preferiblemente un alquenilo C₂₋₆ y un alquenilo C₁₋₂₃, más preferiblemente un alquenilo C₁₃₋₂₃ y/o

-un compuesto de fórmula general (5)



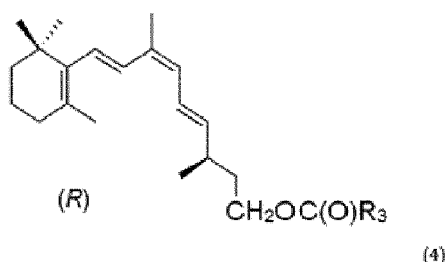
donde Q₁ es un alqueno o cicloalqueno C₆₋₁₀ sustituido o no sustituido, preferiblemente un trimetilcicloalqueno sustituido o no sustituido o más preferiblemente un 2,6,6-trimetilciclohexenilo sustituido o no sustituido, incluso más preferiblemente 2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-ilo o 2,6,6-trimetilciclohex-2-en-1-ilo, si el trimetilciclohexenilo, p. ej., un grupo 2,6,6-trimetilciclohexenilo está sustituido, preferiblemente, está sustituido con hidroxilo o oxosustituido, preferiblemente, oxosustituido; donde dicho compuesto se convierte en (*R*)-9-*cis*-13,14-dihidroretinol en tejido u órgano o células de mamífero, una vez administrado.

8. El compuesto para su uso según la reivindicación 6, donde dicho compuesto es de fórmula general (2)



donde R₁ se selecciona de un alquilo C₁₋₂₃, preferiblemente un alquilo C₁₋₆ y un alquilo C₉₋₂₃, más preferiblemente un alquilo C₁₋₄ y un alquilo C₁₁₋₂₁ y un alqueno C₂₋₂₄, preferiblemente un alqueno C₂₋₆ y un alqueno C₉₋₂₃, más preferiblemente un alqueno C₁₃₋₂₃, donde preferiblemente R₁ se selecciona entre metilo, etilo, propilo o isopropilo opcionalmente metilo, propilo o isopropilo.

9. El compuesto para su uso según la reivindicación 7, donde dicho compuesto es de fórmula general (4)



donde R₃ se selecciona de

- un alquilo C₁₋₄, preferiblemente metilo, etilo, propilo o isopropilo,
- un alquilo C₁₁₋₂₁, preferiblemente un alquilo C₁₃₋₁₉ y
- un alqueno C₁₁₋₂₃, preferiblemente un alqueno C₁₃₋₂₃ poliinsaturado.

10. El compuesto para su uso según la reivindicación 5 o 6 que es 9-*cis*-13,14-dihidro-beta, betacaroteno.

11. Una composición farmacéutica o una composición nutracéutica para su uso en terapia de un sujeto mamífero, preferiblemente en la prevención o tratamiento de una disfunción de señalización mediada por el receptor X de retinoide (RXR) en un sujeto mamífero, comprendiendo dicha composición el compuesto como

se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el compuesto para su uso como se define en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 o el 9-*cis*-carotenoide según la reivindicación 10, comprendiendo también dicha composición uno o más aditivos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 5 12. El compuesto o la composición farmacéutica o nutracéutica que se menciona en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en terapia como precursor selectivo del ligando RXR endógeno en la prevención o tratamiento de una disfunción de señalización mediada por el receptor X de retinoide (RXR) en un sujeto de mamífero; preferiblemente para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad seleccionada de enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central y enfermedades relacionadas con el sistema nervioso periférico, o
- 10 para su uso en la prevención terapéutica y/o el tratamiento de
- 15 -aprendizaje y/o deterioro de memoria, donde preferiblemente dicha memoria es memoria de trabajo,
-funciones cognitivas deterioradas o aprendizaje y memoria deterioradas,
-depresión, o
- 20 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo, preferiblemente un trastorno neurodegenerativo seleccionado de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, deterioro cognitivo leve (MCI), enfermedad de Parkinson con MCI, enfermedad de Huntington, demencia con cuerpos de Lewy (DLB), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), y otras demencias relacionadas neurodegenerativas como debido a cambios en el cerebro causados por envejecimiento, enfermedad o traumatismo; o lesión de la médula espinal y ataxias, esclerosis diseminada y esclerosis múltiple (EM) u otras afecciones neurológicas.
- 25 13. Una composición nutracéutica para su uso en la prevención terapéutica de la disfunción de señalización mediada por el receptor X de retinoide (RXR) dependiendo de una deficiencia de vitamina A5 dependiente de ligando en un sujeto mamífero, para general de vitamina AS-suplementación, comprendiendo dicha composición 9-*cis*-beta, betacaroteno (9CBC) en una cantidad o concentración mayor que la presente en la matriz alimenticia natural y/o comprende una cantidad adicional del compuesto.
- 30 14. Un uso no médico de un compuesto o una composición farmacéutica o nutracéutica como se menciona en cualquiera de las reivindicaciones 1-12, preferentemente para mejorar el rendimiento de la memoria, donde preferentemente dicha memoria es una memoria de trabajo o como un ingrediente alimenticio o como un suplemento dietético para mantener la salud de un sujeto.
- 35 15. Un complemento alimenticio que contiene 9-*cis*-betacaroteno (9CBC) o 9CBC para su uso en terapia como precursor de 9-*cis*-13,14-dihidrobeta-caroteno (9CDHBC), como ingrediente alimenticio o como nutracéutico, para prevenir terapéuticamente una deficiencia de vitamina AS dependiente del ligando y/o para la formulación general de vitamina AS, o como un suplemento alimenticio para activar RXR a nivel fisiológico relevante de 9CDHBC y/o 9CDHRA en el cuerpo humano, donde preferentemente 9CBC se usa en forma de una composición que comprende dicho compuesto en una cantidad o concentración mayor que la que está presente en la matriz alimenticia natural y/o comprende una cantidad adicional del compuesto.
- 40 45 16. Composición nutracéutica para su uso en la prevención terapéutica de la disfunción de señalización mediada por el receptor X de retinoide (RXR) dependiendo de una deficiencia de vitamina A5 dependiente de ligando en un sujeto mamífero, comprendiendo dicha composición 9-*cis*-beta-betacaroteno (9CBC) en una cantidad o concentración mayor que la presente en la matriz alimenticia natural y/o que comprende una cantidad adicional del compuesto.
- 50

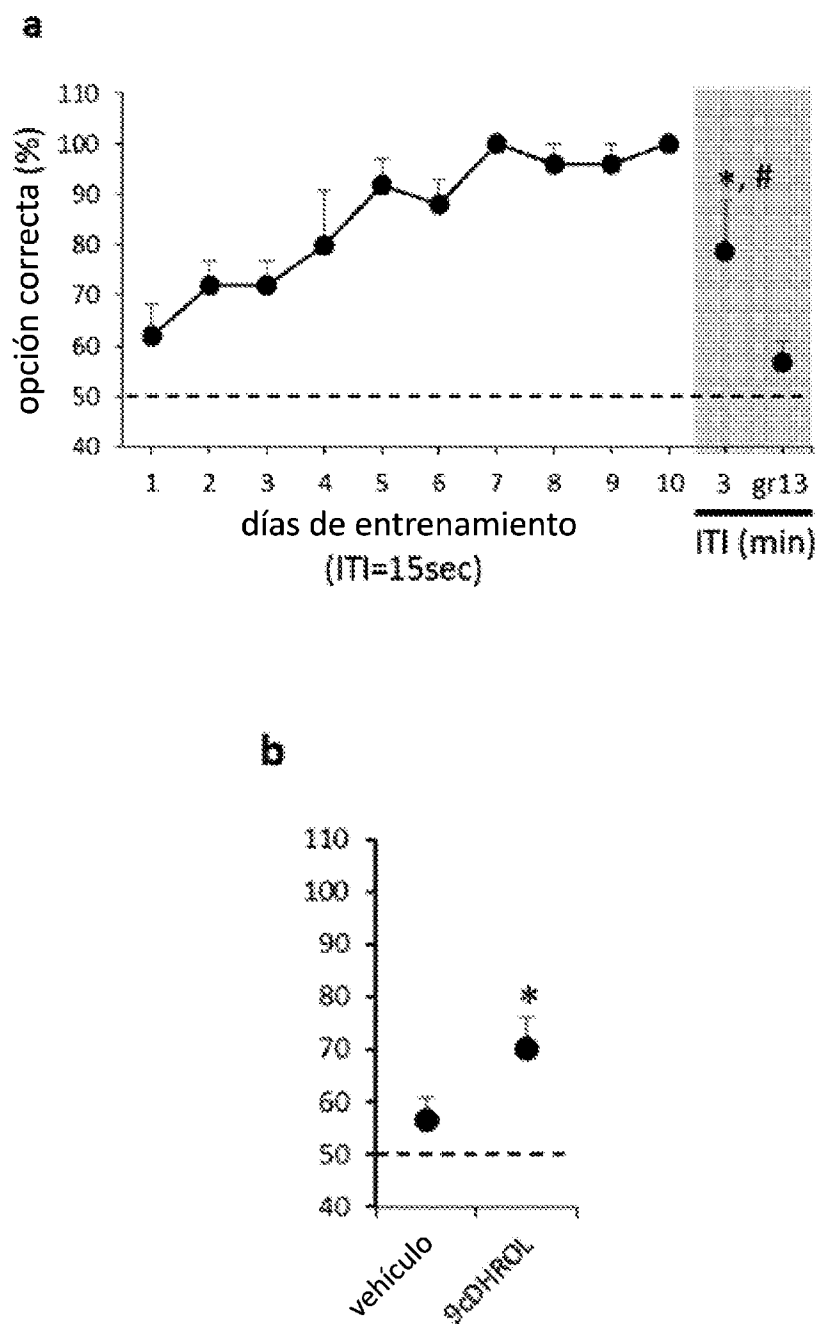


FIGURA 1: Efecto del tratamiento con 9CDHROL sobre el rendimiento de la memoria de trabajo en la tarea de no coincidencia de lugar retrasada (DNMTP).

(a) Curva de aprendizaje para ratones macho C57BL6N de tipo salvaje.

(b) Elecciones correctas 7-9 horas después del tratamiento con 9CDHROL y vehículo cuando se probaron a un ITI medio de gr13 min.

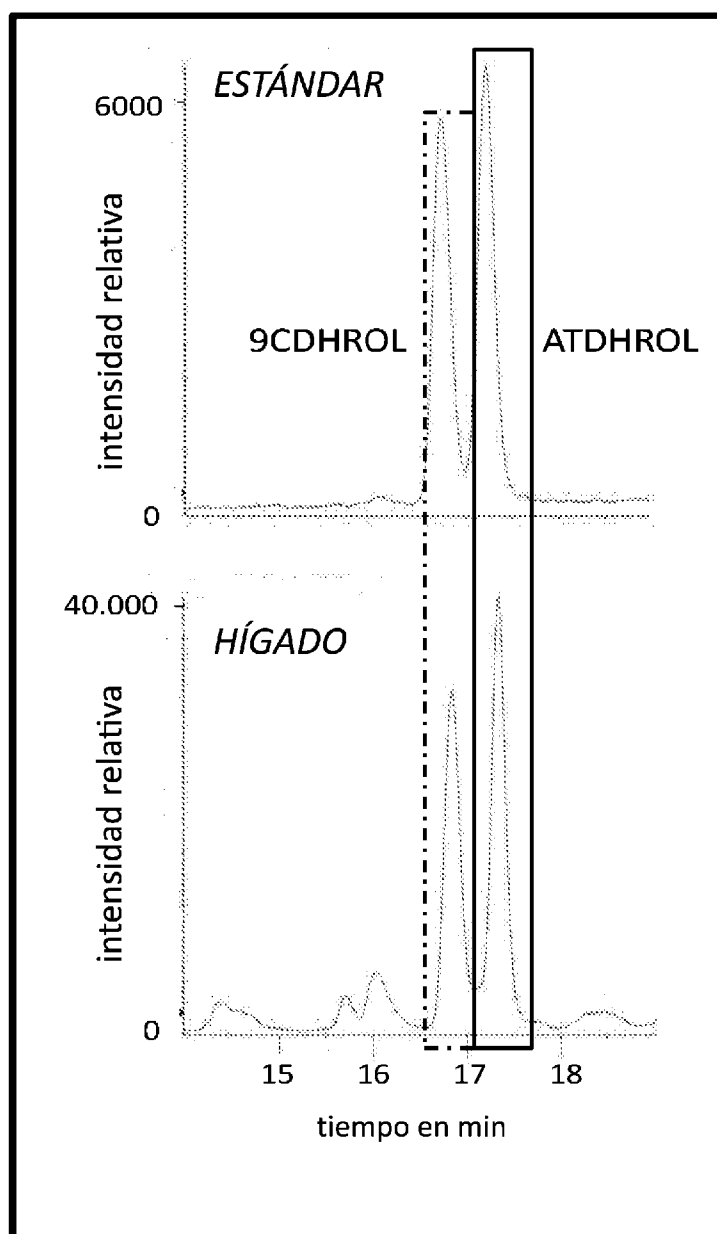


FIGURA 2: Mezcla estándar de 9CDHROL (cromatograma superior) y niveles endógenos en el hígado de ratones tras el tratamiento con vehículo (cromatograma inferior).

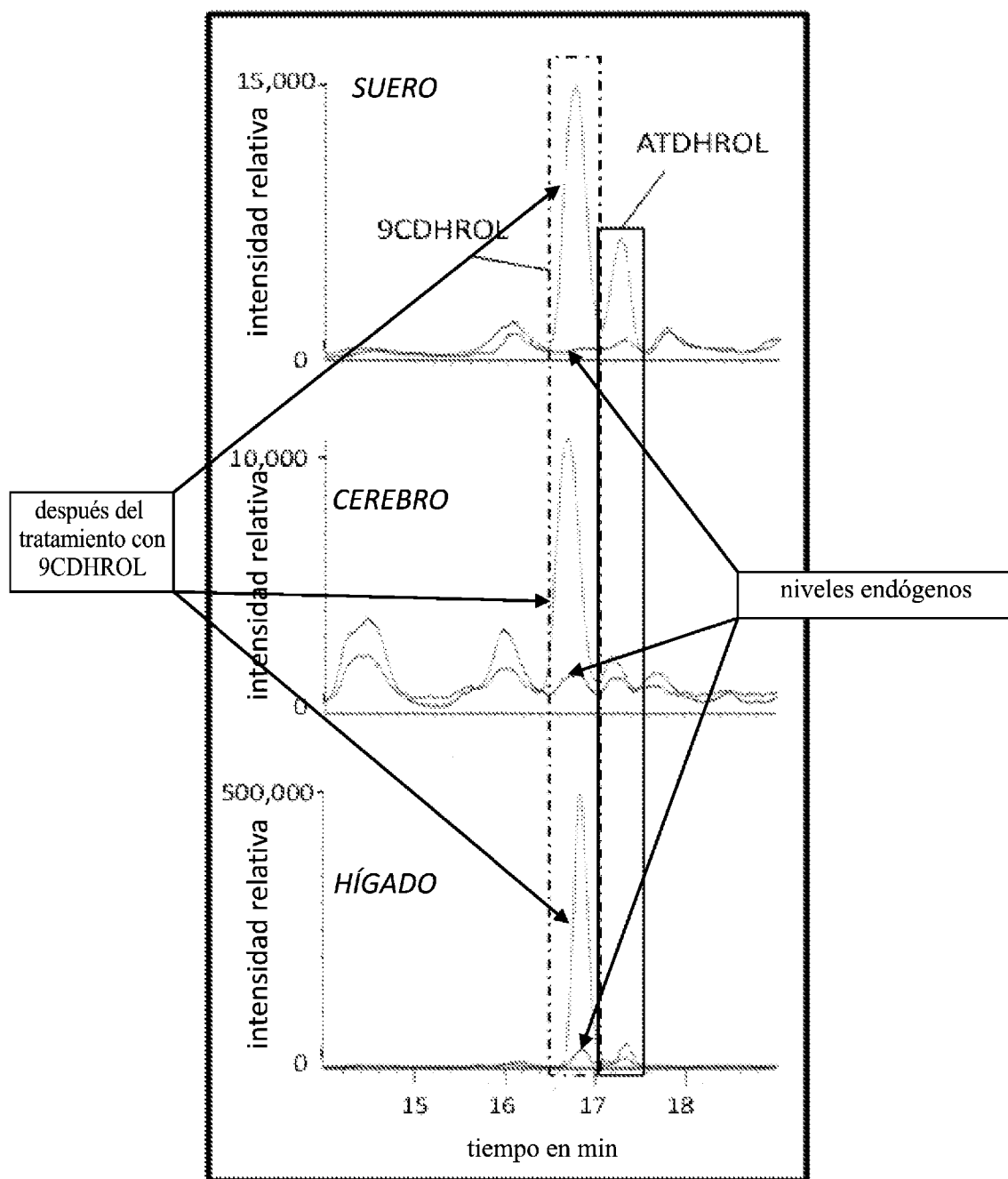


FIGURA 3: 9CDHROL en ratones tras el tratamiento con vehículo que representa los niveles endógenos (azul o gris oscuro) y tras el tratamiento con 9CDHROL (rojo o gris claro) en ratones.

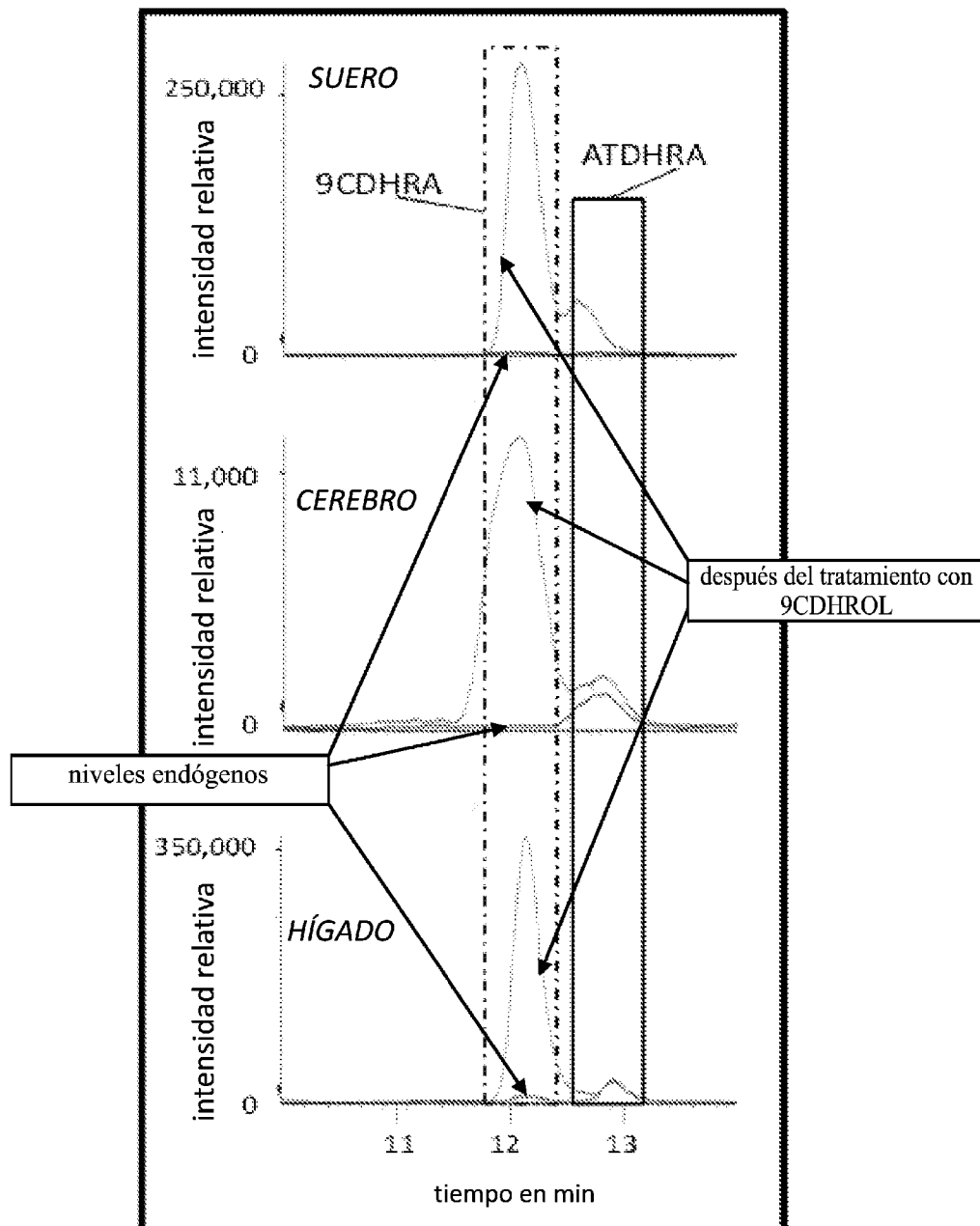


FIGURA 4: Niveles de 9CDHRA tras el tratamiento con vehículo que representan los niveles endógenos (azul o gris oscuro) y tras tratamientos con 9CDHROL (rojo o gris claro) en ratones.

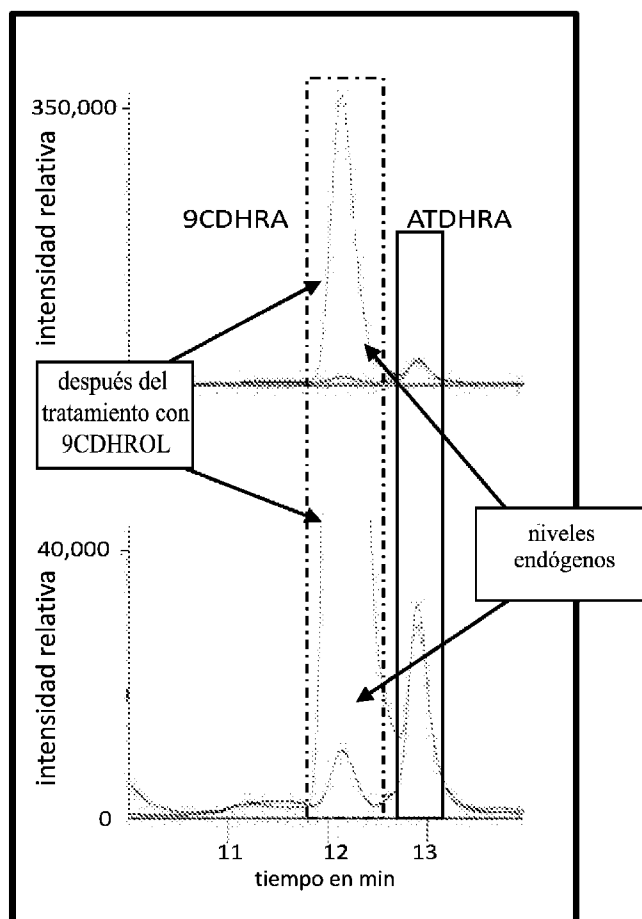


FIGURA 5: Niveles de 9CDHRA tras el tratamiento con vehículo que representan los niveles endógenos (azul o gris oscuro) y tras el tratamiento con 9CDHROL (rojo o gris claro) en el hígado de ratón. Figura superior: Rango normal (fijado en el máximo); figura inferior: rango ampliado para el rango máximo de retinoides endógenos.

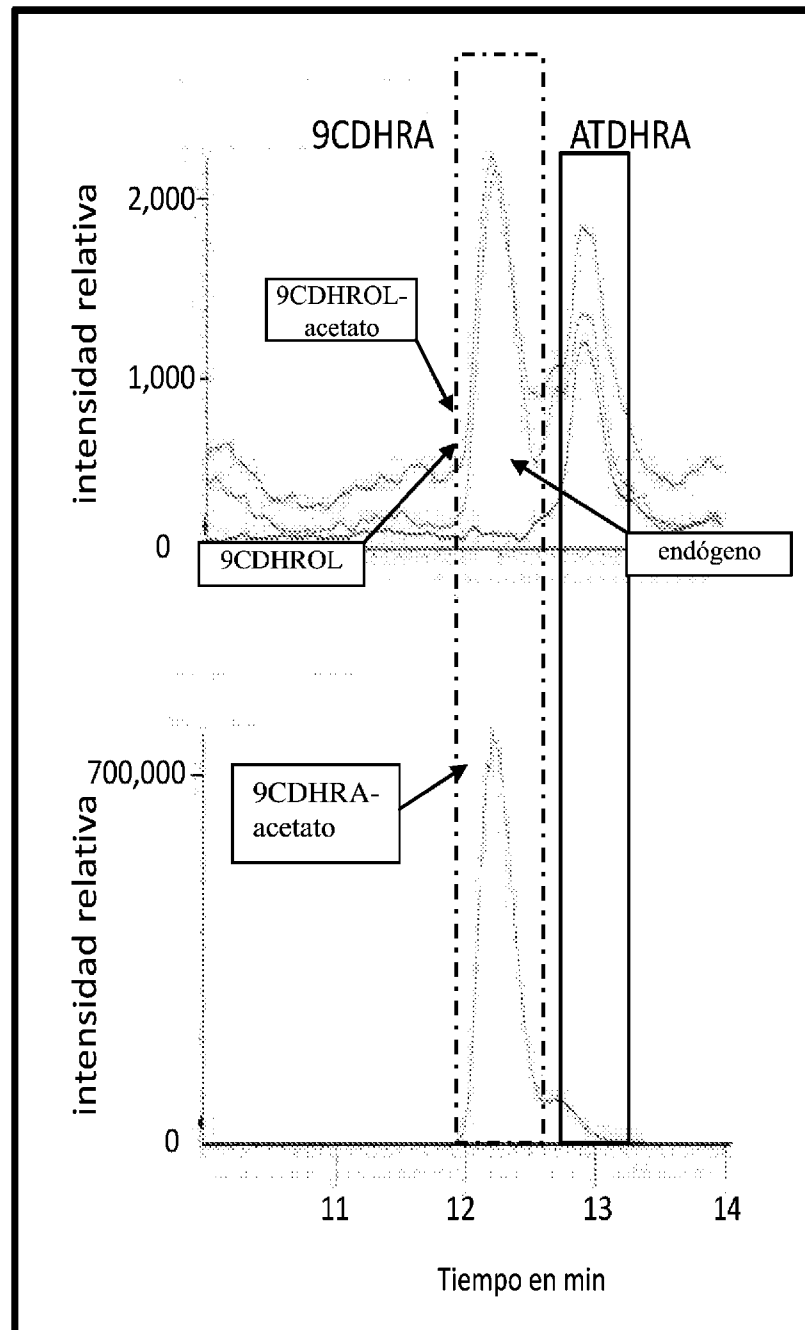


FIGURA 6: 9CDHRA-tratamiento de control (niveles endógenos) y tras suplementos de retinoides a células oligodendroglíticas. Arriba: endógeno (azul o gris oscuro), 9CDHROL (naranja o gris claro) y 9CDHROL-acetato (rosa) y abajo: 9CDHRA-acetato (rosa o gris medio)

CLÚSTER: Vitamina A5

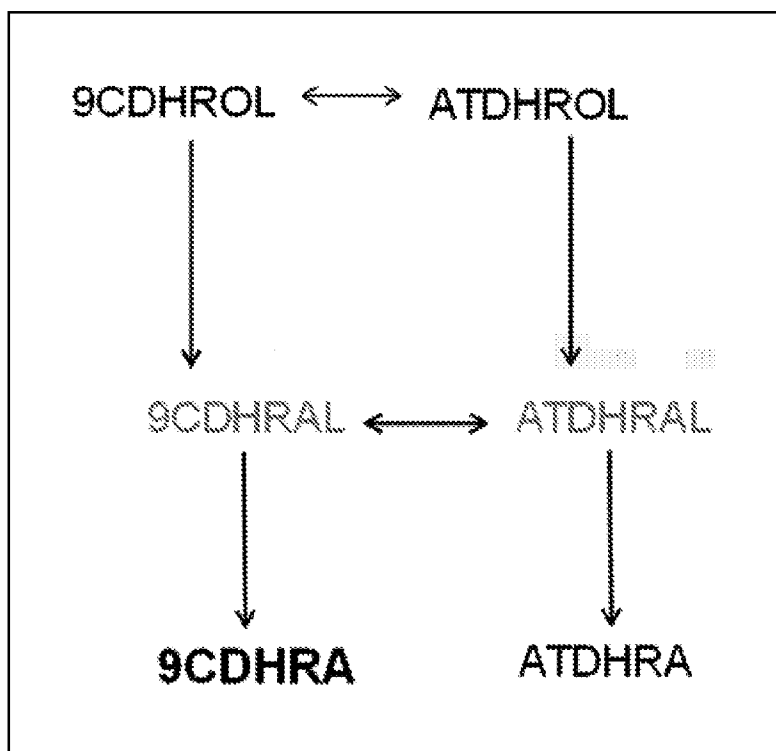


FIGURA 7 Posible vía metabólica de la vitamina A5.

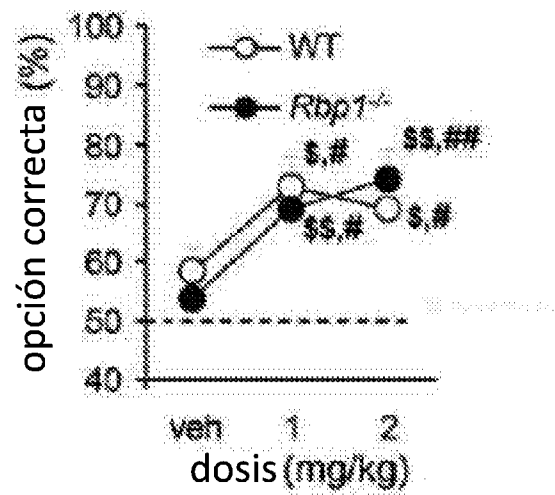


FIGURA 8

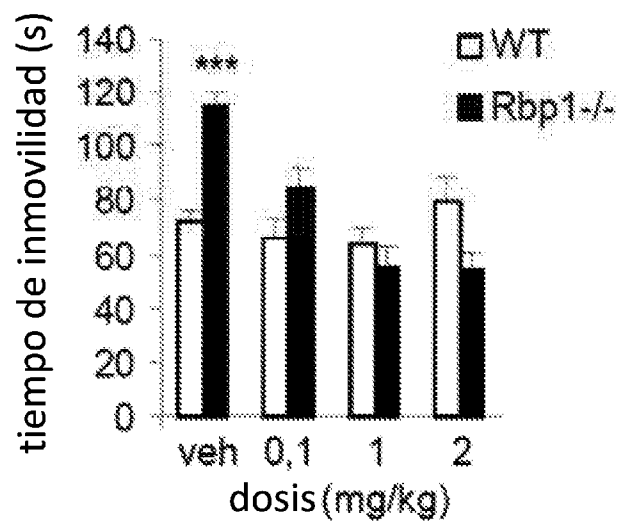


FIGURA 9

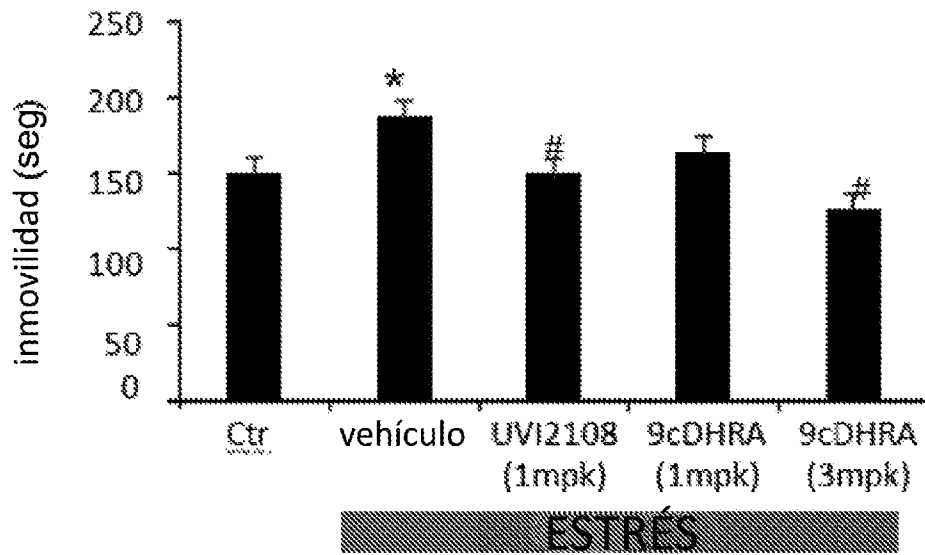


FIGURA 10 a

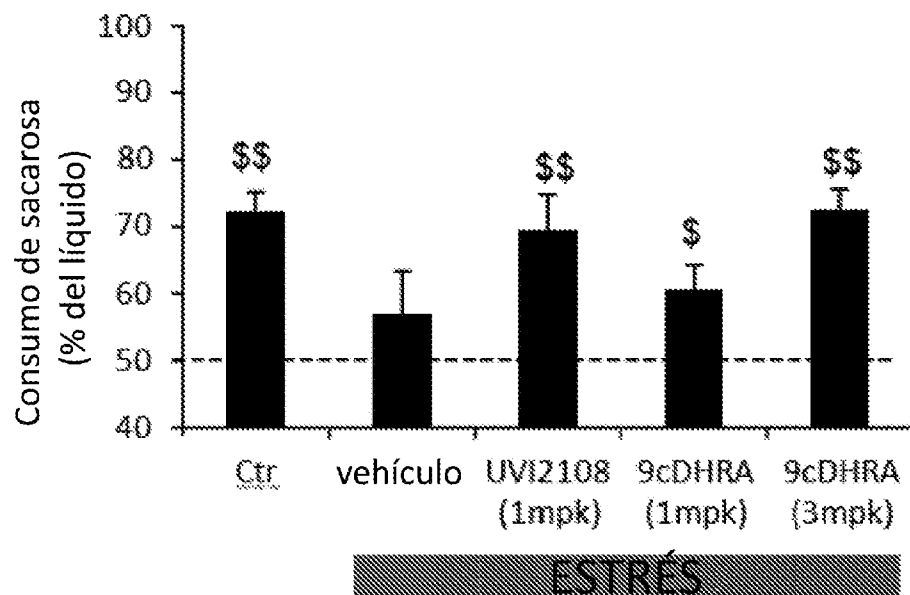


FIGURA 10 b

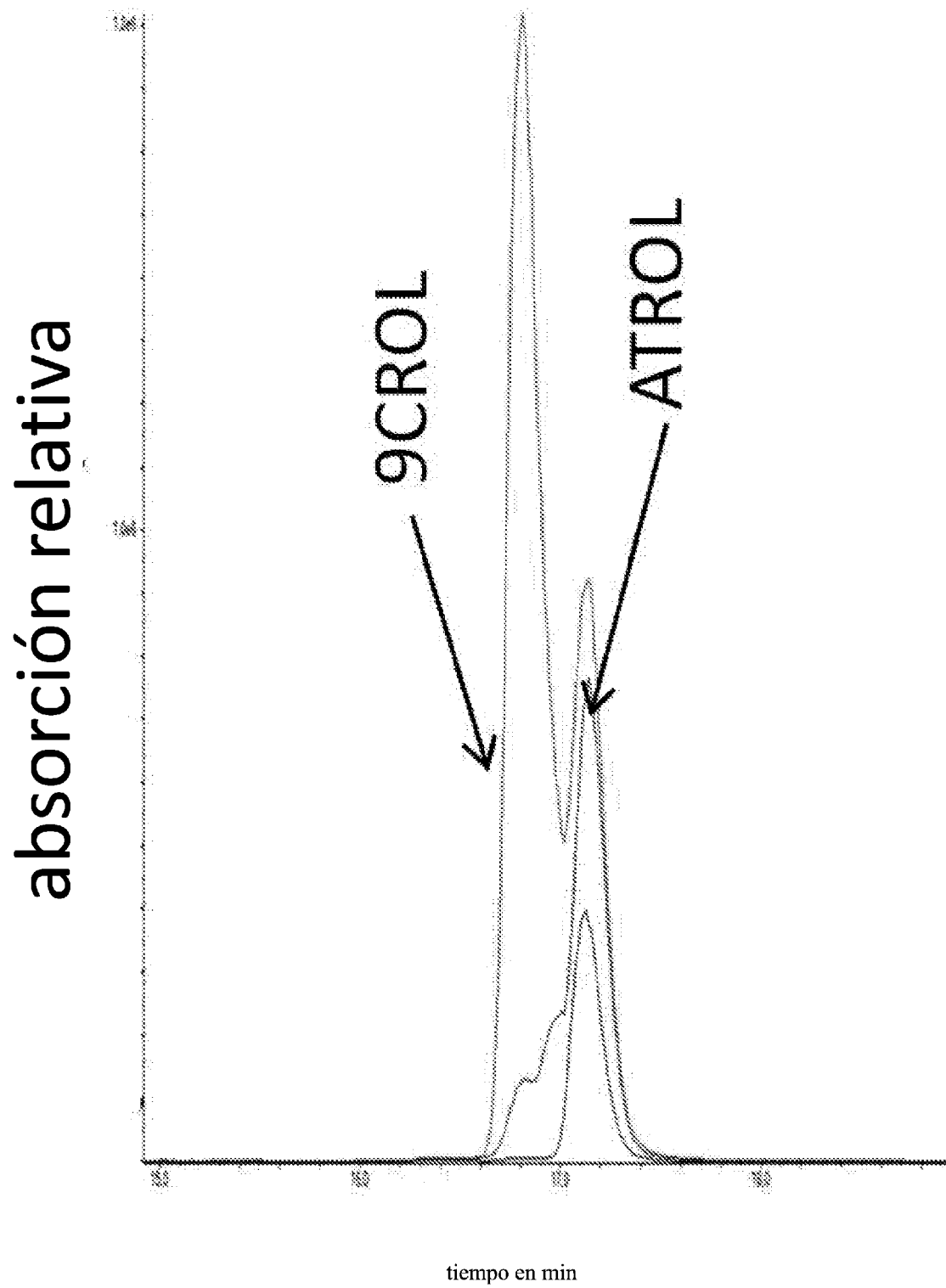


FIGURA 11

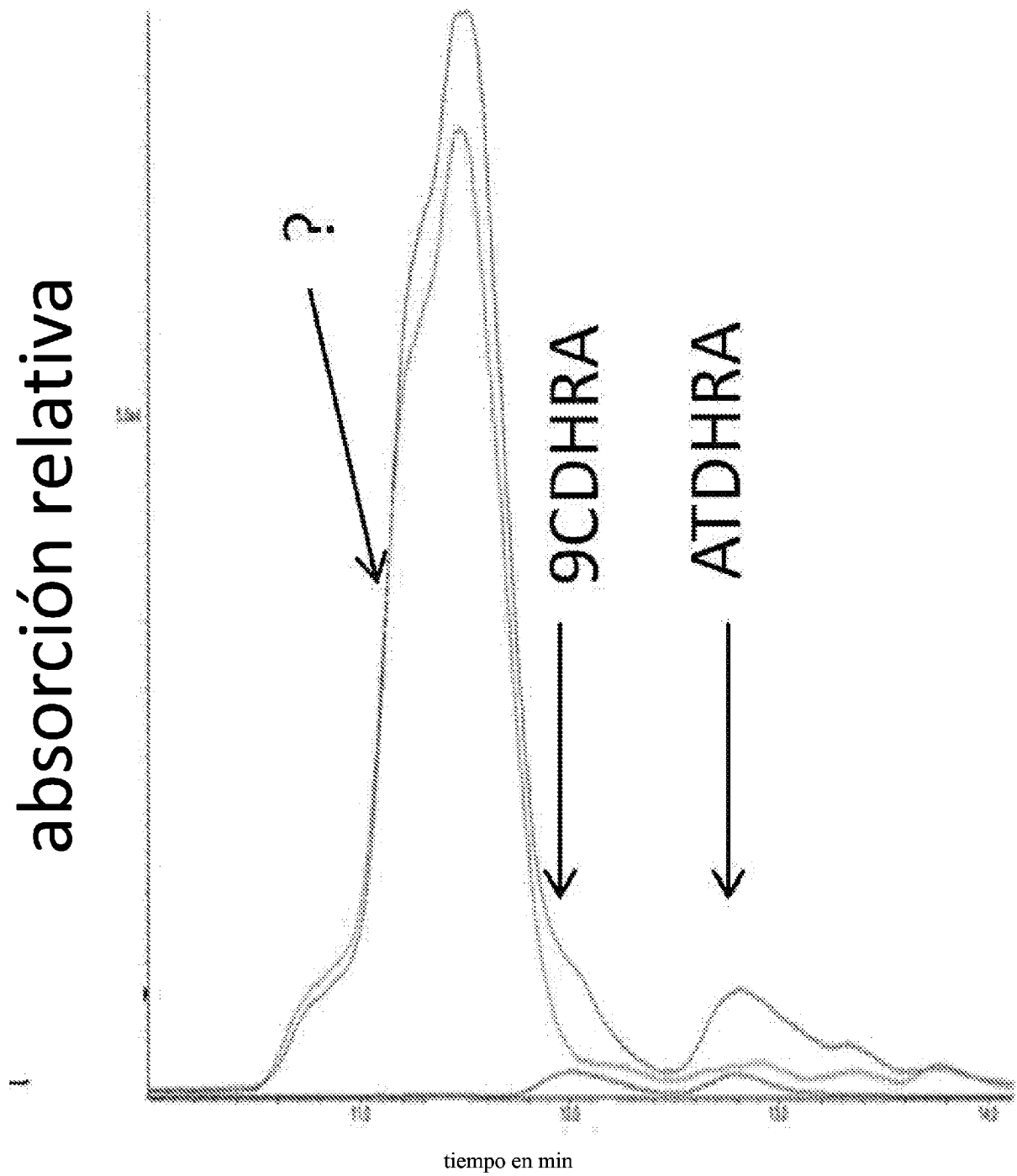


FIGURA 12

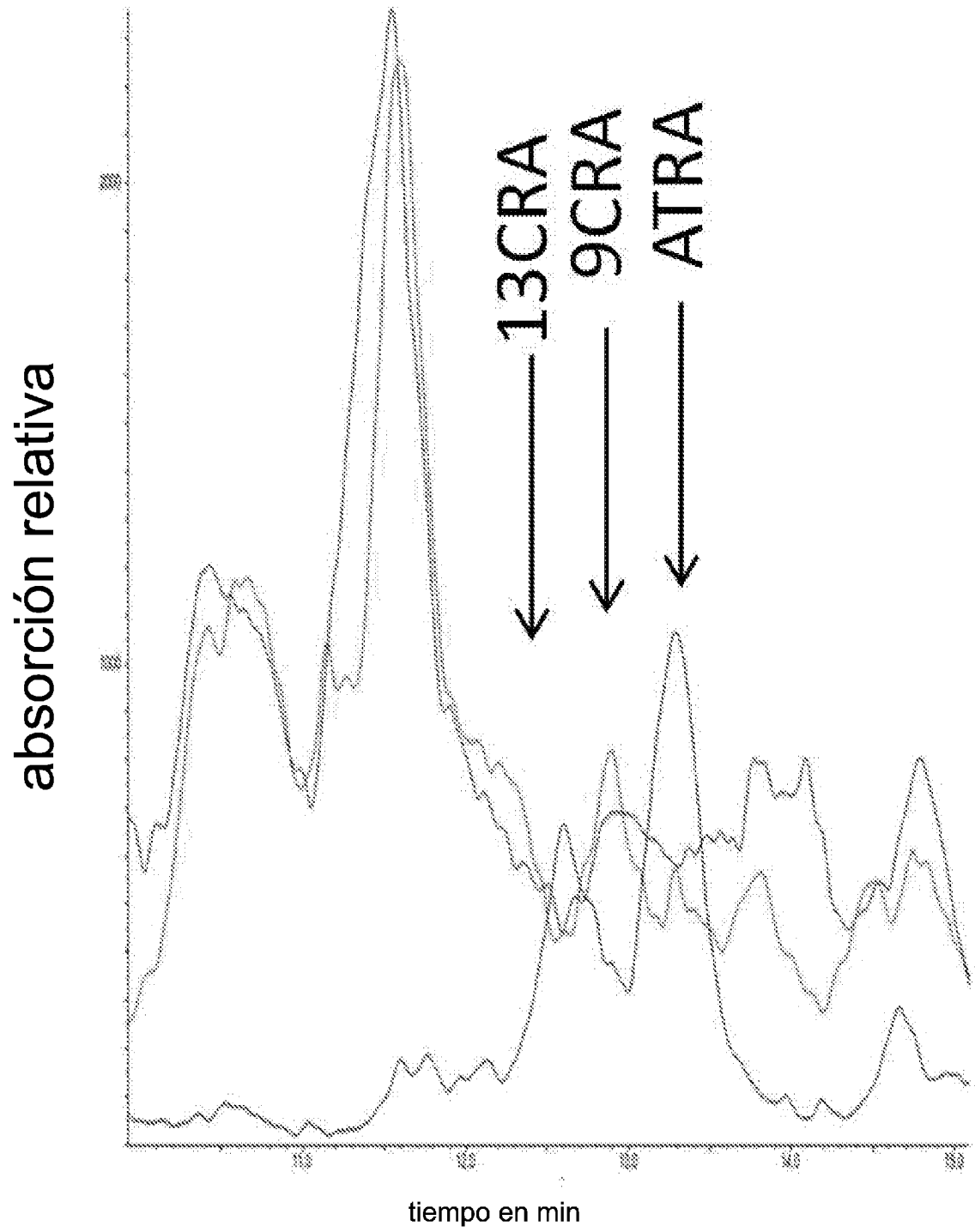


FIGURA 13

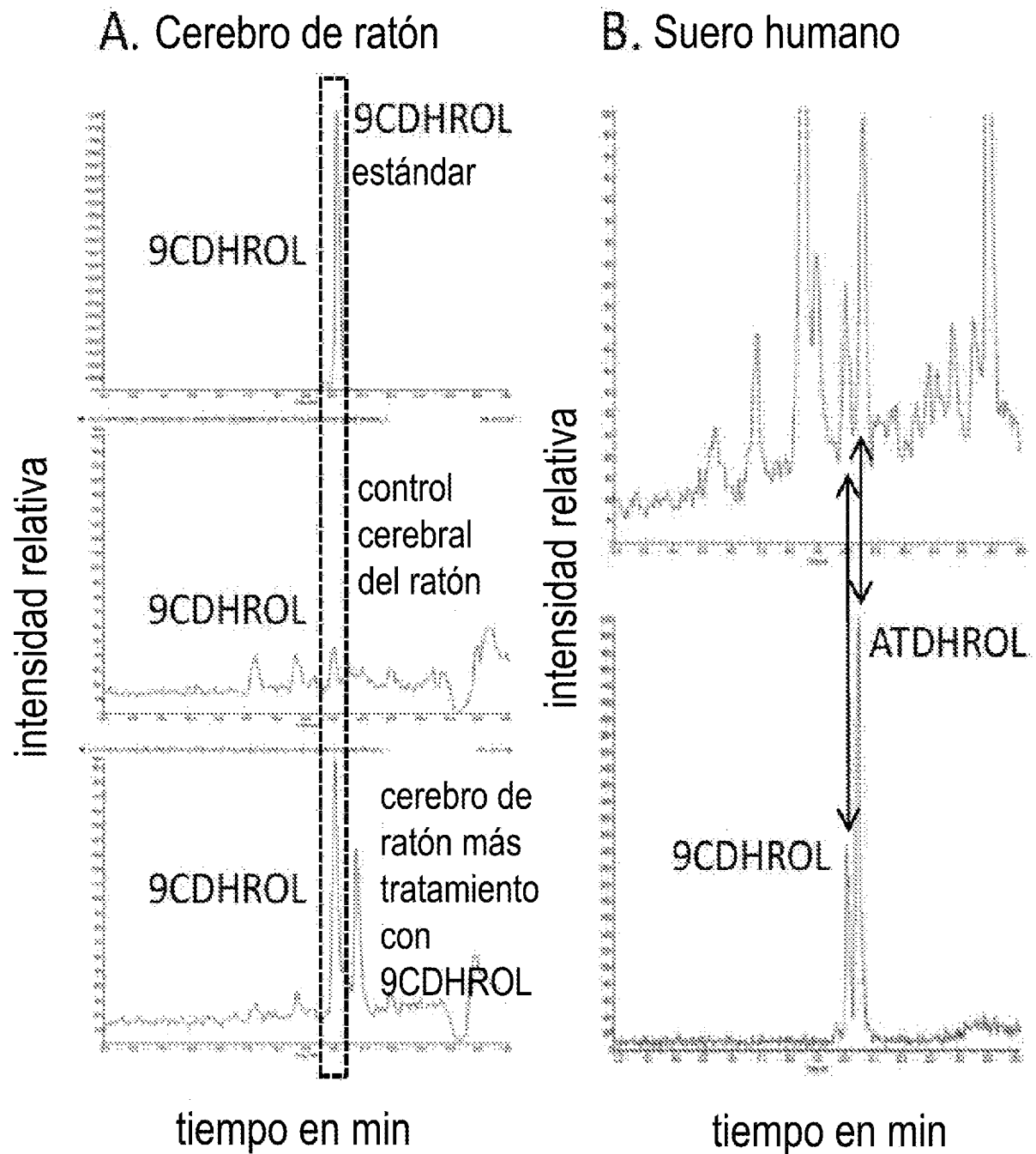


FIGURA 14

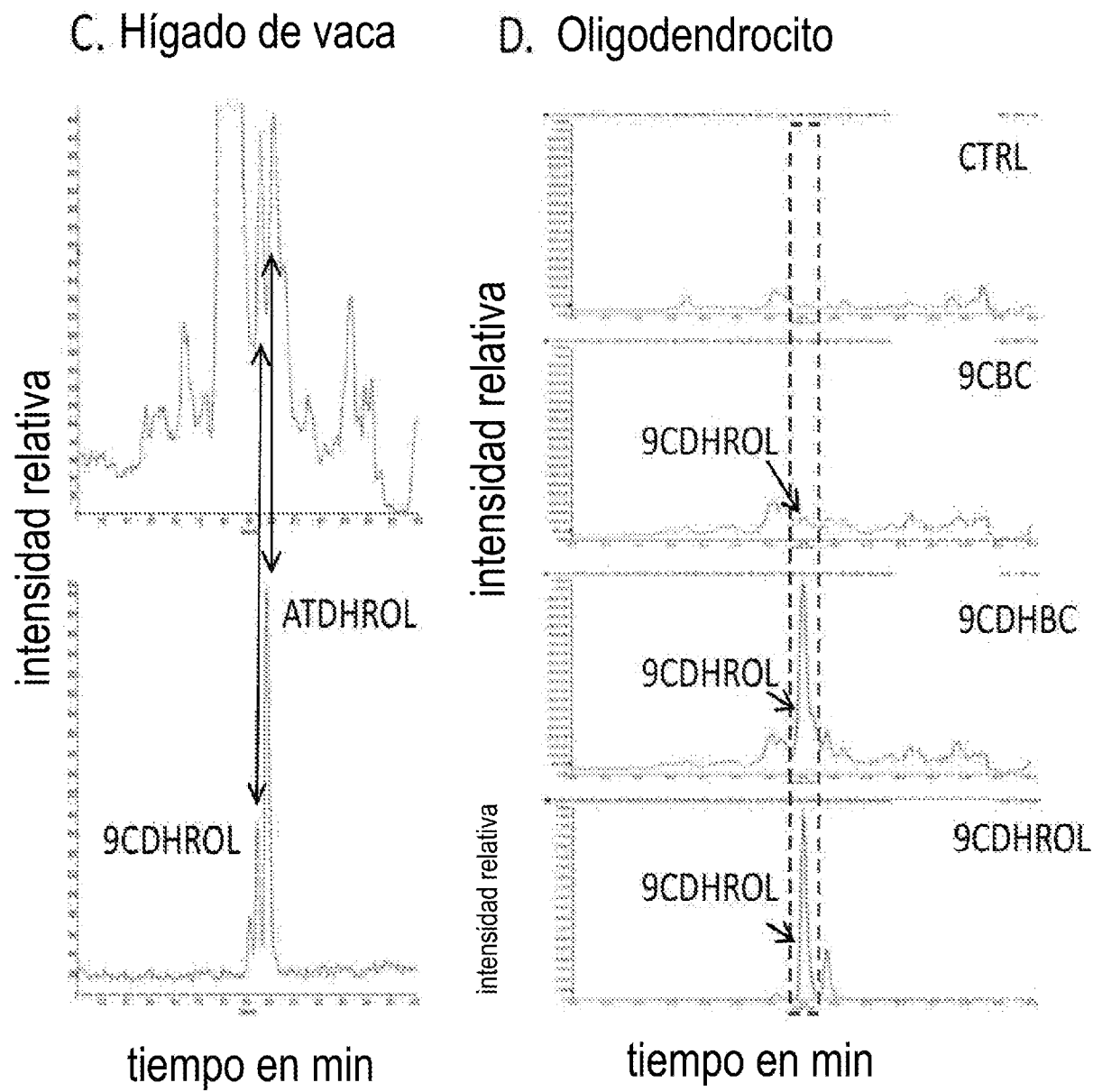


FIGURA 14

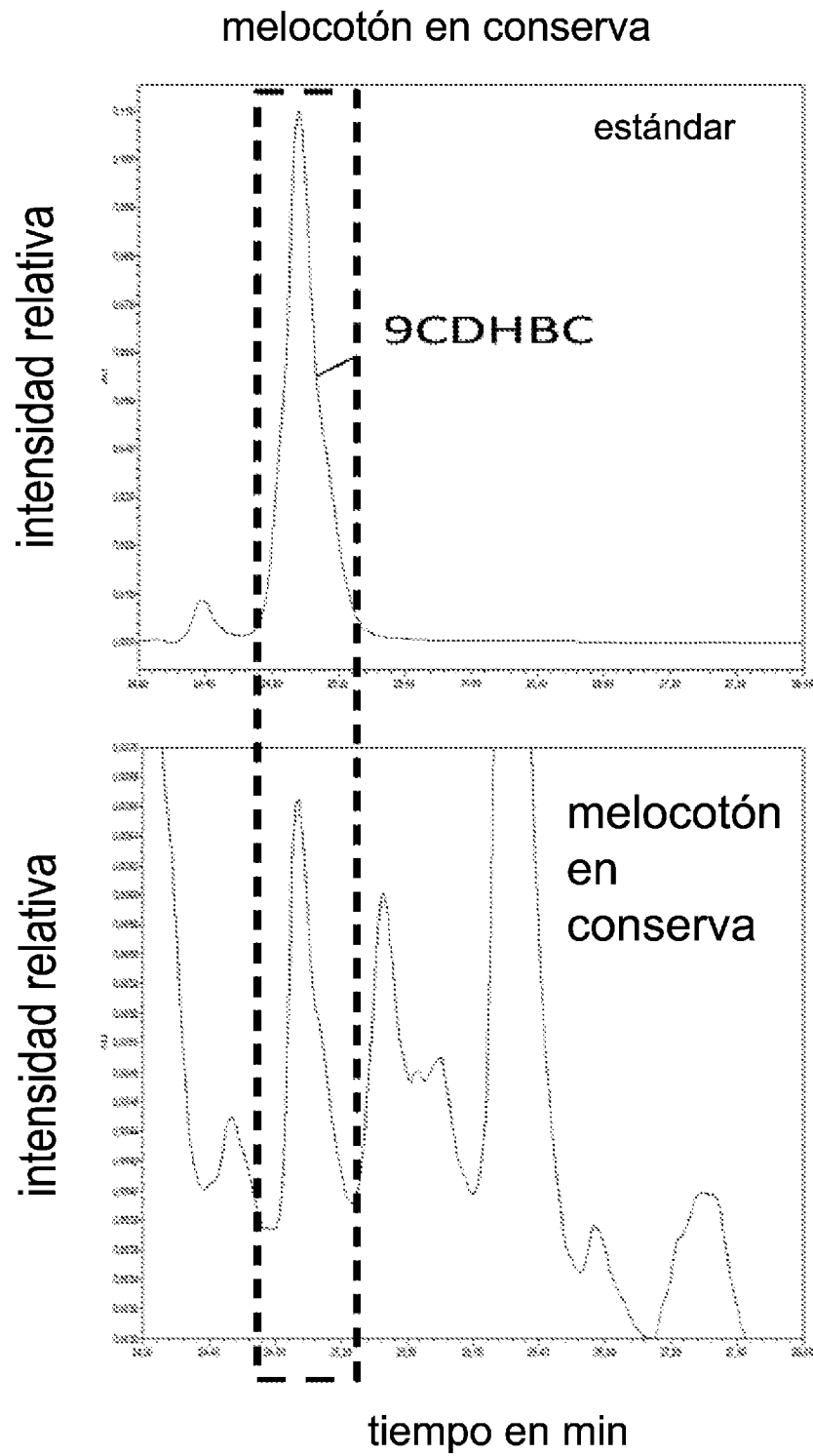


FIGURA 15

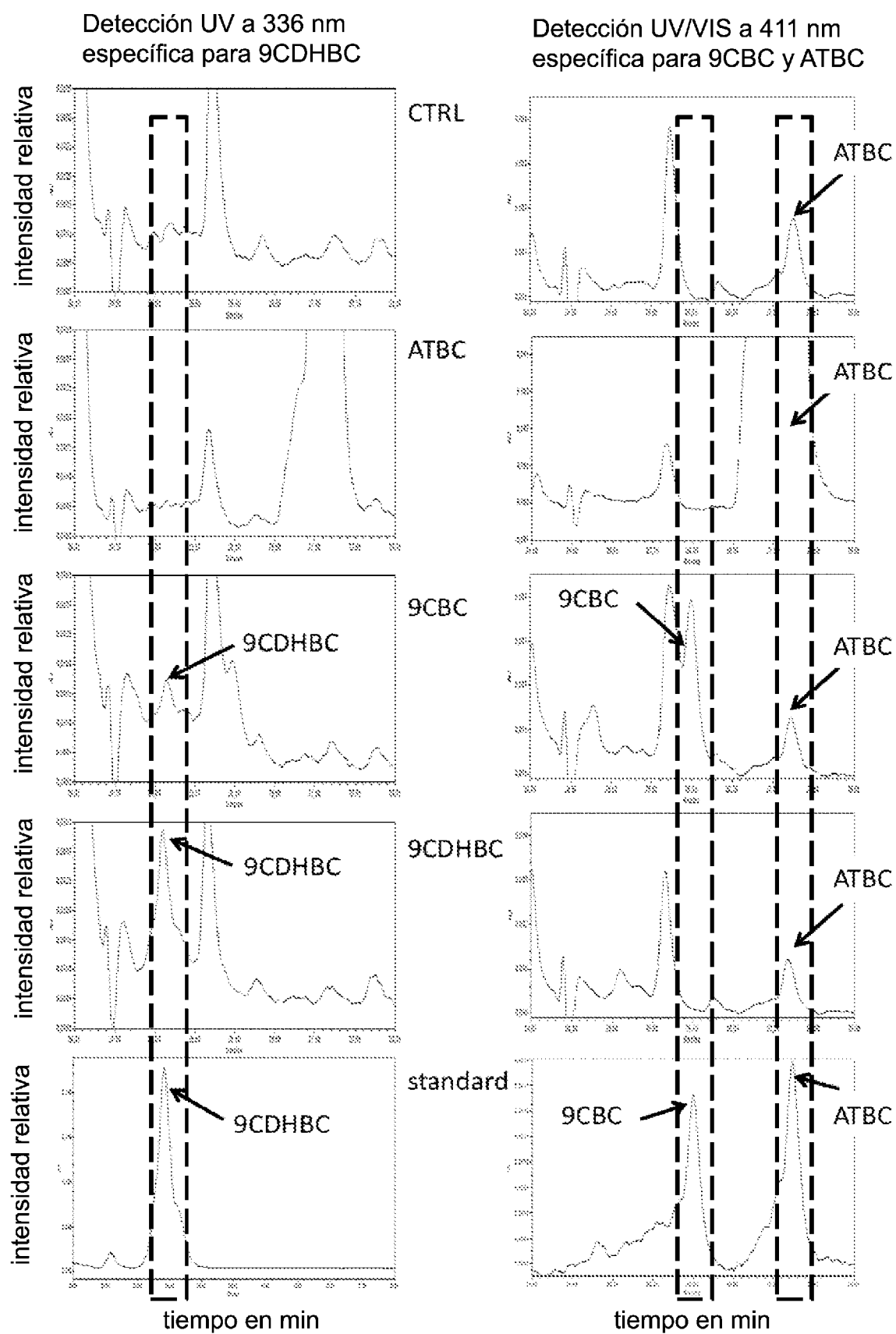


FIGURA 16

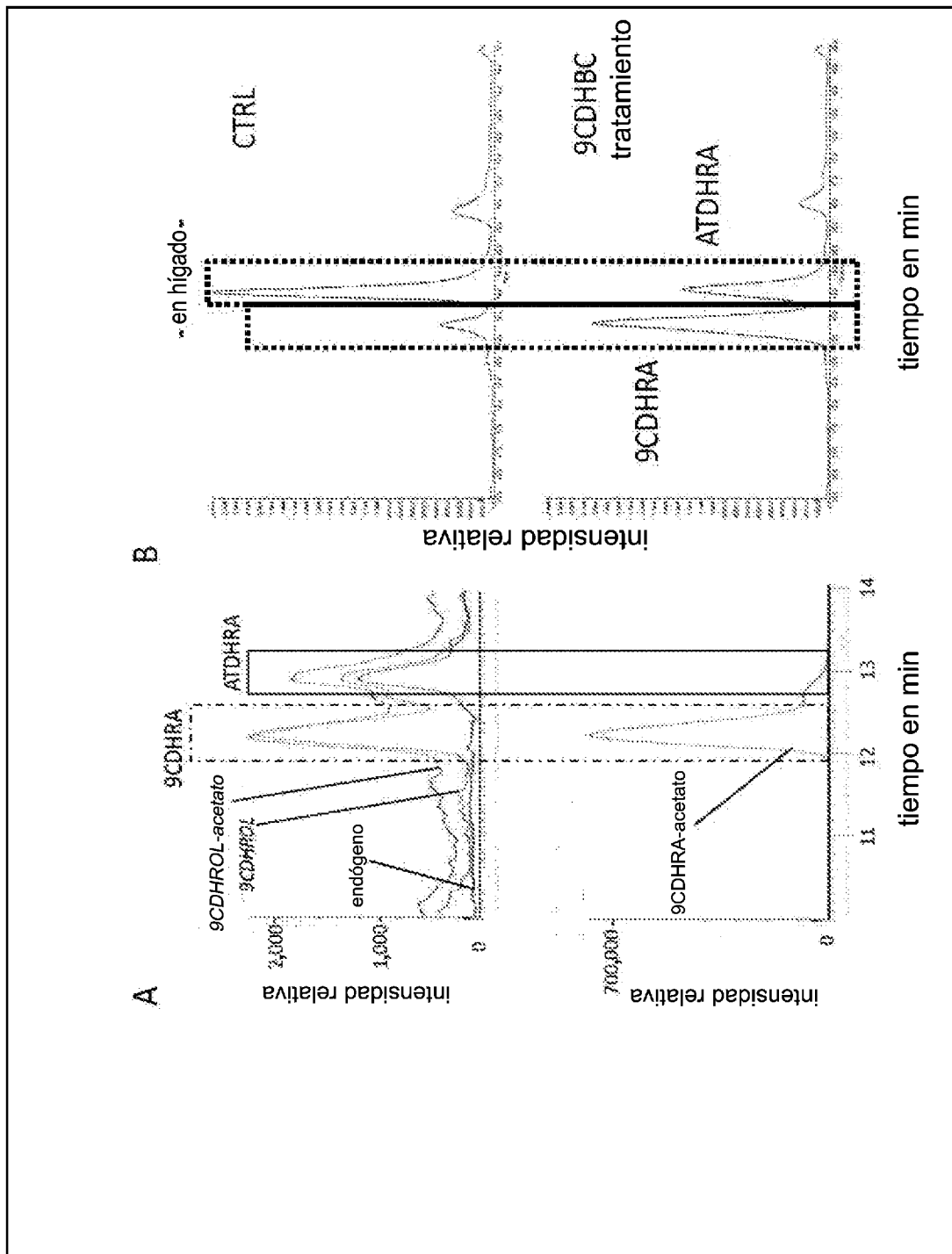


FIGURA 17

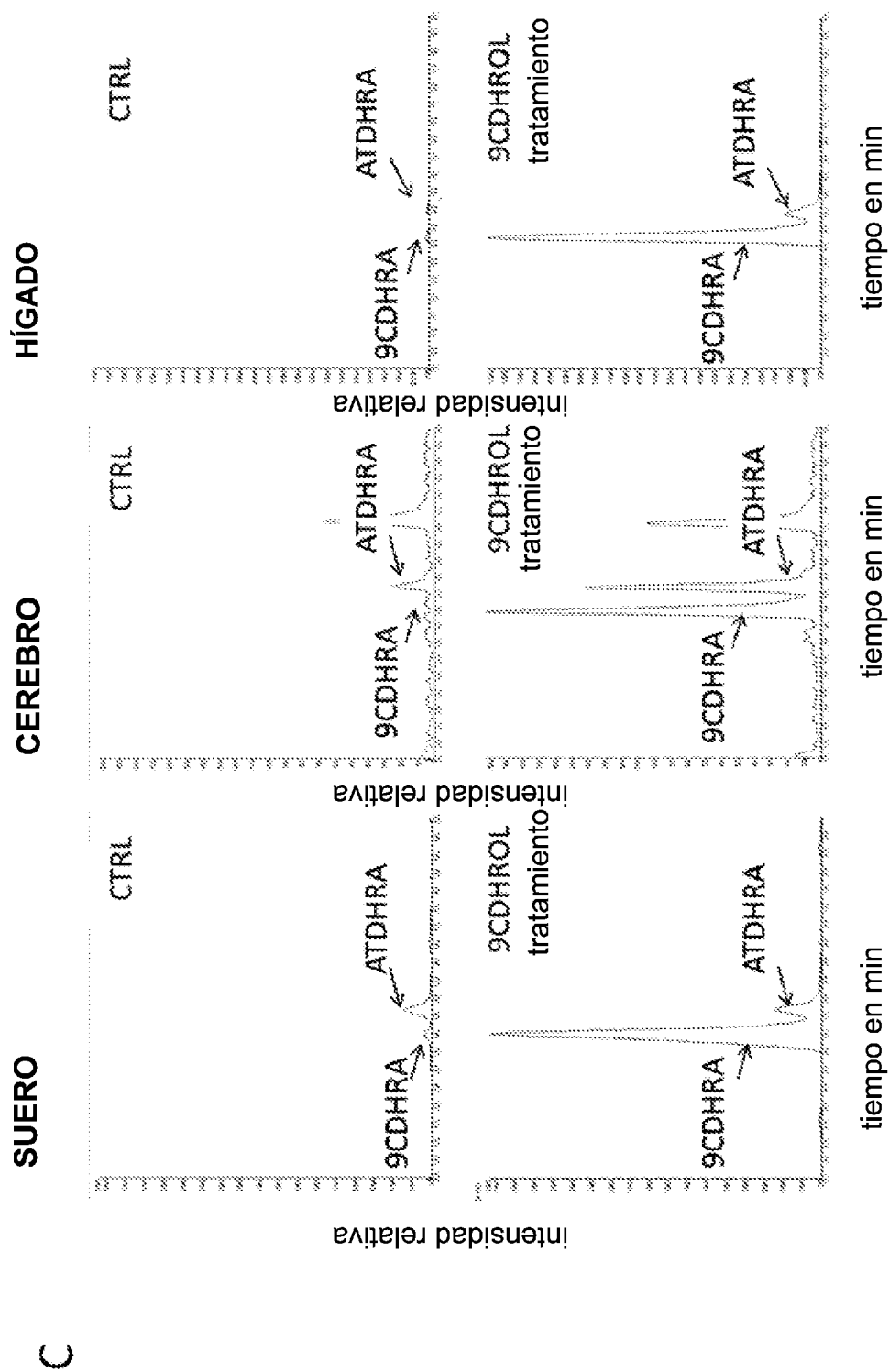


FIGURA 17

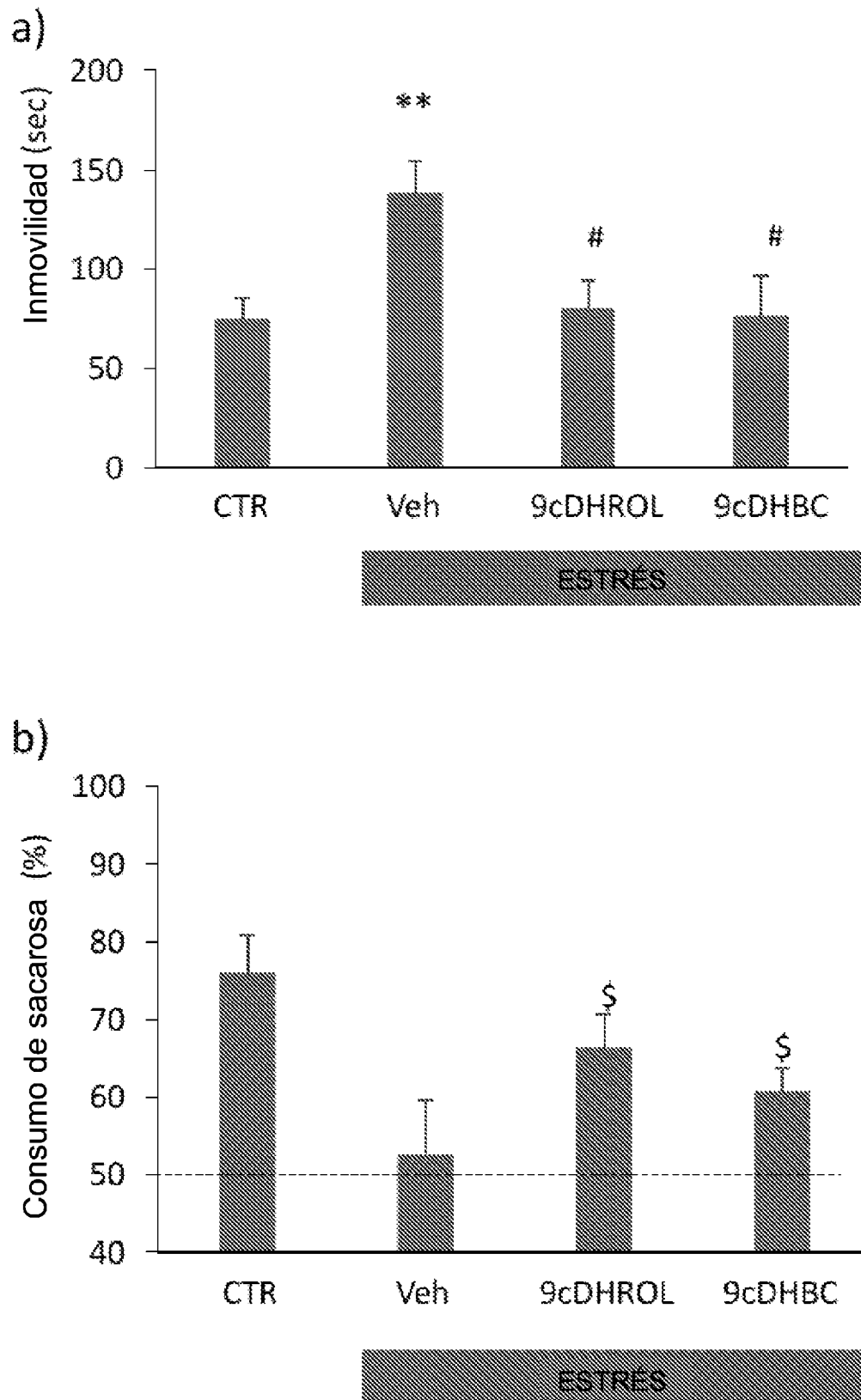


FIGURA 18