



Facultad de Ciencias  
Departamento de Orgánica



Instituto de Química Médica

# **SÍNTESIS Y ESTUDIO DE NUEVOS COMPUESTOS CANNABINOIDES HIDROSOLUBLES**

**MEMORIA**

Para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas por la  
Universidad Autónoma de Madrid

**LAURA MORENO CAPELLÁN**

Madrid 2012



A mi familia



El trabajo que se recoge en esta memoria ha sido realizado en el Instituto de Química Médica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección de la Dra. Nadine Jagerovic y la Prof. Pilar Goya Laza, a quienes quiero expresar mi más sincero agradecimiento por su apoyo y su acogida en su laboratorio para así cumplir mi deseo de realizar la tesis doctoral.

Agradezco sinceramente a la Prof. Ana María Martín Castro del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid por haber aceptado ser la tutora de esta Tesis Doctoral ya que era mi deseo porque ha sido alguien importante para mí no sólo por ser profesora de la carrera sino porque me abrió las puertas al mundo de la investigación permitiéndome realizar el DEA bajo su dirección.

Doy también las gracias a todas las personas que han colaborado con nuestro grupo de investigación en la realización de la evaluación farmacológica que se recoge en esta memoria. A la Prof. María Isabel Martín y su grupo de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Rey Juan Carlos de Alcorcón, que ha llevado a cabo los ensayos *in vitro* en conducto deferente de ratón y la tetrada cannabinoide *in vivo*, especialmente a Rocío Girón y Eva Sánchez. Dar las gracias al grupo del Profesor Javier Fernández-Ruiz del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid por los ensayos de afinidad realizados, especialmente a María Gómez Cañas por su apoyo y enseñanza en el tiempo en el que estuve colaborando en la realización de algunos ensayos de afinidad. Y al Dr. Koldo Callado, profesor del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad del País Vasco por la realización de los ensayos de microdiálisis cerebral en animal despierto.

Quiero agradecer al grupo del Dr. Tomás Herraiz por su colaboración en esta tesis con la realización de los ensayos metabólicos de biotransformación, en especial a Hugo Guillén.

Me gustaría dar las gracias al personal especializado del Centro de Química Orgánica "Manuel Lora-Tamayo" del CSIC (RMN, Microanálisis, Masas, HPLC, etc.), sin cuya ayuda y trabajo no podría haber llevado a cabo esta tesis; en especial a Guadalupe Romero y Felipe Gordillo (HPLC), Pablo (RMN) y la Dra. Maria Luisa Jimeno por su enseñanza y realización de los experimentos DOSY.

También quisiera agradecer la ayuda aportada por el servicio de masas del Instituto Rocasolano del CSIC con la realización de los experimentos MALDI, especialmente a Plácido Galindo por su paciencia.

No quisiera dejar de agradecer al Prof. Kevin M. Smith y a la Prof. Graça Vicente del Departamento de Química de Louisiana State University por haberme permitido estar con ellos en su grupo de investigación durante tres meses apoyándome y cuidándome desde el primer día. A mi compañero de laboratorio durante ese tiempo, Moses, por ayudarme y por ser cómplice de uno de los mejores cumpleaños de mi vida. A Alecia McCall por abrirme las puertas de su casa y compartir conmigo sus investigaciones. Pero muy especialmente a Fabi por hacerme pasar tan buenos ratos en tu compañía. Gracias a todos, de verdad, porque aunque en su día fue un momento difícil, con el paso del tiempo siento que ha sido una experiencia que me ha hecho darme cuenta de lo que quiero en la vida.

También quisiera dar las gracias a todos mis compañeros del Instituto de Química Médica del CSIC en especial a los del laboratorio 351: Ruth y Nieves pero, por supuesto, muy especialmente a mis compañeros del laboratorio 311: Cristina, Laura, Jose, Paula y Andrea por vuestra ayuda, charla, risas y buenos momentos compartidos delante de las vitrinas.

Y qué sería de los descansos y la hora de la comida sin vosotros, me gustaría daros las gracias a todos los compañeros que habéis estado conmigo en esos momentos pero, en especial, a Guada, Pili, Wiki, Magda y Fer. Muchísimas gracias de todo corazón por los buenos y no tan buenos momentos que hemos pasado juntos tanto dentro como fuera del IQM, y especialmente a mi niña, Bea, me llevo una buena amiga aunque estés lejos.

A Raquel porque, aunque en la distancia, me apoyas, me animas y me escuchas. Gracias amiga.

A Celia, Orlando, Celina, Enrique, Javier, Manolo, la abuela María y a todos los miembros de mi nueva familia, gracias por abrirme la puerta de vuestros hogares y aceptarme y preocuparos por mí. Y en especial a la que está en camino porque la espera de tu llegada me llena de ilusión.

Por supuesto, quiero agradecer enormemente a mi familia. A mis padres porque, sin ser de este mundillo científico, han tenido paciencia, comprensión y me han sabido entender y apoyar en todo momento. Pero también quiero aprovechar estas líneas para agradecerles todo lo que me han dado en la vida, nunca os estaré lo bastante agradecida por ello. Y a mi hermanita, Ani, por nuestras charlas, tu apoyo y tu infinita paciencia.

Finalmente, a lo mejor que me llevo de estos cuatro años en el IQM, porque sin ti ya no sé qué hacer, por tu apoyo e infinita paciencia, por saber aguantarme incluso cuando yo no me aguantaba, por todo lo bueno y no tan bueno que hemos vivido en estos años, infinitas gracias Pedro. Gracias por hacerme tan feliz.

*Laura*

"Sigue a tu corazón. El tiempo es limitado. No lo desperdicies"  
Steve Jobs (1955-2011)





### **NOTA SOBRE PUNTUACIÓN**

Con el fin de simplificar la publicación de los resultados en revistas internacionales que requieren uso de puntuación en la numeración inglesa, se ha utilizado este sistema en la parte experimental de la Memoria de esta Tesis Doctoral. Así, las cifras decimales se indican con puntos en lugar de con comas, aceptado por la Real Academia Española de la Lengua en el Diccionario Panhispánico de Dudas desde su primera edición en octubre de 2005 (<http://buscon.rae.es/dpdI>).



## ABREVIATURAS

$^{13}\text{C}$ RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
$^1\text{H}$ RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
2-AG	2-Araquidonilglicerol
ACEA	<i>N</i> -Araquidonil-2-cloroetilamida
AcOEt	Acetato de etilo
AEA	Araquidonilciclopropilamina
AMPc	Adenosin 3'-5'-monofosfato cíclico
Anal.	Microanálisis elemental
Ar	Arilo
c	Cuartete
CB <sub>1</sub>	Receptor cannabinoide tipo 1
CB <sub>2</sub>	Receptor cannabinoide tipo 2
CBD	Cannabidiol
CBG	Cannabigerol
CBrs	Receptores cannabinoides
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
Da	Dalton
d	Doblete
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectroscopía de masas
eq	Equivalentes
ES+	Electrospray positivo
Et <sub>2</sub> O	Dietiléter
EtOH	Etanol
FAAH	Hidrolasa de ácidos grasos
GABA	Ácido- $\gamma$ -aminobutírico
GTP	Guanosintrifosfato

h.	Horas
Hex	Hexano
HPLC/MS	Cromatografía de alta resolución acoplada a un detector de masas
Hz	Herztios
KDa	Kilodalton
Kg	Kilogramo
L	Litro
m	Multiplete
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz
m.o.	Irradiación por microondas
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
min.	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimol
mPEG	Metoxipolietilenglicol
NADA	<i>N</i> -araquidonildopamina
nM	Nanomolar
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
p	Pentuplete
P.f.	Punto de fusión
PEG	Polietilenglicol
ppm	Partes por millón
r.p.m.	Revoluciones por minuto
Rto.	Rendimiento
s	Singlete
sa	Singlete ancho
SAR	Relación estructura-actividad

SNC	Sistema nervioso central
$\Delta^8$ -THC	$\Delta^8$ -Tetrahidrocannabinol
$\Delta^9$ -THC	$\Delta^9$ -Tetrahidrocannabinol
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
THF	Tetrahidrofurano
TRPV	Receptor vanilloide
$\mu$ L	Microlitro



El sistema endocannabinoide endógeno (SEC) es una diana terapéutica involucrada en diversos procesos patológicos y fisiológicos, por lo que la síntesis de nuevos agonistas y antagonistas cannabinoides es un tema de interés en química médica.

A pesar de que ya se han sintetizado y evaluado un considerable número de ligandos cannabinoides, uno de los problemas limitantes es su gran lipofilia y escasa solubilidad en agua.

En este contexto se enmarca la presente tesis doctoral cuyo objetivo principal es el diseño, síntesis y evaluación de nuevos compuestos con actividad cannabinode, así como las aproximaciones llevadas a cabo para obtener cannabinoides hidrosolubles.





## ÍNDICE

<b><u>CAPÍTULO 1. CANNABINOIDES</u></b> .....	17
<b>1.- Cannabinoides. Introducción</b> .....	19
1.1. - Sistema endocannabinoide.....	20
1.1.1.- <i>Receptores cannabinoides</i> .....	20
1.1.2.- <i>Ligandos cannabinoides endógenos</i> .....	24
1.1.3.- <i>Sistema regulador de los endocannabinoides</i> .....	26
1.2.- Ligandos de los receptores cannabinoides.....	31
1.2.1.- <i>Fitocannabinoides y análogos</i> .....	32
1.2.2.- <i>Eicosanoides</i> .....	34
1.2.3.- <i>Cannabinoides heterocíclicos y otras estructuras</i> .....	35
1.3.- Aplicaciones terapéuticas de los cannabinoides.....	39
1.3.1.- <i>Trastornos del apetito y antiemesis</i> .....	40
1.3.2.- <i>Analgesia</i> .....	42
1.3.3.- <i>Enfermedades neurodegenerativas y neuroprotección</i> .....	45
1.3.4.- <i>Cáncer</i> .....	46
1.3.5.- <i>Drogo dependencia</i> .....	48
1.3.6.- <i>Otras aplicaciones terapéuticas</i> .....	49
1.4.- Caracterización farmacológica de ligandos cannabinoides.....	49
<b>2.- Antecedentes y objetivos</b> .....	53
<b>3.- N-aminoalquilpirazolcarboxamidas</b> .....	55
3.1.- <i>N-aminoalquilpirazolcarboxamidas carbamatos de terc-butilo</i> .....	55
3.1.1.- <i>Síntesis N-aminoalquilpirazolcarboxamidas carbamatos de terc-butilo</i> .....	55
3.1.2.- <i>Evaluación farmacológica</i> .....	58
3.2.- <i>N-aminoalquilpirazolcarboxamidas</i> .....	63
3.1.1.- <i>Síntesis N-aminoalquilpirazolcarboxamidas</i> .....	63
3.1.2.- <i>Evaluación farmacológica</i> .....	64
<b>4.- Conclusión</b> .....	67

<b>CAPÍTULO 2. APROXIMACIONES PARA LA OBTENCIÓN DE FÁRMACOS HIDROSOLUBLES</b> .....	69
<b>1.- Aproximaciones para la obtención de fármacos solubles. Introducción</b> .....	71
1.1.- Bioconjugados poliméricos.....	71
1.2.- Polietilenglicol (PEG).....	73
1.3.- Conjugados PEG-proteína.....	74
1.4.- Conjugados PEG-fármaco.....	76
<b>2.- Antecedentes y objetivos</b> .....	80
<b>3.- Cannabinoides hidrosolubles</b> .....	81
3.1.- Conjugados PEG-aminoalquilpirazolcarboxamidas.....	82
3.1.1.- <i>Síntesis de los conjugados PEG-aminoalquilpirazolcarboxamidas</i> .....	82
3.1.2.- <i>Elucidación estructural</i> .....	84
3.1.3.- <i>Estudio de la solubilidad en agua</i> .....	87
3.1.4.- <i>Ensayos metabólicos de biotransformación</i> .....	89
3.1.5.- <i>Evaluación farmacológica</i> .....	92
3.2.- Conjugado PEG-cannabinoide bivalente.....	103
3.2.1.- <i>Síntesis del conjugado PEG-cannabinoide bivalente</i> .....	104
3.2.2.- <i>Evaluación farmacológica</i> .....	105
3.3.- Conjugados $\Delta^9$ -THC-mPEG.....	107
3.3.1.- <i>Síntesis de los conjugados</i> .....	108
3.3.1.1.- Conjugado $\Delta^9$ -THC-mPEG vía enlace carbonato.....	108
3.3.1.2.- Conjugado $\Delta^9$ -THC-mPEG vía enlace éter.....	111
3.3.2.- <i>Evaluación farmacológica</i> .....	113
3.4.- Conjugados cromenopirazol-mPEG.....	114
3.4.1.- <i>Síntesis del conjugado</i> .....	115
3.4.2.- <i>Evaluación farmacológica</i> .....	115

3.5.- Conjugados LH21-PEG.....	116
3.5.1.- Síntesis de los conjugados LH21-PEG.....	117
<b>4.- Paracetamol hidrosoluble.....</b>	<b>120</b>
4.1.- Introducción sobre el paracetamol.....	120
4.2.- Síntesis de los compuestos derivados del paracetamol. <i>N</i> -(4-(metoxipolietilenglicol)fenil)-acetamida.....	122
4.3.- Evaluación farmacológica.....	128
<b>5.- Conclusión.....</b>	<b>130</b>
<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>133</b>
<b>1. Parte experimental química.....</b>	<b>135</b>
1.1. Materiales y métodos generales.....	135
1.2. Procedimientos experimentales.....	137
1.2.1. Síntesis de los compuestos derivados $\Delta^9$ -THC-PEG y cromenopirazol-PEG.....	137
1.2.2. Síntesis de los productos intermedios.....	140
1.2.2.2. <i>terc</i> -Butil aminoalquil carbamatos (7a-m). Procedimiento general.....	141
1.2.3. Síntesis de <i>n</i> -(5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil- 1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamido)alquil carbamatos de <i>terc</i> -butilo. Procedimiento general.....	147
1.2.4. Síntesis de 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil- 1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida.....	157
1.2.5. Síntesis de <i>N</i> -( <i>n</i> -aminoalquil)-5-(4-clorofenil)-1- (2,4-diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida. Procedimiento general.....	158
1.2.6. Síntesis de 2,5-dioxopirrolidin-1-il carbonato de Metoxipolietilenglicol.....	167

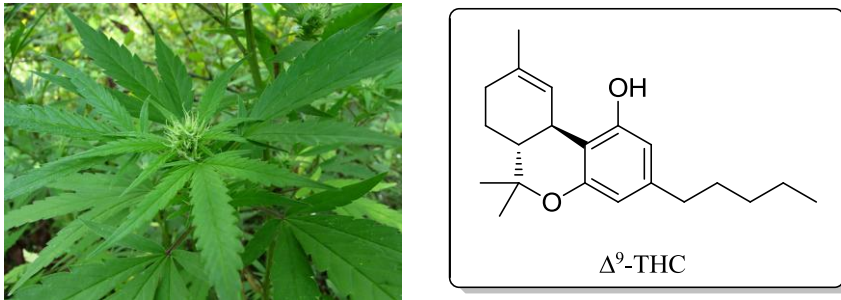
1.2.7. Síntesis de <i>n</i> -(5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamido)alquil carbamatos de metoxipolietilenglicol. Procedimiento general.....	167
1.2.8 Síntesis de derivados SR-PEG <sub>6</sub> sin espaciador.....	176
1.2.9. Síntesis de los compuestos derivados del LH21.....	178
1.2.10. Síntesis de los compuestos derivados del paracetamol. <i>N</i> -(4-(metoxipolietilenglicol)fenil)acetamida.....	178
1.2.11. Ensayos metabólicos de biotransformación.....	179
1.2.11.1 Fracciones y sistemas enzimáticos probados.....	179
1.2.11.2 Procedimiento analítico.....	179
1.2.11.3 Ensayos de biotransformación metabólica de <b>12e</b> .....	180
1.2.11.4 Procedimiento estándar del ensayo.....	180
<b>2. Parte experimental farmacología</b> .....	181
2.1. Ensayos de desplazamiento de radioligando.....	181
2.2. Ensayos <i>in vitro</i> en tejido deferente de ratón aislado.....	182
2.3. Ensayos de microdiálisis cerebral en animal despierto.....	183
2.3.1. Animales de Experimentación.....	183
2.3.2. Administración aguda de fármacos.....	184
2.3.3. Preparación de las sondas de microdiálisis.....	184
2.3.4. Cirugía estereotáxica.....	185
2.3.5. Colección de muestras de dializado.....	188
2.3.6. Análisis cromatográfico de las muestras.....	191
<b>ANEXO</b> .....	195

# CAPÍTULO 1. Cannabinoides



## 1.- CANNABINOIDES. INTRODUCCIÓN:

Los cannabinoides constituyen un conjunto de compuestos presentes en la resina de las hojas y brotes florecidos de la planta *Cannabis sativa*. El uso con fines terapéuticos de los preparados obtenidos a partir de la planta se remonta a más de 4000 años en China e India. Posteriormente su cultivo llegó desde Oriente a la civilización romana, que lo extendió por Europa. Durante el siglo XIX, se difunden las aplicaciones médicas y lúdicas del cannabis por Europa y Estados Unidos pero durante el siglo XX el cannabis fue prohibido ya que se consideró una droga de abuso debido a sus efectos psicoactivos. Dado que era considerada una sustancia ilegal, la investigación científica del cannabis fue ignorada en la primera mitad del siglo XX. Sin embargo, en 1964 se aisló y caracterizó el principal compuesto psicoactivo de la planta<sup>1</sup>, el (-)- $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC, fig. 1) lo que abrió la puerta a la investigación de los compuestos químicos presentes en el cannabis, su mecanismo de acción, y el desarrollo de cannabinoides sintéticos, y al estudio del sistema endocannabinoide endógeno.



**Figura 1.** *Cannabis sativa* y su principio activo, el  $\Delta^9$ -THC.

<sup>1</sup> Y. Gaoni y R. Mechoulam "Isolation Structure + Partial Synthesis of Active Constituent of Hashish" *Journal of the American Chemical Society* **1964**, 86, 1646.

### 1.1. - Sistema endocannabinoide:

El sistema endocannabinoide o sistema cannabinoide endógeno (SCE) es un sistema regulador capaz de modular gran variedad de efectos fisiológicos, formado por receptores cannabinoides, ligandos endógenos y proteínas implicadas en su biosíntesis, transporte y degradación.

#### 1.1.1. - RECEPTORES CANNABINOIDES:

El carácter altamente lipófilo de los cannabinoides naturales dificultó durante muchos años la identificación de receptores específicos para este tipo de sustancias. De hecho, se pensó que estos compuestos realizaban sus efectos mediante interacciones con los componentes de la membrana celular. Sin embargo, en 1984, Howlett<sup>2</sup> demostró que los cannabinoides reducían el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) en células de neuroblastoma y que esta actividad era mediada a través de receptores acoplados a proteínas G lo que demostró la existencia de los receptores cannabinoides.<sup>3</sup>

Hasta el momento se han identificado dos receptores cannabinoides: el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub><sup>4</sup> y el receptor cannabinoide CB<sub>2</sub><sup>5</sup>. Pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), llamados así porque interactúan con el nucleótido guanosintrifosfato (GTP) y que actúan como transductores de la

---

<sup>2</sup> A. C. Howlett "Inhibition of Neuroblastoma Adenylate Cyclase by Cannabinoid and Nantradol Compounds" *Life Sci* **1984**, 35, 1803.

<sup>3</sup> A. C. Howlett y R. M. Fleming "Cannabinoid Inhibition of Adenylate Cyclase. Pharmacology of the Response in Neuroblastoma Cell Membranes" *Mol Pharmacol* **1984**, 26, 532.

<sup>4</sup> L. A. Matsuda, S. J. Lolait, M. J. Brownstein, A. C. Young y T. I. Bonner "Structure of a Cannabinoid Receptor and Functional Expression of the Cloned Cdna" *Nature* **1990**, 346, 561.

<sup>5</sup> S. Munro, K. L. Thomas y M. Abushaar "Molecular Characterization of a Peripheral Receptor for Cannabinoids" *Nature* **1993**, 365, 61.



señal extracelular al interior de la célula a través de la membrana celular activando las proteínas G<sup>6</sup>.

Están formados por siete hélices  $\alpha$  que atraviesan la membrana plasmática, estando el extremo C-terminal orientado intracelularmente, y el N-terminal extracelularmente. El receptor CB<sub>2</sub> tiene un 44 % de homología con el CB<sub>1</sub> en total y un 68% en las regiones transmembrana. Como indica el nombre de la familia a la que pertenecen, están acoplados a las proteínas G<sub>i/o</sub>, formadas por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La interacción de un ligando con uno de estos receptores produce la activación de estas proteínas, que a su vez actúan sobre diferentes sistemas mensajeros: inhiben el sistema de la adenilato ciclasa (AC), lo que supone un descenso de los niveles de AMP cíclico (AMPc) intracelular, ya que no degrada el ATP; se activa la ruta de las quinasas activadas por mitógeno (MAPK)<sup>7</sup>, y la de las fosfolipasas (PL) A, C y D<sup>8</sup>. En el caso del receptor CB<sub>1</sub>, se produce también la activación de canales de potasio (K<sup>+</sup>)<sup>9</sup>, y la inactivación de canales de calcio (Ca<sup>2+</sup>) tipo N<sup>10</sup> y tipo Q<sup>11</sup>. El receptor CB<sub>2</sub> no tiene influencia

---

<sup>6</sup> A. C. Howlett "The Cannabinoid Receptors" *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2002**, 68-69, 619.

<sup>7</sup> M. Bouaboula, C. Poinotchazel, B. Bourrie, X. Canat, B. Calandra, M. Rinaldicarmona, G. Lefur y P. Casellas "Activation of Mitogen-Activated Protein-Kinases by Stimulation of the Central Cannabinoid Receptor Cb1" *Biochemical Journal* **1995**, 312, 637.

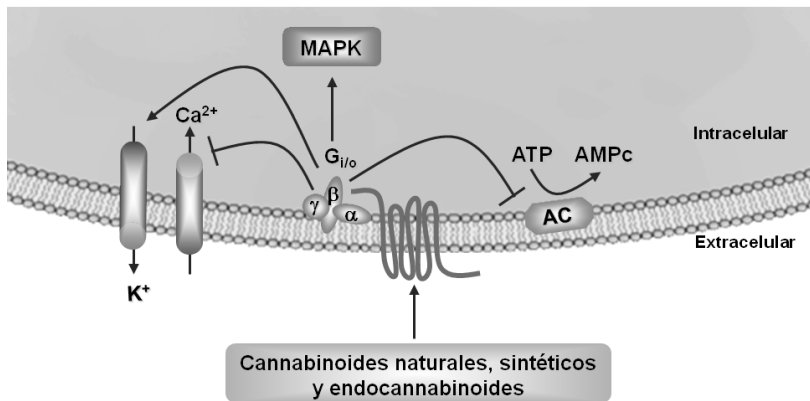
<sup>8</sup> M. Guzman, C. Sanchez y I. Galve-Roperh "Cannabinoids and Cell Fate" *Pharmacology & Therapeutics* **2002**, 95, 175.

<sup>9</sup> S. A. Deadwyler, R. E. Hampson, J. Mu, A. Whyte y S. Childers "Cannabinoids Modulate Voltage-Sensitive Potassium a-Current in Hippocampal-Neurons Via a Camp-Dependent Process" *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1995**, 273, 734.

<sup>10</sup> K. Mackie y B. Hille "Cannabinoids Inhibit N-Type Calcium Channels in Neuroblastoma Glioma-Cells" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, 89, 3825.

<sup>11</sup> K. Mackie, Y. Lai, R. Westenbroek y R. Mitchell "Cannabinoids Activate an Inwardly Rectifying Potassium Conductance and Inhibit Q-Type Calcium Currents in Att20 Cells Transfected with Rat-Brain Cannabinoid Receptor" *Journal of Neuroscience* **1995**, 15, 6552.

sobre los canales iónicos<sup>12</sup>. En la figura 2 se muestra una representación esquemática de los receptores y los sistemas sobre los que actúan.



**Figura 2.** Receptores cannabinoides.

Durante varios años se consideró al receptor CB<sub>1</sub> un receptor del sistema nervioso central debido a su amplia distribución en el cerebro. Sin embargo, se ha podido encontrar en un gran número de tejidos periféricos como el cardiovascular<sup>13</sup> así como en el tracto gastrointestinal<sup>14</sup>. La función que desempeña se relaciona con su localización. Los receptores CB<sub>1</sub> localizados en las terminaciones de los nervios centrales son capaces de inhibir la liberación de otros neurotransmisores pudiendo, por ejemplo, jugar un papel neuroprotector del sistema nervioso central. La modulación de los receptores CB<sub>1</sub> en el núcleo accumbens actúa sobre el sistema de neurotransmisión dopaminérgico mesocorticolímbico implicado en

<sup>12</sup> C. C. Felder, K. E. Joyce, E. M. Briley, J. Mansouri, K. Mackie, O. Blond, Y. Lai, A. L. Ma y R. L. Mitchell "Comparison of the Pharmacology and Signal-Transduction of the Human Cannabinoid Cb1 and Cb2 Receptors" *Molecular Pharmacology* **1995**, 48, 443.

<sup>13</sup> B. Szabo, U. Nordheim y N. Niederhoffer "Effects of Cannabinoids on Sympathetic and Parasympathetic Neuroeffector Transmission in the Rabbit Heart" *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2001**, 297, 819. J. A. Wagner, Z. Jarai, S. Batkai y G. Kunos "Hemodynamic Effects of Cannabinoids: Coronary and Cerebral Vasodilation Mediated by Cannabinoid Cb1 Receptors" *European Journal of Pharmacology* **2001**, 423, 203.

<sup>14</sup> A. Kulkarni-Narla y D. R. Brown "Localization of Cb1-Cannabinoid Receptor Immunoreactivity in the Porcine Enteric Nervous System" *Cell and Tissue Research* **2000**, 302, 73. R. G. Pertwee "Cannabinoids and the Gastrointestinal Tract" *Gut* **2001**, 48, 859.

el desarrollo de trastornos adictivos como la motivación para la ingesta de comida, el tabaco o las drogas de abuso<sup>15</sup>. Su localización en ganglios basales, cerebelo, neocortex e hipocampo justifica su participación en los fenómenos de aprendizaje y memoria<sup>16</sup>. Respecto al papel que juega el receptor CB<sub>1</sub> en la modulación del dolor, se asocia a su localización en la médula espinal y la sustancia gris. El receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> se encuentra también implicado en el metabolismo de lípidos y glucosa<sup>17</sup> debido a su presencia en hígado, músculo, adipocitos, y células endocrinas del páncreas. Igualmente, su presencia en ovarios y testículos le permite controlar las funciones reproductivas.

Los primeros datos de localización del receptor cannabinoide CB<sub>2</sub> indicaron su presencia en células del sistema inmune, como los leucocitos, el bazo y las amígdalas clasificándolo como receptor periférico. Sin embargo, más recientemente se ha detectado el receptor CB<sub>2</sub> en el sistema nervioso central, tanto en células microgliales<sup>18</sup> como en neuronas<sup>19</sup>. En el sistema inmunitario el receptor CB<sub>2</sub> modula la liberación de citoquinas involucradas en la inflamación y la regulación del sistema inmunológico. Debido a su localización en microglia y

---

<sup>15</sup> R. Maldonado, O. Valverde y F. Berrendero "Involvement of the Endocannabinoid System in Drug Addiction" *Trends in Neurosciences* **2006**, 29, 225.

<sup>16</sup> M. Herkenham, A. B. Lynn, M. R. Johnson, L. S. Melvin, B. R. Decosta y K. C. Rice "Characterization and Localization of Cannabinoid Receptors in Rat-Brain - a Quantitative In vitro Autoradiographic Study" *Journal of Neuroscience* **1991**, 11, 563.

<sup>17</sup> M. P. Viveros, F. R. de Fonseca, F. J. Bermudez-Silva y J. M. McPartland "Critical Role of the Endocannabinoid System in the Regulation of Food Intake and Energy Metabolism, with Phylogenetic, Developmental, and Pathophysiological Implications" *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **2008**, 8, 220. C. Silvestri, A. Ligresti y V. Di Marzo "Peripheral Effects of the Endocannabinoid System in Energy Homeostasis: Adipose Tissue, Liver and Skeletal Muscle" *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* **2011**, 12, 153.

<sup>18</sup> J. C. Ashton, D. Friberg, C. L. Darlington y P. F. Smith "Expression of the Cannabinoid Cb2 Receptor in the Rat Cerebellum: An Immunohistochemical Study" *Neuroscience Letters* **2006**, 396, 113.

<sup>19</sup> J. P. Gong, E. S. Onaivi, H. Ishiguro, Q. R. Liu, P. A. Tagliaferro, A. Brusco y G. R. Uhl "Cannabinoid Cb2 Receptors: Immunohistochemical Localization in Rat Brain" *Brain Research* **2006**, 1071, 10.

en neuronas, el receptor cannabinoide CB<sub>2</sub> se encuentra implicado en el control de la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de neuronas.

### 1.1.2.- LIGANDOS CANNABINOIDES ENDÓGENOS:

La identificación de un receptor cannabinoide en el sistema nervioso central hizo pensar en la existencia de sus ligandos endógenos. Los ligandos cannabinoideos endógenos o endocannabinoideos son compuestos de naturaleza lipídica, en concreto amidas, ésteres y éteres de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. En 1992, el grupo del profesor Mechoulam aisló por primera vez la anandamida (*N*-araquidoniletanolamida, AEA)<sup>20</sup> a partir de cerebro porcino y se identificó como una amida estructuralmente relacionada con el ácido araquidónico (figura 3). Presenta afinidad por los dos tipos de receptores cannabinoideos (CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>) aunque se une preferentemente al primero<sup>21</sup>.

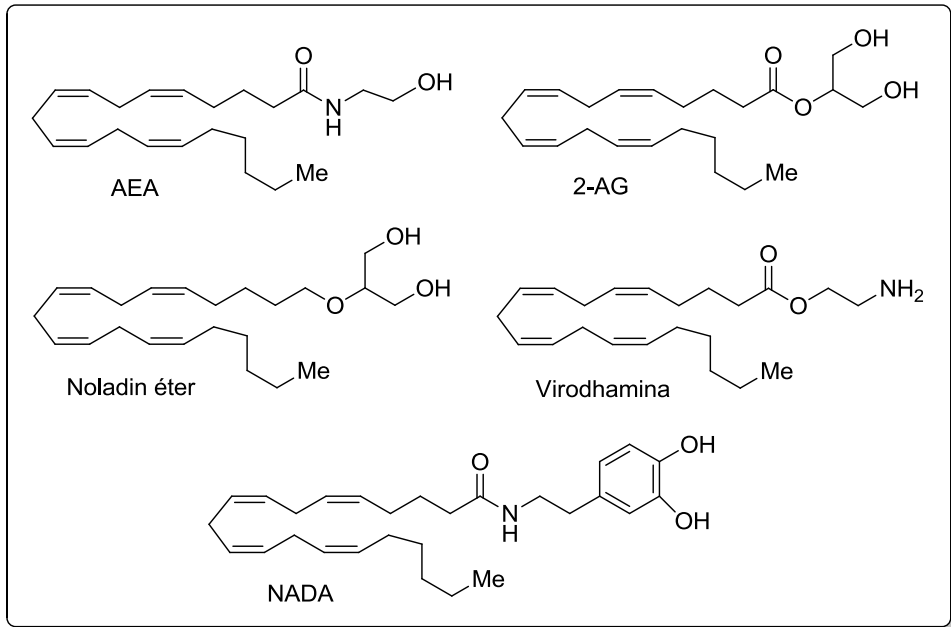
La anandamida es un agonista parcial de dichos receptores y actúa además sobre otros receptores como el receptor vanilloide (TRPV1)<sup>22</sup>. Un agonista es una sustancia que produce un efecto combinándose y estimulando al receptor, con lo que un agonista parcial es un agonista que activa al receptor pero no causa tanto efecto fisiológico como un agonista completo. Por otro lado, un antagonista es una sustancia que bloquea al receptor y por lo tanto es capaz de reducir o eliminar el efecto de un agonista.

---

<sup>20</sup> W. A. Devane, L. Hanus, A. Breuer, R. G. Pertwee, L. A. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Etinger y R. Mechoulam "Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor" *Science* **1992**, 258, 1946.

<sup>21</sup> G. A. Thakur, R. I. Duclos y A. Makriyannis "Natural Cannabinoids: Templates for Drug Discovery" *Life Sciences* **2005**, 78, 454.

<sup>22</sup> P. M. Zygmunt, J. Petersson, D. A. Andersson, H. H. Chuang, M. Sorgard, V. Di Marzo, D. Julius y E. D. Hogestatt "Vanilloid Receptors on Sensory Nerves Mediate the Vasodilator Action of Anandamide" *Nature* **1999**, 400, 452.



**Figura 3.** Ligandos cannabinoides endógenos.

Posteriormente se han descrito cuatro endocannabinoides más, todos ellos derivados del ácido araquidónico (figura 3). El primero fue el 2-araquidonilglicerol (2-AG)<sup>23</sup> aislado de intestino canino y que actúa como un agonista potente frente a los dos receptores cannabinoides (CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>) participando en la regulación de la sensación de hambre y en la de la temperatura corporal. En 2001 se aisló de cerebro porcino el 2-araquidonilglicerol éter (noladín éter)<sup>24</sup> que es un agonista selectivo CB<sub>1</sub><sup>25</sup> y que ha mostrado tener efectos sedantes, analgésicos e inhibidores de la motilidad intestinal en animales de

<sup>23</sup> R. Mechoulam, S. Benschabat, L. Hanus, M. Ligumsky, N. E. Kaminski, A. R. Schatz, A. Gopher, S. Almog, B. R. Martin, D. R. Compton, R. G. Pertwee, G. Griffin, M. Bayewitch, J. Barg y Z. Vogel "Identification of an Endogenous 2-Monoglyceride, Present in Canine Gut, That Binds to Cannabinoid Receptors" *Biochemical Pharmacology* **1995**, 50, 83.

<sup>24</sup> L. Hanus, S. Abu-Lafi, E. Fride, A. Breuer, Z. Vogel, D. E. Shalev, I. Kustanovich y R. Mechoulam "2-Arachidonyl Glyceryl Ether, an Endogenous Agonist of the Cannabinoid Cb1 Receptor" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, 98, 3662.

<sup>25</sup> R. G. Pertwee "Ligands That Target Cannabinoid Receptors in the Brain: From Thc to Anandamide and Beyond" *Addiction Biology* **2008**, 13, 147.

experimentación<sup>26</sup>. Posteriormente, en 2002 se caracterizó un nuevo endocannabinoide llamado virodhamina (*O*-araquidoniletanolamina)<sup>27</sup> que es un agonista parcial CB<sub>1</sub> con propiedades antagonistas CB<sub>1</sub> *in vivo*, que se comporta como agonista puro frente al receptor cannabinoide CB<sub>2</sub>. Por último, se ha identificado al endocannabinoide NADA (*N*-araquidonildopamina)<sup>28</sup> que, además de unirse al receptor CB<sub>1</sub>, también se une al receptor vanilloide TRPV1 y a los receptores de dopamina.

### 1.1.3.- SISTEMA REGULADOR DE LOS ENDOCANNABINOIDES:

Desde el descubrimiento de la existencia de ligandos endógenos, numerosos estudios pusieron de manifiesto su función neuromoduladora a través de su síntesis, liberación y degradación principalmente a nivel de las células nerviosas.

Los ligandos endógenos de los endocannabinoides son neurotransmisores que no se acumulan y almacenan, sino que se liberan inmediatamente después de ser producidos. Una vez que son biosintetizados, son transportados al interior de otra célula, y allí se degradan. Existe, por lo tanto, un sistema enzimático de biosíntesis, transporte e inactivación de estos ligandos endógenos<sup>29</sup>.

Biosíntesis: Hoy en día, el mecanismo de síntesis de la AEA y del 2-AG es perfectamente conocido pero todavía no se conoce con exactitud el del noladín éter, la virodhamina y la NADA.

---

<sup>26</sup> F. Fezza, T. Bisogno, A. Minassi, G. Appendino, R. Mechoulam y V. Di Marzo "Noladin Ether, a Putative Novel Endocannabinoid: Inactivation Mechanisms and a Sensitive Method for Its Quantification in Rat Tissues" *Febs Letters* **2002**, 513, 294.

<sup>27</sup> A. C. Porter, J. M. Sauer, M. D. Knierman, G. W. Becker, M. J. Berna, J. Q. Bao, G. G. Nomikos, P. Carter, F. P. Bymaster, A. B. Leese y C. C. Felder "Characterization of a Novel Endocannabinoid, Virodhamine, with Antagonist Activity at the Cb1 Receptor" *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2002**, 301, 1020.

<sup>28</sup> T. Bisogno, D. Melck, M. Y. Bobrov, N. M. Gretskaya, V. V. Bezuglov, L. De Petrocellis y V. Di Marzo "N-Acyl-Dopamines: Novel Synthetic Cb1 Cannabinoid-Receptor Ligands and Inhibitors of Anandamide Inactivation with Cannabimimetic Activity in Vitro and in Vivo" *Biochemical Journal* **2000**, 351, 817.

<sup>29</sup> L. De Petrocellis, M. G. Cascio y V. Di Marzo "The Endocannabinoid System: A General View and Latest Additions" *British Journal of Pharmacology* **2004**, 141, 765.

La síntesis de la AEA y del 2-AG se produce después de una despolarización de membrana en un proceso dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . La AEA se forma a partir de *N*-araquidonilfosfatidiletanolamina (NAPE) por hidrólisis mediada por la fosfolipasa D (PLD)<sup>30</sup>. En cambio, el 2-AG se sintetiza mediante una ruta diferente en la que el diacilglicerol (DAG) actúa como precursor y las enzimas implicadas en su biosíntesis son la fosfolipasa C (PLC) y la diacilglicerol lipasa (DAGL).

Las enzimas implicadas en la biosíntesis de endocannabinoides son unas nuevas dianas de interés terapéutico. Además, el desarrollo de inhibidores y activadores<sup>31</sup> de estas enzimas puede utilizarse como herramienta farmacológica para conocer el papel de los endocannabinoides en condiciones patológicas y fisiológicas.

Una vez que los ligandos endógenos se biosintetizan de manera estímulo-dependiente, se liberan al espacio extracelular donde pueden actuar sobre los receptores cannabinoides (CBs), vanilloides (TRPV1) o bien inactivarse.

Transporte: Los endocannabinoides conocidos son transportados al interior de la célula mediante un proceso facilitado caracterizado por ser selectivo, saturable, dependiente de la temperatura e independiente de  $\text{Na}^+$ .

El transportador de anandamida a través de la membrana (AMT) aún no ha sido clonado pero diferentes análogos estructurales de la anandamida que inhiben su transporte evidencian su existencia<sup>32</sup>. Los inhibidores del AMT pueden ofrecer,

---

<sup>30</sup> Y. Okamoto, J. Morishita, K. Tsuboi, T. Tonai y N. Ueda "Molecular Characterization of a Phospholipase D Generating Anandamide and Its Congeners" *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279, 5298.

<sup>31</sup> Q. Liu, T. Tonai y N. Ueda "Activation of *N*-Acylethanolamine-Releasing Phospholipase D by Polyamines" *Chemistry and Physics of Lipids* **2002**, 115, 77.

<sup>32</sup> M. L. Lopez-Rodriguez, A. Viso, S. Ortega-Gutierrez, C. J. Fowler, G. Tiger, E. de Lago, J. Fernandez-Ruiz y J. A. Ramos "Design, Synthesis and Biological Evaluation of New Endocannabinoid Transporter Inhibitors" *European Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, 38, 403. V. Di Marzo, A. Ligresti, E. Morera, M. Nalli y G. Ortar "The Anandamide Membrane Transporter. Structure-Activity Relationships of Anandamide and Oleoylethanolamine Analogs with Phenyl Rings in the Polar Head Group Region" *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, 12, 5161.

por lo tanto, una nueva alternativa terapéutica a una gran variedad de enfermedades como el dolor<sup>33</sup>, la esclerosis múltiple<sup>34</sup> o la corea de Huntington<sup>35</sup>.

Se han descrito varios inhibidores del AMT entre los que cabe destacar el AM404<sup>36</sup>, el VDM11<sup>37</sup>, el UCM707<sup>38</sup> y el arvanil<sup>39</sup> (Figura 4). Actualmente se está postulando que los efectos analgésicos del paracetamol se deben a que en su degradación en el metabolismo se transforma en el inhibidor de recaptación de anandamida AM404. El paracetamol primero se deacetila en el hígado, cerebro y médula espinal, proceso tras el cual se produce una *N*-acilación que da lugar al 4-aminofenol. Este compuesto se transforma en el AM404 con el ácido araquidónico por medio de la FAAH. De esta manera el paracetamol actuaría como un profármaco cannabimimético indirecto<sup>40</sup>.

<sup>33</sup> F. R. de Fonseca, M. Navarro, R. Gomez, L. Escuredo, F. Nava, J. Fu, E. Murillo-Rodriguez, A. Giuffrida, J. LoVerme, S. Gaetani, S. Kathuria, C. Gall y D. Piomelli "An Anorexic Lipid Mediator Regulated by Feeding" *Nature* **2001**, *414*, 209.

<sup>34</sup> D. Baker, G. Pryce, J. L. Croxford, P. Brown, R. G. Pertwee, A. Makriyannis, A. Khanolkar, L. Layward, F. Fezza, T. Bisogno y V. Di Marzo "Endocannabinoids Control Spasticity in a Multiple Sclerosis Model" *Faseb Journal* **2001**, *15*, 300.

<sup>35</sup> I. Lastres-Becker, H. H. Hansen, F. Berrendero, R. De Miguel, A. Perez-Rosado, J. Manzanares, J. A. Ramos y J. Fernandez-Ruiz "Alleviation of Motor Hyperactivity and Neurochemical Deficits by Endocannabinoid Uptake Inhibition in a Rat Model of Huntington's Disease" *Synapse* **2002**, *44*, 23.

<sup>36</sup> M. Beltramo, N. Stella, A. Calignano, S. Y. Lin, A. Makriyannis y D. Piomelli "Functional Role of High-Affinity Anandamide Transport, as Revealed by Selective Inhibition" *Science* **1997**, *277*, 1094.

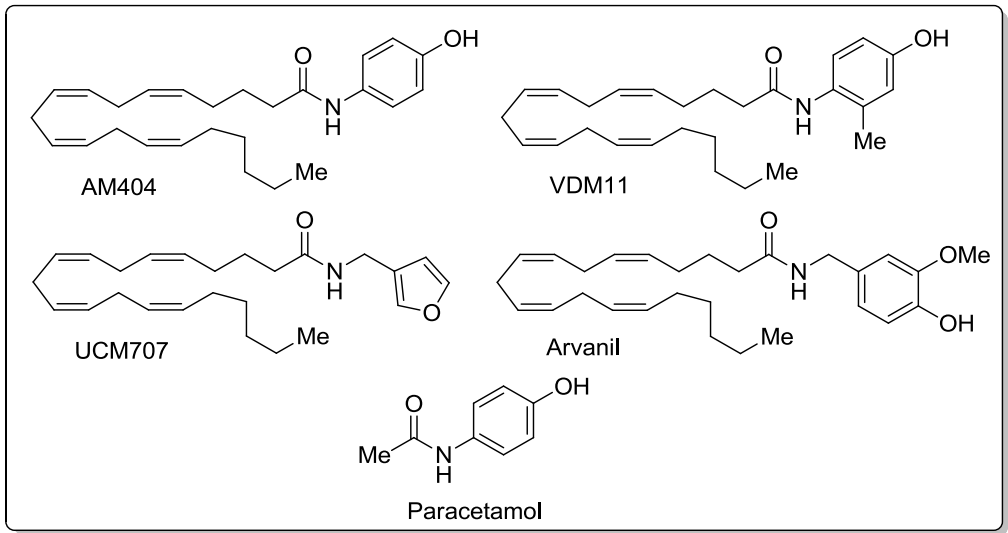
<sup>37</sup> L. De Petrocellis, T. Bisogno, J. B. Davis, R. G. Pertwee y V. Di Marzo "Overlap between the Ligand Recognition Properties of the Anandamide Transporter and the Vr1 Vanilloid Receptor: Inhibitors of Anandamide Uptake with Negligible Capsaicin-Like Activity" *Febs Letters* **2000**, *483*, 52.

<sup>38</sup> M. L. Lopez-Rodriguez, A. Viso, S. Ortega-Gutierrez, I. Lastres-Becker, S. Gonzalez, J. Fernandez-Ruiz y J. A. Ramos "Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Arachidonic Acid Derivatives as Highly Potent and Selective Endocannabinoid Transporter Inhibitors" *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, *44*, 4505.

<sup>39</sup> V. Di Marzo, T. Bisogno, L. De Petrocellis, I. Brandi, R. G. Jefferson, R. L. Winckler, J. B. Davis, O. Dasse, A. Mahadevan, R. K. Razdan y B. R. Martin "Highly Selective Cb1 Cannabinoid Receptor Ligands and Novel Cb1/Vr1 Vanilloid Receptor "Hybrid" Ligands" *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2001**, *281*, 444.

<sup>40</sup> J. Ashton "Pro-Drugs for Indirect Cannabinoids as Therapeutic Agents" *Curr Drug Deliv* **2008**, *5*, 243. C. Sinning, B. Watzer, O. Coste, R. M. Nuesing, I. Ott, A. Ligresti, V. Di Marzo y P. Imming "New Analgesics Synthetically Derived from the Paracetamol





**Figura 4.** Inhibidores del transporte de endocannabinoides.

**Inactivación:** Una vez en el interior de la célula se produce el proceso de hidrólisis enzimática intracelular. La enzima más estudiada es la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH)<sup>41</sup> que fue clonada de hígado de rata<sup>42</sup>. La FAAH hidroliza la AEA y el 2-AG para generar ácido araquidónico (figura 5). Pero se ha identificado otra enzima que hidrozila específicamente el 2-AG, la monoacilglicerol lipasa (MAGL)<sup>43</sup> clonada de tejido adiposo de ratón<sup>44</sup>.

Metabolite N-(4-Hydroxyphenyl)-(5z,8z,11z,14z)-Icosatetra-5,8,11,14-Enamide" *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51*, 7800. M. Dania, J. Guindon, C. Lambert y P. Beaulieu "The Local Antinociceptive Effects of Paracetamol in Neuropathic Pain Are Mediated by Cannabinoid Receptors" *European Journal of Pharmacology* **2007**, *573*, 214.

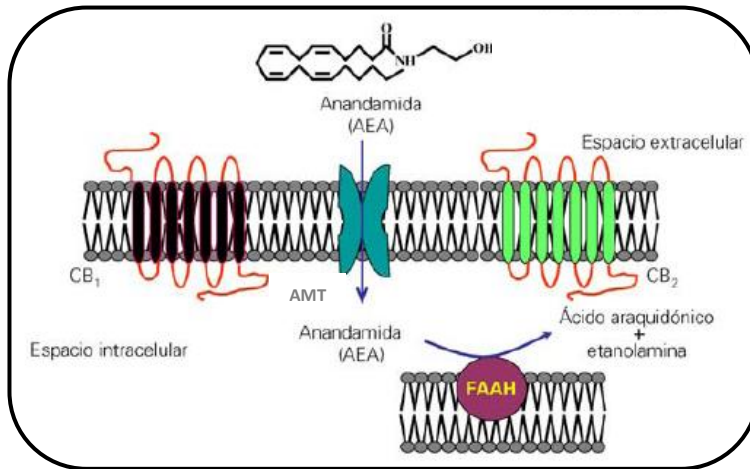
<sup>41</sup> D. G. Deutsch, N. Ueda y S. Yamamoto "The Fatty Acid Amide Hydrolase (Faah)" *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2002**, *66*, 201. M. K. McKinney y B. F. Cravatt, "Structure and Function of Fatty Acid Amide Hydrolase". *Annual Review of Biochemistry*. Vol. *74*, **2005**, 411.

<sup>42</sup> B. F. Cravatt, D. K. Giang, S. P. Mayfield, D. L. Boger, R. A. Lerner y N. B. Gilula "Molecular Characterization of an Enzyme That Degrades Neuromodulatory Fatty-Acid Amides" *Nature* **1996**, *384*, 83.

<sup>43</sup> M. H. Bracey, M. A. Hanson, K. R. Masuda, R. C. Stevens y B. F. Cravatt "Structural Adaptations in a Membrane Enzyme That Terminates Endocannabinoid Signaling" *Science* **2002**, *298*, 1793.

<sup>44</sup> M. Karlsson, J. A. Contreras, U. Hellman, H. Tornqvist y C. Holm "Cdna Cloning, Tissue Distribution, and Identification of the Catalytic Triad of Monoglyceride Lipase -

Con respecto a la inactivación de los otros endocannabinoides, se sabe que la FAAH también hidroliza la virodhamina, y que el noladín éter y la NADA son estables a la hidrólisis.



**Figura 5.** Sistema de biosíntesis, transporte e inactivación de la anandamida (AEA)<sup>45</sup>.

Al igual que otras proteínas implicadas en el sistema endocannabinoide, la FAAH constituye una buena diana terapéutica para el desarrollo de fármacos empleados en paliar estados de dolor agudo o neuropático<sup>46</sup>. Fruto de ello es el desarrollo y estudio de inhibidores de la FAAH siendo algunos de los más destacados el AM374<sup>47</sup>, el MAFP<sup>48</sup>, el ATFMK<sup>49</sup>, el URB-597<sup>50</sup> y el OL-135<sup>51</sup> (figura 6).

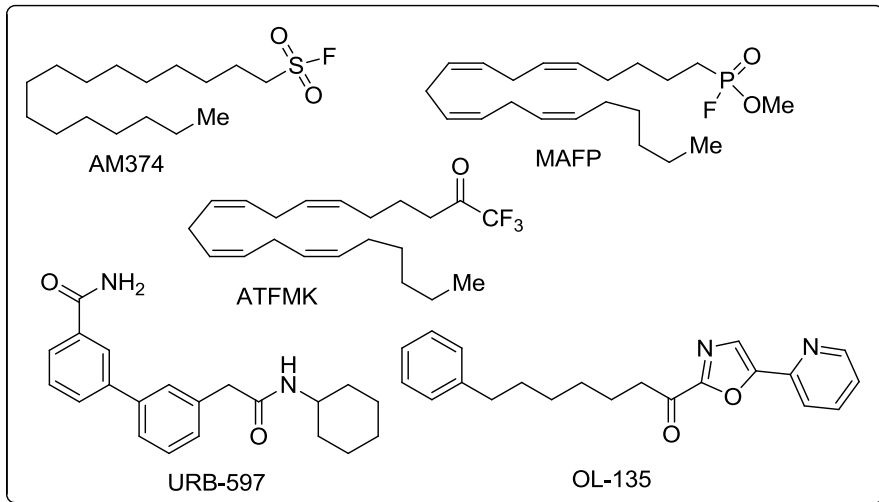
---

Evolutionary Relationship to Esterases, Lysophospholipases, and Haloperoxidases" *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, 27218.

<sup>45</sup> L. Mestre, F. Correa, F. Docagne, D. Clemente, S. Ortega-Gutierrez, A. Arevalo-Martin, E. Molina-Holgado, J. Borrell y C. Guaza "[Cannabinoid System and Neuroinflammation: Therapeutic Perspectives in Multiple Sclerosis]" *Rev Neurol* **2006**, 43, 541.

<sup>46</sup> M. D. Jhaveri, D. Richardson y V. Chapman "Endocannabinoid Metabolism and Uptake: Novel Targets for Neuropathic and Inflammatory Pain" *British Journal of Pharmacology* **2007**, 152, 624. S. G. Kinsey, P. S. Naidu, B. F. Cravatt, D. T. Dudley y A. H. Lichtman "Fatty Acid Amide Hydrolase Blockade Attenuates the Development of Collagen-Induced Arthritis and Related Thermal Hyperalgesia in Mice" *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **2011**, 99, 718.

<sup>47</sup> D. G. Deutsch, S. Lin, W. A. G. Hill, K. L. Morse, D. Salehani, G. Arreaza, R. L. Omeir y A. Makriyannis "Fatty Acid Sulfonyl Fluorides Inhibit Anandamide Metabolism and



**Figura 6.** Inhibidores de la enzima FAAH.

## 1.2.- Ligandos de los receptores cannabinoides:

El término de “ligando cannabinoide” no sólo hace referencia a los ligandos cannabinoides endógenos sino también a toda molécula exógena capaz de actuar sobre los receptores cannabinoides. Según su procedencia o su estructura se

---

Bind to the Cannabinoid Receptor" *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1997**, 231, 217.

<sup>48</sup> D. G. Deutsch, R. Omeir, G. Arreaza, D. Salehani, G. D. Prestwich, Z. Huang y A. Howlett "Methyl Arachidonyl Fluorophosphonate: A Potent Irreversible Inhibitor of Anandamide Amidase" *Biochemical Pharmacology* **1997**, 53, 255.

<sup>49</sup> B. Koutek, G. D. Prestwich, A. C. Howlett, S. A. Chin, D. Salehani, N. Akhavan y D. G. Deutsch "Inhibitors of Arachidonoyl Ethanolamide Hydrolysis" *Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269, 22937.

<sup>50</sup> S. Kathuria, S. Gaetani, D. Fegley, F. Valino, A. Duranti, A. Tontini, M. Mor, G. Tarzia, G. La Rana, A. Calignano, A. Giustino, M. Tattoli, M. Palmery, V. Cuomo y D. Piomelli "Modulation of Anxiety through Blockade of Anandamide Hydrolysis" *Nature Medicine* **2003**, 9, 76. J. L. Stewart y L. R. McMahon "The Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibitor Urb 597: Interactions with Anandamide in Rhesus Monkeys" *British Journal of Pharmacology* **2011**, 164, 655.

<sup>51</sup> A. H. Lichtman, D. Leung, C. C. Shelton, A. Saghatelian, C. Hardouin, D. L. Boger y B. F. Cravatt "Reversible Inhibitors of Fatty Acid Amide Hydrolase That Promote Analgesia: Evidence for an Unprecedented Combination of Potency and Selectivity" *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2004**, 311, 441.

pueden clasificar en<sup>52</sup>: fitocannabinoides y sus análogos, eicosanoides, heterocícllos, y con estructuras variadas.

### 1.2.1.- FITOCANNABINOIDES Y ANÁLOGOS:

Hasta la década de los 80 el término “cannabinoides” hacía referencia a los compuestos presentes en la planta *Cannabis Sativa*. De la planta se han aislado más de 60 compuestos con actividad cannabinoide siendo el  $\Delta^9$ -THC el más relevante por ser, como ya se ha mencionado, el responsable de las propiedades psicoactivas del cannabis pero, también ha mostrado poseer unas propiedades terapéuticas interesantes<sup>53</sup>. A nivel estructural la mayoría de los fitocannabinoides poseen un esqueleto tricíclico tipo terpénico siendo uno de los tres ciclos un anillo de pirano.

Destacan el cannabinal (CBN) con menos efectos psicoactivos y mayor afinidad por el receptor CB<sub>2</sub> que por el CB<sub>1</sub><sup>54</sup>, y el cannabidiol (CBD) que no presenta efectos psicoactivos y ha mostrado tener un efecto neuroprotector *in vitro* y efectos antiinflamatorios, analgésicos, anticonvulsivantes, antipsicóticos, antioxidantes, e inmunomoduladores en modelos de experimentación con animales<sup>55</sup>.

El conocimiento de las relaciones estructura-actividad (SAR) de los fitocannabinoides ha permitido el diseño de análogos para obtener derivados con mayor afinidad por los receptores y menos efectos secundarios. Así, se diseñaron

---

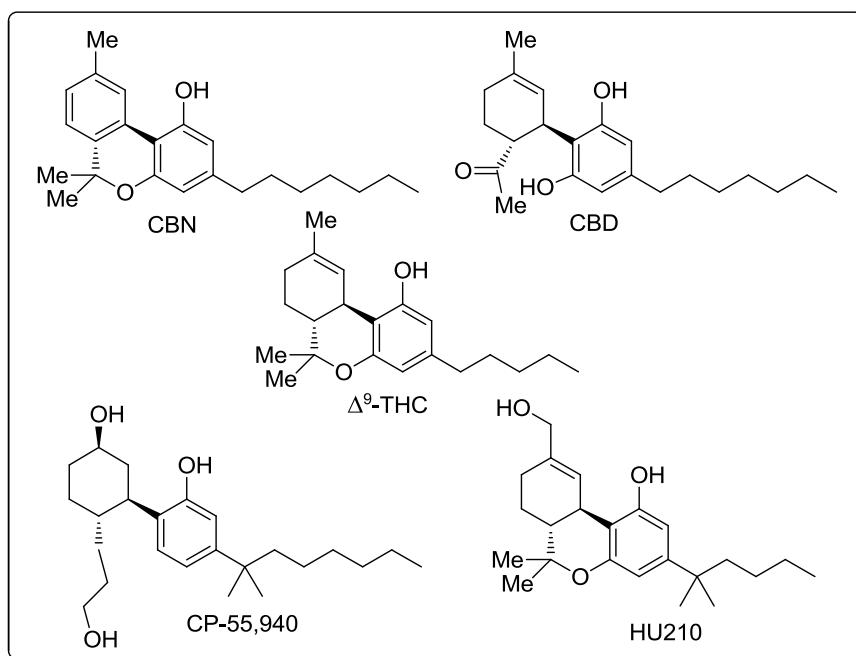
<sup>52</sup> S. L. Palmer, G. A. Thakur y A. Makriyannis "Cannabinergic Ligands" *Chemistry and Physics of Lipids* **2002**, 121, 3.

<sup>53</sup> B. Costa "On the Pharmacological Properties of Delta(9)-Tetrahydrocannabinol (Thc)" *Chemistry & Biodiversity* **2007**, 4, 1664.

<sup>54</sup> R. Condie, A. Herring, W. S. Koh, M. Lee y N. E. Kaminski "Cannabinoid Inhibition of Adenylate Cyclase-Mediated Signal Transduction and Interleukin 2 (Il-2) Expression in the Murine T-Cell Line, E14.II-2" *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271, 13175.

<sup>55</sup> R. G. Pertwee "The Diverse Cb1 and Cb2 Receptor Pharmacology of Three Plant Cannabinoids: Delta(9)-Tetrahydrocannabinol, Cannabidiol and Delta(9)-Tetrahydrocannabivarin" *British Journal of Pharmacology* **2008**, 153, 199.

análogos sintéticos del  $\Delta^9$ -THC como el HU210<sup>56</sup> que es el más potente de los actualmente conocidos caracterizándose por presentar un grupo hidroxilo más que el  $\Delta^9$ -THC y una cadena alifática de 1',1'-dimetilheptilo. La empresa farmacéutica Pfizer desarrolló compuestos bicíclicos como el (-)-CP-55,940<sup>57</sup> que permitió determinar ciertos requisitos farmacofóricos necesarios para la interacción con los receptores cannabinoides, como la cadena lateral y los tres grupos hidroxilo<sup>58</sup>. El primer radioligando desarrollado para la caracterización de cannabinoides<sup>59</sup> fue el derivado tritiado de CP-55,940 que actualmente se sigue empleando en la mayoría de los ensayos farmacológicos (figura 7).



**Figura 7.** Fitocannabinoides y análogos sintéticos.

<sup>56</sup> A. Ottani y D. Giuliani "Hu 210: A Potent Tool for Investigations of the Cannabinoid System" *Cns Drug Reviews* **2001**, 7, 131.

<sup>57</sup> H. G. Fouda, J. Lukaszewicz y E. W. Luther "Selected Ion Monitoring Analysis of Cp-55,940, a Cannabinoid Derived Analgesic Agent" *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry* **1987**, 14, 599.

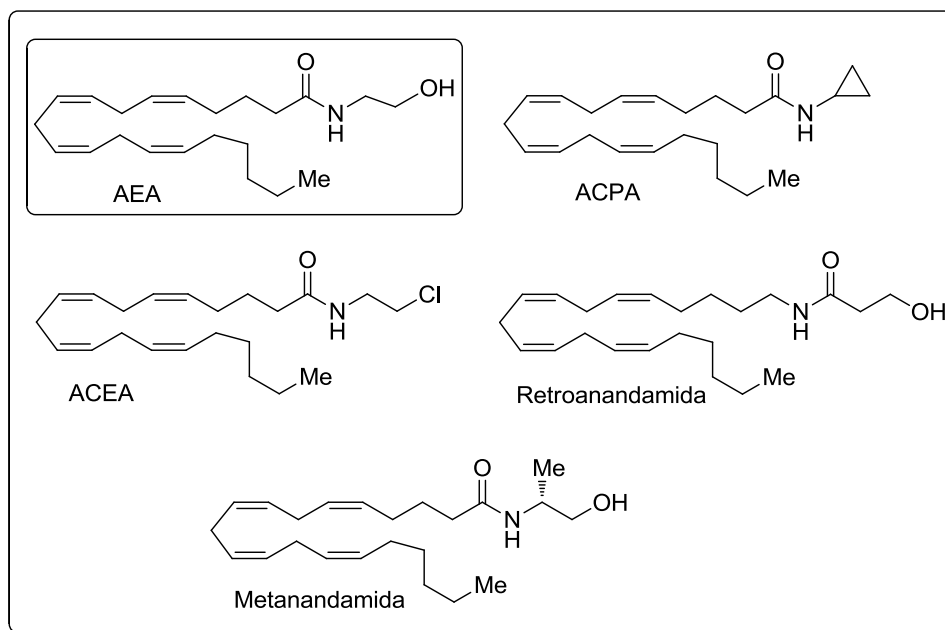
<sup>58</sup> A. D. Khanolkar, S. L. Palmer y A. Makriyannis "Molecular Probes for the Cannabinoid Receptors" *Chemistry and Physics of Lipids* **2000**, 108, 37.

<sup>59</sup> W. A. Devane, F. A. Dysarz, M. R. Johnson, L. S. Melvin y A. C. Howlett "Determination and Characterization of a Cannabinoid Receptor in Rat-Brain" *Molecular Pharmacology* **1988**, 34, 605.

## 1.2.2.- EICOSANOIDES:

Estos ligandos abarcan tanto a los endocannabinoides como a los análogos sintéticos de éstos y a los inhibidores del transporte de endocannabinoides e inhibidores de las enzimas FAAH o MAGL.

Los que más se han desarrollado son los análogos de la AEA cuyas modificaciones más significativas se recogen en la figura 8, mostrando que la presencia del grupo hidroxilo de la AEA no es indispensable ya que se mantiene la afinidad por los receptores cannabinoides cuando dicho grupo se ve modificado.



**Figura 8.** AEA y sus análogos sintéticos.

Estas modificaciones junto con los estudios conformacionales<sup>60</sup> y de modelización molecular<sup>61</sup> han permitido establecer relaciones estructura-actividad (SAR)<sup>62</sup> de la familia de los eicosanoides.

<sup>60</sup> J. Z. Chen, X. W. Han y X. Q. Xie "Preferred Conformations of Endogenous Cannabinoid Ligand Anandamide" *Life Sciences* **2005**, 76, 2053.

En una revisión realizada por los doctores Mahaveda y Razdan se recogen los avances realizados sobre los eicosanoides durante los primeros años del siglo XXI<sup>63</sup>. También podemos encontrar en la bibliografía algunos trabajos donde se muestran nuevos análogos del 2-AG<sup>64</sup> o análogos de la N-araquidonilserotonina con actividad dual como inhibidores de la FAAH y como antagonistas del receptor vanilloide TRPV1 para el tratamiento del dolor<sup>65</sup>.

### 1.2.3.- CANNABINOIDES HETEROCÍCLICOS Y OTRAS ESTRUCTURAS:

Dentro de este grupo cabe destacar los aminoalquilindoles y los diarilpirazoles<sup>66</sup>.

En los años 90, la empresa Sterling Winthrop desarrolló el WIN552122<sup>67</sup>, un aminoalquilindol con una potente afinidad tanto por el receptor CB<sub>1</sub> como por el receptor CB<sub>2</sub>. La familia de los aminoalquilindoles incluye moléculas cuya estructura química deriva del analgésico pravadolina, es decir, no están relacionados estructuralmente con los cannabinoides clásicos pero muestran un

---

<sup>61</sup> B. F. Thomas, I. B. Adams, S. W. Mascarella, B. R. Martin y R. K. Razdan "Structure-Activity Analysis of Anandamide Analogs: Relationship to a Cannabinoid Pharmacophore" *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, 39, 471.

<sup>62</sup> S. L. Palmer, A. D. Khanolkar y A. Makriyannis "Natural and Synthetic Endocannabinoids and Their Structure-Activity Relationships" *Current Pharmaceutical Design* **2000**, 6, 1381.

<sup>63</sup> A. Mahadevan y R. K. Razdan "Further Advances in the Synthesis of Endocannabinoid-Related Ligands" *Aaps Journal* **2005**, 7,

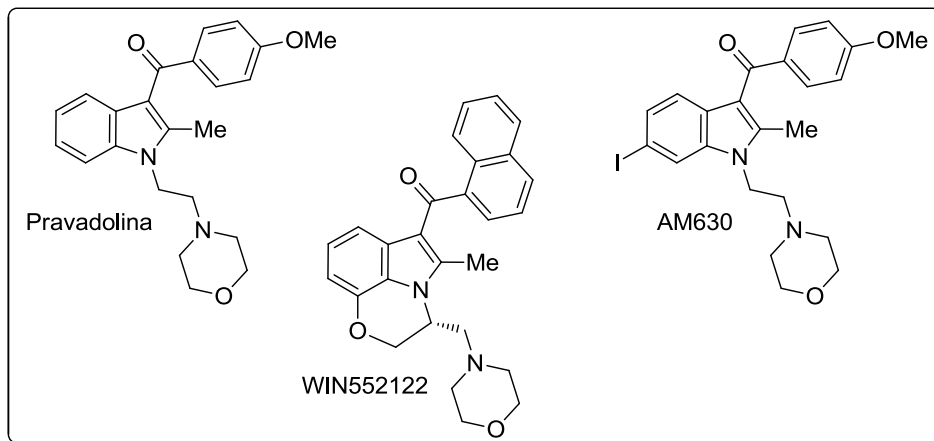
<sup>64</sup> J. A. Cisneros, S. Vandevoorde, S. Ortega-Gutierrez, C. Paris, C. J. Fowler y M. L. Lopez-Rodriguez "Structure-Activity Relationship of a Series of Inhibitors of Monoacylglycerol Hydrolysis-Comparison with Effects Upon Fatty Acid Amide Hydrolase" *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, 50, 5012.

<sup>65</sup> G. Ortar, M. G. Cascio, L. De Petrocellis, E. Morera, F. Rossi, A. Schiano-Moriello, M. Nalli, V. de Novellis, D. F. Woodward, S. Maione y V. Di Marzo "New N-Arachidonoylserotonin Analogues with Potential "Dual" Mechanism of Action against Pain" *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, 50, 6554.

<sup>66</sup> N. Jagerovic, C. Fernandez-Fernandez y P. Goya "Cb1 Cannabinoid Antagonists: Structure-Activity Relationships and Potential Therapeutic Applications" *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2008**, 8, 205.

<sup>67</sup> T. E. Dambra, K. G. Estep, M. R. Bell, M. A. Eissenstat, K. A. Josef, S. J. Ward, D. A. Haycock, E. R. Baizman, F. M. Casiano, N. C. Beglin, S. M. Chippari, J. D. Grego, R. K. Kullnig y G. T. Daley "Conformationally Restrained Analogs of Pravadoline - Nanomolar Potent, Enantioselective, (Aminoalkyl)Indole Agonists of the Cannabinoid Receptor" *Journal of Medicinal Chemistry* **1992**, 35, 124.

perfil farmacológico cannabimimético. El WIN552122 es un compuesto de referencia en la farmacología cannabinoide por lo que se utiliza en la caracterización de receptores cannabinoideos. El primer antagonista selectivo CB<sub>2</sub> descrito fue el AM630 o iodopravadolina (figura 9)<sup>68</sup>.



**Figura 9.** Aminoalquilindoles.

En cuanto a los diarilpirazoles, su principal representante es el rimonabant (SR141716) descrito por la empresa farmacéutica Sanofi-Synthelabo (ahora Sanofi) en 1998<sup>69</sup>. Fue el primer antagonista cannabinoide que llegó al mercado en 2006 (aunque fue posteriormente retirado en 2008) por lo que desde entonces se recogen en la bibliografía numerosas modificaciones estructurales para dar paso a nuevos ligandos cannabinoideos.

Se han publicado una gran variedad de análogos del rimonabant (figura 10) en los cuales se ha modificado la naturaleza de sus cuatro sustituyentes: el metilo de la posición C-4, los anillos aromáticos de las posiciones 1 y 5, y los sustituyentes de estos anillos. Dentro de las modificaciones de los sustituyentes de la posición C-5,

<sup>68</sup> R. Pertwee, G. Griffin, S. Fernando, X. Y. Li, A. Hill y A. Makriyannis "Am630, a Competitive Cannabinoid Receptor Antagonist" *Life Sciences* **1995**, 56, 1949.

<sup>69</sup> M. Rinaldicarmona, F. Barth, M. Heaulme, D. Shire, B. Calandra, C. Congy, S. Martinez, J. Maruani, G. Neliat, D. Caput, P. Ferrara, P. Soubrie, J. C. Breliere y G. Lefur "Sr141716a, a Potent and Selective Antagonist of the Brain Cannabinoid Receptor" *Febs Letters* **1994**, 350, 240.



la presencia de un grupo fenilo parece ser esencial y, si además posee un halógeno (AM251)<sup>70</sup> o una cadena alquílica en la posición 4 del grupo fenilo, aumenta su afinidad (OL-1302)<sup>71</sup>. El sustituyente en posición C-3 no es crucial para la actividad excepto el oxígeno de la amida que forma un puente de hidrógeno con una lisina del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub><sup>72</sup>.

Aunque la mayoría de estos derivados presentan propiedades de antagonista/agonista inversos del receptor CB<sub>1</sub>, algunos de estos compuestos han resultado ser selectivos frente al receptor CB<sub>2</sub> como es el caso del ligando SR144528<sup>73</sup>.

También se han llevado a cabo modificaciones a nivel del heterociclo sustituyéndose el anillo de pirazol<sup>74</sup> por otros heterociclos<sup>75</sup> como los 1,2,4-triazoles<sup>76</sup> preparados en nuestro grupo de investigación. Uno de ellos, el LH21,

---

<sup>70</sup> S. J. Gatley, A. N. Gifford, N. D. Volkow, R. X. Lan y A. Makriyannis "I-123-Labeled Am251: A Radioiodinated Ligand Which Binds in Vivo to Mouse Brain Cannabinoid Cb1 Receptors" *European Journal of Pharmacology* **1996**, 307, 331.

<sup>71</sup> J. L. Wiley, R. G. Jefferson, M. C. Grier, A. Mahadevan, R. K. Razdan y B. R. Martin "Novel Pyrazole Cannabinoids: Insights into Cb1 Receptor Recognition and Activation" *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2001**, 296, 1013.

<sup>72</sup> D. Hurst, U. Umejiego, D. Lynch, H. Seltzman, S. Hyatt, M. Roche, S. McAllister, D. Fleischer, A. Kapur, M. Abood, S. Shi, J. Jones, D. Lewis y P. Reggio "Biarylpyrazole Inverse Agonists at the Cannabinoid Cb1 Receptor: Importance of the C-3 Carboxamide Oxygen/Lysine3.28(192) Interaction" *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49, 5969.

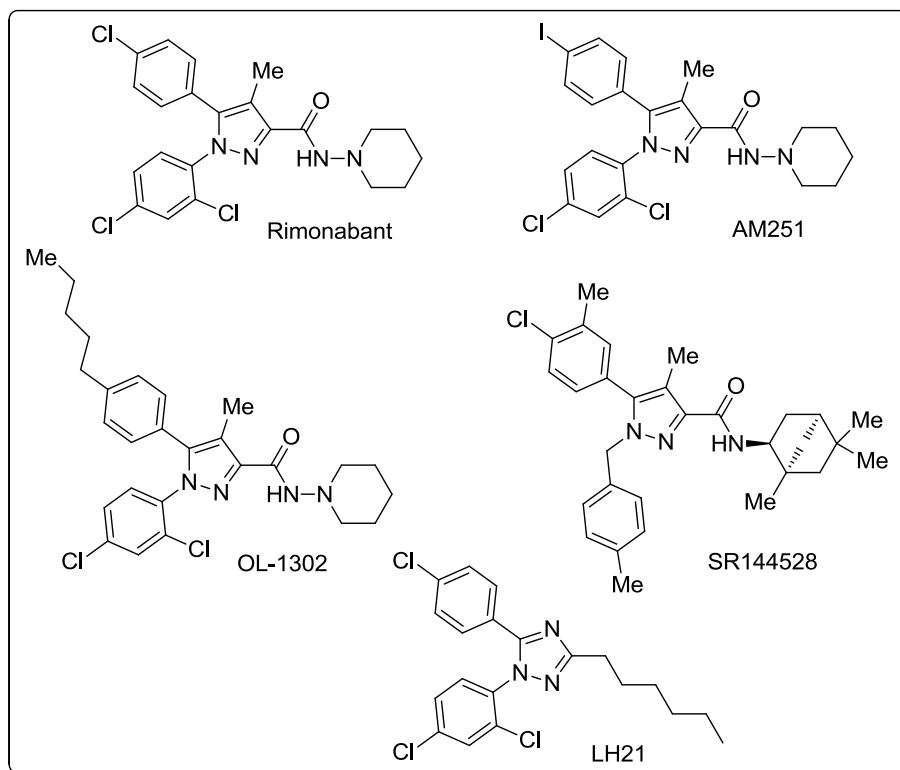
<sup>73</sup> M. Rinaldi-Carmona, F. Barth, J. Millan, J. M. Derocq, P. Casellas, C. Congy, D. Oustric, M. Sarran, M. Bouaboula, B. Calandra, M. Portier, D. Shire, J. C. Breliere y G. Le Fur "Sr 144528, the First Potent and Selective Antagonist of the Cb2 Cannabinoid Receptor" *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1998**, 284, 644.

<sup>74</sup> J. H. M. Lange, H. H. van Stuijvenberg, H. Coolen, T. J. P. Adolfs, A. C. McCreary, H. G. Keizer, H. C. Wals, W. Veerman, A. J. M. Borst, W. de Loeff, P. C. Vermeer y C. G. Kruse "Bioisosteric Replacements of the Pyrazole Moiety of Rimonabant: Synthesis, Biological Properties, and Molecular Modeling Investigations of Thiazoles, Triazoles, and Imidazoles as Potent and Selective Cb1 Cannabinoid Receptor Antagonists" *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 48, 1823.

<sup>75</sup> J. H. M. Lange, H. H. van Stuijvenberg, W. Veerman, H. C. Wals, B. Stork, H. Coolen, A. C. McCreary, T. J. P. Adolfs y C. G. Kruse "Novel 3,4-Diarylpyrazolines as Potent Cannabinoid Cb1 Receptor Antagonists with Lower Lipophilicity" *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, 15, 4794.

<sup>76</sup> N. Jagerovic, L. Hernandez-Folgado, I. Alkorta, P. Goya, M. I. Martin, M. T. Dannert, A. Alsasua, J. Frigola, M. R. Cuberes, A. Dordal y J. Holenz "Structural-Activity

está en la actualidad siendo objeto de numerosos estudios como posible fármaco antiobesidad<sup>77</sup>.

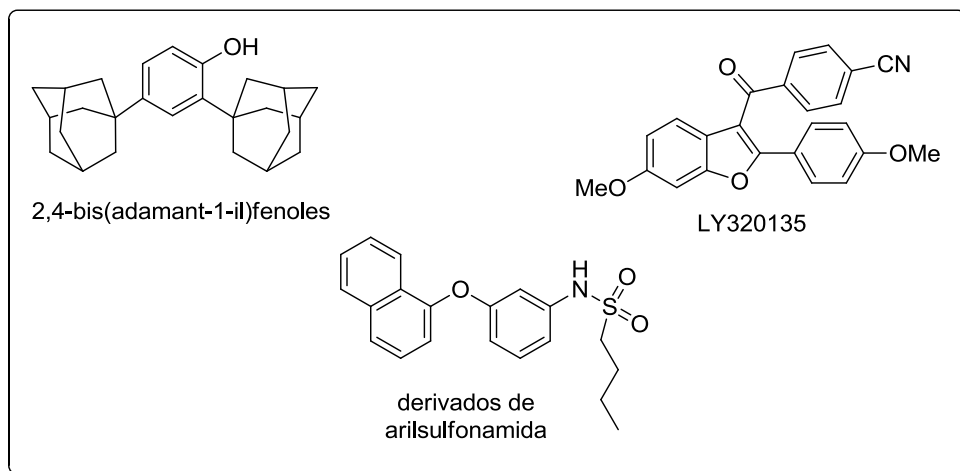


**Figura 10.** Diarilpirazoles.

Relationship Study on C-4 Carbon Atom of the Cb1 Antagonist Sr141716: Synthesis and Pharmacological Evaluation of 1,2,4-Triazole-3-Carboxamides" *European Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *41*, 114.

<sup>77</sup> F. J. Pavon, A. Bilbao, L. Hernandez-Folgado, A. Cippitelli, N. Jagerovic, G. Abellan, M. I. Rodriguez-Franco, A. Serrano, M. Macias, R. Gomez, M. Navarro, P. Goya y F. R. de Fonseca "Antiobesity Effects of the Novel in Vivo Neutral Cannabinoid Receptor Antagonist 5-(4-Chlorophenyl)-1-(2,4-Dichlorophenyl)-3-Hexyl-1h-1,2,4-Triazole-Lh 21" *Neuropharmacology* **2006**, *51*, 358. F. J. Pavón, A. Serrano, V. Pérez-Valero, N. Jagerovic, L. Hernández-Folgado, F. J. Bermúdez-Silva, M. Macías, P. Goya y F. R. De Fonseca "Central Versus Peripheral Antagonism of Cannabinoid Cb1 Receptor in Obesity: Effects of Lh-21, a Peripherally Acting Neutral Cannabinoid Receptor Antagonist, in Zucker Rats" *Journal of Neuroendocrinology* **2008**, *20*, 116. M. Alonso, A. Serrano, M. Vida, A. Crespillo, L. Hernandez-Folgado, N. Jagerovic, P. Goya, C. Reyes-Cabello, V. Perez-Valero, J. Decara, M. Macías-González, F. J. Bermúdez-Silva, J. Suárez, F. R. de Fonseca y F. J. Pavón "Antiobesity Efficacy of Lh-21, a Cannabinoid Cb1 Receptor Antagonist with Poor Brain Penetration, in Diet-Induced Obese Rats" *British Journal of Pharmacology* **2012**, *165*, 2274.

Existe una gran cantidad de nuevos ligandos cannabinoides con o sin una estructura principal heterocíclica y varias empresas farmacéuticas se han interesado en este tipo de compuestos. Como Smithkline Beecham que ha reivindicado los 2,4-bis(adamant-1-il)fenoles para modular la actividad cannabinoide, y Bayer que ha patentado una serie de derivados de arilsulfonamida como agonistas CB<sub>1</sub>, o Lilly que ha desarrollado el benzofurano LY320135 como antagonista CB<sub>1</sub> (figura 11)<sup>78</sup>.



**Figura 11.** Otras estructuras cannabinoides.

### 1.3.- Aplicaciones terapéuticas de los cannabinoides:

El uso terapéutico de los cannabinoides se remonta a la antigüedad cuando ya en el año 2737 a.C. el emperador Sheng-Nung prescribía el cannabis para tratar la malaria, la gota, el reumatismo, el estreñimiento o la fatiga. El 1844 el médico y profesor inglés O'Shaughnessy introdujo los cannabinoides en la medicina occidental, primero en el Reino Unido y posteriormente en Estados Unidos, donde se usó el extracto de la planta como sedante, hipnótico y anticonvulsante.

<sup>78</sup> P. Goya y N. Jagerovic "Recent Advances in Cannabinoid Receptor Agonists and Antagonists" *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2000**, *10*, 1529.

Hoy en día se sabe que los compuestos susceptibles de modificar el transporte o el metabolismo de los endocannabinoides o que actúan sobre sus receptores pueden tener aplicaciones terapéuticas muy variadas como antiepilépticos, hipnóticos, analgésicos, antieméticos<sup>79</sup>, antiinflamatorios, para el tratamiento del glaucoma, del crecimiento óseo, de la fibrosis hepática, de la arterioesclerosis, de la obesidad, de la esclerosis múltiple, del Parkinson o del Alzheimer<sup>80</sup>.

### 1.3.1.- TRASTORNOS DEL APETITO Y ANTIEMESIS:

Desde la antigüedad se conoce la influencia de los cannabinoides en la ingesta de comida y ya en la Farmacopea India aparece el uso de la planta *Cannabis sativa* para pacientes sin apetito además de cómo antiemético.

Los agonistas cannabinoides son estimulantes del apetito y así, se ha observado que el sistema endocannabinoide se encuentra implicado a través de los receptores CB<sub>1</sub> en el control del apetito, ya que dosis bajas de AEA o 2-AG son capaces de estimular la ingesta de comida. Además, los cannabinoides pueden ser empleados como agentes antieméticos como alternativa a los ligandos de receptores de serotonina 5HT<sub>3</sub> que, a pesar de reducir de forma significativa los vómitos y las náuseas en pacientes tratados con quimioterapia, han demostrado poca o ninguna eficacia en multitud de pacientes.

En la actualidad los únicos cannabinoides comercializados para los trastornos del apetito y de la emesis son la nabilona (Cesamet<sup>®</sup>) y el dronabinol (Marinol<sup>®</sup>). Durante la década de los 80 el THC sintético, conocido como dronabinol, se comenzó a utilizar para estimular el apetito en pacientes con SIDA o con tratamientos anticancerosos, además de disminuir las náuseas asociadas a sus tratamientos quimioterapéuticos.

---

<sup>79</sup> L. A. Parker, E. M. Rock y C. L. Limebeer "Regulation of Nausea and Vomiting by Cannabinoids" *British Journal of Pharmacology* **2011**, 163, 1411.

<sup>80</sup> N. E. Campillo y J. A. Paez "Cannabinoid System in Neurodegeneration: New Perspectives in Alzheimer's Disease" *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2009**, 9, 539.

En cuanto al mecanismo de acción, aún no se conoce con seguridad, pero la nabilona ha mostrado tener mayor eficacia antiemética que el THC y que otros agonistas 5HT<sub>3</sub>. Estos resultados permitieron la comercialización de nabilona (Cesamet<sup>®</sup>) en Canadá en 1982 estando también autorizada actualmente en Reino Unido y Suiza para este tipo de trastornos. Sin embargo, la eficacia de la nabilona o el dronabinol se ha visto empañada por la existencia de efectos psicoactivos.

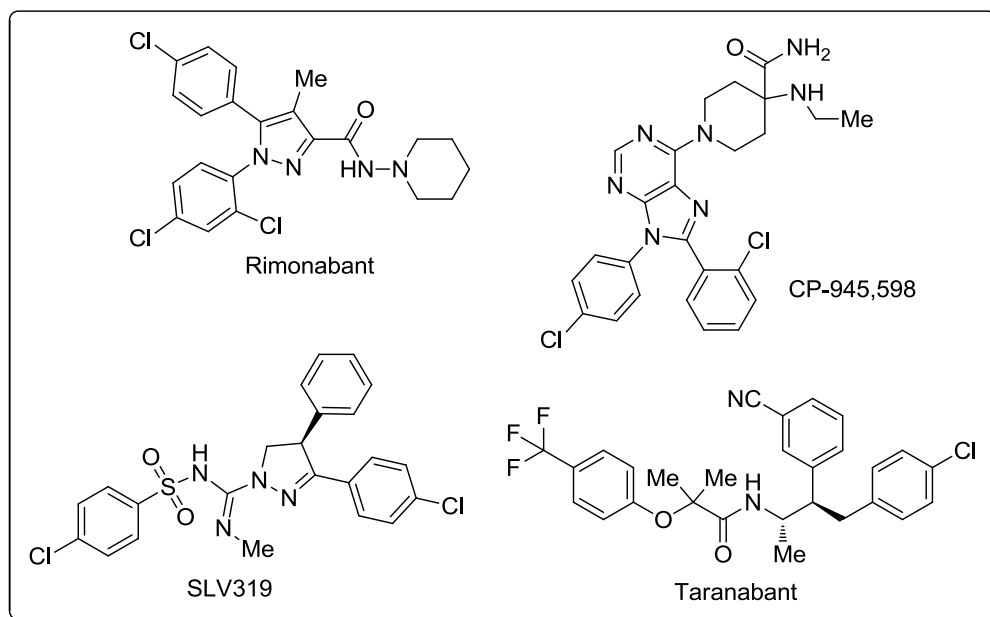
Por otro lado, los antagonistas cannabinoides CB<sub>1</sub> también se han desarrollado para el tratamiento de la obesidad. El bloqueo de estos receptores a nivel central y periférico produce una pérdida de peso además de regular el metabolismo de la glucosa y los lípidos<sup>81</sup>.

Por este motivo se sintetizó el rimonabant (SR141716) (figura 12), comercializado como Acomplia<sup>®</sup>, que fue el primer antagonista cannabinoide aprobado en 2006 por la Unión Europea para el tratamiento de la obesidad como adyuvante de la dieta y el ejercicio para el tratamiento de pacientes obesos (IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>), o pacientes con sobrepeso (IMC  $> 27$  kg/m<sup>2</sup>) con factores de riesgo asociados, como la diabetes tipo 2 o dislipidemia. La farmacovigilancia del rimonabant reveló alteraciones psiquiátricas y, en particular, trastornos depresivos, como potenciales reacciones adversas asociadas al uso del producto. Dos años después de su comercialización, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) procedió a la suspensión de la comercialización de Acomplia<sup>®</sup> debido a que los riesgos eran mayores que los beneficios esperados. Como consecuencia de esto, en noviembre de 2008 la empresa Sanofi-Aventis decidió suspender todos los ensayos clínicos con rimonabant. Se estima que aproximadamente 700000 pacientes en todo el mundo, mayoritariamente en Europa, han recibido tratamiento con Acomplia<sup>®</sup>. En España, se calcula una cifra de 3000 pacientes desde su comercialización en marzo de 2008.

---

<sup>81</sup> J. Antel, P. C. Gregory y U. Nordheim "Cb1 Cannabinoid Receptor Antagonists for Treatment of Obesity and Prevention of Comorbid Metabolic Disorders" *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49, 4008.

Esto provocó que otros antagonistas CB<sub>1</sub> que se encontraban en fases de desarrollo clínico para la obesidad vieran suspendidos sus ensayos. Este fue el caso de la compañía Solvay Pharmaceuticals que suspendió los ensayos clínicos de SLV319 en fase II de desarrollo. Esta misma decisión la tomó Pfizer con su compuesto CP-945,598 en fase III y Merck Sharp & Dhome (MSD) con el compuesto MK-0364 (taranabant)<sup>82</sup> en fase III (figura 12).



**Figura 12.** Antagonistas CB<sub>1</sub> para el tratamiento de la obesidad.

### 1.3.2.- ANALGESIA:

Desde hace años se conoce el uso ilícito del cannabis por enfermos, por ejemplo de esclerosis múltiple o de cáncer, para aliviar el dolor. Este consumo ha generado un gran interés en la industria farmacéutica que se confirmó con el hecho de que el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> se encuentra localizado en muchas vías de señalización del dolor, por lo que está implicado en la analgesia. En

<sup>82</sup> W. K. Hagmann "The Discovery of Taranabant, a Selective Cannabinoid-1 Receptor Inverse Agonist for the Treatment of Obesity" *Archiv Der Pharmazie* **2008**, 341, 405.

primer lugar, se intentaron desarrollar agonistas de los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> a pesar de los posibles efectos psicotrópicos.

Hoy en día existen diversas estrategias de actuación sobre el sistema endocannabinoide para poder conseguir analgesia con efectos secundarios reducidos. Se ha comprobado que inhibidores selectivos de la FAAH como el OL-135 (figura 13) tienen un efecto antinociceptivo en varios modelos de dolor en roedores<sup>83</sup>. Esta nocicepción está mediada por el aumento en la concentración de AEA.

El grupo del profesor Di Marzo sintetizó una nueva serie de cannabinoides, concretamente unos híbridos de resorcinol y anandamida, entre los cuales se ha observado que el compuesto CB86<sup>84</sup> (figura 13) posee unas propiedades antinociceptivas muy interesantes.

Otra estrategia más reciente postula que el receptor cannabinoide CB<sub>2</sub> sería diana de elección para la analgesia. Los agonistas del receptor CB<sub>2</sub> pueden producir antinocicepción aunque aún no se conoce bien su mecanismo de acción. A pesar de las dudas existentes a este respecto, se han descrito agonistas inversos CB<sub>2</sub> como el compuesto SR144528 o el de Schering-Plough que inhiben el dolor de tipo inflamatorio<sup>85</sup>, o el compuesto AM1241<sup>86</sup> que es un ligando selectivo CB<sub>2</sub> (figura 13).

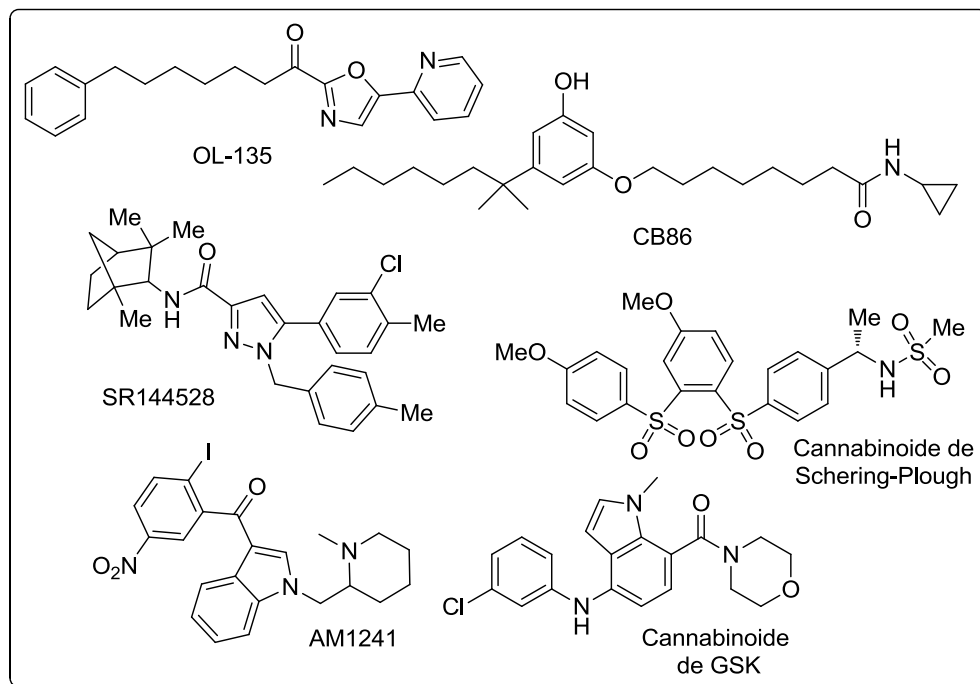
---

<sup>83</sup> S. M. Huang, T. Bisogno, T. J. Petros, S. Y. Chang, P. A. Zavitsanos, R. E. Zipkin, R. Sivakumar, A. Coop, D. Y. Maeda, L. De Petrocellis, S. Burstein, V. Di Marzo y J. M. Walker "Identification of a New Class of Molecules, the Arachidonyl Amino Acids, and Characterization of One Member That Inhibits Pain" *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, 42639.

<sup>84</sup> A. Brizzi, V. Brizzi, M. G. Cascio, F. Corelli, F. Guida, A. Ligresti, S. Maione, A. Martinelli, S. Pasquini, T. Tuccinardi y V. Di Marzo "New Resorcinol-Anandamide "Hybrids" As Potent Cannabinoid Receptor Ligands Endowed with Antinociceptive Activity in Vivo" *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 52, 2506.

<sup>85</sup> B. J. Lavey, J. A. Kozłowski, R. W. Hipkin, W. Gonsiorek, D. J. Lundell, J. J. Piwinski, S. Narula y C. A. Lunn "Triaryl Bis-Sulfones as a New Class of Cannabinoid Cb2 Receptor Inhibitors: Identification of a Lead and Initial Sar Studies" *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, 15, 783.

Se están llevando a cabo ensayos clínicos con ligandos CB<sub>2</sub> para el dolor. Este es el caso de la empresa Glenmark con su candidato más avanzado, GRC10693<sup>87</sup> o el caso de GlaxoSmithKline (GSK) que publicó un azaindo<sup>88</sup> como agonista CB<sub>2</sub> que presentaba una eficacia similar a los inhibidores de COX-2 en test de modelos crónicos en roedores y, además, mostraba buenos resultados en modelos de inflamación.



**Figura 13.** Cannabinoides con actividad analgésica.

<sup>86</sup> B. Bingham, P. G. Jones, A. J. Uveges, S. Kotnis, P. Lu, V. A. Smith, S. C. Sun, L. Resnick, M. Chlenov, Y. He, B. W. Strassle, T. A. Cummons, M. J. Piesla, J. E. Harrison, G. T. Whiteside y J. D. Kennedy "Species-Specific in Vitro Pharmacological Effects of the Cannabinoid Receptor 2 (Cb2) Selective Ligand Am1241 and Its Resolved Enantiomers" *Br J Pharmacol* **2007**, *151*, 1061.

<sup>87</sup> P. Anand, G. Whiteside, C. J. Fowler y A. G. Hohmann "Targeting Cb(2) Receptors and the Endocannabinoid System for the Treatment of Pain" *Brain Research Reviews* **2009**, *60*, 255.

<sup>88</sup> G. M. P. Giblin, A. Billinton, M. Briggs, A. J. Brown, I. P. Chessell, N. M. Clayton, A. J. Eatherton, P. Goldsmith, C. Haslam, M. R. Johnson, W. L. Mitchell, A. Naylor, A. Perboni, B. P. Slingsby y A. W. Wilson "Discovery of 1-[4-(3-Chlorophenylamino)-1-Methyl-1h-Pyrrolo[3,2-C]Pyridin-7-Yl]-1-Mor Pholin-4-Ylmethanone (Gsk554418a), a Brain Penetrant 5-Azaindole Cb(2) Agonist for the Treatment of Chronic Pain" *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*, 5785.



### 1.3.3.- ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y NEUROPROTECCIÓN:

La neurodegeneración es un proceso complejo en el que están involucrados múltiples mecanismos. En el caso de las enfermedades neurodegenerativas crónicas como Párkinson, Alzheimer, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica o la enfermedad de Huntington, hay multitud de hipótesis que explican las causas. Los procesos de inflamación se encuentran implicados en estas patologías.

El efecto neuroprotector que ejercen los cannabinoides se realiza tanto a través del tipo CB<sub>1</sub> como del tipo CB<sub>2</sub>. Los receptores CB<sub>1</sub> son capaces de inhibir la liberación de glutamato<sup>89</sup>, provocando de esta manera un efecto neuroprotector, mientras que los receptores CB<sub>2</sub> modulan el sistema autoinmune y actúan sobre la inflamación. Otro mecanismo independiente es la capacidad antioxidante de algunos cannabinoides como son el  $\Delta^9$ -THC, la nabilona, el cannabinalol y el HU-211 entre otros<sup>90</sup>.

Cabe destacar que la inflamación característica de las enfermedades neurodegenerativas no sólo es una consecuencia de la enfermedad, sino que también puede producir neurodegeneración por sí misma a través de la liberación de mediadores tóxicos o por la actuación de la respuesta autoinmune, como ocurre en el caso de la esclerosis múltiple.

La esclerosis múltiple es una enfermedad neurodegenerativa autoinmune que conlleva una desmielinización de los nervios. Los cannabinoides producen la disminución de la espasticidad muscular y los temblores que presentan los pacientes con esta dolencia.

---

<sup>89</sup> R. I. Grundy "The Therapeutic Potential of the Cannabinoids in Neuroprotection" *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2002**, *11*, 1365.

<sup>90</sup> R. I. Grundy, M. Rabuffetti y M. Beltramo "Cannabinoids and Neuroprotection" *Molecular Neurobiology* **2001**, *24*, 29.

El fármaco Sativex<sup>®</sup> (tetrahidrocannabinol/cannabidiol)<sup>91</sup> se aprobó por primera vez en Canadá en 2005 para el alivio del dolor neuropático asociado a la esclerosis múltiple. Este medicamento se encuentra disponible desde 2010 en las farmacias hospitalarias españolas a través de los laboratorios Almirall para el alivio sintomático del dolor neuropático y para el tratamiento de espasticidad en adultos con esclerosis múltiple. Actualmente se encuentra en investigación en un ensayo clínico en fase III en pacientes que experimentan analgesia insuficiente con un tratamiento crónico optimizado con opioides.<sup>92</sup>



#### 1.3.4.- CÁNCER:

Las primeras referencias al uso de cannabinoides como agentes antitumorales datan de 1975 cuando el grupo de Munson utilizó  $\Delta^9$ -THC para disminuir un adenocarcinoma de pulmón<sup>93</sup>. A pesar de los prometedores resultados obtenidos no fue hasta 1998 cuando el grupo del profesor Guzmán demostró que el  $\Delta^9$ -THC inducía la apoptosis de células de gliomas<sup>94</sup>. La acción antitumoral de algunos cannabinoides como el  $\Delta^9$ -THC o el WIN552122 se ha observado que está mediada por una acumulación de ceramida en el retículo endoplasmático, lo cual conduce a la inducción de las proteínas p8 (coactivador transcripcional) y TRB3 (pseudoquinasa) resultando en la muerte de las células tumorales. También se han visto implicados los receptores cannabinoides CB<sub>2</sub> ya que, por ejemplo, una

---

<sup>91</sup> J. Sastre-Garriga, C. Vila, S. Clissold y X. Montalban "The and Cbd Oromucosal Spray (Sativex (R)) in the Management of Spasticity Associated with Multiple Sclerosis" *Expert Review of Neurotherapeutics* **2011**, *11*, 627.

<sup>92</sup> <http://clinicaltrials.gov/>; ClinicalTrials.gov identifier: NCT01337089

<sup>93</sup> A. E. Munson, L. S. Harris, M. A. Friedman, W. L. Dewey y R. A. Carchman "Antineoplastic Activity of Cannabinoids" *J Natl Cancer Inst* **1975**, *55*, 597.

<sup>94</sup> C. Sanchez, I. Galve-Roperh, C. Canova, P. Brachet y M. Guzman "Delta(9)-Tetrahydrocannabinol Induces Apoptosis in C6 Glioma Cells" *Febs Letters* **1998**, *436*, 6.

activación de éstos por el agonista JWH-133 media la apoptosis de células del glioma por un aumento en la síntesis *de novo* de ceramida<sup>95</sup>.

En 2008, el grupo del profesor Guzmán descubrió otro mecanismo por el que los ligandos cannabinoides son capaces de detener el avance de las células tumorales en algunos tipos de cáncer como el cerebral o el de mama. Se observó que al administrar ligandos cannabinoides, se activa una proteína llamada JunD que inicia una cascada biológica que tiene como resultado la muerte de las células tumorales<sup>96</sup>. Estos resultados tan prometedores dieron paso a la aprobación de un ensayo clínico en Canarias con 9 pacientes que no habían conseguido frenar o remitir el avance del cáncer con la terapia estándar<sup>97</sup>. Nunca antes se había evaluado el efecto antitumoral de los cannabinoides en humanos. A los pacientes se les administraba  $\Delta^9$ -THC directamente en el tumor mediante un catéter previamente colocado por medio de cirugía. Los resultados de estos estudios no fueron concluyentes debido a las limitaciones del diseño ya que el tipo de cáncer que padecían los pacientes tenía un mal pronóstico y la elección del  $\Delta^9$ -THC como ligando cannabinoide no fue la más adecuada debido a su hidrofobicidad.

---

<sup>95</sup> B. Herrera, A. Carracedo, M. Díez-Zaera, T. G. del Pulgar, M. Guzman y G. Velasco "The Cb2 Cannabinoid Receptor Signals Apoptosis Via Ceramide-Dependent Activation of the Mitochondrial Intrinsic Pathway" *Experimental Cell Research* **2006**, 312, 2121.

<sup>96</sup> M. M. Caffarel, G. Moreno-Bueno, C. Cerutti, J. Palacios, M. Guzman, F. Mechta-Grigoriou y C. Sanchez "JunD Is Involved in the Antiproliferative Effect of Delta(9)-Tetrahydrocannabinol on Human Breast Cancer Cells" *Oncogene* **2008**, 27, 5033.

<sup>97</sup> M. Guzman, M. J. Duarte, C. Blazquez, J. Ravina, M. C. Rosa, I. Galve-Roperh, C. Sanchez, G. Velasco y L. Gonzalez-Feria "A Pilot Clinical Study of Delta(9)-Tetrahydrocannabinol in Patients with Recurrent Glioblastoma Multiforme" *British Journal of Cancer* **2006**, 95, 197.

### 1.3.5.- DROGODEPENDENCIA:

Una de las aplicaciones más prometedoras de los antagonistas cannabinoides CB<sub>1</sub> es su uso en los fenómenos de dependencia<sup>98</sup>.

El sistema endocannabinoide participa en las propiedades adictivas de todas las drogas de abuso mediante tres mecanismos que actúan de forma complementaria. El primer mecanismo está implicado en los fenómenos de recompensa de nicotina, alcohol y opioides ya que permite su acción en la transmisión mesolímbica. El segundo se encuentra implicado en la motivación por el consumo de la droga actuando por mecanismos independientes de dopamina. El último se relaciona con los fenómenos de recaída siendo este mecanismo por el cual los antagonistas cannabinoides CB<sub>1</sub> son unos prometedores candidatos para la deshabituación a varios tipos de drogas de abuso como la nicotina, el alcohol e incluso la heroína.

La reducción de la dependencia al alcohol se pudo confirmar en ensayos clínicos que se llevaron a cabo con el rimonabant<sup>99</sup> que también ha sido probado en ensayos clínicos para la terapia contra la adicción al tabaco, aunque actualmente estos ensayos han sido parados debido a la suspensión del medicamento.

---

<sup>98</sup> D. Parolaro y T. Rubino "The Role of the Endogenous Cannabinoid System in Drug Addiction" *Drug News & Perspectives* **2008**, 21, 149. R. Maldonado, O. Valverde y F. Berrendero "Involvement of the Endocannabinoid System in Drug Addiction" *Trends in Neurosciences* **2006**, 29, 225.

<sup>99</sup> G. Colombo, A. Orru, P. Lai, C. Cabras, P. Maccioni, M. Rubio, G. L. Gessa y M. A. M. Carai "The Cannabinoid Cb(1) Receptor Antagonist, Rimonabant, as a Promising Pharmacotherapy for Alcohol Dependence: Preclinical Evidence" *Molecular Neurobiology* **2007**, 36, 102.

### 1.3.6.- OTRAS APLICACIONES TERAPEÚTICAS:

Los cannabinoides tienen también especial importancia en otros campos terapéuticos, como en el sistema cardiovascular<sup>100</sup>, produciendo una reducción de la agregación plaquetaria, hipotensión ortostática y vasodilatación periférica.

La empresa farmacéutica Sanofi-Aventis desarrolló el compuesto AVE-1625<sup>101</sup> como antagonista CB<sub>1</sub> para el tratamiento de las disfunciones cognitivas en pacientes que sufren esquizofrenia y en los que sufren la enfermedad de Alzheimer.

En el campo de la osteoporosis, el sistema endocannabinoide desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la masa ósea. Así pues, los receptores CB<sub>2</sub> son buenas dianas terapéuticas para el diagnóstico y el tratamiento de dicha enfermedad<sup>102</sup>.

### 1.4.- Caracterización farmacológica de ligandos cannabinoides:

En la actualidad la caracterización farmacológica de los ligandos cannabinoides se lleva a cabo utilizando varios tipos de ensayos farmacológicos. A continuación se describen las características y la finalidad de estos ensayos.

*Ensayos de desplazamiento de radioligando* – A pesar de los avances de la biología molecular, los estudios de unión de radioligandos constituyen todavía

---

<sup>100</sup> C. J. Hillard "Endocannabinoids and Vascular Function" *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2000**, 294, 27.

<sup>101</sup> M. D. Black, R. J. Stevens, N. Rogacki, R. E. Featherstone, Y. Senyah, O. Giardino, B. Borowsky, J. Stemmelin, C. Cohen, P. Pichat, M. Arad, S. Barak, A. De Levie, I. Weiner, G. Griebel y G. B. Varty "Ave1625, a Cannabinoid Cb1 Receptor Antagonist, as a Co-Treatment with Antipsychotics for Schizophrenia: Improvement in Cognitive Function and Reduction of Antipsychotic-Side Effects in Rodents" *Psychopharmacology* **2011**, 215, 149.

<sup>102</sup> O. Ofek, M. Karsak, N. Leclerc, M. Fogel, B. Frenkel, K. Wright, J. Tam, M. Attar-Namdar, V. Kram, E. Shohami, R. Mechoulam, A. Zimmer y I. Bab "Peripheral Cannabinoid Receptor, Cb2, Regulates Bone Mass" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, 103, 696.

una herramienta eficaz y ampliamente utilizada para valorar la unión fármaco-receptor y para cuantificar y localizar un determinado receptor.

Un aspecto importante que debe considerarse es la afinidad y especificidad del radioligando por el receptor.<sup>103</sup> En general, el mejor ligando será el de mayor afinidad por el receptor. Así pueden usarse concentraciones bajas, lo que redundará en una menor unión inespecífica. Sin embargo, para ello es necesario que el radioligando posea una elevada actividad específica. También debe considerarse la especificidad de la unión. Son buenos ligandos aquellos que presentan porcentajes de unión específica superior al 70%, y excelentes los que alcanzan el 90% de la unión total. Además, es importante que el radioligando sea selectivo. Muchos radioligandos son capaces de unirse a más de un tipo de receptor, o bien no distinguen entre los diversos subtipos de un mismo receptor. Este es un factor que debe considerarse para definir experimentalmente la unión no específica en los ensayos de unión.

La valoración de la unión ligando-receptores cannabinoides se suele realizar en células transfectadas por receptores cannabinoides recombinantes humanos CB<sub>1</sub> o CB<sub>2</sub>. En cuanto a los radioligandos, el más usado es el [<sup>3</sup>H]CP55940 que no es selectivo CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub>. Por ello, se evaluó *in vitro* la capacidad de nuestros compuestos para desplazar al cannabinoide CP55940 marcado radioactivamente con tritio.<sup>104</sup> Tal y como se describe en el capítulo “Parte experimental farmacología” de esta tesis doctoral, el ensayo se realizó en membranas de células transfectadas con los receptores humanos CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. La afinidad por los receptores se midió en función del porcentaje de desplazamiento de radioligando [<sup>3</sup>H]-CP55940. Los compuestos se analizaron a una concentración de 40 μM.

---

<sup>103</sup> I. M. Klotz "Ligand-Receptor Interactions - What We Can and Cannot Learn from Binding Measurements" *Trends in Pharmacological Sciences* **1983**, 4, 253.

<sup>104</sup> Merighi, S.; Simioni, C.; Gessi, S. Binding thermodynamics at the human cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors. *Biochem. Pharmacol.*, **2010**, 79, 471-477.

Se hace un primer *screening* obteniéndose valores de desplazamientos expresados en porcentajes de radioligando tritiado desplazado. En esa primera aproximación, se considera de manera general que, los compuestos que presentan valores de desplazamiento inferior al 50% no tienen afinidad por el receptor ensayado ( $K_i > 40 \mu\text{M}$ ). Si este valor está incluido entre el 50 y el 80% la afinidad por el receptor está considerada moderada, y con un desplazamiento superior al 80% los compuestos presentan una buena afinidad. Aquellos cuyo porcentaje de afinidad superó el 70% pasaron a un segundo ensayo de competición a distintas concentraciones obteniéndose así su constante de afinidad ( $K_i$ ) por el receptor.

*Ensayos en tejidos aislados* – Otros tipos de ensayo para evaluar la funcionalidad de un ligando cannabinoide, es decir, si activa (agonista) o bloquea (antagonista) la actividad del receptor son los ensayos realizados en tejidos aislados. El conducto deferente de ratón es normalmente usado para caracterizar agonistas y antagonistas cannabinoides.<sup>105</sup>

El ensayo consiste en la valoración de la respuesta contráctil inducida por estimulación eléctrica. Varios receptores median la inhibición de esta respuesta en este tejido, como, por ejemplo, receptores adrenérgicos y cannabinoides para el conducto deferente de ratón. Existen evidencias farmacológicas de que los receptores cannabinoides  $\text{CB}_1$  están presentes en este tipo de tejido,<sup>106</sup> y no se puede descartar la existencia del otro tipo de receptor cannabinoide ( $\text{CB}_2$ ).<sup>107</sup>

---

<sup>105</sup> R. G. Pertwee, L. A. Stevenson, D. B. Elrick, R. Mechoulam y A. D. Corbett "Inhibitory Effects of Certain Enantiomeric Cannabinoids in the Mouse Vas-Deferens and the Myenteric Plexus Preparation of Guinea-Pig Small-Intestine" *British Journal of Pharmacology* **1992**, 105, 980.

<sup>106</sup> R. G. Pertwee, G. JoeAdigwe y G. M. Hawksworth "Further Evidence for the Presence of Cannabinoid  $\text{Cb}_1$  Receptors in Mouse Vas Deferens" *European Journal of Pharmacology* **1996**, 296, 169.

<sup>107</sup> G. Griffin, S. R. Fernando, R. A. Ross, N. G. McKay, M. L. J. Ashford, D. Shire, J. W. Huffman, S. Yu, J. A. H. Lainton y R. G. Pertwee "Evidence for the Presence of  $\text{Cb}_2$ -Like Cannabinoid Receptors on Peripheral Nerve Terminals" *European Journal of Pharmacology* **1997**, 339, 53.

Los agonistas cannabinoides CB<sub>1</sub> producen una inhibición de la contracción inducida eléctricamente en estas preparaciones, mediante un mecanismo de bloqueo de la liberación de acetilcolina.<sup>108</sup> En cambio, los antagonistas no producen este efecto, e incluso los agonistas inversos producen el efecto contrario (aumento de la contracción).

*Tetrada cannabinoide in vivo* – Existe un modelo aceptado para evaluar los efectos centrales de los ligandos cannabinoides *in vivo* denominado la tetrada cannabinoide.<sup>109</sup> Se trata de cuatro experimentos: medida de la temperatura, analgesia, catalepsia, y medida de la actividad locomotora. Los agonistas cannabinoides inducen hipotermia, antinocicepción, catalepsia e inhibición de la actividad espontánea. En cambio, los antagonistas no modifican por sí mismos los parámetros ensayados pero si revierten los efectos producidos por un agonista.

---

<sup>108</sup> A. A. Coutts y R. G. Pertwee "Inhibition by Cannabinoid Receptor Agonists of Acetylcholine Release from the Guinea-Pig Myenteric Plexus" *British Journal of Pharmacology* **1997**, *121*, 1557.

<sup>109</sup> D. R. Compton, K. C. Rice, B. R. Decosta, R. K. Razdan, L. S. Melvin, M. R. Johnson y B. R. Martin "Cannabinoid Structure-Activity-Relationships - Correlation of Receptor-Binding and In vivo Activities" *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1993**, *265*, 218. J. L. Wiley y B. R. Martin "Cannabinoid Pharmacological Properties Common to Other Centrally Acting Drugs" *European Journal of Pharmacology* **2003**, *471*, 185.



## 2.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS:

El principal objetivo de nuestro grupo de trabajo se centra en el diseño, la síntesis y la evaluación farmacológica de nuevos ligandos de receptores cannabinoides. En este contexto, hemos descubierto varias familias de cannabinoides de estructuras variadas, como por ejemplo los 1,2,4-triazoles<sup>110</sup>, las 1,2,6-tiadiazinas<sup>111</sup>, los cromenopirazoles<sup>112</sup> o los derivados de ácidos grasos<sup>113</sup>.

También se han estudiado variaciones estructurales del propio rimonabant dando lugar a resultados interesantes. Entre los compuestos descritos por nosotros cabe destacar el pirazol representado en la figura 14 que mostró buena afinidad por el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> en ensayos realizados en membranas de córtex frontal humano *postmortem*.

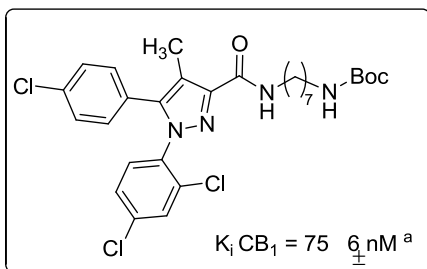
---

<sup>110</sup> N. Jagerovic, L. Hernandez-Folgado, I. Alkorta, P. Goya, M. Navarro, A. Serrano, F. R. de Fonseca, M. T. Dannert, A. Alsasua, M. Suardiaz, D. Pascual y M. I. Martín "Discovery of 5-(4-Chlorophenyl)-1-(2,4-Dichlorophenyl)-3-Hexyl-1h-1,2,4-Triazole, a Novel in Vivo Cannabinoid Antagonist Containing a 1,2,4-Triazole Motif" *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 2939.

<sup>111</sup> C. Cano, P. Goya, J. A. Paez, R. Giron, E. Sanchez y M. I. Martín "Discovery of 1,1-Dioxo-1,2,6-Thiadiazine-5-Carboxamide Derivatives as Cannabinoid-Like Molecules with Agonist and Antagonist Activity" *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15*, 7480.

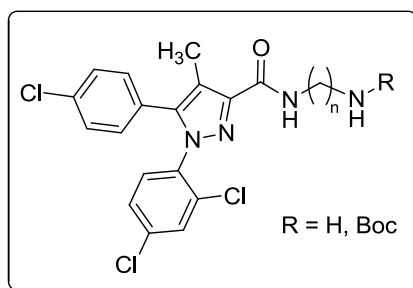
<sup>112</sup> J. Cumella, L. Hernandez-Folgado, R. Giron, E. Sanchez, P. Morales, D. P. Hurst, M. Gomez-Canas, M. Gomez-Ruiz, D. C. G. A. Pinto, P. Goya, P. H. Reggio, M. Isabel Martín, J. Fernandez-Ruiz, A. M. S. Silva y N. Jagerovic "Chromenopyrazoles: Non-Psychoactive and Selective Cb1 Cannabinoid Agonists with Peripheral Antinociceptive Properties" *Chemmedchem* **2012**, *7*, 452.

<sup>113</sup> C. Cano, J. Antonio Paez, P. Goya, A. Serrano, J. Pavon, F. Rodriguez de Fonseca, M. Suardiaz y M. Isabel Martín "Synthesis and Pharmacological Evaluation of Sulfamide-Based Analogues of Anandamide" *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *44*, 4889.



**Figura 14.** <sup>a</sup>Ensayos realizados en membranas de córtex frontal humano *postmortem* empleando [<sup>3</sup>H]-CP55940 como radioligando.

El objetivo de este capítulo consiste en el estudio de series de aminoalquilpirazoles, cuyas estructuras están relacionadas con este cabeza de serie, variando la longitud y características de la cadena alquílica y preparando derivados con el grupo amino libre y protegido.



**Figura 15.** Aminoalquilpirazoles del estudio.

### 3.- *N*-AMINOALQUILPIRAZOLCARBOXAMIDAS:

#### 3.1.- *N*-aminoalquilpirazolcarboxamidas carbamatos de *terc*-butilo:

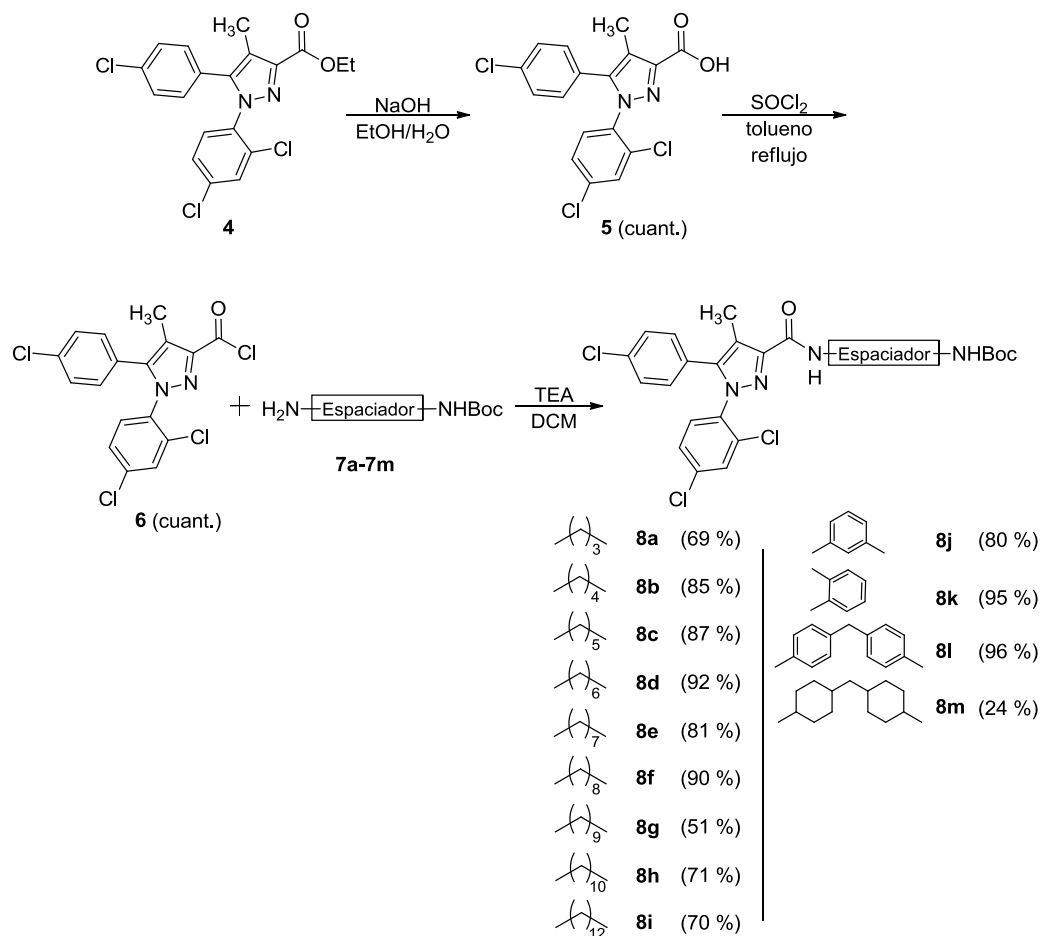
##### 3.1.1.- SÍNTESIS *N*-AMINOALQUILPIRAZOLCARBOXAMIDAS CARBAMATOS DE *terc*-BUTILO:

La ruta sintética descrita en el esquema 1 nos condujo a los compuestos propuestos. Para ello, se partió del 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxilato de etilo **4** que se sintetizó siguiendo un método descrito en la bibliografía<sup>110</sup>. Tras una hidrólisis básica para conseguir el ácido carboxílico **5** y posterior tratamiento con cloruro de tionilo se generó el cloruro de ácido **6** que se utilizó en el paso siguiente sin previa purificación. Finalmente, el cloruro de ácido **6** reaccionó con las diaminas monoprotegidas deseadas en presencia de trietilamina para dar lugar a los compuestos correspondientes **8a-8m** (Esquema 1).

Se consiguieron buenos rendimientos con excepción del compuesto **8m** cuyo bajo rendimiento se debió a un problema ocurrido durante la purificación.

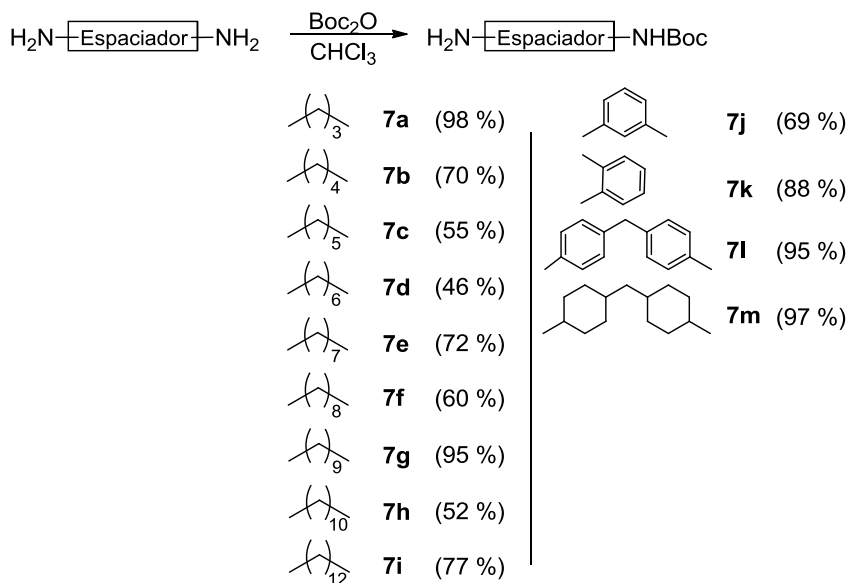
---

<sup>110</sup> V. K. Kotagiri, S. Suthrapu, J. M. Reddy, C. P. Rao, V. Bollugoddu, A. Bhattacharya y R. Bandichhor "An Improved Synthesis of Rimonabant: Anti-Obesity Drug" *Organic Process Research & Development* **2007**, *11*, 910.



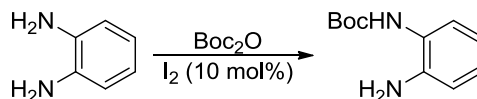
Esquema 1

Para llevar a cabo esta síntesis, fue necesaria la obtención de diaminas *N*-monoprotegidas. El grupo protector elegido fue el di-*tert*-butoxicarbonil-dicarbonato (Boc). Se consiguieron las aminas monoprotegidas **7a-7m** con rendimientos de moderados a buenos utilizando un exceso de diamina (5 equivalentes) frente al dicarbamato de di-*tert*-butilo ( $\text{Boc}_2\text{O}$ ) (Esquema 2).



Esquema 2

En 2006, el grupo de Adapa<sup>111</sup> describió la monoprotección de diaminas por un grupo Boc sin disolventes y en presencia catalítica de I<sub>2</sub>. Para evitar la utilización de disolventes orgánicos y conseguir una síntesis mediante química verde, nos pareció interesante probar este método para la preparación de nuestras aminas monoprotegidas.



Esquema 3

Por ello, empezamos con la 1,2- fenilendiamina siguiendo las condiciones de reacción descritas por el grupo de Adapa que obtiene un rendimiento del 85% utilizando un equivalente de Boc<sub>2</sub>O por cada equivalente de 1,2- fenilendiamina, en presencia de una cantidad catalítica de I<sub>2</sub> tras cuatro horas de reacción a temperatura ambiente.

<sup>111</sup> R. Varala, S. Nuvula y S. R. Adapa "Molecular Iodine-Catalyzed Facile Procedure for N-Boc Protection of Amines" *Journal of Organic Chemistry* **2006**, 71, 8283.

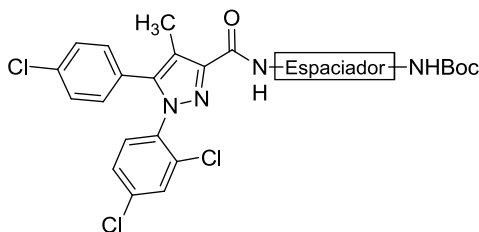
Intentando reproducir la monoprotección de la 1,2- fenilendiamina en estas condiciones, no solamente recuperamos diamina de partida sin reaccionar, sino que además, se obtuvo un 44% de diamina diprotegida frente a un 8% de la especie monoprotegida deseada. Utilizando un exceso de diamina, no conseguimos disminuir la cantidad de producto diprotegido formado. Así, ninguno de los intentos realizados fueron satisfactorios ya que en todos los casos se consiguió la amina diprotegida en altas proporciones. Debido a esto, decidimos no utilizar este método de síntesis y seguir preparando nuestras aminas **7a-7m** por el método tradicional.



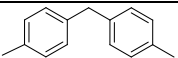
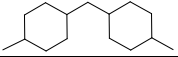
La caracterización estructural de los intermedios y productos finales descritos en este apartado se determinaron sin ambigüedad en base a sus datos analíticos de espectrometría de masas y de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , y de análisis elemental en caso de productos finales tal y como se recoge en la parte experimental.

### 3.1.2.- EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA:

De la serie de compuestos **8a-8m** obtenidos se realizaron estudios farmacológicos *in vitro* de desplazamiento de radioligando y de funcionalidad en tejidos aislados.

*Ensayos de desplazamiento de radioligando* – Los resultados obtenidos de la evaluación del desplazamiento del radioligando se encuentran recogidos en la siguiente tabla. Se han incluido los datos del rimonabant y del  $\Delta^9$ -THC como compuestos de referencia.



Compuesto	Espaciador	K <sub>i</sub> (nM) CB <sub>1</sub>	K <sub>i</sub> (nM) CB <sub>2</sub>
<b>8a</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	28.5	>40 μM
<b>8b</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	>40 μM	>40 μM
<b>8c</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	2160	>40 μM
<b>8d</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	>40 μM	>40 μM
<b>8e</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub>	261	>40 μM
<b>8f</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub>	>40 μM	>40 μM
<b>8g</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub>	>40 μM	>40 μM
<b>8h</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub>	>40 μM	>40 μM
<b>8i</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub>	>40 μM	>40 μM
<b>8j</b>		4520	>40 μM
<b>8k</b>		16523	3040
<b>8l</b>		>40 μM	>40 μM
<b>8m</b>		Insoluble a 10 mM	Insoluble a 10 mM
<b>Rimonabant<sup>a</sup></b>		1.8	> 1000
<b>Δ<sup>9</sup>-THC<sup>a</sup></b>		40.7	36.4

**Tabla 1.** Constantes de afinidad. <sup>a</sup>R. Vidal, E. Castro, A. Pazos, *Avances Recientes En La Farmacología Del Sistema Endocannabinoide*, in *Actualización Sobre El Potencial Terapéutico De Los Cannabinoides*. 2009: Madrid. p. 33 y 37.

Como se puede observar en la tabla 1, los compuestos **8a**, **8c**, **8e** y **8j** mostraron buena afinidad por el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> siendo los compuestos **8a** y **8e** ligandos muy afines en el rango nanomolar (28.5 nM y 261 nM respectivamente), por lo que el compuesto **8a** fue seleccionado para posteriores pruebas farmacológicas. Respecto al receptor cannabinoide CB<sub>2</sub>, ninguno de los

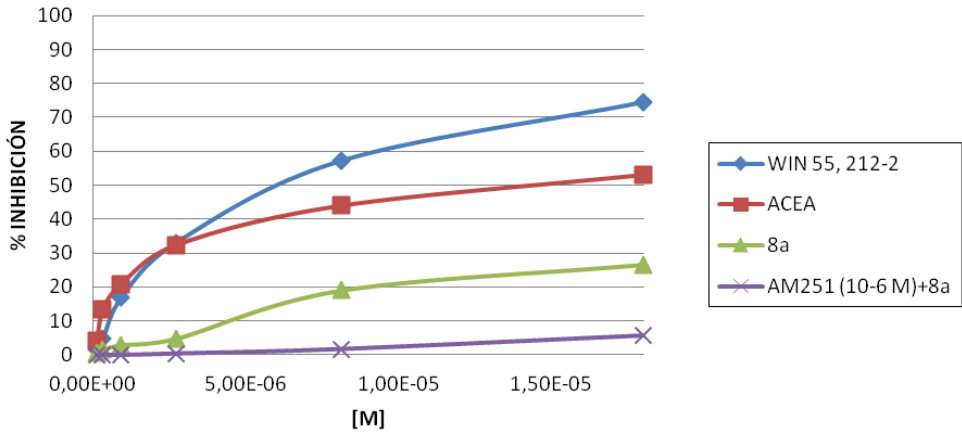
compuestos ensayados mostraron afinidad por el receptor cannabinoide CB<sub>2</sub> a excepción del compuesto **8k** que mostró una afinidad débil.

No se han podido obtener valores de desplazamiento para el compuesto **8m** puesto que es insoluble a la concentración de 10 mM. Esta concentración es la más pequeña aceptada en la realización de los ensayos de desplazamiento de radioligando puesto que a concentraciones inferiores a 10 mM los resultados que se obtendrían no serían fiables.

*Ensayos en tejidos aislados* – Una vez que el producto **8a** se había identificado como buen ligando cannabinoide, había que determinar si funcionaba como agonista o antagonista. Para ello, el compuesto **8a** fue sometido a ensayos de funcionalidad en conducto deferente de ratón con el fin de caracterizar su actividad agonista o antagonista cannabinoide.

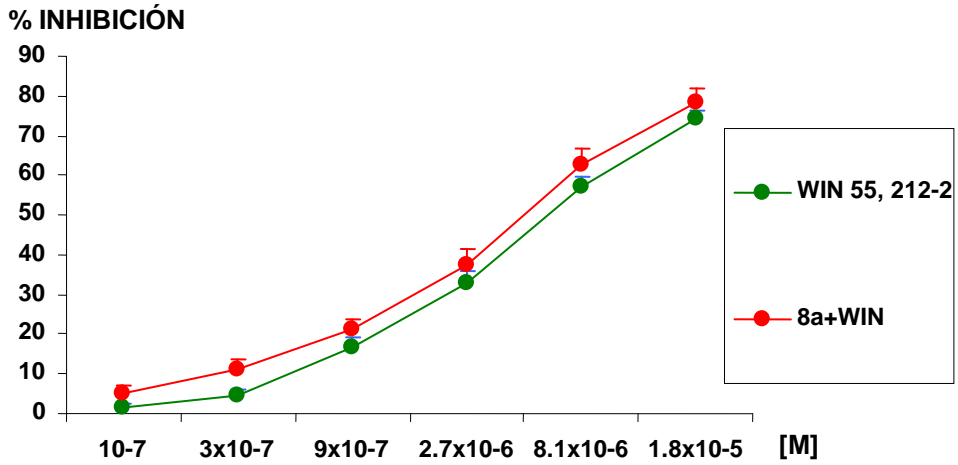
En primer lugar se evaluó la actividad agonista de **8a** administrándolo en un intervalo de concentraciones crecientes ( $10^{-7}$  -  $1.8 \times 10^{-5}$  M) al baño de órganos. Como se puede observar en la gráfica 1, el compuesto **8a** inhibe la actividad contráctil de la preparación del conducto deferente de ratón indicando una actividad agonista. Sin embargo, mostró menos eficacia que los dos cannabinoides de referencia WIN y ACEA. Para saber si este efecto es debido a una acción sobre los receptores cannabinoides y no a la activación de otro receptor presente en el tejido, se realizó el ensayo en presencia del antagonista del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> AM251 ( $10^{-6}$  M). Como se observa en la gráfica 1 (AM251 + **8a**), el AM251 antagoniza el efecto del compuesto **8a**, por lo que se puede concluir que **8a** es un compuesto agonista cannabinoide.



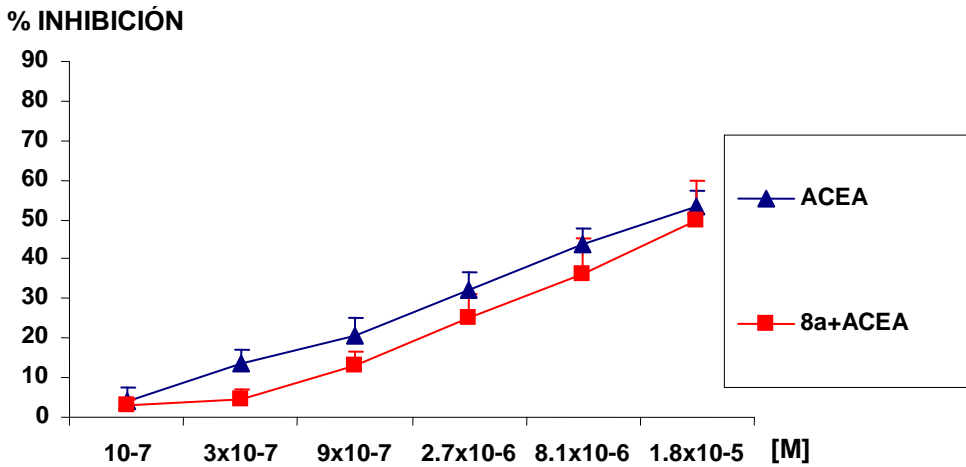


**Gráfica 1.** Efecto inhibitorio sobre la respuesta contráctil del compuesto **8a**, del WIN552122 y de la ACEA.

Se realizaron ensayos adicionales para comprobar un posible efecto antagonista del compuesto **8a**. Para ello se administró una dosis única de dicho compuesto al baño de órganos. La preparación se incubó y posteriormente se determinó la curva por adición de concentraciones crecientes del agonista WIN55,2122 ( $10^{-7}$  -  $1.8 \times 10^{-5}$  M) o del agonista ACEA ( $10^{-7}$  -  $1.8 \times 10^{-5}$  M). Así se observó si el compuesto bloqueaba el efecto inhibitorio de la contracción producido por el agonista patrón. El compuesto **8a** ( $10^{-6}$  M) no modifica el efecto inhibitorio de la contracción inducida por los agonistas WIN 55,212-2 y ACEA (gráficas 2 y 3), por lo que podemos descartar que se comporte como un antagonista cannabinoide.



**Gráfica 2.** Efecto inhibitorio sobre la respuesta contráctil del compuesto **8a** y del WIN552122.

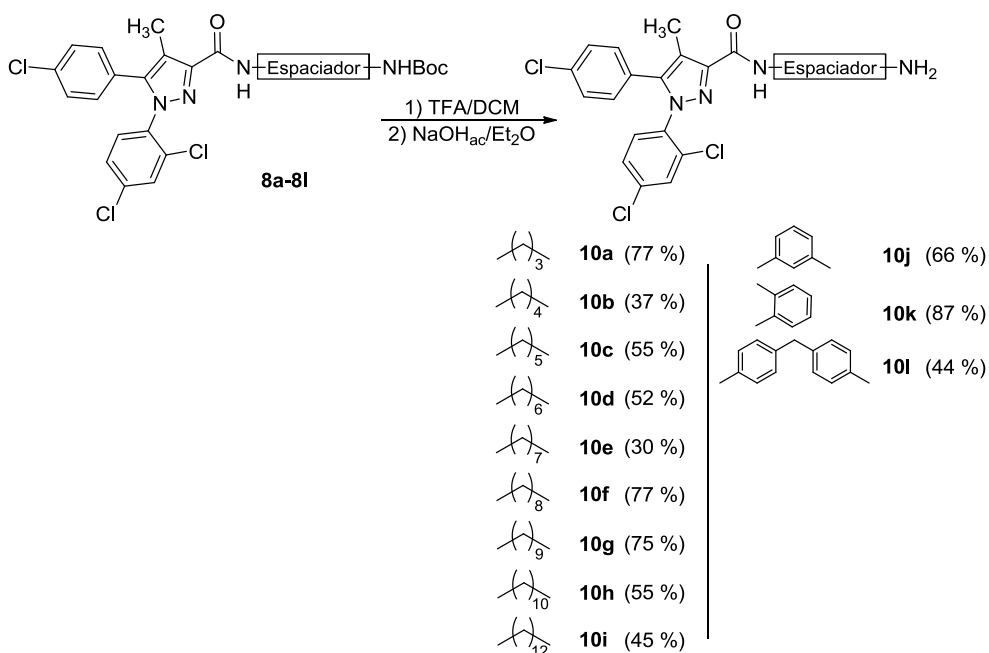


**Gráfica 3.** Efecto inhibitorio sobre la respuesta contráctil del compuesto **8a** y de la ACEA.

### 3.2.- *N*-aminoalquilpirazolcarboxamidas:

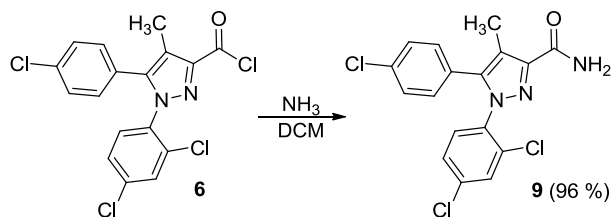
#### 3.1.1.- SÍNTESIS *N*-AMINOALQUILPIRAZOLCARBOXAMIDAS:

Para la preparación de las *N*-aminoalquilpirazolcarboxamidas propuestas, se partió de los compuestos **8a-8l** cuya preparación se describe en el apartado anterior de esta tesis. La desprotección de dichas aminas protegidas con el grupo Boc se realizó en medio ácido con ácido trifluoroacético. La sal resultante se liberó mediante una solución bifásica de NaOH<sub>ac</sub> / Et<sub>2</sub>O para dar lugar a las pirazolcarboxamidas **10a-10l** deseadas con rendimientos moderados (Esquema 4).



**Esquema 4**

Con el fin de estudiar también el compuesto de amina libre sin espaciador, se sintetizó el pirazol **9**. Para ello se partió del cloruro de ácido **6**, cuya síntesis se explicó en el apartado 3.1.1, al que se le hizo reaccionar con NH<sub>3</sub> comercial según el esquema 5 siguiente, para obtener el compuesto **9** deseado con buen rendimiento.



Esquema 5

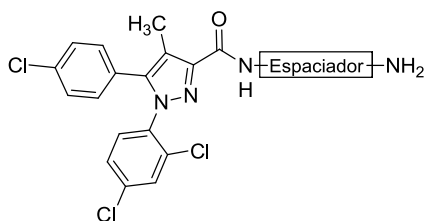
La caracterización estructural de los intermedios y productos finales descritos en este apartado se llevó a cabo sin ambigüedad en base a sus datos analíticos, de espectrometría de masas, de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , que están recogidos en la parte experimental.

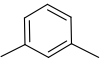
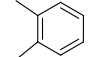
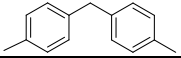
### 3.1.2.- EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA:

Se realizaron estudios farmacológicos *in vitro* de desplazamiento de radioligando para el compuesto **9** y para la serie de compuestos **10a-10m** obtenidos.

*Ensayos de desplazamiento de radioligando* – Los resultados obtenidos de la evaluación del desplazamiento del radioligando se encuentran recogidos en la siguiente tabla 2. Se han incluido los valores bibliográficos del rimonabant y del  $\Delta^9$ -THC como compuestos de referencia.

Desafortunadamente, no se han podido obtener valores de desplazamiento para los compuestos **9** y **10i** puesto que son insolubles a la concentración de 10 mM.



Compuesto	Espaciador	K <sub>i</sub> (nM) CB <sub>1</sub>	K <sub>i</sub> (nM) CB <sub>2</sub>
<b>10a</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	104 ± 81	2560 ± 1315
<b>10b</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	1 ± 0.09	121 ± 27
<b>10c</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	386 ± 187	872 ± 225
<b>10d</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	133 ± 28	494 ± 256
<b>10e</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub>	6 ± 3	349 ± 179
<b>10f</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub>	151 ± 85	526 ± 39
<b>10g</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub>	351 ± 283	356 ± 58
<b>10h</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub>	31 ± 11	343 ± 58
<b>10i</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub>	Insoluble a 10 mM	Insoluble a 10 mM
<b>10j</b>		76 ± 6	176 ± 48
<b>10k</b>		23 ± 10	80 ± 1
<b>10l</b>		43 ± 14	>40μM
<b>9</b>		Insoluble a 10 mM	Insoluble a 10 mM
<b>Rimonabant<sup>a</sup></b>		1.8	> 1000
<b>THC<sup>a</sup></b>		40.7	36.4

**Tabla 2.** Constantes de afinidad. <sup>a</sup>R. Vidal, E. Castro, A. Pazos, *Avances Recientes En La Farmacología Del Sistema Endocannabinoide*, in *Actualización Sobre El Potencial Terapéutico De Los Cannabinoides*. 2009: Madrid. p. 33 y 37.

Como se observa en la tabla 2, se consiguieron constantes de afinidad de moderadas a excelentes. Cabe destacar la alta afinidad por el receptor CB<sub>1</sub> de los compuestos **10b**, **10e**, **10h**, **10j-10l**, siendo los valores de los derivados butilamino (**10b**) y heptilamino (**10e**) comparables a los valores del propio rimonabant.

En cuanto a la afinidad por el receptor CB<sub>2</sub>, a excepción de los compuestos **10a** y **10l**, los diarilpirazoles de esta serie mostraron una afinidad significativa por el receptor cannabinoide CB<sub>2</sub>. Es interesante destacar la diferencia de selectividad existente entre esta nueva serie de diarilpirazoles y el propio rimonabant. Al contrario que él, los nuevos derivados son capaces de unirse al receptor CB<sub>2</sub> de forma que podrían tener propiedades y aplicaciones terapéuticas distintas.

De estos resultados se puede deducir que la naturaleza del espaciador alquilo o arilo no parece modificar de manera significativa la unión a los receptores.

Por tanto, observando estos datos se eligieron los compuestos **10b**, **10e**, **10h**, **10j** y **10k** para seguir ensayándolos en posteriores pruebas farmacológicas por ser los que presentan mayor afinidad por los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>.

#### 4.- CONCLUSIÓN:

En este capítulo de la tesis doctoral se ha descrito la síntesis de *N*-aminoalquilpirazolcarboxamidas carbamatos de *terc*-butilo y *N*-aminoalquilpirazolcarboxamidas y la evaluación farmacológica de dichos compuestos frente a los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. En concreto, las conclusiones más significativas del capítulo son las siguientes:

- De la primera serie de *N*-aminoalquilpirazolcarboxamidas carbamatos de *terc*-butilo sintetizadas destaca el compuesto 3-(5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamido)propil carbamato de *terc*-butilo (**8a**) por su alta afinidad por el receptor CB<sub>1</sub>. Los ensayos de funcionalidad realizados en tejido aislado revelaron su carácter agonista, es decir, que el compuesto **8a** activa el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>.
- Para los *N*-aminoalquilpirazolcarboxamidas carbamatos de *terc*-butilo **8c**, **8e**, **8j** y **8k**, se observó una selectividad en la afinidad hacia el receptor CB<sub>1</sub> mientras que para el resto de esta familia, no existe afinidad por ninguno de los dos receptores cannabinoides.
- En cuanto a la serie de las *N*-aminoalquilpirazolcarboxamidas, y a excepción del **9** y el **10i** que mostraron ser insolubles a concentraciones de 10 mM, se ha observado mediante ensayos de afinidad que todas poseen una buena afinidad por los dos receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>.
- Por lo tanto, comparando las dos familias, se podría decir que la desprotección de los *N*-aminoalquilpirazolcarboxamidas carbamatos de *terc*-butilo para obtener las *N*-aminoalquilpirazolcarboxamidas les confiere alta afinidad por los receptores cannabinoides.





## CAPÍTULO 2. Aproximaciones para la obtención de fármacos hidrosolubles



## 1.- APROXIMACIONES PARA LA OBTENCIÓN DE FÁRMACOS SOLUBLES. INTRODUCCIÓN:

### 1.1.- Bioconjugados poliméricos:

Hoy en día existen nuevos abordajes terapéuticos de administración de fármacos. El empleo de nanosistemas y bioconjugados proporcionan nuevas perspectivas en este campo. El término de bioconjugado corresponde a entidades resultantes de la conjugación de anticuerpos, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos o cualquier molécula biológicamente activa con un grupo molecular capaz de modificar sus propiedades tal como toxinas, radionucleidos, fluoróforos, enzimas, partículas de oro o polímeros. Nuestro interés se ha dirigido hacia los bioconjugados poliméricos. Los polímeros que más se utilizan en la bioconjugación se pueden clasificar en dos tipos:

- (a) polímeros naturales: alginato, chitosán, pectina, ácido hialurónico, dextrano, pululano, manano, dextrina y proteínas,
- (b) polímeros sintéticos: poli(vinilpirrolidona) (PVP), polietilenglicol (PEG), copolímeros de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMA), alcohol polivinílico (PVA), poli(etilenimina) (PEI), poliamidoaminas, poli(estireno-co-ácido/anhídrido maleico) (SMA).

Se han estudiado y descrito las ventajas de la conjugación de moléculas a polímeros siendo algunas<sup>112</sup>:

- aumento de la solubilidad en agua (importante para moléculas de baja solubilidad como el taxol o la camptotecina);

---

<sup>112</sup> G. Pasut y F. M. Veronese "Polymer-Drug Conjugation, Recent Achievements and General Strategies" *Progress in Polymer Science* **2007**, 32, 933.

- mejora de la biodisponibilidad y aumento de la vida media plasmática, debido al aumento del volumen hidrodinámico que reduce la depuración renal;
- protección contra las enzimas degradantes;
- prevención o reducción de la agregación, inmunogenicidad y antigenicidad; y
- acumulación específica en órganos, tejidos o células, mediante polímeros activados o la explotación del efecto EPR (*enhanced permeability and retention effect*) (es la propiedad por la que moléculas de ciertos tamaños (liposomas, nanopartículas, y medicamentos macromoleculares) tienden a acumularse en el tejido tumoral mucho más que en los tejidos normales debido a que los vasos sanguíneos de los tumores son diferentes a los vasos sanguíneos normales porque tienen arquitecturas distintas y la regulación funcional disminuida, en particular la permeabilidad vascular en los tumores)<sup>113</sup>.

En este contexto, nuestra actividad investigadora se ha centrado en el desarrollo de conjugados poliméricos dirigidos a los receptores cannabinoides como diana terapéutica. Teniendo como objetivo el aumento de la solubilidad de los ligandos cannabinoides lipófilos elegimos el metoxipolietilenglicol (mPEG) como polímero. Esta estrategia, denominada PEGilación<sup>114</sup>, ha conducido a importantes resultados en terapia, biocatálisis orgánica y en diagnóstico.

---

<sup>113</sup> H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura y K. Hori "Tumor Vascular Permeability and the Epr Effect in Macromolecular Therapeutics: A Review" *Journal of Controlled Release* **2000**, 65, 271.

<sup>114</sup> A. Abuchowski, T. Vanes, N. C. Palczuk y F. F. Davis "Alteration of Immunological Properties of Bovine Serum-Albumin by Covalent Attachment of Polyethylene-Glycol" *Journal of Biological Chemistry* **1977**, 252, 3578. A. Abuchowski, J. R. McCoy, N. C. Palczuk, T. Vanes y F. F. Davis "Effect of Covalent Attachment of Polyethylene-Glycol on Immunogenicity and Circulating Life of Bovine Liver Catalase" *Journal of Biological*

## 1.2.- Polietilenglicol (PEG):

El polietilenglicol o PEG se sintetiza por polimerización con apertura aniónica del anillo del óxido de etileno utilizando metanol o agua como iniciador para producir metoxipolietilenglicol (mPEG) o diol polietilenglicol (PEG), respectivamente. Se ha utilizado durante mucho tiempo como excipiente en muchas formulaciones farmacéuticas y cosméticas mientras que los estudios en el campo de la conjugación y liberación de fármacos comenzaron hace tan sólo 30 años. El PEG presenta propiedades únicas tales como falta de inmunogenicidad, antigenicidad y toxicidad; una alta solubilidad en agua y en muchos disolventes orgánicos; alta hidratación y flexibilidad de la cadena; y tolerancia fisiológica habiendo sido aprobado por la FDA para el uso humano<sup>115</sup>. Entre una variedad de polímeros hidrofílicos, el PEG se ha convertido en un nanocomponente prometedor utilizándose como nanotransportador aumentando la solubilidad de fármacos como el docetaxel<sup>116</sup>.

Otra característica, importante para las aplicaciones farmacéuticas, es la baja polidispersidad, con un cociente  $M_w/M_n$  que va desde 1.01 para PEG < 5 kDa hasta 1.1 para PEG de hasta 50 kDa; siendo  $M_w$  el peso molecular promedio en peso que está basado en el hecho de que una molécula más grande contiene más de la masa total de la muestra polimérica que las moléculas pequeñas, y  $M_n$  el peso molecular promedio en número que es el peso total de todas las moléculas poliméricas contenidas en una muestra, dividido por el número total de moléculas poliméricas en dicha muestra.

---

*Chemistry* **1977**, 252, 3582. G. Pasut, A. Guiotto y F. Veronese "Protein, Peptide and Non-Peptide Drug Pegylation for Therapeutic Application" *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2004**, 14, 859.

<sup>115</sup> J. M. Harris y R. B. Chess "Effect of Pegylation on Pharmaceuticals" *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, 2, 214. M. J. Roberts, M. D. Bentley y J. M. Harris "Chemistry for Peptide and Protein Pegylation" *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, 459. S. Zalipsky "Chemistry of Polyethylene-Glycol Conjugates with Biologically-Active Molecules" *Advanced Drug Delivery Reviews* **1995**, 16, 157.

<sup>116</sup> P. Zhao y D. Astruc "Docetaxel Nanotechnology in Anticancer Therapy" *Chemmedchem* **2012**, 7, 952.

El PEG es considerado un polímero no biodegradable, de hecho sólo se ha documentado una lenta degradación por la alcohol deshidrogenasa<sup>117</sup>, aldehído deshidrogenasa<sup>118</sup> y citocromo P-450<sup>119</sup>. Su eliminación del organismo depende de su peso molecular y, así, por debajo de 20 kDa es fácilmente secretado en la orina, mientras que PEG de mayores pesos moleculares se eliminan más lentamente a través de ella. Sin embargo, la eliminación de estos PEG de mayores pesos moleculares a través del hígado se convierte en predominante. El umbral para la filtración en los riñones es de unos 40-60 kDa (un radio hidrodinámico de aproximadamente 45Å)<sup>120</sup>, lo que representa el límite de excreción de albúmina. Por encima de este límite el polímero permanece en la circulación más tiempo y se acumula en el hígado. La cinética plasmática de los PEG ha sido estudiada encontrándose que depende tanto del peso molecular como del sitio de inyección.

### 1.3.- Conjugados PEG-proteína:

En los últimos años, la conjugación de proteínas y/o péptidos con moléculas de polietilenglicol ha tenido un fuerte impacto en la industria bio-farmacéutica. La PEGilación de proteínas ha sido utilizada con el fin de mejorar las propiedades fisicoquímicas de dichas proteínas. Así pues, permite prolongar el tiempo de retención en el organismo, mejorar la estabilidad, aumentar la solubilidad y disminuir la proteólisis y la excreción renal.

---

<sup>117</sup> F. Kawai "Microbial Degradation of Polyethers" *Applied Microbiology and Biotechnology* **2002**, 58, 30.

<sup>118</sup> R. Mehvar "Modulation of the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Proteins by Polyethylene Glycol Conjugation" *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2000**, 3, 125.

<sup>119</sup> M. Beranova, R. Wasserbauer, D. Vancurova, M. Stifter, J. Ocenaskova y M. Mara "Effect of Cytochrome-P-450 Inhibition and Stimulation on Intensity of Polyethylene Degradation in Microsomal Fraction of Mouse and Rat Livers" *Biomaterials* **1990**, 11, 521.

<sup>120</sup> K. Petrak y P. Goddard "Transport of Macromolecules across the Capillary Walls" *Advance drug delivery review* **1989**, 3, 191.

La FDA ha aprobado desde los años 90 varios bioconjugados proteína-PEG con aplicaciones terapéuticas diversas. Por ejemplo, Adagen<sup>®121</sup>, un conjugado PEG-ademasa bovina, fue la primera proteína PEGilada en ser comercializada. Se utilizó para el tratamiento de la enfermedad de inmunodeficiencia combinada severa. En este caso concreto, el empleo de PEG hizo aumentar el tiempo de presencia de la ademasa bovina en el plasma y reducir su inmunogenicidad. También podemos citar como ejemplos Oncaspar<sup>®122</sup> (PEG-asparginasa), Pegasys<sup>®123</sup> (PEG-interferón ramificado  $\alpha 2a$ ), PEG-Intron<sup>®124</sup> (PEG-interferón lineal  $\alpha 2b$ ), Neulasta<sup>®125</sup> PEG-factor estimulante de colonias de granulocitos), Mircera<sup>®</sup> (mPEG-epoetina beta) o más recientemente Cimzia (Certolizumab pegol) (figuras 16).

---

<sup>121</sup> Y. Levy, M. S. Hershfield, C. Fernandezmeja, S. H. Polmar, D. Scudiery, M. Berger y R. U. Sorensen "Adenosine-Deaminase Deficiency with Late Onset of Recurrent Infections Response to Treatment with Polyethylene-Glycol Modified Adenosine-Deaminase" *Journal of Pediatrics* **1988**, *113*, 312.

<sup>122</sup> M. L. Graham "Pegaspargase: A Review of Clinical Studies" *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, 1293.

<sup>123</sup> P. Bailon, A. Palleroni, C. A. Schaffer, C. L. Spence, W. J. Fung, J. E. Porter, G. K. Ehrlich, W. Pan, Z. X. Xu, M. W. Modi, A. Farid y W. Berthold "Rational Design of a Potent, Long-Lasting Form of Interferon: A 40 Kda Branched Polyethylene Glycol-Conjugated Interferon Alpha-2a for the Treatment of Hepatitis C" *Bioconjugate Chemistry* **2001**, *12*, 195. K. R. Reddy, M. W. Modi y S. Pedder "Use of Peginterferon A1fa-2a (40 Kd) (Pegasys (R)) for the Treatment of Hepatitis C" *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 571.

<sup>124</sup> Y. S. Wang, S. Youngster, M. Grace, J. Bausch, R. Bordens y D. F. Wyss "Structural and Biological Characterization of Pegylated Recombinant Interferon Alpha-2b and Its Therapeutic Implications" *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 547.

<sup>125</sup> O. Kinstler, G. Molineux, M. Treuheit, D. Ladd y C. Gegg "Mono-N-Terminal Poly(Ethylene Glycol)-Protein Conjugates" *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 477.



**Figura 16.** Conjugados PEG-proteína.

Todos estos ejemplos comercializados son claramente un éxito del proceso de la PEGilación de proteínas y muestra que gracias al empleo de bioconjugados poliméricos se pueden mejorar las propiedades de las proteínas terapéuticas.

#### 1.4.- Conjugados PEG-fármaco:

Algunos de los problemas más frecuentes en el uso de fármacos de bajo peso molecular, especialmente los antitumorales, son su baja solubilidad, rápida excreción y biodistribución indirecta. Todos estos factores podrían ser abordados mediante la PEGilación. Generalmente, las propiedades de PEG se transmiten a los fármacos conjugados y así su destino en el organismo refleja el destino del polímero.

La química de la conjugación de fármacos no proteicos a polímeros, se enfrenta a menos problemas debido al reducido número de grupos funcionales presentes en una molécula pequeña, a la ausencia de una conformación rígida y a una

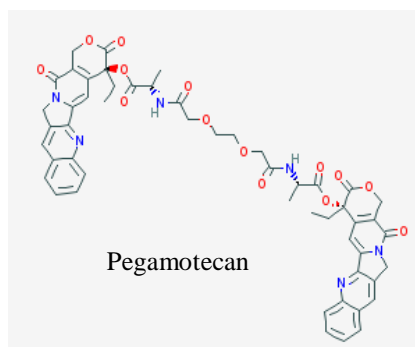


purificación y una caracterización más sencillos de los conjugados fármaco-polímero.

Para los fármacos de bajo peso molecular muchos investigadores están explotando la PEGilación para conseguir en el campo de los antitumorales un aumento de la permeabilidad y mejor efecto de retención,<sup>126</sup> o simplemente una mejora del perfil farmacocinético del fármaco disminuyendo su eliminación del organismo. Por lo general, los conjugados se consideran profármacos macromoleculares, ya que el fármaco tiene que ser liberado para realizar su actividad. En los últimos años, se han desarrollado métodos para liberar los fármacos pequeños del conjugado en compartimentos específicos bajo condiciones controladas. Por ejemplo, la liberación del fármaco dentro de la célula se puede lograr mediante el uso de conectores o enlaces especiales entre el polímero y dicho fármaco pequeño que pueden ser hidrolizados por el pH ácido del endosoma o por las enzimas lisosomales.

Varios estudios se han llevado a cabo en este campo, pero ningún producto ha llegado al mercado. Por ejemplo, se ha descrito la PEGilación de fármacos como el taxol, la camptotecina, el *cis*-platino y la doxorubicina.<sup>127</sup> A continuación se describen algunos ejemplos de los conjugados de PEG a fármacos no proteicos:

- Un conjugado de PEG con camptotecina (Prothecan o Pegamotecan por Enzon Inc.) fue obtenido mediante la unión de dos moléculas de fármaco, a través de un enlace éster involucrando el



<sup>126</sup> H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura y K. Hori "Tumor Vascular Permeability and the Epr Effect in Macromolecular Therapeutics: A Review" *Journal of Controlled Release* **2000**, 65, 271.

<sup>127</sup> G. Pasut, A. Guiotto y F. Veronese "Protein, Peptide and Non-Peptide Drug Pegylation for Therapeutic Application" *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2004**, 14, 859.

grupo hidroxilo C-20 del fármaco, a los extremos de una cadena polimérica de 40 kDa. La carga del fármaco corresponde a un 1,7% en peso, lo cual es bastante bajo si se compara con otros polímeros multivalentes (como la PGA, o los copolímeros HPMA). El producto pasó la fase I de los ensayos clínicos<sup>128</sup> y la dosis máxima tolerada fue de 200 mg/m<sup>2</sup> (equivalente a la camptotecina). En estudios de fase II, el producto, administrado cada 3 semanas, mostró ser prometedor en el tratamiento del adenocarcinoma de estómago y gastroesofágico, y parece estar bien tolerado, con una baja incidencia de toxicidad.<sup>129</sup>

- Conjugados de PEG con un derivado de camptotecina, SN-392 (10-amino-7-etil camptotecina). Se obtuvieron mediante la unión del fármaco al polímero a través de conectores trior tetrapéptido y mostró ser menos tóxico que el fármaco libre y que el análogo de la camptotecina CPT-11, que siguen siendo muy efectivos contra las líneas celulares Meth A de fibrosarcoma. El conector peptídico permite la liberación del fármaco sólo dentro de la célula, ya que es estable en el plasma pero se hidroliza rápidamente en presencia de la enzima lisosomal catepsina B.<sup>130</sup>

---

<sup>128</sup> E. K. Rowinsky, J. Rizzo, L. Ochoa, C. H. Takimoto, B. Forouzes, G. Schwartz, L. A. Hammond, A. Patnaik, J. Kwiatek, A. Goetz, L. Denis, J. McGuire y A. W. Tolcher "A Phase I and Pharmacokinetic Study of Pegylated Camptothecin as a 1-Hour Infusion Every 3 Weeks in Patients with Advanced Solid Malignancies" *Journal of Clinical Oncology* **2003**, 21, 148.

<sup>129</sup> L. C. Scott, T. Evans, J. C. Yao, A. I. Benson, M. Mulcahy, A. Thomas, M. Decatris, S. Falk, M. Rudoltz y J. A. Ajani "Pegamotecan (Ez-246), a Novel Pegylated Camptothecin Conjugate, for Treatment of Adenocarcinomas of the Stomach and Gastroesophageal (Ge) Junction: Preliminary Results of a Single-Agent Phase 2 Study" *Journal of Clinical Oncology* **2004**, 22, 321S. L. C. Scott, J. C. Yao, A. B. Benson, III, A. L. Thomas, S. Falk, R. R. Mena, J. Picus, J. Wright, M. F. Mulcahy, J. A. Ajani y T. R. J. Evans "A Phase II Study of Pegylated-Camptothecin (Pegamotecan) in the Treatment of Locally Advanced and Metastatic Gastric and Gastro-Oesophageal Junction Adenocarcinoma" *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **2009**, 63, 363.

<sup>130</sup> A. Guiotto, M. Canevari, P. Orsolini, O. Lavanchy, C. Deuschel, N. Kaneda, A. Kurita, T. Matsuzaki, T. Yaegashi, S. Sawada y F. M. Veronese "Synthesis, Characterization, and Preliminary in Vivo Tests of New Poly(Ethylene Glycol) Conjugates of the Antitumor Agent 10-Amino-7-Ethylcamptothecin" *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, 47, 1280.

- Conjugados PEG-doxorrubicina. Durante el diseño de fármacos, se presta especial atención a parámetros como el peso molecular del polímero (5-20 kDa), la estructura del polímero (lineal o ramificada), y la elección del péptido conector entre el fármaco y el transportador (es decir, GFLG, GLFG, GLG, GGRR o RGLG).<sup>131</sup> Sorprendentemente, el conjugado con el PEG de menor peso molecular muestra la mayor actividad antitumoral en ratas (mPEG5000-GFLF-doxorrubicina). Esto parece contrastar con la necesidad de pesos moleculares por encima de 20-30 kDa para permitir la acumulación en los tumores por el efecto EPR. Sin embargo, caracterizaciones adicionales mediante dispersión de luz mostraron que este conjugado de bajo peso molecular de PEG con doxorrubicina forma micelas en solución con un peso molecular aparente de 120 kDa. Este ensamblado supramolecular garantiza un efecto EPR efectivo y explica la alta actividad antitumoral del conjugado.

A lo largo de estas dos últimas décadas, la PEGilación ha mostrado resultados interesantes desde un punto de vista comercial y terapéutico. Es un proceso que se desarrolló más ampliamente en el campo de las proteínas, sin embargo, los bioconjugados PEG-fármaco no proteico ofrecen perspectivas interesantes.

---

<sup>131</sup> F. M. Veronese, O. Schiavon, G. Pasut, R. Mendichi, L. Andersson, A. Tsirk, J. Ford, G. F. Wu, S. Kneller, J. Davies y R. Duncan "Peg-Doxorubicin Conjugates: Influence of Polymer Structure on Drug Release, in Vitro Cytotoxicity, Biodistribution, and Antitumor Activity" *Bioconjugate Chemistry* **2005**, *16*, 775.

## 2.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS:

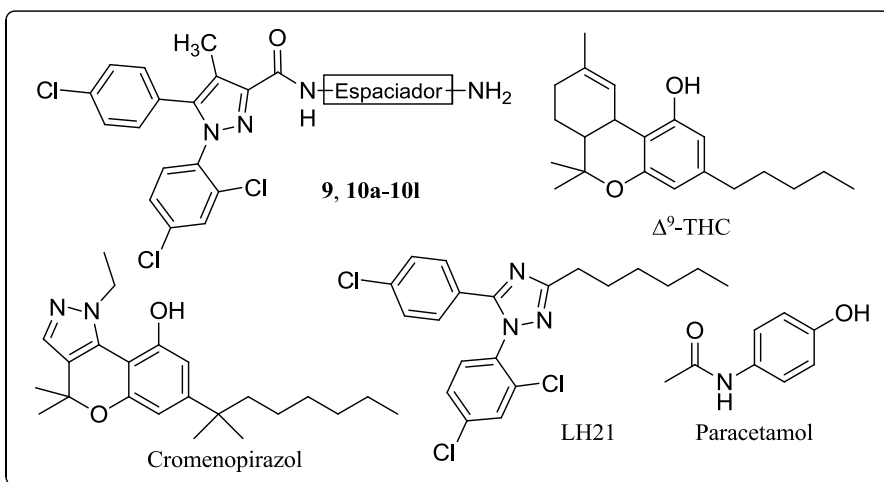
Como ya se ha comentado en esta memoria, los compuestos cannabinoides, ya sean naturales o sintéticos, suelen ser muy lipófilos lo que dificulta los experimentos farmacológicos y la administración de dichos fármacos *in vivo*.

La utilización de disolventes no-acuosos tales como el etanol, pueden modificar en muchos casos u ocultar resultados de ensayos biológicos y, en caso de estudios *in vivo*, son conocidos los efectos secundarios debidos al uso de dichos disolventes.

Como se comentó en la introducción de este capítulo, el polietilenglicol es un polímero de gran interés en el campo farmacéutico debido a su hidrosolubilidad y a su tolerancia fisiológica.

Por ello, nuestro objetivo consiste en el desarrollo de nuevos compuestos conjugados cannabinoides-PEG con el fin de mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas y, principalmente, la solubilidad de dichos compuestos en agua. Así, nos planteamos introducir un polímero PEG en las estructuras cannabinoides representadas en la figura 17:

- cannabinoides como el THC
- cannabinoides sintetizados en esta tesis
- paracetamol



**Figura 17.** Cannabinoides para conjugación con PEG.

### 3.- CANNABINOIDES HIDROSOLUBLES:

En los últimos años, la PEGilación ha sido utilizada principalmente para mejorar las propiedades fisicoquímicas de proteínas como enzimas, citoquinas y anticuerpos. En estos casos, esta técnica permite mejorar la estabilidad de prácticamente cualquier proteína.

Nuestro objetivo es utilizar la PEGilación con moléculas pequeñas y, más precisamente su aplicación a cannabinoides. La lipofilia de estos últimos dificulta su manejo en los experimentos farmacológicos y en su administración. Por lo tanto, se planteó la preparación de bioconjugados del polímero PEG con el propio  $\Delta^9$ -THC, con las diarilpirazolcarboxamidas descritas en el capítulo anterior, con un cannabinoide bivalente y con un cromenopirazol previamente descrito por nuestro grupo de trabajo<sup>131</sup>.

Se seleccionó el material polimérico según dos criterios: su peso molecular y sus posibilidades de activación. Elegimos el monometoxipolietilenglicol (mPEG) lineal de estructura general  $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$  y con un peso molecular promedio de 2000 (mPEG2000). La absorción por el tracto intestinal es mejor a bajo peso molecular, a partir de 4000 el PEG se absorbe solamente un 10%.<sup>132</sup> Sin embargo, los PEG de peso molecular superior a 1000 se eliminan más fácilmente del organismo,<sup>133</sup> lo que justifica nuestra elección de un PEG de peso molecular 2000. Con el fin de disponer de un polímero monofuncional, utilizamos el mPEG2000.

---

<sup>131</sup> J. Cumella, L. Hernandez-Folgado, R. Giron, E. Sanchez, P. Morales, D. P. Hurst, M. Gomez-Canas, M. Gomez-Ruiz, D. C. G. A. Pinto, P. Goya, P. H. Reggio, M. Isabel Martin, J. Fernandez-Ruiz, A. M. S. Silva y N. Jagerovic "Chromenopyrazoles: Non-Psychoactive and Selective Cb1 Cannabinoid Agonists with Peripheral Antinociceptive Properties" *Chemmedchem* **2012**, 7, 452.

<sup>132</sup> C. Fruijtjer-Polloth "Safety Assessment on Polyethylene Glycols (Pegs) and Their Derivatives as Used in Cosmetic Products" *Toxicology* **2005**, 214, 1.

<sup>133</sup> P. K. Working, M. S. Newman, J. Johnson y J. B. Cornacoff, "Safety of Poly(Ethylene Glycol) and Poly(Ethylene Glycol) Derivatives". *Poly(Ethylene Glycol): Chemistry and Biological Applications*, ed. Harris. Vol. 680, **1997**, 45.

### 3.1.- Conjugados PEG-aminoalquilpirazolcarboxamidas:

#### 3.1.1.- SÍNTESIS DE LOS CONJUGADOS PEG-AMINOALQUILPIRAZOLCARBOXAMIDAS:

Para realizar la PEGilación de las aminas de las diarilpirazolcarboxamidas **10a-10l** expuestas en el capítulo anterior, fue necesaria la activación del mPEG2000. Esta activación se puede realizar a cualquier estructura de PEG por tratamiento del mismo con diferentes agentes alquilantes o acilantes, para dar lugar a los correspondientes derivados, como se puede observar en la figura 18.

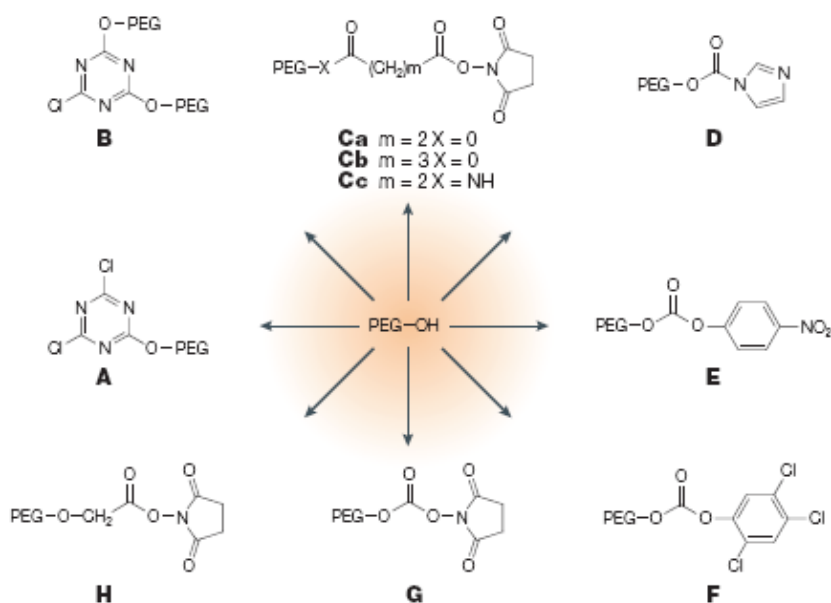
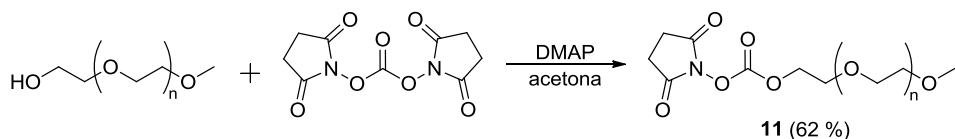


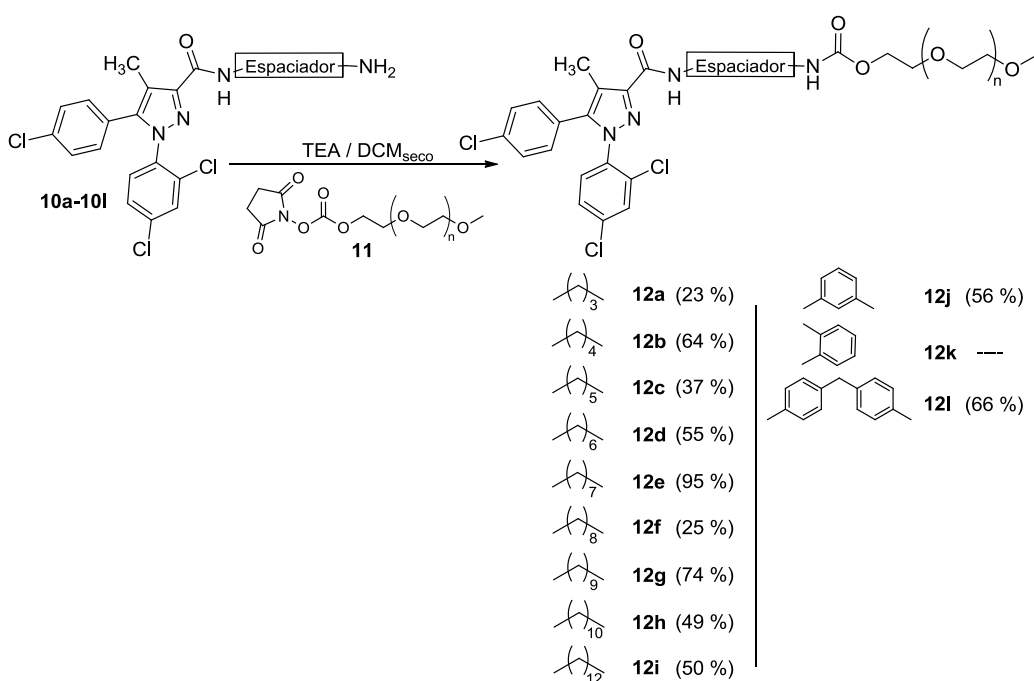
Figura 18. Derivados activados de PEG.

Para la formación del mPEG activado, se hizo reaccionar el mPEG comercial con *N,N'*-disuccinimidil carbonato en presencia de DMAP como se muestra en el esquema 6.



El producto precipitó en el medio de reacción dando lugar al 2,5-dioxopirrolidin-1-il carbonato de mPEG **11**.

La preparación de los conjugados PEG-aminoalquilpirazolcarboxamidas se realizó siguiendo el esquema de síntesis representado como esquema 7. El mPEG2000 activado **11** reaccionó con las aminas de las diarilpirazolcarboxamidas **10a-10j** y **10l** en presencia de TEA con rendimientos de moderados a buenos.



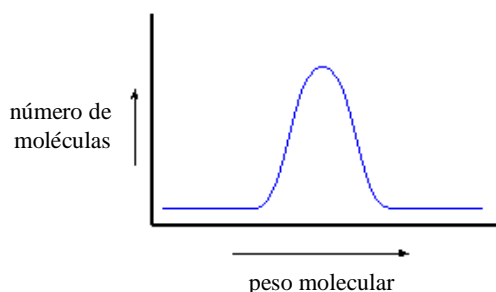
Esquema 7

Tras varios intentos no se consiguió la PEGilación de la *N*-(2-aminofenil)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida **10k**. Lo más probable es que se deba al mayor impedimento estérico que presenta el grupo amino de **10k** que debe reaccionar con el mPEG activado lo que hace que el acercamiento entre dicho grupo amino y el grupo succinimidilo del mPEG **11** se vea dificultado.

### 3.1.2.- ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL:

La caracterización estructural de los intermedios descritos en este apartado se llevó a cabo en base a sus datos analíticos, de espectrometría de masas, de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , que están recogidos en la parte experimental.

Los productos finales, derivados de PEG, son más difíciles de caracterizar. Esto es debido a que los polímeros sintéticos están formados por macroadenas que pueden diferir en una o varias unidades repetitivas, sin que por ello varíen sus características. Esto hace que no exista un único peso molecular, sino una distribución de pesos moleculares. Algunas de las cadenas poliméricas serán mucho más grandes que otras, y otras serán mucho más pequeñas, estando el mayor número agrupado alrededor de un punto central. Dicha distribución puede obtenerse representando en el eje X la cantidad de polímero que hay presente frente a un peso molecular determinado representado en el eje Y (figura 19).



**Figura 19.** Distribución de pesos moleculares de un polímero.

Por lo tanto, cuando se trata de polímeros, hay que hablar de pesos moleculares promedio. Estos a su vez pueden calcularse de diferentes maneras, y cada una tiene su propio valor.



*Peso molecular promedio en número,  $M_n$*  – Es el cociente entre el peso total de todas las moléculas poliméricas contenidas en una muestra, y el número total de moléculas poliméricas en dicha muestra:

$$M_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i}$$

siendo  $N_i$  el número de macromoléculas de peso molecular  $M_i$ .

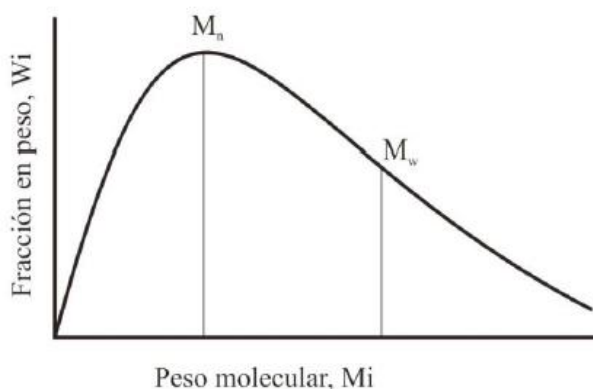
*Peso molecular promedio en peso,  $M_w$*  – Está basado en el hecho de que una molécula más grande contiene más de la masa total de la muestra polimérica que las moléculas pequeñas:

$$M_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i}$$

*Índice de polidispersidad,  $IP$*  – Ambos pesos moleculares se relacionan entre sí a través del llamado índice de polidispersidad ( $IP$ ), que indica el grado de homogeneidad de pesos moleculares que presentan las moléculas del polímero. Así, si  $IP \sim 1.01-1.05$  se trata de polímeros monodispersos, si es mayor de estos valores, son polímeros polidispersos. Este índice se calcula a través de la siguiente expresión:

$$IP = M_w / M_n$$

En la figura 20 se representa una distribución de pesos moleculares para un polímero con indicación de sus pesos moleculares promedio. Para obtener dicha distribución se emplea, entre otras técnicas analíticas, la espectrometría de masas.



**Figura 20.** Distribución de pesos moleculares en un polímero.

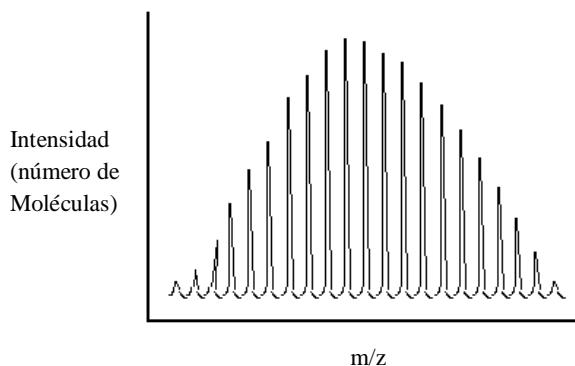
Se caracterizaron los derivados de PEG **12a-12j** y **12l** por RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . El peso molecular se determinó por espectrometría de masas por ionización MALDI.

Tradicionalmente, la espectrometría de masas ha tenido un uso limitado para el estudio de especies con alta masa molecular (exceptuando el FAB para proteínas), ya que requiere que los analitos sean transferidos a la fase gas como especies ionizadas intactas y aisladas. El desarrollo a finales de los años 80 de la ionización por electrospray (ESI) y por desorción láser asistida por matriz (MALDI, *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation*), revolucionaron el análisis por espectrometría de masas de moléculas grandes.

En la ionización MALDI, para poder conseguir iones es necesario mezclar el polímero con una sustancia que absorba en el ultravioleta y que recibe el nombre de matriz. Para nuestro caso utilizamos el ácido 2,5-dihidroxibenzoico como matriz. La mezcla se introduce dentro de la cámara de ionización del espectrómetro donde se hace incidir un láser pulsado de nitrógeno lo que provoca la desorción de parte de las moléculas de matriz y polímero.

Una vez que se tienen las moléculas del polímero ionizadas y en estado gas, se hacen pasar al analizador para que se produzca su separación. Los iones, una vez

separados, llegan al detector TOF (*Time Of Flight*) en orden creciente de sus relaciones masa/carga ( $m/z$ ), por lo que el registro es una representación del número de moléculas que hay de un determinado peso molecular (figura 21)



**Figura 21.** Espectro de masas de un polímero.

A partir de los espectrómetros de masas obtenidos por ionización MALDI-TOF, se determinaron para cada uno de los conjugados de PEG su peso molecular promedio en número ( $M_n$ ), el peso molecular promedio en peso ( $M_w$ ) y el índice de polidispersidad (IP). Estos datos se encuentran recogidos en la parte experimental de la presente memoria.

Esta técnica nos permitió, además de evaluar el peso molecular de los conjugados de PEG, evaluar su pureza.

### 3.1.3.- ESTUDIO DE LA SOLUBILIDAD EN AGUA:

La solubilidad en agua es un parámetro físico-químico muy importante en la biodisponibilidad de un fármaco ya que, cuando éste se administra de forma oral, debe ser soluble en el contenido acuoso del tracto gastrointestinal antes de pasar a través de la membrana intestinal, ya sea por difusión pasiva o transporte activo, hacia la sangre para su distribución en el organismo. Incluso si el fármaco no se administra por vía oral necesita disolverse en un líquido o gel acuoso para poder ser administrado por vía parenteral. Por lo tanto, la medida experimental de la

solubilidad en agua de un compuesto, o bien su predicción, es un aspecto importante en el desarrollo de un medicamento.

Como ya se ha comentado anteriormente en esta tesis, uno de los problemas que presentan los compuestos cannabinoides para su desarrollo es su baja o escasa solubilidad en agua debido a su lipofilia. Por ello, llevamos a cabo un estudio experimental de la solubilidad en agua de los conjugados cannabinoide-mPEG sintetizados.

Para la realización de este estudio, se tomó el conjugado cannabinoide PEGilado **12f** por ser del que disponíamos mayor cantidad, y se suspendió un exceso de dicho conjugado en agua desionizada, a pH neutro, y se sonicó. No conseguimos una disolución saturada como se esperaba sino que se formó un gel. En la bibliografía se describe que los polímeros de PEG son capaces de formar hidrogeles. Esto se debe a que forman una red tridimensional de cadenas flexibles que retienen cantidades considerables de agua. Han sido utilizados para la liberación controlada de fármacos ya que el fármaco puede ser encapsulado o unido covalentemente a la red polimérica siendo luego capaz de hidrolizarse, por ejemplo por vía enzimática.


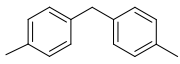
Debido a la formación de este tipo de geles a concentraciones saturadas, se evaluó de forma aproximada la solubilidad de nuestros conjugados disolviendo una cantidad de cada compuesto en agua desionizada hasta su completa disolución visual. Estos datos experimentales se encuentran recogidos en la tabla 3 junto con datos teóricos de lipofilia determinados por un método de predicción *in silico*. Se usó el programa ALOGPS 2.1.<sup>134</sup> Este programa estima el coeficiente de partición octanol-agua ( $\log P$ ) y la solubilidad en agua ( $\log S_{\text{calc.}}$ ) de compuestos químicos a

---

<sup>134</sup> VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory. <http://www.vcclab.org>. I. V. Tetko, J. Gasteiger, R. Todeschini, A. Mauri, D. Livingstone, P. Ertl, V. Palyulin, E. Radchenko, N. S. Zefirov, A. S. Makarenko, V. Y. Tanchuk y V. V. Prokopenko "Virtual Computational Chemistry Laboratory - Design and Description" *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2005**, *19*, 453.

partir de sus pesos moleculares e índices del estado electrotopológico con la ayuda de redes neuronales artificiales.

Como se esperaba, la solubilidad en agua disminuye al aumentar el valor de log P.

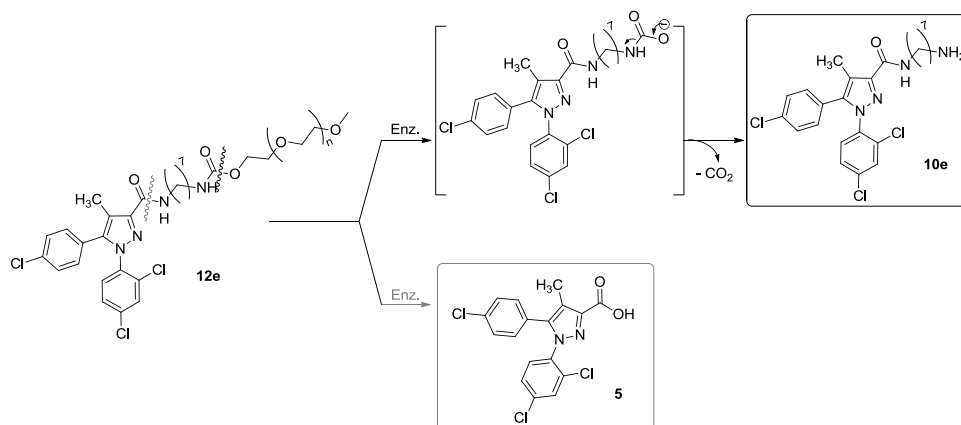
Compuesto	Espaciador	Solubilidad aprox. (mg/mL)	logS <sub>exp</sub>	logP (ALOGPS 2.1)
<b>12b</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	101	-1.392	1.60
<b>12c</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	102	-1.391	1.70
<b>12d</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	109	-1.364	1.82
<b>12f</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub>	86	-1.472	2.03
<b>12g</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub>	88	-1.463	2.13
<b>12j</b>		47	-1.731	2.10
<b>12l</b>		25	-2.023	2.73

**Tabla 3.** Datos de solubilidad experimentales y teóricos.

### 3.1.4.- ENSAYOS METABÓLICOS DE BIOTRANSFORMACIÓN:

Los conjugados PEG-aminoalquilpirazolcarboxamidas se prepararon con el objetivo de conseguir profármacos. Esta hipótesis nos llevó a estudiar el posible mecanismo metabólico antes de valorar sus propiedades farmacológicas. Para ello, elegimos el conjugado polimérico **12e**. Dicho conjugado, es un derivado pirazólico unido a una cadena alquílica vía enlace amida y que lleva una cadena de polietilenglicol unida por enlace carbamato. Por lo tanto, se pueden proponer dos vías de hidrólisis enzimática:

- Hidrólisis del enlace carbamato para dar lugar al derivado aminoalquilo **10e**.
- Hidrólisis del enlace amida adyacente al núcleo de pirazol para dar lugar al ácido **5** indicado en el esquema 8.



Esquema 8

Por consiguiente, este tipo de conjugado podría metabolizarse enzimáticamente, *in vivo*, por distintos tipos de esterasas como las carboxilesterasas, que son enzimas responsables de la detoxificación de xenobióticos y que se ha visto que actúan también en carbamatos, tioésteres y amidas.<sup>135</sup> También podrían metabolizarse por enzimas del citocromo P450 que es una gran y diversa superfamilia de hemoproteínas asociadas a las membranas citoplasmática, mitocondrial y del retículo endoplásmico, donde actúan metabolizando cientos de sustancias endógenas y exógenas. Este citocromo está involucrado en el metabolismo de los fármacos en nuestro organismo al jugar un papel fundamental en la fase oxidativa del metabolismo (conocida como fase I).

Así, los sistemas enzimáticos que se usaron para la realización de este ensayo metabólico con el conjugado de PEG **12e** fueron:

- una mezcla S9 de hígado de rata que contiene enzimas microsomales y citosólicas encargadas del metabolismo;

<sup>135</sup> P. M. Potter y R. M. Wadkins "Carboxylesterases - Ddetoxifying Enzymes and Targets for Drug Therapy" *Current Medicinal Chemistry* **2006**, *13*, 1045.

- microsomas de hígado humano (HLM, *Human Liver Microsomes*) que contiene, entre otras enzimas, citocromo P450, flavin-monooxigenasas, carboxilesterasas, epóxido hidrolasa y UDP-glucuronosiltransferasas; y
- supersomas CYP3A4 que contienen enzima recombinante humana citocromo P450 3A4 (CYP3A4) con P450 reductasa, ya que se encuentra en la bibliografía que el rimonabant se metaboliza por el CYP3A4.

Se eligieron estos sistemas enzimáticos teniendo en cuenta que el hígado es el principal lugar de biotransformación y que el sistema enzimático CYP3A4 es el responsable de la eliminación presistémica intestinal de muchos fármacos que presentan escasa biodisponibilidad.

Los ensayos enzimáticos se realizaron por un método cromatográfico mediante HPLC. La detección de los compuestos se hizo mediante DAD (*Diode Array Detection*) a 243, 254, 265 y 280 nm.

En primer lugar, se procedió a la optimización de la separación analítica para conseguir determinar y cuantificar los posibles metabolitos de las reacciones enzimáticas, el *N*-(7-aminoheptil)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (**10e**), el ácido 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico (**5**) y el propio sustrato **12e**. En las condiciones cromatográficas empleadas (ver punto 1.2.11 de la Parte Experimental), los compuestos eluyeron en los siguientes tiempos de retención: **10e** a 20.3 min, **5** a 23.7 min y el sustrato **12e** a 24.6 min.

Se realizaron numerosos ensayos con el sustrato **12e** en cada uno de los tres sistemas enzimáticos descritos anteriormente. Como se describe en el punto 1.2.11 de la Parte Experimental, se llevaron a cabo variaciones sobre la concentración del sustrato en agua, la concentración del sistema enzimático, presencia o no del cofactor NADPH y el tiempo de incubación. Para cada uno de

los ensayos realizados, el medio de reacción se centrifugó y congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la inyección en HPLC.

En los ensayos con la fracción S9 de hígado de rata, con el HLM, y con el CYP3A4 tanto con el cofactor NADPH como sin él, no se observó la presencia de ningún metabolito de manera significativa por lo que el compuesto **12e** es estable frente a los sistemas enzimáticos probados.

También se realizaron algunas pruebas con enzimas proteasas utilizando una mezcla de tripsina con quimiotripsina y proteasa bacteriana a una concentración de 1 mg/mL (1h a  $37^{\circ}\text{C}$ ) pero tampoco se observó hidrólisis del conjugado **12e**.

Además de estos ensayos, se realizó una prueba de estabilidad química. Para ello se incubó 1 mL del compuesto **12e** (210  $\mu\text{M}$ ) con 50  $\mu\text{L}$  de HCl concentrado a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1h. No se observó una degradación inmediata significativa mediante HPLC con lo que se podría decir que el compuesto **12e** es relativamente estable en estas condiciones. Sin embargo, después de 4 días a temperatura ambiente el producto finalmente se descompuso.

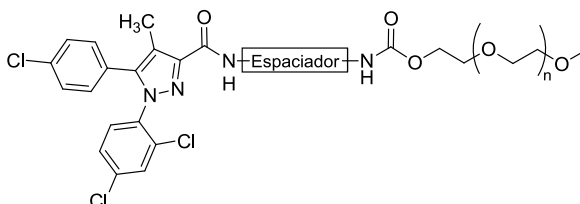
### 3.1.5.- EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA:


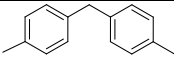
Nuestro objetivo era utilizar la conjugación al polímero de mPEG para obtener profármacos hidrosolubles de compuestos cannabinoides. Pues bien, con los ensayos metabólicos anteriores se demostró que la parte estructural cannabinoide no se libera del mPEG ni enzimática ni hidrolíticamente por lo que, estos compuestos conjugados con mPEG se enviaron a ensayos farmacológicos como nuevas entidades.

*Ensayos de desplazamiento de radioligando* – Como en los demás ensayos de desplazamiento de radioligando realizados con otras moléculas incluidas en esta tesis, la afinidad por los receptores cannabinoides  $\text{CB}_1$  y  $\text{CB}_2$  de los nuevos compuestos sintetizados **12a-12j** y **12l** se evaluó mediante la realización de



ensayos de desplazamiento del radioligando [ $^3\text{H}$ ]-CP55940 en células transfectadas con receptores humanos  $\text{CB}_1$  y  $\text{CB}_2$ . Los valores de desplazamientos se expresaron en constantes de afinidad ( $K_i$ ) como se muestra en la siguiente tabla 5.


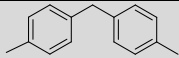


Compuesto	Espaciador	$K_i$ (nM) $\text{CB}_1$	$K_i$ (nM) $\text{CB}_2$
12a	$(\text{CH}_2)_3$	50%	$>40\mu\text{M}$
12b	$(\text{CH}_2)_4$	53%	$>40\mu\text{M}$
12c	$(\text{CH}_2)_5$	55%	62%
12d	$(\text{CH}_2)_6$	$2806 \pm 642$	$5487 \pm 2095$
12e	$(\text{CH}_2)_7$	$1680 \pm 1000$	$8840 \pm 3000$
12f	$(\text{CH}_2)_8$	$640 \pm 161$	$3327 \pm 1046$
12g	$(\text{CH}_2)_9$	$532 \pm 81$	$12180 \pm 397$
12h	$(\text{CH}_2)_{10}$	$334 \pm 105$	$12600 \pm 6000$
12i	$(\text{CH}_2)_{12}$	$1200 \pm 400$	$8343 \pm 591$
12j		$1083 \pm 80$	66%
12l		$255 \pm 67$	54%
Rimonabant <sup>a</sup>		1.8	$> 1000$
$\Delta^9$ -THC <sup>a</sup>		40.7	36.4

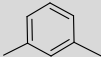
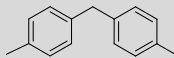
**Tabla 4.** Constantes de afinidad. <sup>a</sup>R. Vidal, E. Castro, A. Pazos, *Avances Recientes En La Farmacología Del Sistema Endocannabinoide*, in *Actualización Sobre El Potencial Terapéutico De Los Cannabinoides*. 2009: Madrid. p. 33 y 37.

Cuatro de los diarilpirazoles conjugados a PEG estudiados (compuestos **12f**, **12g**, **12h** y **12l**) mostraron valores de constantes de afinidad submicromolar (334 - 640 nM) para el receptor  $\text{CB}_1$ . Estos datos corresponden a un espaciador de cadena alquílica de ocho, nueve y diez metilenos y al espaciador bifenílico. Sin embargo, ninguno de los diarilpirazoles conjugados a PEG estudiados mostró una afinidad significativa por el receptor cannabinoide  $\text{CB}_2$  respecto al receptor  $\text{CB}_1$ .

Ahora bien, si comparamos estos resultados con los derivados de diarilpirazol descritos en el capítulo anterior que llevan la función amina (**10a–10l**) o el grupo Boc (**8a–8l**), parece muy difícil establecer una relación estructura-actividad (ver tablas 6 y 7). Desde un punto de vista general, se puede concluir que la presencia del grupo amino (**10a–10l**) confiere afinidad hacia los dos tipos de receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. La presencia del grupo Boc (**8a–8l**), excepto para los compuestos **8a** y **8e**, impide la unión a dichos receptores. En cuanto a la presencia del polímero PEG en la estructura se han obtenido algunos conjugados con valores de K<sub>i</sub> significativos para el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>.

CB <sub>1</sub>	Boc	NH <sub>2</sub>	PEG
Espaciador	K <sub>i</sub> (nM) 8a-8l	K <sub>i</sub> (nM) 10a-10l	K <sub>i</sub> (nM) 12a-12l
(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	28.5	104 ± 81	50%
(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	>40 μM	0.61 ± 0.09	53%
(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	2160	386 ± 187	55%
(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	>40 μM	133 ± 28	2806 ± 642
(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub>	261	6 ± 3	1680 ± 1000
(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub>	>40 μM	151 ± 85	640 ± 161
(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub>	>40 μM	351 ± 283	532 ± 81
(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub>	>40 μM	31 ± 11	334 ± 105
(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub>	>40 μM	Insoluble a 10 mM	1200 ± 400
	4520	76 ± 6	1083 ± 80
	>40 μM	43 ± 14	255 ± 67
<b>Rimonabant<sup>a</sup></b>		1.8	
<b>Δ<sup>9</sup>-THC<sup>a</sup></b>		40.7	

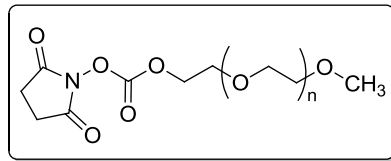
**Tabla 5.** Valores de afinidades para el receptor CB<sub>1</sub>. <sup>a</sup>R. Vidal, E. Castro, A. Pazos, *Avances Recientes En La Farmacología Del Sistema Endocannabinoide*, in *Actualización Sobre El Potencial Terapéutico De Los Cannabinoides*. 2009: Madrid. p. 33 y 37.

CB <sub>2</sub>	Boc	NH <sub>2</sub>	PEG
Espaciador	K <sub>i</sub> (nM) 8a-8l	K <sub>i</sub> (nM) 10a-10l	K <sub>i</sub> (nM) 12a-12l
(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	>40 μM	2560 ± 1315	>40μM
(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	>40 μM	121 ± 27	>40μM
(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	>40 μM	872 ± 225	62%
(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	>40 μM	494 ± 256	5487 ± 2095
(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub>	>40 μM	349 ± 179	8840 ± 3000
(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub>	>40 μM	526 ± 39	3327 ± 1046
(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub>	>40 μM	356 ± 58	12180 ± 397
(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub>	>40 μM	343 ± 58	12600 ± 6000
(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub>	>40 μM	Insoluble a 10 mM	8343 ± 591
	>40 μM	176 ± 48	66%
	>40 μM	>40μM	54%
<b>Rimonabant<sup>a</sup></b>		> 1000	
<b>Δ<sup>9</sup>-THC<sup>a</sup></b>		36.4	

**Tabla 6.** Valores de afinidades para el receptor CB<sub>2</sub>. <sup>a</sup>R. Vidal, E. Castro, A. Pazos, *Avances Recientes En La Farmacología Del Sistema Endocannabinoide*, in *Actualización Sobre El Potencial Terapéutico De Los Cannabinoides*. 2009: Madrid. p. 33 y 37.

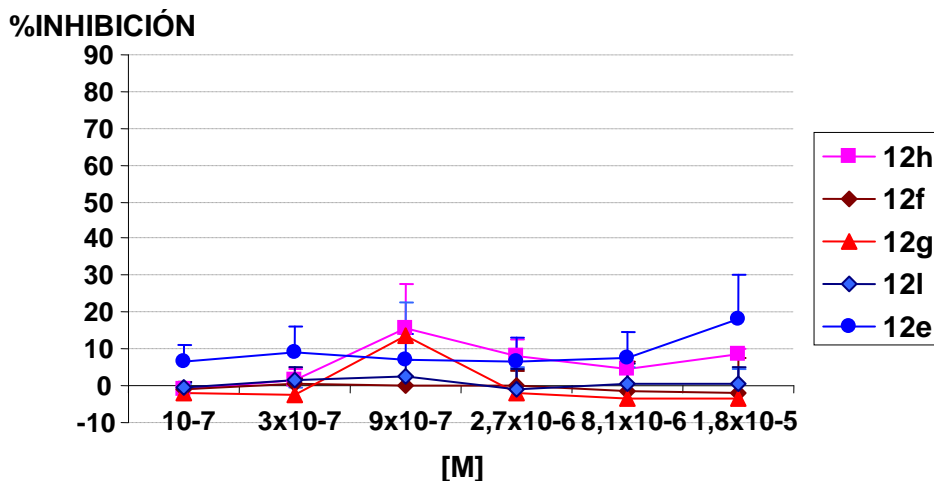
De estos conjugados de mPEG obtenidos se eligieron los compuestos **12e**, **12f**, **12g**, **12h** y **12l** para seguir ensayándolos en posteriores pruebas farmacológicas.

Con el fin de verificar el papel que podría jugar el resto polimérico de polietilenglicol sobre el reconocimiento de los receptores cannabinoides, se evaluó el desplazamiento del radioligando [<sup>3</sup>H]CP55940 para el compuesto de mPEG activado **11** que viene recogido en la figura 22. Su falta de afinidad indica que el resto polimérico por sí solo no se une a los receptores cannabinoides.



**Figura 22.** Compuesto de mPEG activado.

*Ensayos en tejidos aislados* – Se realizaron ensayos en conducto deferente de ratón de los compuestos **12e** ( $K_i(\text{CB}_1) = 1680 \text{ nM}$ ), **12f** ( $K_i(\text{CB}_1) = 640 \text{ nM}$ ), **12g** ( $K_i(\text{CB}_1) = 532 \text{ nM}$ ), **12h** ( $K_i(\text{CB}_1) = 334 \text{ nM}$ ) y **12i** ( $K_i(\text{CB}_1) = 255 \text{ nM}$ ). Con el fin de determinar su funcionalidad como agonistas cannabinoides, fueron administrados en un intervalo de concentraciones crecientes ( $10^{-7}$  -  $1.8 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) al baño de órganos. Como se puede observar en la figura 23, ninguno de los conjugados ensayados presentaron efecto agonista ya que, incluso a altas concentraciones ( $1.8 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) los valores de inhibición no llegaron al 20%.

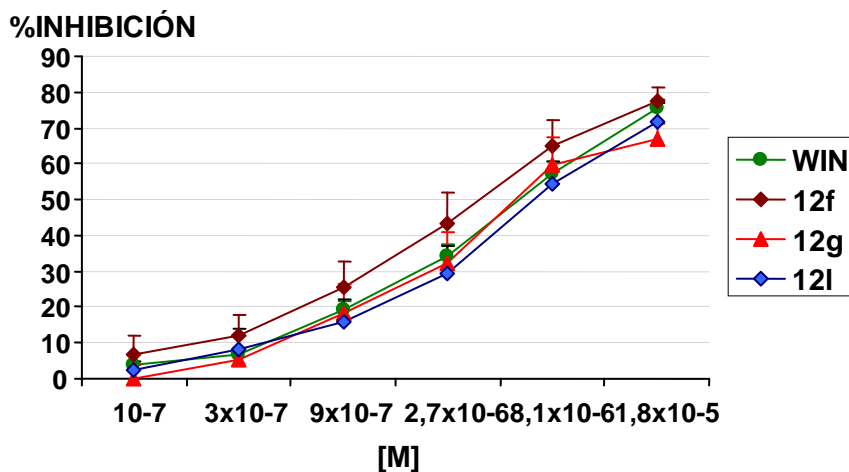


**Figura 23.** Representación gráfica del efecto inhibitorio sobre la respuesta contráctil.

A continuación se ensayó el efecto antagonista de los compuestos **12e**, **12f**, **12g**, **12h** y **12i** y para ello, en cada ensayo se administró una dosis única del compuesto ( $10^{-6} \text{ M}$ ) al baño de órganos. La preparación se incubó y posteriormente se determinó la curva por adición de concentraciones crecientes del agonista cannabinoide WIN55,2122 ( $10^{-7}$  -  $1.8 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) ya que un antagonista cannabinoide

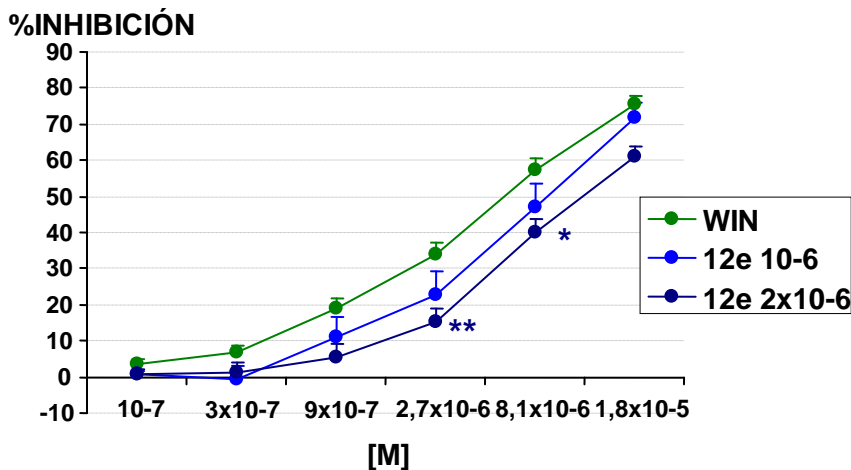
sería capaz de bloquear el efecto inhibitorio de la contracción producida por el agonista patrón WIN.

Como se indica en la figura 24 los compuestos **12f**, **12g** y **12i** no fueron capaces de antagonizar el efecto de WIN, por lo que no se comportan como antagonistas cannabinoides.

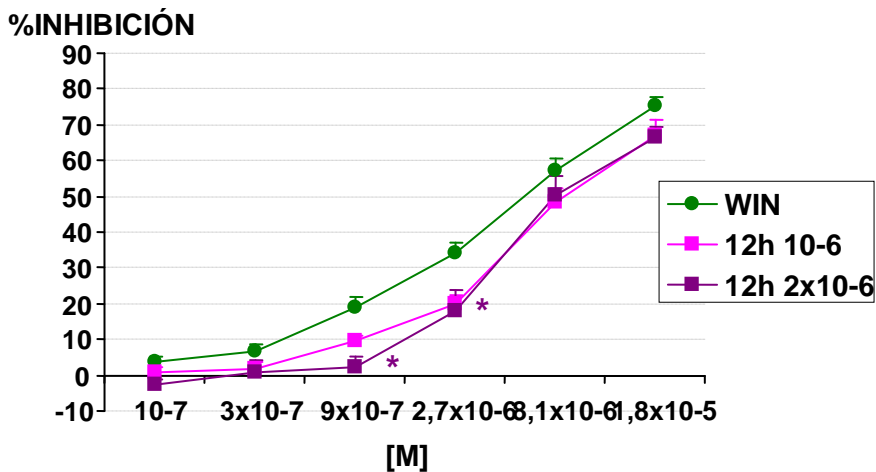


**Figura 24.** Representación gráfica del efecto inhibitorio sobre la respuesta contráctil.

Sin embargo, para los compuestos **12e** y **12h** se observó actividad antagonista a la concentración de  $10^{-6}$  M y  $2 \times 10^{-6}$  M (figuras 25 y 26). En el caso del compuesto **12h**, el antagonismo no fue dosis dependiente.



**Figura 25.** Representación gráfica del efecto inhibitorio sobre la respuesta contráctil frente a WIN 55, 212-2: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , ANOVA dos vías, Bonferroni



**Figura 26.** Representación gráfica del efecto inhibitorio sobre la respuesta contráctil frente a WIN 55, 212-2: \* $p < 0.05$ , ANOVA dos vías, Bonferroni

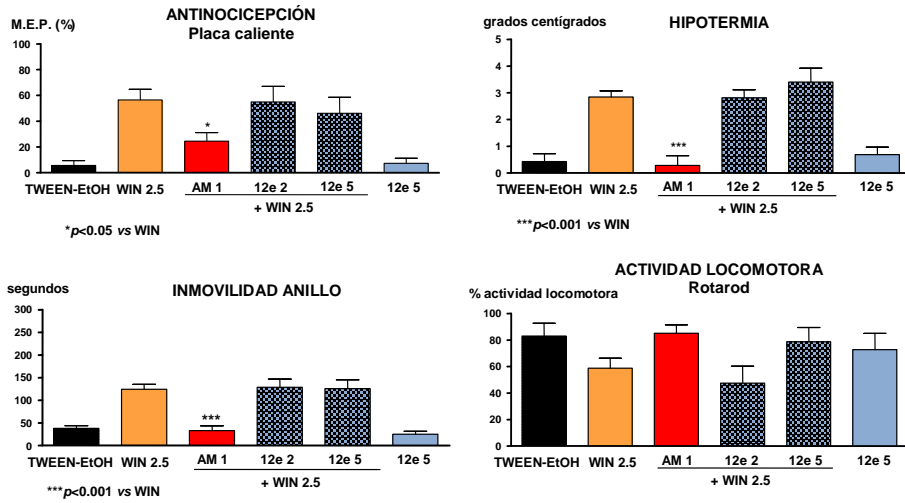
Por lo tanto, podemos concluir que los conjugados **12e** y **12h** desplazaron el efecto del WIN pudiendo presentar perfil antagonista cannabinoide interesante para seguir con ensayos comportamentales *in vivo*.

*Tetrada cannabinoide* in vivo – La tetrada cannabinoide consiste en un conjunto de cuatro ensayos de comportamiento que son la antinocicepción, la hipotermia, la actividad locomotora e inmovilidad en el anillo (catalepsia).

En estos ensayos, el compuesto agonista cannabinoide de referencia WIN55,2122 a las dosis de 2.5 y 5 mg/kg produce analgesia, hipotermia, catalepsia y disminución de la locomoción, siendo antagonizado por 1 mg/kg del compuesto agonista cannabinoide AM251.

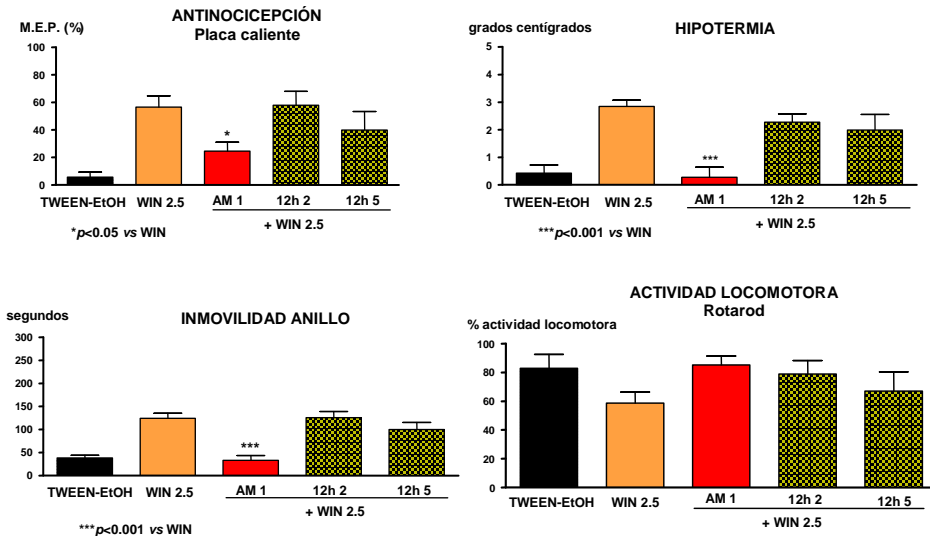
Se realizaron los ensayos de tetrada cannabinoide en ratón sobre los compuestos **12e** y **12h** administrándolos por vía intraperitoneal. El efecto agonista del WIN se estudió a los 20 minutos después de su administración y los conjugados **12e** y **12h** se inyectaron 30 minutos antes que el WIN.

Como se observa en la figura 27, la administración intraperitoneal del compuesto **12e** a la dosis de 5 mg/kg no produjo ninguna modificación en los parámetros evaluados descartando, por tanto, una actividad cannabimimética. En cuanto a la evaluación de las propiedades antagonistas, se evaluó la reversión del efecto de WIN (2.5 mg/kg) a las dosis de 2 y 5 mg/kg de **12e**. A estas concentraciones se puede observar en los cuatro ensayos realizados que el compuesto **12e** no antagoniza el efecto del WIN.



**Figura 27.** Representación gráfica de los resultados de la tetra de cannabinoide del compuesto **12e**.

En la figura 28 se puede ver que el compuesto **12h** a las dosis de 2 y 5 mg/kg tampoco modificó los efectos producidos por el agonista cannabinoide WIN, por lo tanto, no se comporta como antagonista cannabinoide en estos ensayos *in vivo*.



**Figura 28.** Representación gráfica de los resultados de la tetra de cannabinoide del compuesto **12h**.



El hecho de no modificarse el comportamiento en ninguno de los cuatro ensayos de la tetrada cannabinoide se puede deber a que los compuestos no tienen actividad *in vivo* o a que no son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica a estas dosis probadas (2 y 5 mg/kg).

*Microdiálisis cerebral en animal despierto* – Los agonistas cannabinoideos que actúan sobre los receptores cannabinoideos CB<sub>1</sub>, lo hacen, generalmente, a nivel del sistema nervioso central ya que estos receptores se encuentran en gran medida en el cerebro. El hecho de que **12e** y **12h** no tengan actividad en los ensayos de tetrada característicos de los efectos centrales, nos conduce a la hipótesis de que no pasen la barrera hematoencefálica.

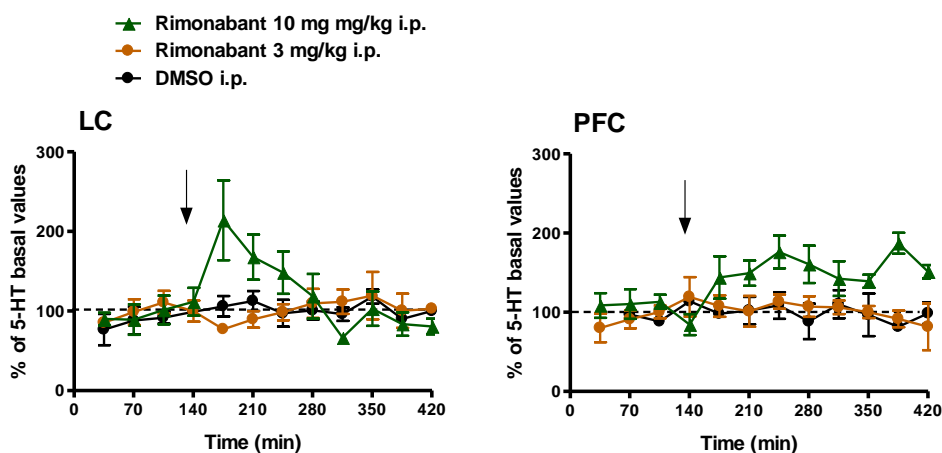
Por ello, nos propusimos realizar un ensayo de microdiálisis cerebral en animales despiertos eligiendo el compuesto **12h** para ello.

Hacer microdiálisis con compuestos cannabinoideos es muy complejo debido a su lipofilia. Así, la ventaja del conjugado de mPEG **12h** es que es soluble en agua. Por otra parte, el método usado es indirecto ya que se trata de medir los niveles de serotonina (5-HT) en el cerebro tras la administración del compuesto a evaluar porque se ha visto que los cannabinoideos alteran esos niveles.

Con este método se han determinado los niveles de serotonina tras la administración del conjugado PEGilado **12h** por vía intraperitoneal a ratas Wistar macho despiertas a las cuales se les realiza previamente una implantación estereotáxica de cánula-guía. El procedimiento de microdiálisis consiste en una perfusión continua de líquido cefalorraquídeo de cuyo contenido se analizan los niveles de serotonina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a un detector electroquímico (para más información, ver punto 2.3. de la Parte Experimental de esta tesis).

En la figura 29 se representa el efecto del rimonabant sobre los niveles de serotonina en corteza cerebral de rata tras su administración intraperitoneal

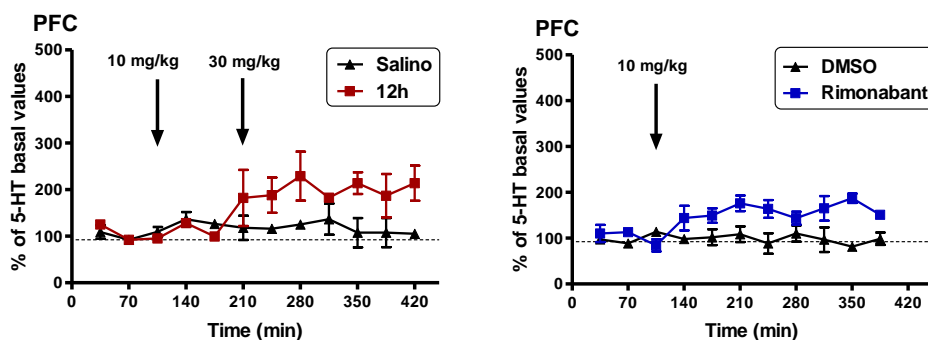
medidos en la microdiálisis. Tras la administración de rimonabant tanto en Cortex Prefrontal (PFC), un área terminal de inervación noradrenérgica y serotoninérgica, como en Locus Coeruleus (LC), el principal núcleo noradrenérgico del cerebro, se observa un aumento de los niveles basales de serotonina a la dosis de 10 mg/kg, lo que indica el paso de la barrera hematoencefálica del rimonabant. Efectivamente, está descrito que la administración de rimonabant a dosis superiores a 3 mg/kg incrementa la concentración de serotonina en la corteza prefrontal.<sup>136</sup>



**Figura 29.** Representación gráfica de los niveles de serotonina en microdiálisis. La flecha indica el momento en el que se administra el rimonabant.

Para la realización del ensayo de microdiálisis con el conjugado **12h** a una dosis de 30 mg/kg, se empleó una dosis elevada del compuesto considerando que posee menos afinidad por el receptor cannabinoide  $CB_1$  ( $K_i = 334$  nM) que el antagonista cannabinoide de referencia, rimonabant ( $K_i = 1.8$  nM). Como se muestra en la figura 30, el compuesto **12h** aumenta los niveles de serotonina a dosis de 30 mg/kg. Este dato indica que dicho conjugado PEGilado **12h** o algún metabolito activo derivado es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica.

<sup>136</sup> E. T. Tzavara, R. J. Davis, K. W. Perry, X. Li, C. Salhoff, F. P. Bymaster, J. M. Witkin y G. G. Nomikos "The  $Cb1$  Receptor Antagonist Sr141716a Selectively Increases Monoaminergic Neurotransmission in the Medial Prefrontal Cortex: Implications for Therapeutic Actions" *British Journal of Pharmacology* **2003**, 138, 544.

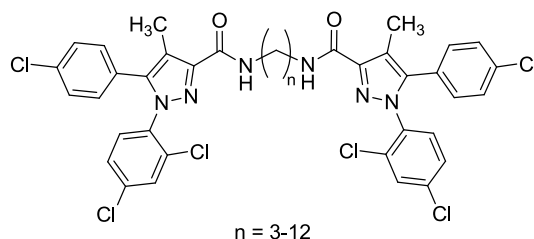


**Figura 30.** Representación gráfica de los niveles de serotonina en microdiálisis. Las flechas indican el momento en el que se administra el rimonabant.

Así pues, la falta de modificación observada en la conducta comportamental del ratón tras la administración de **12h** (tetrada cannabinoide descrita previamente), puede deberse a una dosis inyectada demasiado baja (la dosis más alta empleada fue de 10 mg/kg).

### 3.2.- Conjugado PEG-cannabinoide bivalente

Anteriormente, nuestro grupo de trabajo sintetizó y describió las propiedades farmacológicas de ligandos cannabinoides bivalentes<sup>137</sup> cuyas estructuras se representan en la figura 31.

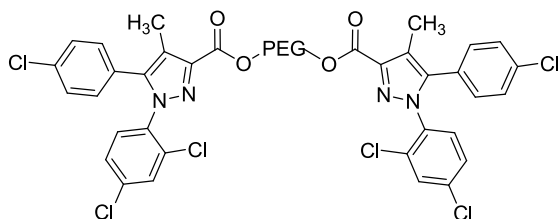


**Figura 31.** Estructura general de ligandos cannabinoides bivalentes.

El *N,N'*-heptano-1,7-diilbis[5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-1H-pirazol-3-carboxamida] ( $n=7$ ) mostró una alta afinidad por el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>. Otros compuestos de esta serie ( $n=4$  y  $n=12$ ) consiguieron desplazar el

<sup>137</sup> F. J. Bermudez Silva, F. Rodriguez de Fonseca, M. Romero Cuevas, N. Jagerovic, C. Fernandez Fernandez y M. P. Goya Laza; "Bivalent Pyrazole Derivatives as Food Intake Inhibitors"; WO2010128191

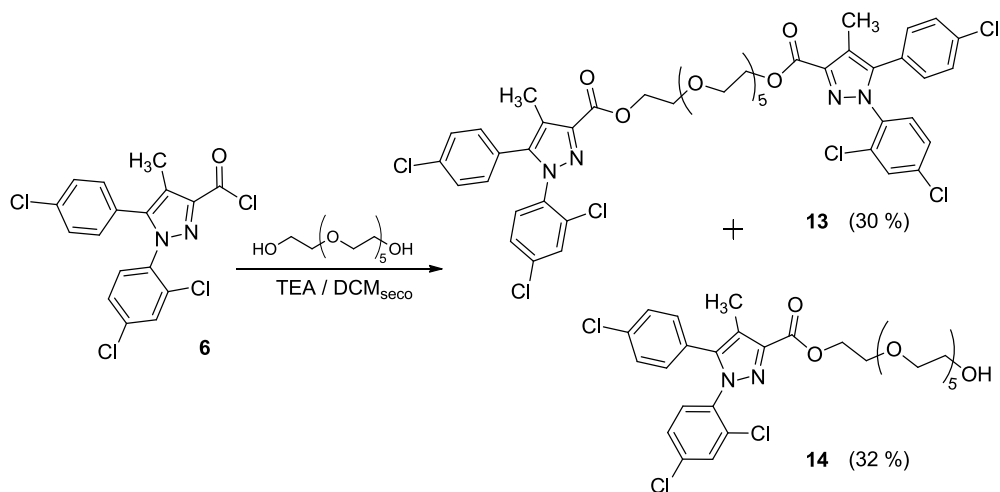
radioligando del receptor cannabinoide CB<sub>2</sub> con un alto porcentaje. Sin embargo, debido a la alta lipofilia de dichos compuestos no se consiguieron determinar las constantes de afinidad correspondientes. Por lo tanto, nos propusimos sintetizar un conjugado PEG-cannabinoide bivalente (figura 32). Por ello, elegimos el hexaetilenglicol que tiene una toxicidad más reducida que otros PEG de peso molecular más bajo.



**Figura 32.** Estructura del conjugado PEG-cannabinoide bivalente.

### 3.2.1.- SINTESIS DEL CONJUGADO PEG-CANNABINOIDE BIVALENTE:

Se preparó el conjugado PEG-cannabinoide bivalente **13** como se describe en el esquema 9. Al cloruro de ácido **6** se le hizo reaccionar con el hexaetilenglicol comercial dando lugar a una mezcla de PEG monosustituído (compuesto **14**) y disustituído (compuesto **13**) en presencia de TEA. Aunque se utilizó un exceso del cloruro de ácido del diarilpirazol **6** se obtuvo el compuesto disustituído **13** y el monosustituído **14**.



**Esquema 9**

La caracterización estructural de los intermedios y productos finales descritos en este apartado se llevó a cabo en base a sus datos analíticos, de espectrometría de masas MALDI-TOF, de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , que están recogidos en la parte experimental.

### 3.2.2.- EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA:

Se hicieron ensayos de afinidad por los receptores cannabinoides  $\text{CB}_1$  y  $\text{CB}_2$  del compuesto bivalente **13** y del diarilpirazol conjugado con hexaetilenglicol **14**. Los datos que se obtuvieron en este ensayo se recogen en la siguiente tabla 7.

Compuesto	$K_i$ (nM) $\text{CB}_1$	$K_i$ (nM) $\text{CB}_2$
<b>13</b>	$386 \pm 104$	$810 \pm 334$
<b>14</b>	$3500 \pm 1760$	$3280 \pm 970$

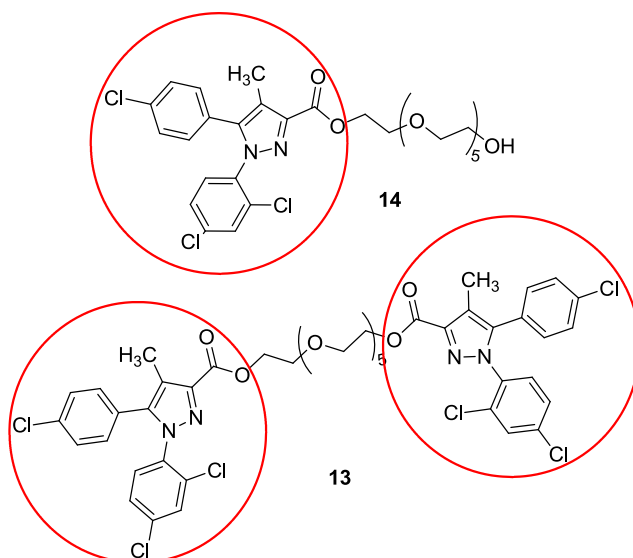
**Tabla 7.** Constantes de afinidad.

Los resultados obtenidos son muy interesantes. Por un lado, el diarilpirazol conjugado con mPEG **14** tiene poca afinidad por los receptores cannabinoides, lo que concuerda con los resultados de la literatura que sugieren que los grupos hidrófobos son necesarios en la posición 1 de la carboxamida<sup>138</sup>. Por otro lado, se observa una mejora de la afinidad para los dos tipos de receptores  $\text{CB}_1$  y  $\text{CB}_2$  con el compuesto bivalente **13**. Este aumento de afinidad puede deberse a una interacción con los receptores cannabinoides diméricos.

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) se consideran tradicionalmente como entidades monoméricas. Sin embargo, contamos con numerosos datos que sugieren que pueden existir complejos oligoméricos y, en particular, homo o heterodímeros. Por lo tanto, el hecho de que el compuesto bivalente **13** posee más afinidad que el propio compuesto monomérico **14**, sugiere que la presencia de un

<sup>138</sup> M. E. Y. Francisco, H. H. Seltzman, A. F. Gilliam, R. A. Mitchell, S. L. Rider, R. G. Pertwee, L. A. Stevenson y B. F. Thomas "Synthesis and Structure-Activity Relationships of Amide and Hydrazide Analogues of the Cannabinoid  $\text{CB}_1$  Receptor Antagonist N-(Piperidinyl)-5-(4-Chlorophenyl)-1-(2,4-Dichlorophenyl)-4-Methyl-1h-Pyrazole-3-Carboxamide (Sr141716)" *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 2708.

segundo farmacóforo podría interactuar con el sitio de unión de un receptor próximo (figura 33).



**Figura 33.** Farmacóforos en los compuestos **13** y **14**.

Según estudios de modelización molecular realizados con receptores de rodopsina bovina y otros estudios realizados con receptores opioides, la distancia entre los sitios de unión es de aproximadamente 20-30 Å para receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).<sup>139</sup>

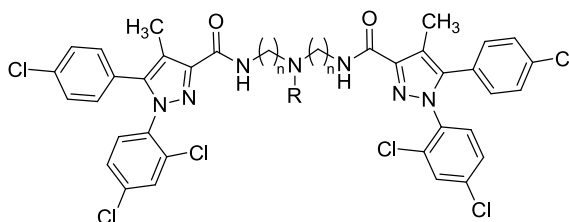
Portoghese y colaboradores han descrito en la literatura estudios de ligandos bivalentes para los receptores opioides.<sup>140</sup> Variando el espaciador, consiguieron los mejores resultados con un espaciador de 19 metilenos, lo que corresponde a unos 22 Å.

<sup>139</sup> K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto y M. Miyano "Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor" *Science* **2000**, 289, 739.

<sup>140</sup> P. S. Portoghese "From Models to Molecules: Opioid Receptor Dimers, Bivalent Ligands, and Selective Opioid Receptor Probes" *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, 44, 2259.

El espaciador de PEG utilizado en nuestro caso es de 17 átomos (aproximadamente 20 Å), una distancia coherente con los datos de la literatura.

Posteriormente a nuestros estudios, han aparecido publicados por Brian F. Thomas y colaboradores<sup>141</sup> ligandos bivalentes del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> (figura 34). Los espaciadores que se emplearon fueron aminoalquilos consiguiendo la mejor actividad con el espaciador de 15 átomos.



**Figura 34.** Estructuras cannabinoideas bivalentes obtenidas por el grupo de Brian F. Thomas y colaboradores.

Nuestros resultados obtenidos para el compuesto bivalente **13** son muy preliminares pero son consistentes con la hipótesis de interacción con dímeros de receptores cannabinoideas.

### 3.3.- Conjugados $\Delta^9$ -THC-mPEG:

En la actualidad, el uso terapéutico del  $\Delta^9$ -THC está autorizado en varios países como antiemético y analgésico. Sin embargo, su desarrollo no está a la altura de su potencial debido a las consideraciones legales pero también a su forma de administración. Esto es, la cantidad de  $\Delta^9$ -THC que se absorbe y la velocidad de absorción dependen de su vía de administración<sup>142</sup>. Así, por ejemplo, la biodisponibilidad del  $\Delta^9$ -THC por vía oral es de un 10-25%, debido a que es destruido parcialmente por el jugo gástrico y a que está sometido a

<sup>141</sup> Y. Zhang, A. Gilliam, R. Maitra, M. I. Damaj, J. M. Tajuba, H. H. Seltzman y B. F. Thomas "Synthesis and Biological Evaluation of Bivalent Ligands for the Cannabinoid 1 Receptor" *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, 53, 7048.

<sup>142</sup> M. Duran, J. R. Laporte y D. Capella "News About Therapeutic Use of Cannabis and Enclocannabinoid System" *Medicina Clinica* **2004**, 122, 390.

metabolización hepática. Los efectos se inician entre 30 min y 2 h después de su ingesta y duran de 2 a 6 h. Las concentraciones plasmáticas de  $\Delta^9$ -THC que se alcanzan tras la administración por vía oral pueden resultar modificadas por la presencia de alimentos, sobre todo lípidos, los cuales aumentarían su biodisponibilidad<sup>143</sup>.

En los ensayos clínicos, se suele usar la vía oral como vía de administración. Así, el Marinol<sup>®</sup> (Solvay Pharmaceutical),  $\Delta^9$ -THC sintético, se administra en cápsulas disueltas en aceite de sésamo. El Cannador<sup>®</sup> (Society for Clinical Research) que contiene extractos de la planta, se encuentra igualmente en forma de cápsulas. Respecto al Sativex<sup>®</sup> (GW Pharmaceuticals), la mezcla 1:1 de  $\Delta^9$ -THC y cannabidiol se administra por vía oromucal.

Con objetivo de modificar la biodisponibilidad y solubilidad del  $\Delta^9$ -THC y teniendo en consideración el problema que conlleva su alta lipofilia y las características del PEG expuestas en la introducción de este capítulo, nos pareció interesante tratar de conseguir un derivado de  $\Delta^9$ -THC cuya estructura estuviera conjugada con un polímero de tipo PEG.

### 3.3.1.- SÍNTESIS DE LOS CONJUGADOS:

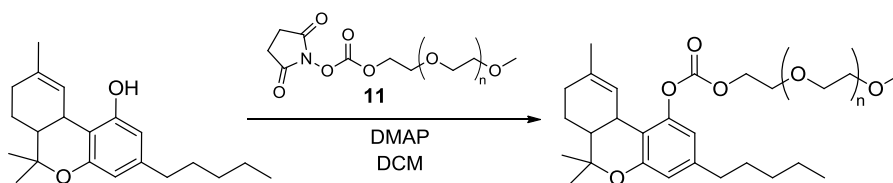
#### 3.3.1.1.- Conjugado $\Delta^9$ -THC-mPEG vía enlace carbonato:

Para obtener el conjugado de  $\Delta^9$ -THC-mPEG con enlace carbonato entre las dos especies (como los compuestos del apartado anterior 3.1.1), nos propusimos llevar a cabo la reacción representada en el siguiente esquema 10:

---

<sup>143</sup> F. Grotenhermen "Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids" *Clinical Pharmacokinetics* **2003**, 42, 327.



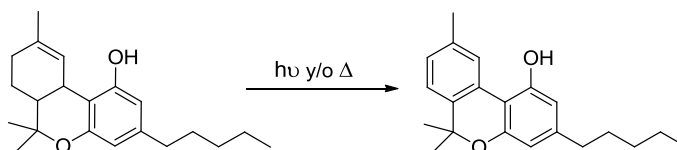


Esquema 10

Así, se intentó realizar la síntesis del conjugado del  $\Delta^9$ -THC con el mPEG para lo cual, y siguiendo un procedimiento parecido a la síntesis del PEG activado **11**, se hizo reaccionar al  $\Delta^9$ -THC comercial con el mPEG activado **11** en ligero exceso en presencia de DMAP según se indica en el esquema 10.

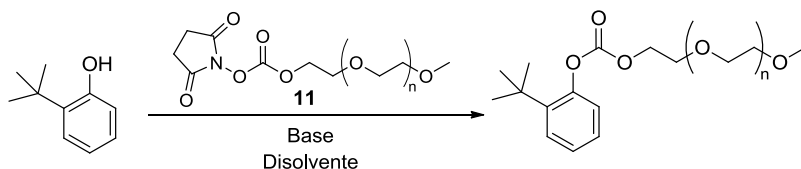
Sin embargo, no se consiguió una reacción completa. A pesar de emplear tiempos de reacción de varios días, se observó que no se consumía todo el  $\Delta^9$ -THC de partida dificultando las purificaciones..

El hecho de que el  $\Delta^9$ -THC sea una molécula relativamente inestable ya que es susceptible de oxidarse y reordenarse para formar, en su mayoría, cannabinol (ver esquema 11);<sup>144</sup> limitó considerablemente las variaciones de las condiciones de reacción que se realiza a temperatura ambiente y en ausencia de luz.

Esquema 11. Oxidación del  $\Delta^9$ -THC a cannabinol

Debido a la serie de normativas y formularios de seguridad necesarios para la obtención de  $\Delta^9$ -THC, realizamos un estudio metodológico utilizando el 2-*t*-butilfenol en vez del  $\Delta^9$ -THC. Se emplearon las condiciones de reacción recogidas en la tabla 8.

<sup>144</sup> P. Bhatarah, K. J. Batchelor, D. McHattie y A. K. Greenwood; "Delta 9 Tetrahydrocannabinol Derivatives"; WO2008099183. R. F. Turk, J. E. Manno, N. C. Jain y R. B. Forney "Identification, Isolation, and Preservation of Delta9-Tetrahydrocannabinol (Delta9-Thc)" *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1971**, 23, 190.



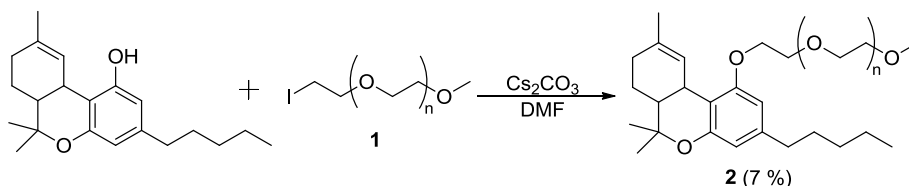
Disolvente	Base	Condiciones
EtOH/DCM	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 3eq	t.a. 15 horas
EtOH/DCM	TEA 1eq	t.a. 15 horas
DCM	TEA 1eq	t.a. 15 horas
DCM	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 3eq	t.a. 15 horas
DMF	TEA 1eq	t.a. 3 días
DMF	TEA 3eq	t.a. 4 días
DMF	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 3eq	t.a. 4 días /Δ 60°C 15 horas
DCM	DMAP 1.5eq	t.a. 1+2h
DCM	DMAP 1.5eq	m.o. (40°) 5+2+5+15min
DCM	DMAP 2eq	t.a. 6 días
DCM	TEA 3eq	t.a. 6 días

**Tabla 8.** Condiciones de reacción estudiadas.

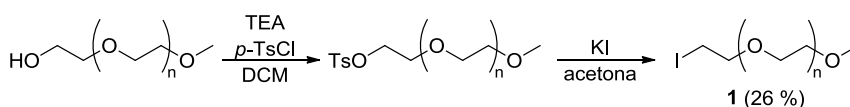
Para todos los casos, la proporción de los reactivos mPEG:*t*-butilfenol fue de 1:1. Para ninguna de las condiciones de reacción probadas se consiguió una reacción completa.

### 3.3.1.2.- Conjugado $\Delta^9$ -THC-mPEG vía enlace éter:

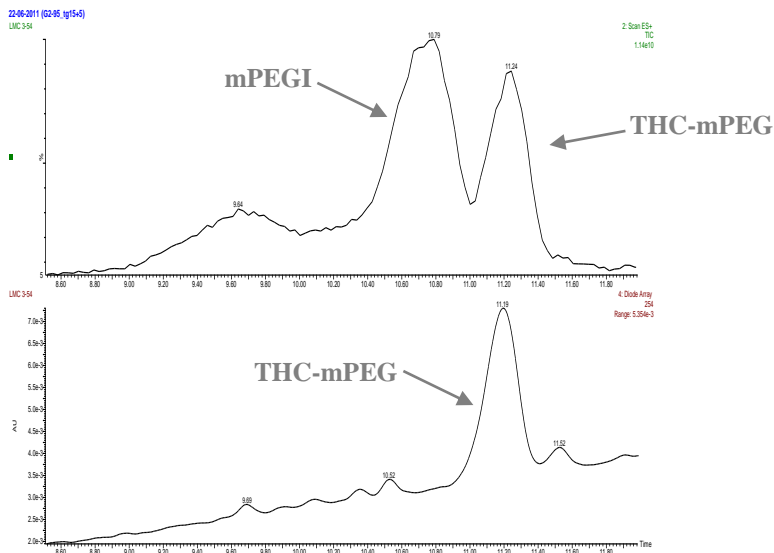
Con el fin de conseguir un conjugado  $\Delta^9$ -THC-mPEG cuyas estructuras estuvieran unidas por un enlace éter, se llevó a cabo la reacción descrita en el esquema 12.



Para ello, fue necesaria la obtención del yoduro de metoxipolietilenglicol. Se hizo reaccionar metoxipolietilenglicol de 2000 de peso molecular con cloruro de *p*-toluensulfonilo en presencia de trietilamina para así obtener el tosilato de metoxipolietilenglicol. Tras reaccionar con yoduro potásico se condujo a la obtención del yoduro de metoxipolietilenglicol **1** con un rendimiento moderado tras su purificación mediante cromatografía en columna (esquema 13).

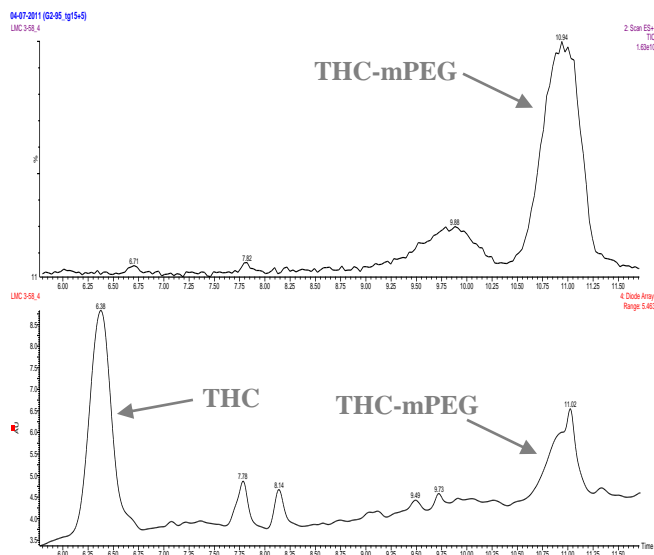


En un primer intento de conjugación se hizo reaccionar  $\Delta^9$ -THC (1eq) con un exceso de mPEGI (**1**) (2eq) a temperatura ambiente durante varios días pero el exceso de mPEGI no nos permitió aislar el conjugado THC-mPEG **2** deseado (HPLC-MS en la figura 35).



**Figura 35.** Cromatograma HPLC/MS de la conjugación del  $\Delta^9$ -THC con exceso de mPEGI. Se representa el espectro de masas (superior) y de *Diode Array* en el rango ultravioleta-visible (inferior).

Sin embargo, al utilizar un exceso de  $\Delta^9$ -THC (1.5eq) respecto al polímero mPEGI (1eq), sí se consiguió aislar el producto de síntesis  $\Delta^9$ -THC-mPEG **2**, como se puede ver en el cromatograma de HPLC/MS de la figura 36.



**Figura 36.** Cromatograma HPLC/MS de la conjugación del exceso de  $\Delta^9$ -THC con 1eq de mPEGI. Se representa el espectro de masas (superior) y de *Diodo Array* en el rango ultravioleta-visible (inferior).

La caracterización estructural de los intermedios y productos finales descritos en este apartado se llevó a cabo en base a sus datos analíticos, de espectrometría de masas MALDI-TOF, de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , que están recogidos en la parte experimental.

### 3.3.2.- EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA:

*Ensayos de desplazamiento de radioligando* – Se realizaron ensayos de desplazamiento del radioligando cannabinoide [ $^3\text{H}$ ]-CP55940 con el fin de determinar la afinidad del conjugado  $\Delta^9$ -THC-mPEG por los receptores cannabinoideos  $\text{CB}_1$  y  $\text{CB}_2$ .

Estos datos están recogidos en la tabla 9 conjuntamente con los valores de constantes de afinidad del propio  $\Delta^9$ -THC.

Compuesto	K <sub>i</sub> (nM) CB <sub>1</sub>	K <sub>i</sub> (nM) CB <sub>2</sub>
2 (THC-mPEG)	>40μM	11260 ± 510
Δ <sup>9</sup> -THC <sup>a</sup>	40.7	36.4

**Tabla 9.** Constantes de afinidad. <sup>a</sup>R. Vidal, E. Castro, A. Pazos, *Avances Recientes En La Farmacología Del Sistema Endocannabinoide*, in *Actualización Sobre El Potencial Terapéutico De Los Cannabinoides*. 2009: Madrid. p. 33 y 37.

Como se puede observar por los resultados obtenidos, el Δ<sup>9</sup>-THC al conjugarse con un polietilenglicol pierde su afinidad por los dos tipos de receptores cannabinoides. Desafortunadamente, los éteres no son profármacos adecuados ya que su desalquilación es lenta.

### 3.4.- Conjugados cromenopirazol-mPEG:

Desde hace varios años, nuestro grupo de trabajo ha desarrollado una línea de investigación centrada en la búsqueda de nuevos ligandos cannabinoides. En este contexto, se descubrió una familia de cromenopirazoles capaces de actuar sobre el sistema endocannabinoide.

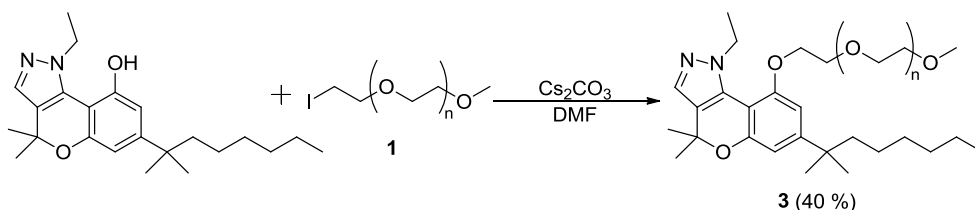
El 1-etil-4,4-dimetil-1,4-dihidrocromeno[4,3-c]pirazol-9-ol es el compuesto de la serie en el que más se ha avanzado en cuanto a estudios farmacológicos se refiere.<sup>145</sup> Es un ligando selectivo y potente del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> y tiene la particularidad de tener propiedades analgésicas periféricas como se demostró mediante un modelo orofacial en ratones.

Teniendo en cuenta esta propiedad periférica, nos pareció interesante el hecho de poder conjugar esta molécula a un polietilenglicol para formar un conjugado hidrosoluble.

<sup>145</sup> J. Cumella, L. Hernandez-Folgado, R. Giron, E. Sanchez, P. Morales, D. P. Hurst, M. Gomez-Canas, M. Gomez-Ruiz, D. C. G. A. Pinto, P. Goya, P. H. Reggio, M. Isabel Martin, J. Fernandez-Ruiz, A. M. S. Silva y N. Jagerovic "Chromenopyrazoles: Non-Psychoactive and Selective Cb1 Cannabinoid Agonists with Peripheral Antinociceptive Properties" *Chemmedchem* **2012**, 7, 452.

### 3.4.1.- SÍNTESIS DEL CONJUGADO:

Habiendo observado que la reacción con el mPEGI **1** era la que dio mejor resultado para el caso del  $\Delta^9$ -THC, llevamos a cabo la formación del conjugado cromenopirazol-mPEG según se indica en el esquema 14 obteniéndose el compuesto **3** con un rendimiento moderado tras su aislamiento mediante cromatografía líquida semipreparativa de alta eficacia.



Esquema 14

En este caso, sí se pudo llevar a cabo la reacción calentando el sistema ya que el cromenopirazol es una molécula estable a la temperatura y a la luz, a diferencia del  $\Delta^9$ -THC. Así, creemos que ésta puede ser la razón por la que el rendimiento de esta reacción es mejor para el conjugado **3** (cromenopirazol-mPEG) que para el **2** ( $\Delta^9$ -THC-mPEG).

La caracterización estructural de los intermedios y productos finales descritos en este apartado se llevó a cabo en base a sus datos analíticos, de espectrometría de masas MALDI-TOF, de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , que están recogidos en la parte experimental.

### 3.4.2.- EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA:

*Ensayos de desplazamiento de radioligando* – Se determinaron los valores de constante de afinidad por los dos tipos de receptores cannabinoides mediante ensayos de desplazamiento del radioligando [ $^3\text{H}$ ]-CP55940.

Como se indica en la tabla 10, el conjugado **3** pierde afinidad por el receptor CB<sub>1</sub>, sin embargo, se une al receptor CB<sub>2</sub> con valores de afinidad en el rango micromolar.

Compuesto	K <sub>i</sub> (nM) CB <sub>1</sub>	K <sub>i</sub> (nM) CB <sub>2</sub>
<b>3</b> (cromenopirazol-mPEG)	>40μM	3100 ± 1520
<b>Cromenopirazol</b>	5 ± 1	>40μM

**Tabla 10.** Constantes de afinidad.

Por lo tanto, la unión del cromenopirazol estudiado al mPEG hace que pierda su afinidad por el receptor CB<sub>1</sub> y que muestre una cierta afinidad por el receptor CB<sub>2</sub>.

La obtención de un cannabinoide hidrosoluble y capaz de unirse selectivamente al receptor cannabinoide CB<sub>2</sub> es de gran interés.

### 3.5.- Conjugados LH21-PEG:

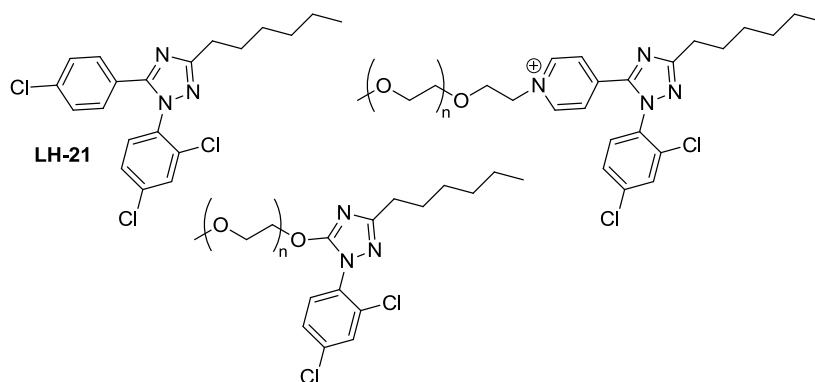
Anteriormente en nuestro grupo de investigación y dentro de un programa dirigido hacia ligandos cannabinoides se identificó el 1,2,4-triazol como esqueleto cannabinoide. Dentro de esta serie el 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-3-hexil-1H-1,2,4-triazol (conocido como LH21) presentó el mejor perfil farmacológico.<sup>146</sup> En ensayos *in vivo*, el LH21 presentó propiedades de antagonista CB<sub>1</sub> reduciendo significativamente la ingesta en ratas normales y obesas<sup>147</sup> mostrando una

<sup>146</sup> N. Jagerovic, L. Hernandez-Folgado, I. Alkorta, P. Goya, M. Navarro, A. Serrano, F. R. de Fonseca, M. T. Dannert, A. Alasua, M. Suardiaz, D. Pascual y M. I. Martin "Discovery of 5-(4-Chlorophenyl)-1-(2,4-Dichlorophenyl)-3-Hexyl-1h-1,2,4-Triazole, a Novel *in Vivo* Cannabinoid Antagonist Containing a 1,2,4-Triazole Motif" *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 2939.

<sup>147</sup> F. J. Pavon, A. Bilbao, L. Hernandez-Folgado, A. Cippitelli, N. Jagerovic, G. Abellan, M. I. Rodriguez-Franco, A. Serrano, M. Macias, R. Gomez, M. Navarro, P. Goya y F. R. de Fonseca "Antiobesity Effects of the Novel *in Vivo* Neutral Cannabinoid Receptor Antagonist 5-(4-Chlorophenyl)-1-(2,4-Dichlorophenyl)-3-Hexyl-1h-1,2,4-Triazole-Lh 21" *Neuropharmacology* **2006**, *51*, 358. F. J. Pavon, A. Serrano, V. Perez-Valero, N. Jagerovic, L. Hernandez-Folgado, F. J. Bermudez-Silva, M. Macias, P. Goya y F. R. de Fonseca "Central Versus Peripheral Antagonism of Cannabinoid Cbl Receptor in



potencia similar al compuesto de referencia, el antagonista CB<sub>1</sub> rimonabant, pero con la particularidad de ser un antagonista periférico. Así pues, en estos estudios, el LH21 se comportó como un anorexigénico exento de efectos centrales indeseables tales como los efectos psicoactivos. Este hecho tiene especial relevancia ya que numerosos trabajos farmacológicos han mostrado que el rimonabant atraviesa la barrera hematoencefálica y que sus efectos son mediados a nivel central y periférico. Pero como cualquier cannabinoide, el LH21 es poco soluble en agua por lo que nos propusimos sintetizar derivados del LH21 conjugados con PEG (figura 37).

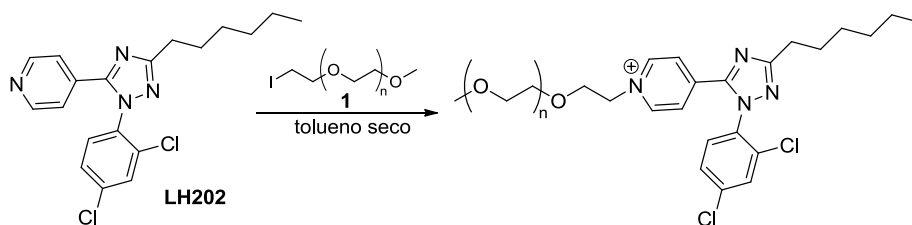


**Figura 37.** Derivados de LH21 conjugados a mPEG.

### 3.5.1.- SÍNTESIS DE LOS CONJUGADOS LH21-PEG:

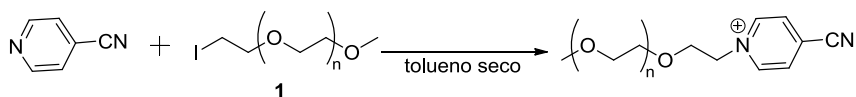
Para la preparación de los conjugados propuestos, se llevaron a cabo varios intentos de reacción.

En un primer objetivo, nos propusimos la síntesis del catión piridinio representado en el siguiente esquema 15.



Esquema 15

Pero debido a que disponíamos de poca cantidad del compuesto de partida LH202 decidimos llevar a cabo la búsqueda de condiciones de reacción adecuadas con 4-cianopiridina en vez de con LH202 (ver tabla 11) en presencia del yoduro de mPEG **1**, cuya síntesis se describió anteriormente en este capítulo.

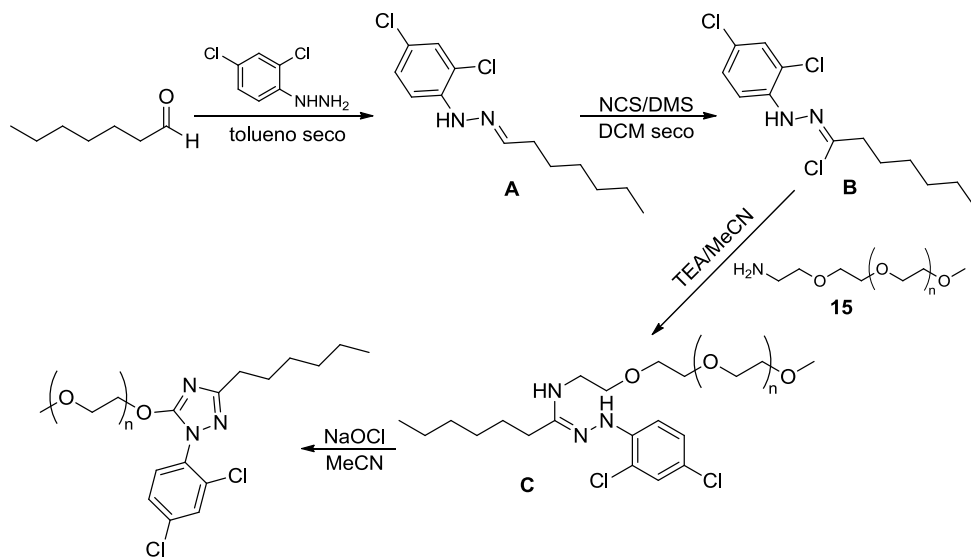


Sistema	Temperatura	Tiempo
microondas	120°C	1 hora
microondas	120°C	3 horas
microondas	140°C	4 horas
tubo sellado	150°C	7 días

Tabla 11. Condiciones de reacción estudiadas.

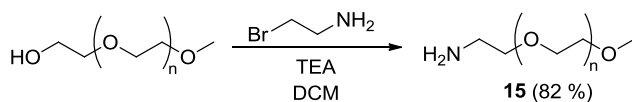
Para esta reacción se empleó una proporción de reactivos 1:1. El mejor resultado obtenido fue en tubo sellado a 150 °C durante 7 días aunque no se consiguió una reacción total quedando algo de producto de partida. En estas condiciones, no se consiguió la reacción con el triazol LH202 de partida.

Decidimos intentar la formación de otro conjugado derivado del LH21 como es el representado en el siguiente esquema 16.



Esquema 16

Para ello, se hizo reaccionar el heptanaldehído comercial en proporción 1:1 con la 2,4-diclorofenilhidracina comercial a temperatura ambiente durante una noche para obtener la especie intermedia **A** que con NCS en presencia de DMS durante dos horas a  $-78^{\circ}\text{C}$  nos condujo a la especie clorada **B**. Dicha especie se purificó por cromatografía en columna obteniéndose con un rendimiento del 11%. Ahora bien, para el siguiente paso de síntesis se necesitó la preparación del mPEG con un grupo amino terminal **15**. Por ello, se hizo reaccionar el metoxipolietilenglicol comercial con bromoetilamina en presencia de TEA a temperatura ambiente durante un día que, tras purificación por cromatografía en columna, nos condujo al compuesto **15** deseado con un rendimiento del 82% (esquema 17).



Esquema 17

Desafortunadamente no conseguimos que reaccionara el compuesto **B** con el mPEG-NH<sub>2</sub> en presencia de TEA. Los esfuerzos de síntesis realizados para la obtención de derivados de LH21 conjugados con mPEG resultaron infructuosos.

#### 4.- PARACETAMOL HIDROSOLUBLE:

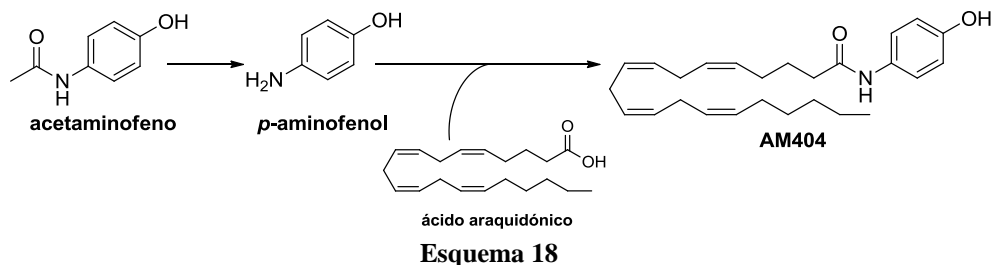
##### 4.1.- Introducción sobre el paracetamol:

El paracetamol (acetaminofeno) es uno de los medicamentos más populares y más ampliamente utilizado para el tratamiento del dolor y la fiebre. Fue sintetizado en 1878 por Morse y utilizado clínicamente por primera vez por von Mering en 1887. A diferencia de los AINEs se considera que casi no tiene actividad anti-inflamatoria y no produce daños gastrointestinales o trastornos cardiorrenales.

En comparación con los opiáceos, el paracetamol es prácticamente ineficaz en el dolor intenso y no tiene efecto depresor sobre la respiración. Aunque se ha utilizado clínicamente desde hace más de un siglo, su modo de acción ha sido desconocido hasta hace unos años, cuando dos grupos independientes (Zygmunt y sus colaboradores, y Bertolini y sus colaboradores) obtuvieron de manera inequívoca datos experimentales que demuestran que parte del efecto analgésico del paracetamol es debido a la activación indirecta de los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub>.<sup>143</sup> Como se observa en el esquema 18, en la médula espinal y en el cerebro, el paracetamol, tras su desacetilación a su amina primaria (*p*-aminofenol), se conjuga con el ácido araquidónico para formar *N*-araquidonoilfenolamina, AM404, un compuesto ya conocido como cannabinoide endógeno. La enzima de degradación implicada en ello es la FAAH.

---

<sup>143</sup> E. D. Hogestatt, B. A. G. Jonsson, A. Ermund, D. A. Andersson, H. Bjork, J. P. Alexander, B. F. Cravatt, A. I. Basbaum y P. M. Zygmunt "Conversion of Acetaminophen to the Bioactive *N*-Acylphenolamine Am404 Via Fatty Acid Amide Hydrolase-Dependent Arachidonic Acid Conjugation in the Nervous System" *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280, 31405. A. Bertolini, A. Ferrari, A. Ottani, S. Guerzoni, R. Tacchi y S. Leone "Paracetamol: New Vistas of an Old Drug" *Cns Drug Reviews* **2006**, 12, 250.



La *N*-araquidonoilfenolamina o AM404 es un agonista de los receptores TRPV1 y un inhibidor de la recaptación de anandamida celular, lo que conduce a mayores niveles de cannabinoides endógenos y, además, inhibe las ciclooxygenasas en el cerebro, si bien en concentraciones que probablemente no son alcanzables con dosis analgésicas del paracetamol. Un estudio independiente ha demostrado que el bloqueo de los receptores CB<sub>1</sub> afecta a las propiedades antinociceptivas del paracetamol lo que sugiere que esta ruta metabólica puede al menos contribuir a las propiedades farmacológicas del paracetamol.<sup>144</sup>

Por lo tanto, el paracetamol actúa como un profármaco. Estos hallazgos, explican el mecanismo de acción del paracetamol y la peculiaridad de sus efectos.

Debido a su acción antipirética y analgésica, el paracetamol se utiliza en muchas formulaciones sólidas mientras que las formas líquidas están limitadas por su poca solubilidad en agua,<sup>145</sup> como se puede observar por los datos de la siguiente tabla 12.

<sup>144</sup> V. Onnis, C. Congiu, E. Bjoerklund, F. Hempel, E. Soederstroem y C. J. Fowler "Synthesis and Evaluation of Paracetamol Esters as Novel Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibitors" *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, 53, 2286.

<sup>145</sup> A. Yurquina, M. E. Manzur, P. Brito, R. Manzo y M. A. A. Molina "Physicochemical Studies of Acetaminophen in Water-Peg 400 Systems" *Journal of Molecular Liquids* **2007**, 133, 47.

<b>SOLUBILIDAD (mg/mL H<sub>2</sub>O)</b>	
Sacarosa (azúcar)	2039
NaCl (sal común)	359
<b><i>Paracetamol</i></b>	<b><i>12.78</i></b>
ác. acetilsalicílico (aspirina)	1
Ibuprofeno	< 1

**Tabla 12.** Datos de solubilidad de sustancias conocidas.

Como se observa en la tabla 12, la aspirina y el ibuprofeno son menos solubles en agua que el paracetamol sin embargo, el paracetamol tiene una solubilidad en agua bastante baja con 12.78 mg de paracetamol por cada mL de agua.

#### **4.2.- Síntesis de los compuestos derivados del paracetamol. N-(4-(metoxipoli(etilenglicol)fenil)-acetamida**

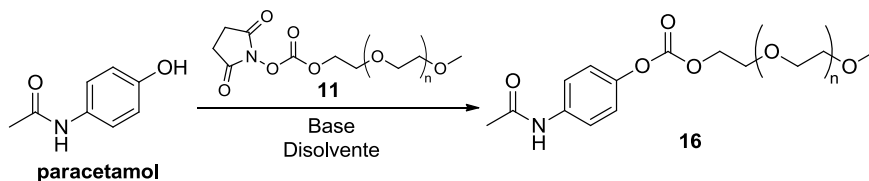
En la bibliografía se recogen datos sobre la síntesis de conjugados de PEG con analgésicos comunes tales como la aspirina<sup>146</sup> o el ibuprofeno<sup>147</sup> pero, no se encuentra nada descrito sobre el conjugado del paracetamol con el PEG. Debido a esto y a la baja solubilidad del paracetamol, comentada anteriormente, nos propusimos sintetizar un conjugado de paracetamol con mPEG. Por ello, utilizamos el mPEG 11.

Para que la formación del producto deseado tuviera lugar, realizamos un estudio metodológico con las condiciones de reacción más adecuadas (tabla 13) ya que cuando realizamos la primera síntesis, observamos que la reacción no finalizaba completamente quedando ambos reactivos sin reaccionar.

<sup>146</sup> V. Baranovsky, T. Petrova y I. Rashkov "Nonspecific Interactions in Polymer-Polymer Reactions .3. Complex-Formation between Polycarboxylic Acids and 2-Acetoxybenzoate Derivatives of Poly(Ethylene Glycol)S" *European Polymer Journal* **1991**, 27, 1045.

<sup>147</sup> R. Cecchi, L. Rusconi, M. C. Tanzi, F. Danusso y P. Ferruti "Synthesis and Pharmacological Evaluation of Poly(Oxyethylene) Derivatives of 4-Isobutylphenyl-2-Propionic Acid (Ibuprofen)" *Journal of Medicinal Chemistry* **1981**, 24, 622.

Empezamos por variar la temperatura, los tiempos de reacción y la utilización del microondas. A continuación, se empleó un exceso de paracetamol y se probaron varias bases y disolventes. En ningún caso se completó la reacción, observándose mPEG activado **11** sin reaccionar.



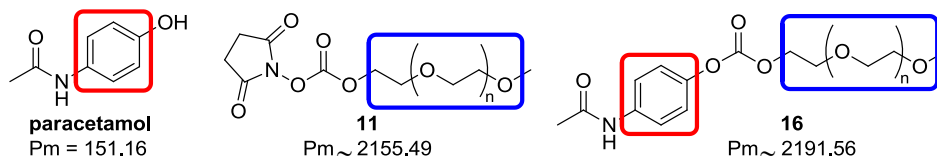
Disolvente	Base	parac.:PEGactiv.	Condiciones
DCM	TEA 1eq	1 : 1	t.a. 2 días
DCM	TEA 1eq	1 : 1	m.o. (50°) 30min
DCM	TEA 1eq	1 : 1	m.o. (50°) 30min + (90°) 15min
DCM	TEA 1eq	1 : 1	m.o. (50°) 30min + (90°) 15min + t.a. 5 días
DCM	TEA 1eq	1 : 1	m.o. (50°) 30min + (90°) 15min + t.a. 7 días
DCM	TEA 1eq	1 : 1	m.o. (50°) 30min + (90°) 15min + t.a. 10 días
DCM	TEA 1 eq	1.2 : 1	t.a. 10 días
DCM	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 3eq	1 : 1	t.a. 7 días
H <sub>2</sub> O	NaOH 2eq	1.34 : 1	t.a. 3 días
H <sub>2</sub> O	NaOH 3eq	1.34 : 1	t.a. 2 días
THF	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 3eq	1.37 : 1	t.a. 6 días
THF	TEA 3eq	1.37 : 1	t.a. 6 días
DCM	TEA 3eq	1.2 : 1	t.a. 8 días
DCM	TEA 3eq	1.3 : 1	m.o. (50°) 1h + (70°) 1h + (90°) 4.5h

**Tabla 13.** Condiciones de reacción estudiadas.

Para corroborar que realmente teníamos producto formado en la mezcla de reacción, se realizó un estudio DOSY de mezclas de dicha reacción.

El DOSY (*Diffusion Ordered Spectroscopy*) es un experimento de RMN en el que adicionalmente se discrimina la señal por efecto de la difusión de los núcleos detectados en la solución de muestra. Esta difusión es dependiente del tamaño de molécula, es decir, depende del peso molecular de cada molécula de la mezcla a estudiar. Así, cuanto mayor diferencia de pesos moleculares haya entre las moléculas, mejor será la separación por difusión y, por tanto, más separadas estarán las señales de las moléculas implicadas en la mezcla de reacción. Suele representarse como un arreglo bidimensional de coeficiente de difusión frente al desplazamiento químico.

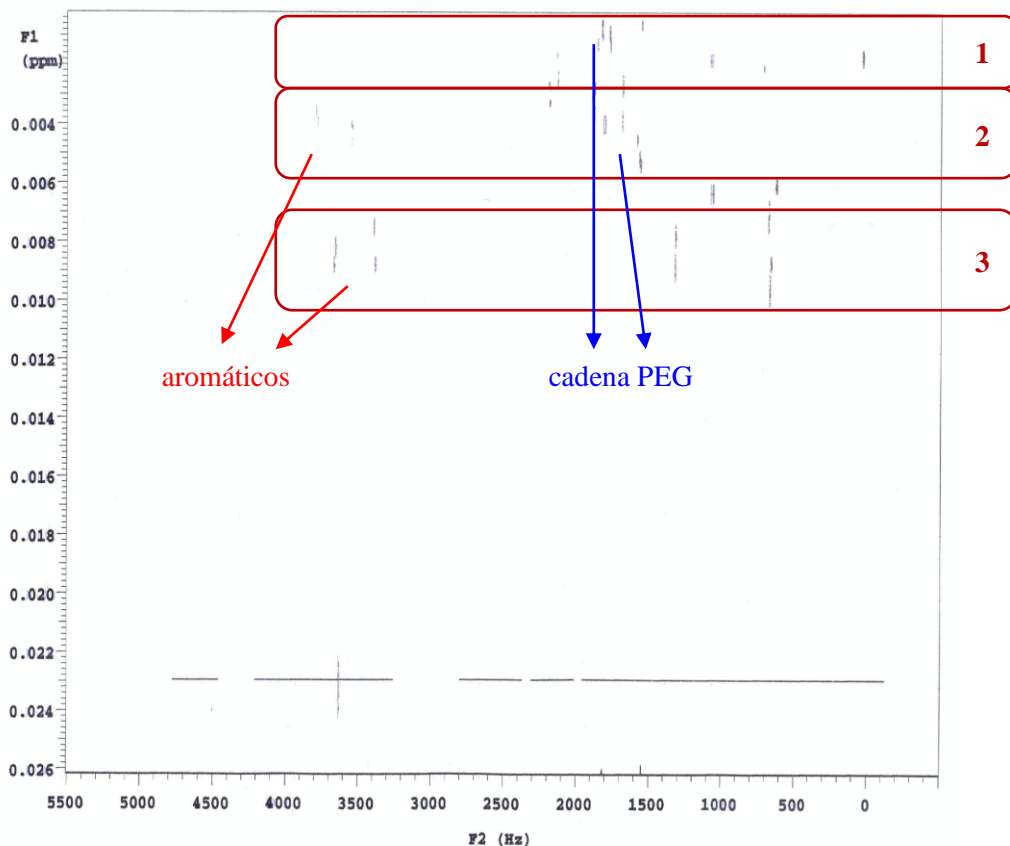
Así, para nuestro caso, en nuestra mezcla de reacción tendríamos tres moléculas, dos de las cuales con un peso molecular del mismo orden (producto **16** y mPEG activado **11**) mientras que la tercera (paracetamol) tiene un peso molecular bastante alejado de las otras dos, tal y como se puede ver en la siguiente figura 38.



**Figura 38.** Estructuras presentes en la mezcla analizada. Los grupos estructurales marcados son cuyas señales se aprecian en el espectro de la figura 39.

Sin embargo, la molécula **11** puede diferenciarse de la **16** debido a que esta última tiene un grupo aromático en su estructura que da lugar a señales aromáticas en análisis de  $^1\text{H}$ -RMN y como el experimento DOSY es un experimento bidimensional de  $^1\text{H}$ -RMN frente a coeficiente de difusión, tenemos que las estructuras se pueden apreciar en dicho análisis. Así, como se observa en la figura 39, tenemos tres franjas diferenciadas (**1**, **2** y **3**) y cada una correspondiente a un compuesto.



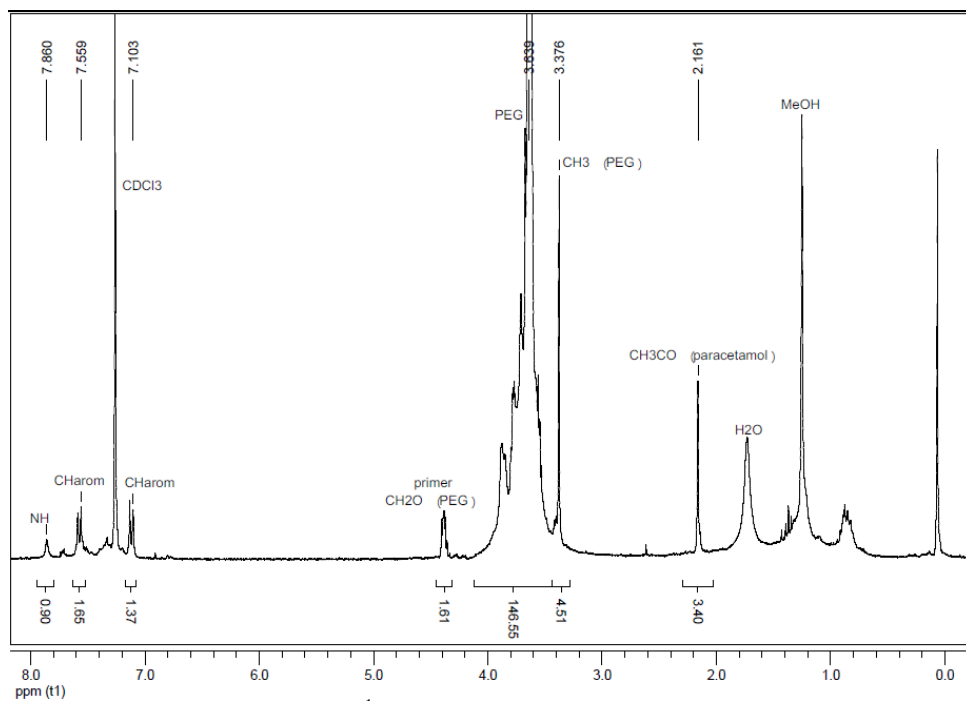


**Figura 39.** Espectro DOSY de la mezcla con paracetamol.

Por lo tanto, como se puede observar en el espectro de DOSY, la franja **1** corresponde al mPEG activado **11**, la franja **2** al compuesto de reacción **16** y la franja **3** sería al paracetamol de partida.

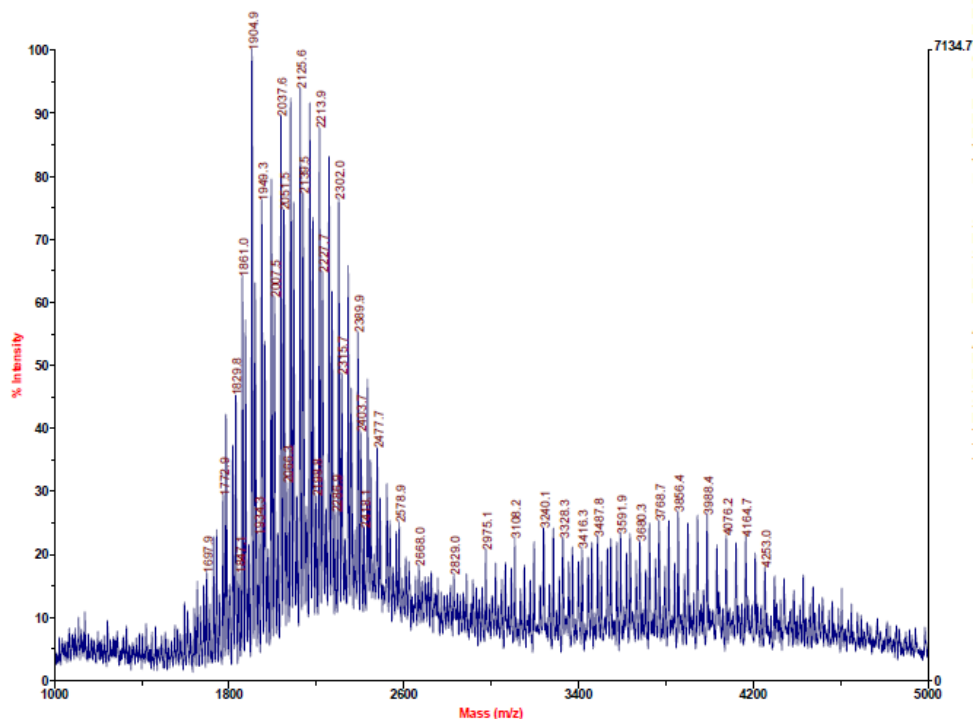
Así, una vez comprobado que tenemos el compuesto deseado, lo intentamos purificar mediante cromatografía líquida semipreparativa de alta eficacia. Para ello se buscaron las condiciones más adecuadas de separación y se llevó a cabo la purificación. Obtuvimos 3 mg de lo que consideramos era nuestro producto por lo que realizamos los análisis de caracterización pertinentes de  $^1\text{H}$ -RMN y MALDI.

En el caso del experimento de  $^1\text{H}$ -RMN, se observaron claramente las señales del conjugado paracetamol-mPEG **16** como se puede ver en la siguiente figura 40.



**Figura 40.** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del conjugado paracetamol-mPEG.

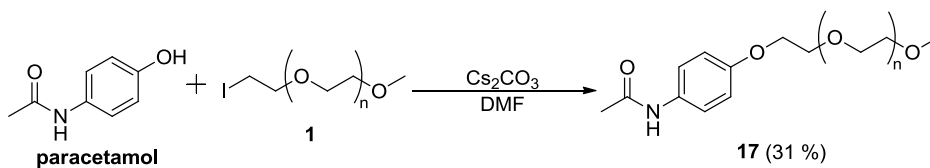
Sin embargo, cuando se estudiaron los resultados obtenidos en el experimento de masas MALDI (figura 41), además de la señal del compuesto **16** se encuentra una señal, aunque menos intensa, de un derivado de PEG distinto del reactivo **11** y que no conseguimos caracterizar.



**Figura 41.** Espectro de masas MALDI del conjugado paracetamol-mPEG.

Por lo tanto, decidimos cambiar de estrategia y unir el paracetamol al mPEG mediante un enlace éter.

Así, se hicieron reaccionar 1.3 equivalentes del paracetamol comercial con 1 eq del mPEG **1** en presencia de  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  como base, como se observa en el siguiente esquema 19. Se eligieron las mismas condiciones de reacción que las empleadas para la síntesis del conjugado  $\Delta^9$ -THC-mPEG **2** ya descrito anteriormente en esta tesis y con la que obtuvimos buen resultado.



**Esquema 19**

Tras 1.5 horas de calentamiento por microondas a 90 °C y 2 horas de calentamiento por microondas a 160 °C, se necesitó calentar el medio de reacción a reflujo de DMF durante una semana para completar la reacción

Así obtuvimos el conjugado paracetamol-mPEG **17** con un rendimiento moderado del 31% tras su purificación por cromatografía sobre gel de sílice.

#### 4.3.- Evaluación farmacológica:

Se realizaron estudios farmacológicos *in vitro* de desplazamiento de radioligando al conjugado **17** obtenido.

*Ensayos de desplazamiento de radioligando* – La afinidad por los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> del nuevo compuesto **17** sintetizado se evaluó mediante la realización de ensayos de desplazamiento del radioligando [<sup>3</sup>H]-CP55940. La tabla 14 recoge los datos de desplazamiento del paracetamol conjugado al mPEG y del propio paracetamol libre.

Compuesto	K <sub>i</sub> (nM) CB <sub>1</sub>	K <sub>i</sub> (nM) CB <sub>2</sub>
<b>17</b>	>40μM	>40μM
<b>paracetamol</b>	62%	>40μM

**Tabla 14.** Constantes de afinidad.

Como se puede observar tanto el paracetamol libre como el conjugado con mPEG no presentan afinidad por los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> como cabría esperar puesto que, como ya se comentó en la introducción sobre el paracetamol, el efecto cannabinoide que podría tener esta especie se observa tras unirse al ácido araquidonónico mediante un proceso metabólico.

Por ello, el siguiente paso en el estudio farmacológico de nuestro conjugado **17** sintetizado sería el de realizar estudios *in vivo* donde realmente se observe si dicho conjugado es un profármaco como el paracetamol libre o no.

Los ensayos como analgésico del conjugado paracetamol-mPEG **17** están pendientes de realización.

## 5.- CONCLUSIÓN:

En este capítulo de la tesis doctoral se describe la síntesis de compuestos conjugados con mPEG y la evaluación farmacológica de dichos compuestos frente a los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. En concreto, las conclusiones más significativas del capítulo son las siguientes:

- Se sintetizaron derivados de rimonabant conjugados a un polímero de polietilenglicol mediante un espaciador de longitud variable dando lugar a compuestos hidrosolubles.
- Se estudió la estabilidad de estos conjugados cannabinoides de mPEG mediante ensayos de biotransformación metabólica *in vitro* obteniéndose como resultado que son estables frente a varios sistemas enzimáticos.
- Se evaluó la unión de dichos compuestos hidrosolubles a los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. Cuatro de ellos (**12f**, **12g**, **12h** y **12l**) presentaron una afinidad significativa por el receptor CB<sub>1</sub>, dos de los cuales (**12e** y **12h**) se comportaron como antagonistas cannabinoides en ensayos de tejidos aislados.
- Se realizaron ensayos comportamentales *in vivo* en ratones (antinocicepción, hipotermia, inmovilidad en el anillo, actividad locomotora) sobre dos de los conjugados (**12e** y **12h**). La falta de actividad con 10 mg/kg puede deberse a compuestos inactivos *in vivo* o que no tienen efectos sobre el sistema nervioso central.
- Se hicieron estudios de microdiálisis cerebral en animal despierto con el compuesto **12h** apreciándose un aumento de los niveles de serotonina a dosis altas de 30 mg/kg, lo que indica que dicho conjugado atraviesa la barrera hematoencefálica a esta dosis.

- Se preparó un ligando cannabinoide bivalente cuya estructura corresponde a dos farmacóforos de rimonabant separados por un polietilenglicol. Los resultados de estudio de unión a receptor sugieren una interacción con las entidades oligoméricas de los receptores cannabinoides.
- Se consiguió la preparación de un derivado de  $\Delta^9$ -THC conjugado con mPEG dando lugar a un compuesto hidrosoluble.
- Se sintetizó un conjugado cromenopirazol-mPEG con una afinidad débil por el receptor cannabinoide CB<sub>2</sub> mientras que el propio cromenopirazol presenta afinidad por el receptor CB<sub>1</sub>.





## PARTE EXPERIMENTAL



## 1. PARTE EXPERIMENTAL QUÍMICA:

### 1.1. Materiales y métodos generales:

Los experimentos que involucraron compuestos sensibles al H<sub>2</sub>O se realizaron en condiciones anhidras bajo atmósfera de nitrógeno. El CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se secó destilándolo sobre CaCl<sub>2</sub> y el THF se destiló sobre Na /benzofenona.

El seguimiento de las reacciones se efectuó por cromatografía en capa fina empleando cromatofolios de gel de sílice tipo F254 (Merck), de un espesor de capa de 0,2 mm. Los compuestos se detectaron con luz UV de 254 y 365 nm. Y se revelaron utilizando PMA como agente revelador.

El reactor de microondas utilizado fue el Biotage Initiator 2.0.

La purificación de los productos de reacción se realizó por cromatografía en columna bajo presión (cromatografía flash) utilizando como soporte gel de sílice 60 Merck 230-400 mesh.

La cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas (HPLC/EM) se realizó en un cromatógrafo Waters integrado por un módulo de separación Alliance 2695, un detector Photodiode Array 2996 y un espectrómetro de masas Micromass ZQ 2000, utilizando unas columnas de fase reversa Waters XBridge C18-3,5 μm de dimensiones 2,1 mm x 150 mm y Sunfire™ C18-3,5 μm de dimensiones 4.6 mm x 50 mm. Como fase móvil se emplearon mezclas de A: MeCN + 0,1 % Ac. fórmico y B: H<sub>2</sub>O + 0,1 % Ac. fórmico. El gradiente y tiempo utilizados vienen indicados en cada caso, a un flujo de 0,25 mL/min para la columna XBridge y un flujo de 1 mL/min para la columna Sunfire. La detección de masas se realizó mediante el equipo MicroMass ZQ acoplado al módulo de HPLC utilizando tres voltajes de cono diferentes (20, 40 y 60V) y detección por ESI-MS positiva. Los datos obtenidos de la detección de masas vienen expresados

en unidades de relación masa/carga ( $m/z$ ) y el valor entre paréntesis indica la intensidad relativa de la señal frente al pico base (100%).

La separación por cromatografía líquida de alta resolución semipreparativa se realizó en un cromatógrafo Waters integrado por un módulo inyector/colector 2767 Sample Manager, por un módulo de separación System Fluidic Organizer, una bomba 2545 Binary Gradient, un detector Photodiode Array 2998 (UV-visible) y un espectrómetro de masas 3100 Mass Detector. Como columnas de fase reversa para la separación se utilizaron la Sunfire™ C18-5  $\mu\text{m}$  de dimensiones 10 mm x 150 mm con flujo de 8 mL/min y de 19 mm x 150 mm con flujo de 24 mL/min. Como columna de fase reversa para el análisis se utilizó la Sunfire™ C18-5  $\mu\text{m}$  de dimensiones 4.6 mm x 150 mm con flujo de 1 mL/min. Como fase móvil se emplearon mezclas de A: MeCN + 0,08 % Ac. fórmico y B: H<sub>2</sub>O + 0,1 % Ac. fórmico.

Los análisis de RMN fueron registrados en un espectrómetro Bruker 300 MHz a 25 °C y utilizando CDCl<sub>3</sub> como disolvente a no ser que se indique lo contrario. Los desplazamientos químicos se describen en la escala  $\delta$  (en ppm) tomando como referencia la señal del disolvente empleado. En los espectros de <sup>1</sup>H RMN se indica además la multiplicidad (s, singlete; d, doblete; dd, doblete de dobletes; t, triplete; c, cuartete; q, quintuplete; m, multiplete; sa, singlete ancho), el valor de las constantes de acoplamiento ( $J$ , en Hz), el número de protones correspondientes a cada señal y la asignación de las señales más significativas.

Los análisis de MALDI se llevaron a cabo usando un espectrómetro de masas Voyager DE-PRO (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipado con un láser pulsado de nitrógeno ( $\lambda=337$  nm, 3 ns anchura de pulso, y 3 Hz de frecuencia). Los iones positivos generados por la desorción láser se introdujeron en el tubo de vuelo con un voltaje de aceleración de 25 kV, trabajando en el modo lineal y con extracción retardada de los iones. Los espectros de masas se obtuvieron en el intervalo de  $m/z$  de 1000-6000 u. Como calibración externa se

usó angiotensina I, hormona adrenocorticotropa (fragmentos 1-17, 18-39 y 7-38) e insulina bovina. Las muestras se disolvieron en agua, llevándolas a una concentración de 3mM. Se tomó 1  $\mu$ L de disolución y se mezcló con 4  $\mu$ L de la matriz (ácido 2,5-dihidroxibenzoico, 10 mg/ml en acetonitrilo). Después, 1 $\mu$ l de esta disolución se depositó sobre una placa de muestras de acero inoxidable y se secó con aire. Los datos obtenidos vienen expresados en unidades de relación masa/carga (m/z) y el valor entre paréntesis indica la intensidad relativa de la señal frente al pico base (100%).

Los análisis elementales se realizaron en el laboratorio de microanálisis del centro de Química Orgánica “Lora Tamayo”, con un analizador LECO CHNS-932.

Los puntos de fusión no están corregidos y se midieron en un aparato MP 70 Melting Point System de Mettler Toledo.

La numeración empleada en la parte experimental no ha seguido los criterios de la IUPAC en todos los casos, por lo que sólo se ha empleado para la caracterización de los compuestos sintetizados.

## **1.2. Procedimientos experimentales:**

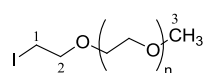
### **1.2.1. Síntesis de los compuestos derivados $\Delta^9$ -THC-PEG y cromenopirazol-PEG**

#### **Yoduro de metoxipolietilenglicol (1)**

Sobre una disolución de 2.0 g (1.0 mmol) de mPEG en 10.0 mL de DCM seco se le añaden 272.0  $\mu$ L de TEA y se enfría a 0°C. Se adiciona gota a gota una disolución de 202.0 mg (1.1 mmol) de cloruro de *p*-toluensulfonilo en 2.0 mL de DCM y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 h. La reacción se hidroliza con 10.0 mL de agua. Se adiciona una disolución saturada de NaCl y la fase orgánica se separa, se seca sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtra. El disolvente se

elimina a presión reducida obteniéndose 2.0 g del producto tosilado que se utiliza posteriormente sin purificar.

A continuación, los 2.0 g (0.9 mmol) del producto tosilado se disuelven en 20.0 mL de acetona seca y se añaden 310.0 mg (1.9 mmol) de KI. La reacción se agita a reflujo durante 24 horas. Tras enfriar, la mezcla de reacción se filtra bajo vacío y se lava el residuo con acetona. La disolución se colecta, se concentra y se redisuelve en 50.0 mL de DCM. Se lava sucesivamente con una disolución 1 N de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y con una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se colecta, se seca sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtra y el disolvente se elimina a vacío. El producto se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de DCM:MeOH (20:1). Rendimiento: 26 %, sólido amarillo.



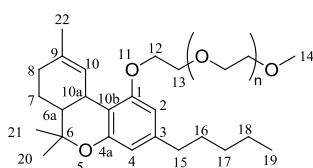
**P.f.** 49.4 °C

<sup>1</sup>H RMN δ 3.83-3.34 (m, 126H [PEG]), 3.26 (s, 3H [3]), 3.14 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H [1]).

<sup>13</sup>C RMN δ 71.5 [1], 70.2 [PEG], 58.6 [3].

### **6,6,9-Trimetil-1-metoxipolietilenglicol-3-pentil-6a,7,8,10a-tetrahidro-6H-benzo[c]cromeno (2)**

Una mezcla de 115.0 mg (0.4 mmol) de Δ<sup>9</sup>-THC y 357.8 mg (1.1 mmol) de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 6.0 mL de DMF se agita a temperatura ambiente durante una hora. Entonces se adiciona una disolución de 514.4 mg (0.2 mmol) del yoduro de metoxipolietilenglicol **1** en 8.0 mL de DMF y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante una semana. Se adiciona una disolución saturada de NaCl y la fase acuosa se extrae tres veces con DCM. La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se elimina el disolvente a vacío. El crudo de reacción se liofiliza para eliminar los restos de DMF y el producto se purifica una vez por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de DCM:MeOH (20:1) y posteriormente se aísla por HPLC semipreparativo. Rendimiento: 7 %, sólido blanco.



**P.f.** se descompone a 50 °C

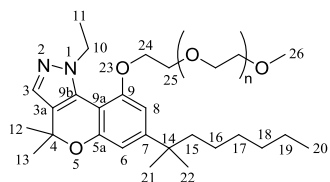
**<sup>1</sup>H RMN**  $\delta$  (Varian Unity 500 MHz) 6.34 (s, 1H [2]), 6.28 (s, 1H [4]), 6.22 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H [10]), 4.17-4.08 (m, 2H [12]), 3.92-3.82 (m, 2H [13]), 3.80-3.42 (m, 11H [PEG]), 3.37 (s, 3H [14]), 3.16 (m, 1H [10a]), 2.46 (c,  $J = 6.6$  Hz, 2H [15]), 2.12 (m, 1H [6a]), 1.75 (m, 4H [8]), 1.64 (s, 6H [20, 21]), 1.55 (m, 4H [7]), 1.39 (s, 3H [22]), 1.35-1.19 (m, 6H [16, 17, 18]), 0.87 (t,  $J = 6.8$  Hz, 3H [19]).

**<sup>13</sup>C RMN**  $\delta$  (Varian Unity 500 MHz) 195.5 [1], 157.5, 142.5, 132.9, 125.1 [2], 110.3 [4], 103.8 [10], 72.0 [CH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub> PEG], 70.6 [PEG], 69.9 [13], 67.3 [12], 59.0 [14], 45.8, 36.0 [15], 33.9 [10a], 31.5 [6a], 31.3 [7], 30.8, 27.6 [22], 25.1, 23.5 [20, 21], 22.6, 19.2, 14.0 [19].

**EM (MALDI-TOF)**  $M_n$ : 2129.97,  $M_w$ : 2151.68 y IP: 1.01.

### 1-Etil-4,4-dimetil-7-(2-metiloctan-2-il)-9-metoxipolietilenglicol-1,4-dihidrocromeno[4,3-c]pirazol (3)

Una mezcla de 30.0 mg (0.1 mmol) de 1-etil-4,4-dimetil-1,4-dihidrocromeno[4,3-c]pirazol-9-ol y 79.2 mg (0.2 mmol) de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 2.0 mL de DMF se agita a temperatura ambiente durante una hora. Entonces se adiciona una disolución de 113.9 mg (0.1 mmol) del yoduro de metoxipolietilenglicol **1** en 2.0 mL de DMF y la mezcla se calienta a 90°C mediante microondas durante 4.5 horas. Se adiciona una disolución saturada de NaCl y la fase acuosa se extrae tres veces con DCM. La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se elimina el disolvente a vacío. El crudo de reacción se liofiliza para eliminar los restos de DMF y el producto se purifica una vez por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de DCM:MeOH (20:1) y posteriormente se aísla por HPLC semipreparativo. Rendimiento: 40 %, sólido amarillo.



**P.f.** 48.7 °C

**<sup>1</sup>H RMN**  $\delta$  (Varian Unity 500 MHz) 7.30 (s, 1H [3]), 6.66 (s, 1H [8]), 6.54 (s, 1H [6]), 4.55 (c,  $J = 7.1$  Hz, 2H [10]), 4.25 (t,  $J = 4.9$  Hz, 2H [24]), 3.87 (t,  $J = 4.9$  Hz, 2H [25]), 3.81-3.44 (m, 115H [PEG]), 3.37 (s, 3H [26]), 1.54 (s, 6H [12, 13]), 1.35 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H [11]), 1.30-1.01 (m, 16H [15, 16, 17, 18, 19, 21, 22]), 0.83 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H [20]).

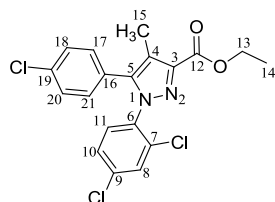
**<sup>13</sup>C RMN**  $\delta$  (Varian Unity 500 MHz) 153.9 [9], 153.0 [5a], 152.1 [7], 132.1 [3], 131.7 [9b], 123.3 [3a], 109.8 [8], 104.7 [9a], 103.5 [6], 76.4 [4], 71.9 [CH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub> PEG], 70.5 [PEG], 69.4 [25], 67.8 [24], 59.0 [26], 48.0 [10], 44.4, 38.0, 31.7, 29.9, 28.7, 27.2 [12, 13], 24.6, 22.6, 15.5 [11], 14.0 [20].

**EM (MALDI-TOF)**  $M_n$ : 2457.4,  $M_w$ : 2491.4, IP: 1.01.

### 1.2.2. Síntesis de los productos intermedios.

#### 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxilato de etilo (4)

La síntesis del compuesto etil carboxilato se realizó según el procedimiento descrito en la bibliografía<sup>165</sup>. Rendimiento: 26 %, sólido amarillo anaranjado.



**P.f.** 123.3 °C (P.f. lit. 156-158 °C)

**<sup>1</sup>H RMN**  $\delta$  7.48-7.20 (m, 5H [8, 10, 11, 17, 21]), 7.07 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H [18, 20]), 4.45 (c,  $J = 7.1$  Hz, 2H [13]), 2.33 (s, 3H [15]), 1.43 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H [14]).

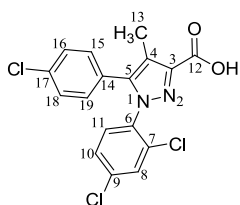
**<sup>13</sup>C RMN**  $\delta$  162.7 [12], 143.0 [5], 142.8 [3], 136.0 [6, 7], 135.0 [19], 133.0 [9], 130.8 [18, 20], 130.7 [8], 130.1 [10], 129.0 [17, 21], 127.7 [11], 127.0 [16], 119.1 [4], 60.9 [13], 14.4 [14], 9.6 [15].

<sup>165</sup> V. K. Kotagiri, S. Suthrapu, J. M. Reddy, C. P. Rao, V. Bollugoddu, A. Bhattacharya, R. Bandichhor "An improved synthesis of rimonabant: Anti-obesity drug" *Organic Process Research & Development* **2007**, *11*, 910.



**Ácido 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxílico (5)**

La síntesis del ácido carboxílico representado se realizó según el procedimiento descrito en la bibliografía<sup>166</sup>. Rendimiento: 97 %, sólido amarillo.

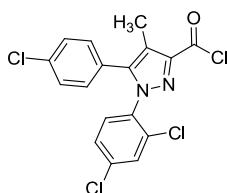


**P.f.** 175.3 °C

**<sup>1</sup>H RMN** (CD<sub>3</sub>OD) δ 7.76-7.20 (m, 5H [8, 10, 11, 15, 19]), 7.40 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H [16, 18]), 2.49 (s, 3H [13]).

**<sup>13</sup>C RMN** δ 165.4 [12], 144.7 [5], 144.3 [3], 137.6 [6], 137.1 [7], 136.3 [17], 134.2 [9], 132.5 [16, 18], 131.1 [8], 129.9 [10], 129.7 [15, 19], 129.3 [11], 128.4 [14], 120.0 [4], 9.8 [13].

**Cloruro de 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxilato de ácido (6)**



A una disolución de 987.0 mg del compuesto **5** (2.5 mmol) en tolueno se adicionan 291.0 μL de cloruro de tionilo (4.0 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 3 horas. El disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se redissuelve en tolueno y el disolvente se vuelve a eliminar a presión reducida. Se utiliza en las etapas siguientes sin purificación previa.

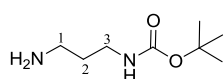
**1.2.2.2. *tert*-BUTIL AMINOALQUIL CARBAMATOS (7A-M). PROCEDIMIENTO GENERAL**

Sobre una disolución de la diamina indicada en cada caso en cloroformo a 0°C se adiciona otra disolución de Boc<sub>2</sub>O en cloroformo. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche y se filtra sobre celita. El disolvente se elimina a presión reducida y el aceite obtenido se redissuelve en AcOEt y se lava

<sup>166</sup> V. K. Kotagiri, S. Suthrapu, J. M. Reddy, C. P. Rao, V. Bollugoddu, A. Bhattacharya, R. Bandichhor "An improved synthesis of rimonabant: Anti-obesity drug" *Organic Process Research & Development* **2007**, *11*, 910.

con una disolución de NaCl al 50 %. Los extractos orgánicos se secan sobre MgSO<sub>4</sub>. El disolvente se elimina a presión reducida. La purificación del producto se lleva a cabo mediante cromatografía en columna si fuera necesario.

### 3-Aminopropil carbamato de *tert*-butilo (7a)



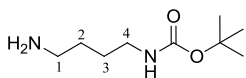
Se emplea 1.3 mL (15.0 mmol) de 1,3-diaminopropano como diamina y 0.7 mL (3.0 mmol) de Boc<sub>2</sub>O. El producto se obtiene sin necesidad de posterior purificación. Rendimiento: 98 %, sólido blanco.

**P.f.** 141.1 °C

<sup>1</sup>H RMN δ 4.93 (sa, 1H [NH]), 3.33-3.08 (m, 2H [3]), 2.79 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H [1]), 1.70-1.52 (m, 2H [2]), 1.44 (s, 9H [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]).

<sup>13</sup>C RMN δ 156.2 [C=O], 79.3 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 39.5 [1], 38.4 [3], 33.0 [2], 28.4 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>].

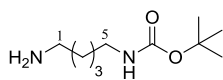
### 4-Aminobutil carbamato de *tert*-butilo (7b)



Se emplea 1.3 g (15.0 mmol) de 1,4-diaminobutano como diamina y 0.7 mL (3.0 mmol) de Boc<sub>2</sub>O. El producto se obtiene sin necesidad de posterior purificación. Rendimiento: 32 %, aceite amarillo.

<sup>1</sup>H RMN δ 4.74 (sa, 1H [NH]), 3.30-2.95 (m, 2H [4]), 2.74 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H [1]), 2.29 (sa, 2H [NH<sub>2</sub>]), 1.66-1.11 (m, 4H [2,3]), 1.43 (s, 9H [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]).

<sup>13</sup>C RMN δ 156.0 [C=O], 79.1 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 41.5 [1], 40.4 [4], 33.2, 28.4 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 27.4.

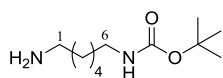
**5-Aminopentil carbamato de *tert*-butilo (7c)**

Se emplea 1.8 mL (15.0 mmol) de 1,5-diaminopentano como diamina y 0.7 mL (3.0 mmol) de Boc<sub>2</sub>O. El producto se obtiene sin necesidad de posterior purificación. Rendimiento: 55 %, sólido amarillo.

**P.f.** 94.8 °C

<sup>1</sup>H RMN δ 4.98 (sa, 1H [NH]), 3.32-2.61 (m, 4H [1, 5]), 1.86-1.01 (m, 6H [2-4]), 1.42 (s, 9H [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]).

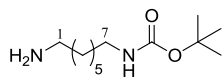
<sup>13</sup>C RMN δ 156.2 [C=O], 79.0 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 40.4 [1, 5], 29.8, 28.5 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 24.0, 23.9.

**6-Aminohexil carbamato de *tert*-butilo (7d)**

Se emplea 6.7 g (57.3 mmol) de 1,6-diaminohexano como diamina y 2.6 mL (11.5 mmol) de Boc<sub>2</sub>O. El producto se obtiene sin necesidad de posterior purificación. Rendimiento: 46 %, aceite amarillo.

<sup>1</sup>H RMN δ 4.64 (sa, 1H [NH]), 3.31-2.93 (m, 2H [6]), 2.90-2.55 (m, 2H [1]), 1.66-1.10 (m, 8H [2-5]), 1.43 (s, 9H [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]).

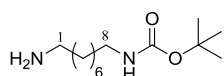
<sup>13</sup>C RMN δ 156.0 [C=O], 79.0 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 41.6 [1], 40.5 [6], 32.4, 30.1, 29.9, 28.4 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 26.5.

**7-Aminoheptil carbamato de *tert*-butilo (7e)**

Se emplea 20.5 g (157.7 mmol) de 1,7-diaminoheptano como diamina y 7.3 mL (31.5 mmol) de Boc<sub>2</sub>O. El producto se obtiene sin necesidad de posterior purificación. Rendimiento: 72 %, aceite anaranjado.

<sup>1</sup>H RMN δ 4.51 (sa, 1H [NH]), 3.19-2.96 (m, 2H [7]), 2.67 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H [1]), 1.77-1.05 (m, 10H [2-6]), 1.43 (s, 9H [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]).

**EM (ESI+)** *m/z* 231.0 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

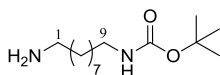
**8-Aminooctil carbamato de *terc*-butilo (7f)**

Se emplea 2.2 g (15.0 mmol) de 1,8-diaminooctano como diamina y 0.7 mL (3.0 mmol) de  $\text{Boc}_2\text{O}$ . El producto se obtiene sin necesidad de posterior purificación. Rendimiento: 60 %, sólido amarillo.

**P.f.** 79.7 °C

$^1\text{H RMN}$   $\delta$  4.52 (sa, 1H [NH]), 3.30-2.92 (m, 2H [8]), 2.67 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H [1]), 1.83-1.05 (m, 12H [2-7]), 1.43 (s, 9H [( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>]).

$^{13}\text{C RMN}$   $\delta$  156.0 [C=O], 79.0 [ $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$ ], 42.1 [1], 40.6 [8], 33.5, 30.0, 29.3, 29.2, 28.4 [ $\underline{\text{C}}(\text{H}_3)_3$ ], 26.8, 26.7.

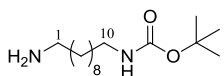
**9-Aminononil carbamato de *terc*-butilo (7g)**

Se emplea 2.3 g (15.0 mmol) de 1,9-diaminononano como diamina y 0.7 mL (3.0 mmol) de  $\text{Boc}_2\text{O}$ . El producto se obtiene sin necesidad de posterior purificación. Rendimiento: 90 %, sólido blanco.

**P.f.** 120.4 °C

$^1\text{H RMN}$   $\delta$  4.51 (sa, 1H [NH]), 3.29-2.94 (m, 2H [9]), 2.67 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H [1]), 1.70-1.00 (m, 14H [2-8]), 1.43 (s, 9H [( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>]).

$^{13}\text{C RMN}$   $\delta$  156.0 [C=O], 79.0 [ $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$ ], 42.3 [1], 41.1 [9], 33.9, 32.9, 30.0, 29.4, 28.4 [ $\underline{\text{C}}(\text{H}_3)_3$ ], 27.4, 26.8, 25.9.

**10-Aminodecil carbamato de *terc*-butilo (7h)**

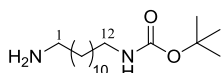
Se emplea 2.6 g (15.0 mmol) de 1,10-diaminodecano como diamina y 0.7 mL (3.0 mmol) de  $\text{Boc}_2\text{O}$ . El producto se obtiene sin necesidad de posterior purificación. Rendimiento: 52 %, sólido amarillo pálido.

**P.f.** 91.4 °C

$^1\text{H RMN}$   $\delta$  4.56 (sa, 1H [NH]), 3.25-2.96 (m, 2H [10]), 2.65 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H [1]), 1.60-1.02 (m, 16H [2-9]), 1.41 (s, 9H [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]).

$^{13}\text{C RMN}$   $\delta$  156.0 [C=O], 78.9 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 42.1 [1], 40.6 [10], 39.6, 33.7, 30.0, 29.5, 29.4, 29.2, 28.4 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 26.8, 23.2.

### 12-Aminododecil carbamato de *terc*-butilo (7i)



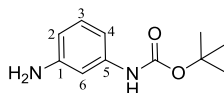
Se emplea 3.0 g (15.0 mmol) de 1,12-diaminododecano como diamina y 0.7 mL (3.0 mmol) de Boc<sub>2</sub>O. El producto se obtiene sin necesidad de posterior purificación. Rendimiento: 77 %, sólido blanco.

**P.f.** 96.4 °C

$^1\text{H RMN}$   $\delta$  4.51 (sa, 1H [NH]), 3.24-2.94 (m, 2H [12]), 2.67 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H [1]), 1.73-0.99 (m, 20H [2-11]), 1.43 (s, 9H [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]).

$^{13}\text{C RMN}$   $\delta$  155.5 [C=O], 78.5 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 41.8 [1], 40.1 [12], 33.4, 29.9, 29.7, 29.6, 29.1, 29.0, 28.8, 28.7, 27.9 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 27.3, 26.3.

### 3-Aminofenil carbamato de *terc*-butilo (7j)

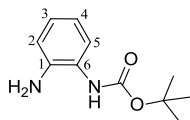


Se emplea 1.6 g (15.0 mmol) de 1,3-fenilendiamina como diamina y 0.7 mL (3.0 mmol) de Boc<sub>2</sub>O. Se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de AcOEt-hexano (1:3) Rendimiento: 69 %, sólido gris.

**P.f.** 188.8 °C

$^1\text{H RMN}$   $\delta$  7.15-6.88 (m, 1H [3]), 6.65-6.23 (m, 3H [2, 4, 6]), 3.64 (sa, 2H [NH<sub>2</sub>]), 1.51 (s, 9H [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]).

**EM (ESI+)**  $m/z$  209.0 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

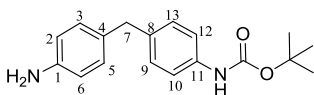
**2-Aminofenil carbamato de *terc*-butilo (7k)**

Se emplea 1.6 g (15.0 mmol) de 1,2-fenilendiamina como diamina y 0.7 mL (3.0 mmol) de  $\text{Boc}_2\text{O}$ . Se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de AcOEt-hexano (1:3) Rendimiento: 88 %, sólido marrón.

**P.f.** 113.2 °C

**$^1\text{H RMN}$**   $\delta$  7.31-7.20 (m, 1H [5]), 7.05-6.94 (m, 1H [3]), 6.83-6.69 (m, 2H [2, 4]), 6.28 (sa, 1H [NH]), 3.63 (sa, 2H [NH<sub>2</sub>]), 1.51 (s, 9H [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]).

**EM (ESI+)**  $m/z$  209.0 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

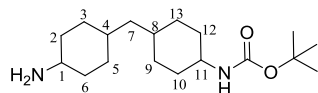
**4-(4-Aminobencil)fenil)carbamato de *terc*-butilo (7l)**

Se emplea 3.4 g (17.0 mmol) de 4,4'-diaminodifenilmetano como diamina y 0.7 mL (3.0 mmol) de  $\text{Boc}_2\text{O}$ . Se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente un gradiente de la mezcla de AcOEt-hexano (0:1 a 1:2) Rendimiento: 95 %, sólido blanco.

**P.f.** 131.7 °C

**$^1\text{H RMN}$**   $\delta$  7.38-6.76 (m, 6H [3, 5, 9, 10, 12, 13]), 6.66-6.46 (m, 2H [2, 6]), 6.34 (sa, 1H [NH]), 3.75 (s, 2H [7]), 3.49 (sa, 2H [NH<sub>2</sub>]), 1.44 (s, 9H [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]).

**EM (ESI+)**  $m/z$  299.0 [M+H]<sup>+</sup> (55%), 244.0 (100%).

**4-(4-Aminociclohexil)metil)carbamato de *terc*-butilo (7m)**

Se emplea 3.5 g (16.5 mmol) de 4,4'-metilenebis(ciclohexilamina) como diamina y 0.8 mL (3.0 mmol) de  $\text{Boc}_2\text{O}$ . El producto se obtiene sin necesidad de posterior purificación. Rendimiento: 97 %, sólido marrón.

**P.f.** 158.7 °C

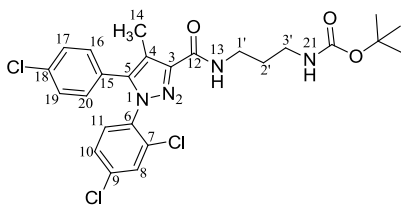
**$^1\text{H RMN}$**   $\delta$  4.48 (sa, 1H [NH]), 2.98-2.81 (m, 1H [11]), 2.61-2.43 (m, 1H [1]), 2.03-0.61 (m, 29H [biciclohexilo]), 1.38 (s, 9H [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]).

**EM (ESI+)**  $m/z$  311.0  $[M+H]^+$  (100%).

### 1.2.3. Síntesis de n-(5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)alquil carbamatos de *terc*-butilo. Procedimiento general.

Sobre una disolución de la amina monoprottegida de Boc indicada en cada caso con TEA en DCM se adiciona una disolución del cloruro de ácido **6** en DCM. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche y el disolvente se elimina a presión reducida. La purificación del producto se lleva a cabo mediante cromatografía en columna en las condiciones indicadas en cada caso.

### 3-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)propil carbamato de *terc*-butilo (**8a**)



Se emplea 104.5 mg (0.6 mmol) de la amina **7a**, 84.0  $\mu$ L (0.6 mmol) de TEA y 200.0 mg (0.5 mmol) del cloruro de ácido **6**. Se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de AcOEt-hexano

(1:3). Rendimiento: 69 %, sólido amarillo.

**P.f.** 224.9 °C

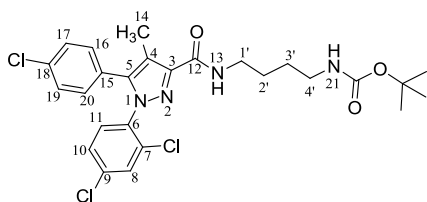
**$^1\text{H}$  RMN**  $\delta$  7.42 (d,  $J$  = 1.6 Hz, 1H [8]), 7.34-7.27 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.12-7.01 (m, 3H [17, 19, 21]), 5.08 (sa, 1H, [13]), 3.48 (c,  $J$  = 6.4 Hz, 2H [1']), 3.19 (c,  $J$  = 6.2 Hz, 2H [3']), 2.37 (s, 3H [14]), 1.80-1.69 (m, 2H [2']), 1.43 (s, 9H [( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>]).

**$^{13}\text{C}$  RMN**  $\delta$  163.6 [12], 145.3 [5], 143.5 [3], 136.4 [6, 7], 135.3 [18], 133.4 [9], 131.2 [17, 19], 130.9 [10], 130.7 [8], 129.3 [16, 20], 128.3 [11], 127.6 [15], 118.1 [4], 79.5 [ $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ], 38.0 [3'], 36.4 [1'], 30.8 [2'], 28.8 [ $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ], 9.8 [14].

**MS (ESI+)**  $m/z$ : 539.3  $[M+H]^+$  (100%).

**Anal.** calculado  $C_{25}H_{27}Cl_3N_4O_3$ : C 55.83, H 5.06, N 10.42, Cl 19.77. Encontrado: C 55.67, H 5.21, N 10.44, Cl 19.95.

**4-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)butil carbamato de *terc*-butilo (8b)**



Se emplea 80.0 mg (0.4 mmol) de la amina **7b**, 56.0  $\mu$ L (0.4 mmol) de TEA y 120.0 mg (0.3 mmol) del cloruro de ácido **6**. Se purifica por cromatografía en columna

utilizando como eluyente un gradiente de la mezcla de AcOEt-hexano (1:3 a 1:2).

Rendimiento: 85 %, sólido blanco.

**P.f.** 233 °C

**$^1H$  RMN**  $\delta$  7.42 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H [8]), 7.33-7.27 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.06 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H [17, 19]), 6.99 (t,  $J = 6.1$  Hz, 1H [21]), 4.58 (sa, 1H [13]), 3.42 (c,  $J = 6.2$  Hz, 2H [1']), 3.14 (c,  $J = 5.6$  Hz, 2H [4']), 2.37 (s, 3H [14]), 1.77-1.49 (m, 4H [2', 3']), 1.43 (s, 9H [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]).

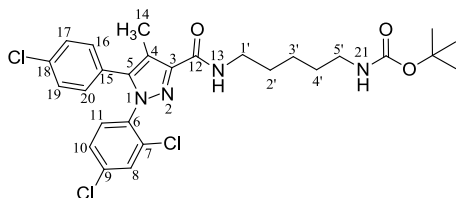
**$^{13}C$  RMN**  $\delta$  163.1 [12], 145.4 [5], 143.5 [3], 136.4 [6, 7], 135.3 [18], 133.4 [9], 131.2 [17, 19], 130.9 [10], 130.7 [8], 129.3 [16, 20], 128.3 [11], 127.6 [15], 118.1 [4], 79.5 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 40.7 [4'], 39.0 [1'], 28.8 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] 28.0 y 27.6 [2' y 3'], 9.8 [14].

**MS (ESI+)**  $m/z$ : 553.4 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

**Anal.** calculado  $C_{26}H_{29}Cl_3N_4O_3$ : C 56.58, H 5.30, N 10.15, Cl 19.27. Encontrado: C 56.39, H 5.60, N 9.89, Cl 19.61.



**5-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)pentil carbamato de *terc*-butilo (8c)**



Se emplea 120.8 mg (0.6 mmol) de la amina **7c**, 84.0  $\mu\text{L}$  (0.6 mmol) de TEA y 200.0 mg (0.5 mmol) del cloruro de ácido **6**. Se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente un

gradiente de la mezcla de AcOEt-hexano (1:3 a 1:2). Rendimiento: 87 %, sólido blanco.

**P.f.** 90.1 °C

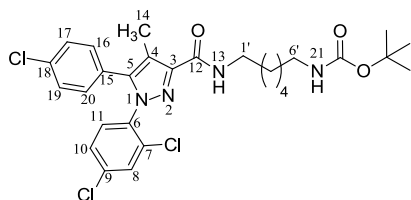
**$^1\text{H}$  RMN**  $\delta$  7.42 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H [8]), 7.35-7.19 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.07 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H [17, 19]), 6.96 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H [21]), 4.55 (sa, 1H [13]), 3.41 (c,  $J = 7.2$  Hz, 2H [1']), 3.10 (c,  $J = 6.5$  Hz, 2H [5']), 2.37 (s, 3H [14]), 1.74-1.56 (m, 2H [2']), 1.56-1.46 (m, 2H [4']), 1.46-1.33 (m, 11H [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 3']).

**$^{13}\text{C}$  RMN**  $\delta$  171.6 [C=O Boc], 163.1 [12], 145.4 [5], 143.4 [3], 136.4 [6, 7], 135.3 [18], 133.4 [9], 131.2 [17, 19], 130.9 [10], 130.7 [8], 129.3 [16, 20], 128.3 [11], 127.7 [15], 118.1 [4], 79.5 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 40.9 [5'], 39.1 [1'], 30.1 [4'], 29.9 [2'], 28.8 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 24.5 [3'], 9.8 [14].

**MS (ESI+)**  $m/z$ : 567.3 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

**Anal.** calculado C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: C 57.30, H 5.52, N 9.90, Cl 18.79. Encontrado: C 57.02, H 5.73, N 9.71, Cl 19.52.

**6-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)hexil carbamato de *terc*-butilo (8d)**



Se emplea 128.6 mg (0.6 mmol) de la amina **7d**, 84.0  $\mu$ L (0.6 mmol) de TEA y 200.0 mg (0.5 mmol) del cloruro de ácido **6**. Se purifica por cromatografía en columna

utilizando como eluyente un gradiente de la mezcla de AcOEt-hexano (1:3 a 1:2). Rendimiento: 92 %, sólido amarillo.

**P.f.** 231.9 °C

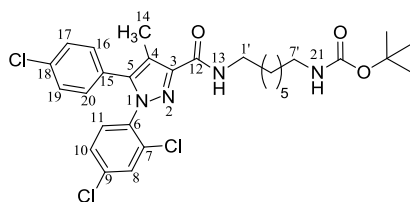
**<sup>1</sup>H RMN**  $\delta$  7.42 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H [8]), 7.33-7.22 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.06 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H [17, 19]), 6.95 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 1H [21]), 4.43 (sa, 1H [13]), 3.41 (c,  $J$  = 6.5 Hz, 2H [1']), 3.08 (sa, 2H [6']), 2.37 (s, 3H [14]), 1.75-1.29 (m, 8H [2'-5']), 1.43 (s, 9H [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]).

**<sup>13</sup>C RMN**  $\delta$  163.1 [12], 145.5 [5], 143.4 [3], 136.4 [6, 7], 135.3 [18], 133.4 [9], 131.2 [17, 19], 131.0 [10], 130.7 [8], 129.3 [16, 20], 128.3 [11], 127.7 [15], 118.1 [4], 79.5 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 40.9 [6'], 39.2 [1'], 30.4, 30.1, 28.8 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 27.0, 26.8, 9.8 [14].

**MS (ESI+)**  $m/z$ : 581.5 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

**Anal.** calculado C<sub>28</sub>H<sub>33</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: C 57.99, H 5.74, N 9.66, Cl 18.34. Encontrado: C 57.82, H 5.71, N 9.66, Cl 17.96.

**7-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)heptil carbamato de *terc*-butilo (8e)**



Se emplea 103.0 mg (0.5 mmol) de la amina **7e**, 62.0  $\mu$ L (0.5 mmol) de TEA y 150.0 mg (0.4 mmol) del cloruro de ácido **6**. Se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de

AcOEt-hexano (1:3). Rendimiento: 81 %, sólido blanco.

**P.f.** 156.2 °C

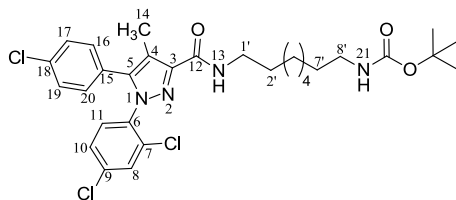
$^1\text{H RMN}$   $\delta$  7.43 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H [8]), 7.33-7.23 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.06 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H [17, 19]), 6.94 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H [21]), 4.49 (sa, 1H [13]), 3.40 (c,  $J = 6.7$  Hz, 2H [1']), 3.09 (c,  $J = 5.7$  Hz, 2H [7']), 2.37 (s, 3H [14]), 1.67-1.29 (m, 10H [2'-6']), 1.43 (s, 9H [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]).

$^{13}\text{C RMN}$   $\delta$  163.0 [12], 145.5 [5], 143.4 [3], 136.4 [6, 7], 135.3 [18], 133.4 [9], 131.2 [17, 19], 130.9 [10], 130.7 [8], 129.3 [16, 20], 128.3 [11], 127.7 [15], 118.1 [4], 79.4 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 41.0 [7'], 39.4 [1'], 30.4, 30.1, 29.4, 28.8 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 27.3, 27.1, 9.8 [14].

**EM (ESI+)**  $m/z$ : 595.5 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

**Anal.** calculado C<sub>29</sub>H<sub>35</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: C 58.64, H 5.94, N 9.43, Cl 18.34. Encontrado: C 58.47, H 5.89, N 9.31, Cl 18.35.

**8-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)octil carbamato de *terc*-butilo (8f)**



Se emplea 144.2 mg (0.6 mmol) de la amina **7f**, 84.0  $\mu\text{L}$  (0.6 mmol) de TEA y 200.0 mg (0.5 mmol) del cloruro de ácido **6**. Se purifica por cromatografía en

columna utilizando como eluyente un gradiente de la mezcla de AcOEt-hexano (1:3 a 1:2). Rendimiento: 90 %, sólido amarillo.

**P.f.** 101.4 °C

$^1\text{H RMN}$   $\delta$  7.43 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H [8]), 7.35-7.22 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.06 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H [17, 19]), 6.94 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H [21]), 4.49 (sa, 1H [13]), 3.40 (c,  $J = 6.7$  Hz, 2H [1']), 3.09 (c,  $J = 6.1$  Hz, 2H [8']), 2.37 (s, 3H [14]), 1.71-1.51 (m, 4H [2', 7']), 1.44 (s, 9H [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]), 1.38-1.26 (m, 8H [3'-6']).

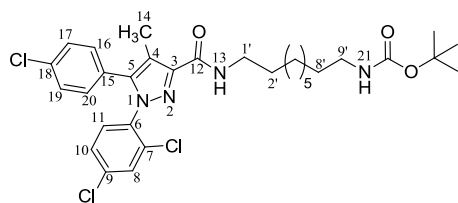
$^{13}\text{C RMN}$   $\delta$  171.6 [C=O Boc], 163.0 [12], 145.5 [5], 143.4 [3], 136.3 [6, 7], 135.3 [18], 133.4 [9], 131.2 (2C) [17, 19], 130.9 [10], 130.7 [8], 129.3 [16, 20], 128.3

[11], 127.7 [15], 118.1 [4], 79.4 [ $\underline{C}(\text{CH}_3)_3$ ], 41.0 [8'], 39.4 [1'], 30.4, 30.1, 29.6 (2C), 28.8 [ $\underline{C}(\text{H}_3)_3$ ], 27.3, 27.1, 9.8 [14].

**EM (ESI+)**  $m/z$ : 609.5 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

**Anal.** calculado  $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_3$ : C 59.26, H 6.13, N 9.21, Cl 17.49. Encontrado: C 59.18, H 6.12, N 9.11, Cl 17.19.

**9-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)nonil carbamato de *terc*-butilo (8g)**



Se emplea 152.0 mg (0.6 mmol) de la amina **7g**, 84.0  $\mu\text{L}$  (0.6 mmol) de TEA y 200.0 mg (0.5 mmol) del cloruro de ácido **6**. Se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente un

gradiente de la mezcla de AcOEt-hexano (1:3 a 1:2). Rendimiento: 51 %, sólido anaranjado.

**P.f.** 183.5 °C

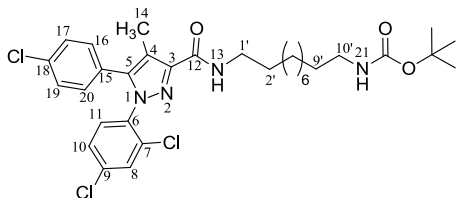
**<sup>1</sup>H RMN**  $\delta$  7.43 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H [8]), 7.33-7.22 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.06 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H [17, 19]), 6.94 (t,  $J = 6.1$  Hz, 1H [21]), 4.49 (sa, 1H [13]), 3.40 (c,  $J = 6.8$  Hz, 2H [1']), 3.09 (c,  $J = 6.1$  Hz, 2H [9']), 2.37 (s, 3H [14]), 1.71-1.49 (m, 4H [2', 8']), 1.44 (s, 9H [ $\underline{C}(\text{H}_3)_3$ ]), 1.38-1.22 (m, 10H [3'-7']).

**<sup>13</sup>C RMN**  $\delta$  171.6 [C=O Boc], 163.0 [12], 145.5 [5], 143.4 [3], 136.3 [6, 7], 135.3 [18], 133.4 [9], 131.2 [17, 19], 131.0 [10], 130.7 [8], 129.3 [16, 20], 128.3 [11], 127.7 [15], 118.1 [4], 79.4 [ $\underline{C}(\text{CH}_3)_3$ ], 41.0 [9'], 39.4 [1'], 30.4, 30.1, 29.8, 29.6 (2C), 28.8 [ $\underline{C}(\text{H}_3)_3$ ], 27.3, 27.2, 9.9 [14].

**EM (ESI+)**  $m/z$ : 623.5 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

**Anal.** calculado  $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_3$ : C 59.86, H 6.32, N 9.01, Cl 17.10. Encontrado: C 59.57, H 6.61, N 8.89, Cl 18.73.

**10-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)decil carbamato de *terc*-butilo (8h)**



Se emplea 159.8 mg (0.6 mmol) de la amina **7h**, 84.0  $\mu$ L (0.6 mmol) de TEA y 200.0 mg (0.5 mmol) del cloruro de ácido **6**. Se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente un

gradiente de la mezcla de AcOEt-hexano (1:3 a 1:2). Rendimiento: 71 %, sólido anaranjado.

**P.f.** 110.7 °C

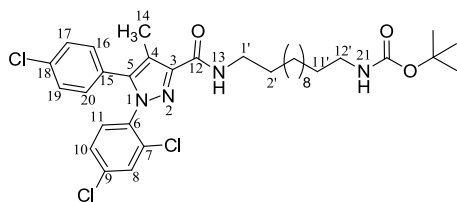
**$^1\text{H}$  RMN**  $\delta$  7.41 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H [8]), 7.31-7.21 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.04 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H [17, 19]), 6.93 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H [21]), 4.51 (sa, 1H [13]), 3.39 (c,  $J = 6.8$  Hz, 2H [1']), 3.07 (c,  $J = 6.2$  Hz, 2H [10']), 2.36 (s, 3H [14]), 1.66-1.45 (m, 4H [2', 9']), 1.42 (s, 9H [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]), 1.38-1.20 (m, 12H [3'-8']).

**$^{13}\text{C}$  RMN**  $\delta$  162.6 [12], 145.1 [5], 142.9 [3], 135.9 [6, 7], 134.8 [18], 133.0 [9], 130.8 [17, 19], 130.5 [10], 130.3 [8], 128.8 [16, 20], 127.8 [11], 127.2 [15], 117.6 [4], 78.9 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 40.6 [10'], 39.0 [1'], 30.0, 29.7, 29.4 (2C), 29.2 (2C), 28.4 (3C) [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 27.0, 26.7, 9.4 [14].

**EM (ESI+)**  $m/z$ : 637.6 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

**Anal.** calculado C<sub>32</sub>H<sub>41</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: C 60.43, H 6.50, N 8.81, Cl 16.72. Encontrado: C 60.63, H 6.83, N 9.27, Cl 16.99.

**12-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)dodecil carbamato de *terc*-butilo (8i)**



Se emplea 175.4 mg (0.6 mmol) de la amina **7i**, 84.0  $\mu$ L (0.6 mmol) de TEA y 200.0 mg (0.5 mmol) del cloruro de ácido **6**. Se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente un

gradiente de la mezcla de AcOEt-hexano (1:3 a 1:2). Rendimiento: 70 %, sólido amarillo.

**P.f.** 190.0 °C

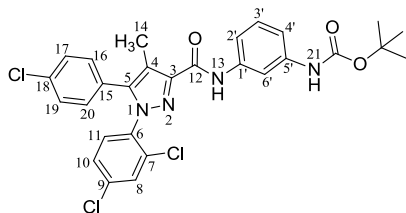
**$^1\text{H}$  RMN**  $\delta$  7.43 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H [8]), 7.36-7.20 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.06 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H [17, 19]), 6.94 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H [21]), 4.49 (sa, 1H [13]), 3.41 (c,  $J = 6.7$  Hz, 2H [1']), 3.09 (c,  $J = 6.4$  Hz, 2H [12']), 2.37 (s, 3H [14]), 1.72-1.50 (m, 4H [2', 11']), 1.44 (s, 9H [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]), 1.37-1.16 (m, 16H [3'-10']).

**$^{13}\text{C}$  RMN**  $\delta$  171.6 [C=O Boc], 163.0 [12], 145.6 [5], 143.4 [3], 136.4 [6, 7], 135.3 [18], 133.4 [9], 131.2 [17, 19], 130.9 [10], 130.7 [8], 129.3 [16, 20], 128.3 [11], 127.7 [15], 118.1 [4], 79.4 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 41.1 [12'], 39.5 [1'], 30.5, 30.2, 30.0 (3C), 29.7 (2C), 28.8 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 27.4, 27.2, 9.8 [14].

**EM (ESI+)**  $m/z$ : 665.6 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

**Anal.** calculado C<sub>34</sub>H<sub>45</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: C 61.49, H 6.83, N 8.44, Cl 16.02. Encontrado: C 61.59, H 6.62, N 8.42, Cl 16.52.

**3-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)fenil carbamato de *tert*-butilo (8j)**



Se emplea 125.0 mg (0.6 mmol) de la amina **7j**, 84.0  $\mu$ L (0.6 mmol) de TEA y 200.0 mg (0.5 mmol) del cloruro de ácido **6**. Se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de AcOEt-hexano

(1:5). Rendimiento: 80 %, sólido amarillo.

**P.f.** 260.4 °C

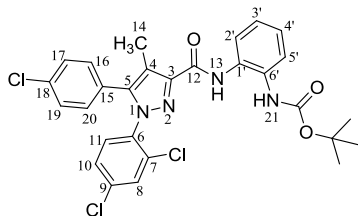
**<sup>1</sup>H RMN**  $\delta$  8.77 (s, 1H [21]), 7.76 (t,  $J = 2.0$  Hz, 1H [6']), 7.50-6.91 (m, 10H<sub>ar</sub>), 6.59 (sa, 1H [13]), 2.35 (s, 3H [14]), 1.44 (s, 9H [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]).

**<sup>13</sup>C RMN**  $\delta$  160.9 [C=O Boc], 153.1 [12], 145.1 [5], 143.8 [3], 139.5 [5'], 139.0 [1'], 136.5 [6], 136.2 [7], 135.4 [18], 133.4 [9], 131.3 [17, 19], 131.0 [10], 130.7 [8], 129.9 [3'], 129.3 [16, 20], 128.3 [11], 127.5 [15], 118.6 [4], 114.6 [6'], 114.3, 109.9 [2', 4'], 80.9 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 28.7 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 9.9 [14].

**EM (ESI+)**  $m/z$ : 573.3 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

**Anal.** calculado C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: C 58.81, H 4.41, N 9.80, Cl 18.60. Encontrado: C 58.48, H 4.04, N 9.47, Cl 18.97.

**2-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)fenil carbamato de *tert*-butilo (8k)**



Se emplea 125.0 mg (0.6 mmol) de la amina **7k**, 84.0  $\mu$ L (0.6 mmol) de TEA y 200.0 mg (0.5 mmol) del cloruro de ácido **6**. Se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente un gradiente de la mezcla de AcOEt-hexano

(1:5 a 1:3). Rendimiento: 95 %, sólido amarillo.

**P.f.** 214.1 °C

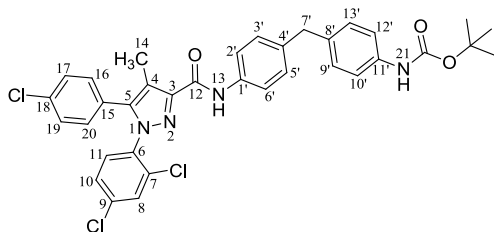
$^1\text{H RMN}$   $\delta$  8.85 (s, 1H [21]), 7.95 (sa, 1H), 7.77-7.01 (m, 10H), 6.76 (sa, 1H [13]), 2.36 (s, 3H [14]), 1.29 (s, 9H [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]).

$^{13}\text{C RMN}$   $\delta$  161.5 [C=O Boc], 153.4 [12], 144.1, 136.3, 135.6, 135.0, 133.0, 131.5 [17, 19], 129.9, 129.4 [16, 20], 128.4, 127.4, 127.3, 126.7, 124.6, 123.8, 118.4, 81.2 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 28.3 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 10.0 [14].

**EM (ESI+)**  $m/z$ : 573.3 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

**Anal.** calculado C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: C 58.81, H 4.41, N 9.80, Cl 18.60. Encontrado: C 58.44, H 4.04, N 9.47, Cl 18.97.

#### 4-(4-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)encil)fenil carbamato de *terc*-butilo (**8l**)



Se emplea 143.0 mg (0.5 mmol) de la amina **7l**, 66.8  $\mu\text{L}$  (0.5 mmol) de TEA y 156.0 mg (0.4 mmol) del cloruro de ácido **6**. Se purifica por cromatografía en columna utilizando

como eluyente un gradiente de la mezcla de AcOEt-hexano (1:4 a 1:2). Rendimiento: 96 %, aceite amarillo.

$^1\text{H RMN}$   $\delta$  8.68 (s, 1H [21]), 7.53 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H<sub>ar</sub> [16, 20]), 7.39 (t,  $J = 1.2$  Hz, 1H [8]), 7.30-6.93 (m, 12H<sub>ar</sub>), 6.39 (sa, 1H [13]), 3.85 (s, 2H [7']), 2.37 (s, 3H [14]), 1.46 (s, 9H [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]).

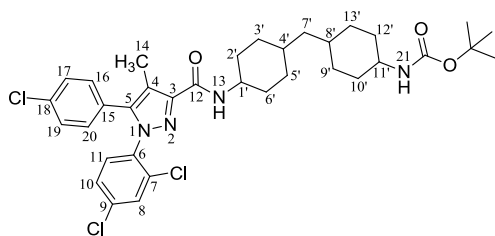
$^{13}\text{C RMN}$   $\delta$  160.8 [12], 153.3, 145.3, 143.8, 137.5, 136.8, 136.5, 136.3 (2C), 135.5, 133.4, 131.3 [17, 19], 131.0, 130.8, 129.8 (2C), 129.7 (2C), 129.3 (2C), 128.3, 127.5, 120.3 (2C), 119.2, 118.6, 80.8 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 41.1 [7'], 28.8 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 9.9 [14].

**EM (ESI+)**  $m/z$ : 663.6 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

**Anal.** calculado C<sub>35</sub>H<sub>31</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: C 63.50, H 4.72, N 8.46, Cl 16.07. Encontrado: C 62.06, H 4.89, N 7.95, Cl 15.49.



**4-((4-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)ciclohexil)metil)ciclohexil carbamato de *terc*-butilo (8m)**



Se emplean 186.0 mg (0.6 mmol) de la amina **7m**, 84.0  $\mu$ L (0.6 mmol) de TEA y 200.0 mg (0.5 mmol) del cloruro de ácido **6**. Se purifica por cromatografía en columna utilizando

como eluyente un gradiente de la mezcla de AcOEt-hexano (6:1). Rendimiento: 24 %, sólido amarillo.

**P.f.** 138.8 °C

**$^1\text{H}$  RMN**  $\delta$  7.42-7.36 (m, 1H [8]), 7.31-7.19 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.02 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H [17, 19]), 6.74 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H [21]), 4.48 (sa, 1H [13]), 2.34 (s, 3H [14]), 2.17-0.75 (m, 21H [1'-13']), 1.41 (s, 9H [( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>]).

**$^{13}\text{C}$  RMN**  $\delta$  161.9 [12], 145.2 [5], 143.0 [3], 135.9 [6, 7], 134.8 [18], 133.0 [9], 130.8 [17, 19], 130.5 [10], 130.3 [8], 128.8 [16, 20], 127.9 [11], 127.3 [15], 117.7 [4], 79.0 [ $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ], 50.0, 48.4, 46.6, 44.1, 42.9, 33.8, 33.7, 33.5, 33.1, 32.6, 32.1, 29.7, 28.4 [ $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ], 28.1, 9.4 [14].

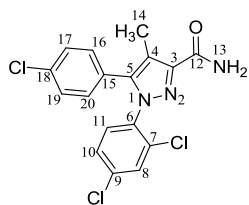
**EM (ESI+)**  $m/z$ : 675.0 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> (100%).

**Anal.** calculado  $\text{C}_{35}\text{H}_{43}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_3$ : C 62.36, H 6.43, N 8.31, Cl 15.78. Encontrado: C 62.63, H 6.76, N 8.53, Cl 16.08

**1.2.4. Síntesis de 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida (9)**

Sobre una disolución de 117.0 mg (0.3 mmol) del cloruro de ácido **6** en 2.0 mL de DCM a 0 °C, se adiciona gota a gota 0.9 mL de  $\text{NH}_3$  comercial (disolución al 30% en agua). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se extrae con DCM (2x), las fases orgánicas se combinan y se lavan sucesivamente con agua, se secan sobre  $\text{MgSO}_4$  y el disolvente se elimina a

presión reducida. Obteniéndose el producto sin necesidad de posteriores purificaciones. Rendimiento: 96 %, sólido amarillo.



**P.f.** 183.7 °C

**<sup>1</sup>H RMN** δ 7.43-7.37 (m, 1H [8]), 7.34-7.23 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.05 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H [17, 19]), 6.84 (sa, 1H [13]), 5.89 (sa, 1H [13]), 2.34 (s, 3H [14]).

**<sup>13</sup>C RMN** δ 164.7 [12], 144.3 [5], 143.0 [3], 135.9 [6], 135.8 [7], 134.8 [18], 132.8 [9], 130.7 [17, 19], 130.4 [10], 130.2 [8], 128.8 [16, 20], 127.8 [11], 127.1 [15], 117.9 [4], 9.4 [14].

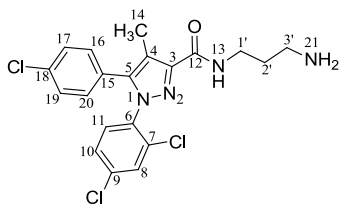
**EM (ESI+)**  $m/z$ : 382.3 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

**Anal.** calculado C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O: C 53.64, H 3.18, N 11.04, Cl 27.94. Encontrado: C 53.91, H 3.35, N 10.98, Cl 27.53.

### 1.2.5. Síntesis de *N*-(*n*-aminoalquil)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida. Procedimiento general.

Una disolución de la amina protegida indicada en cada caso en una mezcla al 50 % TFA/DCM se agita a temperatura ambiente durante 30 min. Los disolventes se eliminan a presión reducida. El crudo de reacción se redissuelve en éter etílico y se vuelve a eliminar el disolvente a presión reducida para obtener el producto en forma de sal de TFA. Sobre una disolución de la sal de TFA en éter etílico, se adiciona otra disolución de NaOH al 10 %. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 h. Se extrae y los extractos orgánicos se secan sobre MgSO<sub>4</sub>. El disolvente se elimina a presión reducida.

***N*-(3-Aminopropil)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (10a)**



Se emplea 54.0 mg (0.1 mmol) de la amina monoprottegida **8a** y 5.0 mL de la mezcla TFA/DCM al 50 %. Rendimiento: 77 %, sólido amarillo.

**P.f.** 114.6 °C

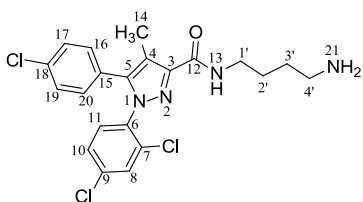
<sup>1</sup>H RMN δ 7.55-6.96 (m, 6H [8, 10, 11, 13, 16, 20]), 7.06 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H [17, 19]), 3.54 (c, *J* = 5.5 Hz, 2H [1']), 2.87 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H [3']), 2.37 (s, 3H [14]), 1.89-1.69 (m, 2H [2']).

<sup>13</sup>C RMN δ 163.2 [12], 144.9 [5], 143.1 [3], 136.0 [6], 135.9 [7], 134.9 [18], 133.0 [9], 130.8 [17, 19], 130.5 [10], 130.3 [8], 128.9 [16, 20], 127.9 [11], 127.2 [15], 117.8 [4], 39.2 [3'], 36.4 [1'], 32.4 [2'], 9.4 [14].

**EM (ESI+)** *m/z*: 439.0 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

**Anal.** calculado C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O: C 54.87, H 4.37, N 12.80, Cl 24.30. Encontrado: C 54.53, H 4.17, N 12.45, Cl 24.71.

***N*-(4-Aminobutil)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (10b)**



Se emplea 60.7 mg (0.1 mmol) de la amina monoprottegida **8b** y 5.0 mL de la mezcla TFA/DCM al 50 %. Rendimiento: 37 %, sólido amarillo.

**P.f.** 79.0 °C

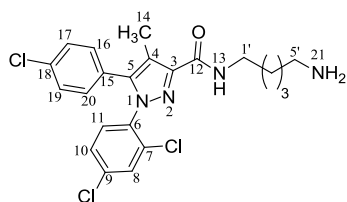
<sup>1</sup>H RMN δ 7.57-7.17 (m, 6H [8, 10, 11, 13, 16, 20]), 7.04 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H [17, 19]), 3.42 (c, *J* = 6.4 Hz, 2H [1']), 2.76 (c, *J* = 6.5 Hz, 2H [4']), 2.35 (s, 3H [14]), 1.72-1.47 (m, 4H [2', 3']).

$^{13}\text{C}$  RMN  $\delta$  162.7 [12], 145.0 [5], 142.6 [3], 135.9 [6, 7], 134.9 [18], 133.0 [9], 130.8 [17, 19], 130.4 [10], 130.1 [8], 128.9 [16, 20], 127.9 [11], 127.2 [15], 117.7 [4], 41.7 [4'], 38.8 [1'], 30.6, 27.2, 9.4 [14].

**EM (ESI+)**  $m/z$ : 431.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100%).

**Anal.** calculado  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}$ : C 55.83, H 4.69, N 12.40, Cl 23.54. Encontrado: C 55.53, H 4.30, N 12.25, Cl 23.80.

***N*-(5-Aminopentil)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (10c)**



Se emplea 62.4 mg (0.1 mmol) de la amina monoprottegida **8c** y 5.0 mL de la mezcla TFA/DCM al 50 %. Rendimiento: 55 %, sólido amarillo.

**P.f.** 66.3 °C

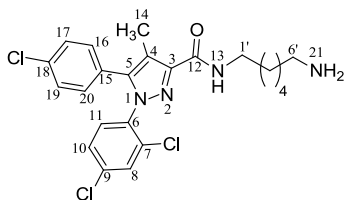
$^1\text{H}$  RMN  $\delta$  7.41 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H [8]), 7.32-7.22 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.04 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H [17, 19]), 6.95 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H [13]), 3.41 (c,  $J = 6.7$  Hz, 2H [1']), 2.68 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H [5']), 2.35 (s, 3H [14]), 1.69-1.31 (m, 6H [2'-4']).

$^{13}\text{C}$  RMN  $\delta$  163.1 [12], 145.5 [5], 143.5 [3], 136.4 [6, 7], 135.1 [18], 133.4 [9], 131.2 [17, 19], 130.9 [10], 130.8 [8], 129.3 [16, 20], 128.3 [11], 127.7 [15], 118.1 [4], 40.4 [5'], 39.3 [1'], 33.4, 30.1, 24.7, 9.8 [14].

**EM (ESI+)**  $m/z$ : 467.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100%).

**Anal.** calculado  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}$ : C 56.73, H 4.98, N 12.03, Cl 22.83. Encontrado: C 56.82, H 5.12, N 12.27, Cl 22.56.

***N*-(6-Aminohexil)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (10d)**



Se emplea 58.0 mg (0.1 mmol) de la amina monoprotendida **8d** y 5.0 mL de la mezcla TFA/DCM al 50 %. Rendimiento: 52 %, sólido amarillo.

**P.f.** 71.4 °C

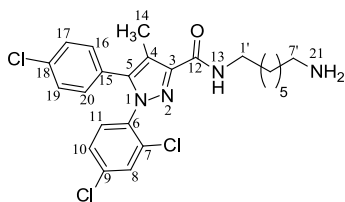
<sup>1</sup>H RMN δ 7.55-7.20 (m, 5H [8, 10, 11, 16, 20]), 7.04 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H [17, 19]), 6.94 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H [13]), 3.40 (c, *J* = 6.6 Hz, 2H [1']), 2.79-2.61 (m, 2H [6']), 2.35 (s, 3H [14]), 1.73-1.21 (m, 8H [2'-5']).

<sup>13</sup>C RMN δ 163.1 [12], 145.5 [5], 143.4 [3], 136.4 [6, 7], 135.3 [18], 133.4 [9], 131.2 [17, 19], 131.0 [10], 130.8 [8], 129.3 [16, 20], 128.3 [11], 127.7 [15], 118.1 [4], 42.5 [6'], 39.3 [1'], 34.0, 30.2, 27.3, 27.0, 9.9 [14].

**EM (ESI+)** *m/z*: 481.1 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

**Anal.** calculado C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O: C 57.57, H 5.25, N 11.68, Cl 22.17. Encontrado: C 57.82, H 5.30, N 11.84, Cl 22.48.

***N*-(7-Aminoheptil)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (10e)**



Se emplea 59.4 mg (0.1 mmol) de la amina monoprotendida **8e** y 5.0 mL de la mezcla TFA/DCM al 50 %. Rendimiento: 30 %, sólido amarillo.

**P.f.** 63.7 °C

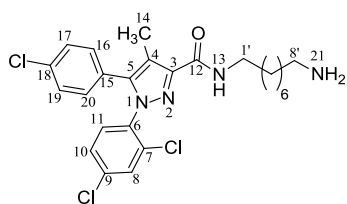
<sup>1</sup>H RMN δ 7.46-7.39 (m, 1H [8]), 7.34-7.21 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H [17, 19]), 6.77 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H [13]), 3.88 (c, *J* = 6.7 Hz, 2H [1']), 3.35 (m, 2H [7']), 2.37 (s, 3H [14]), 1.66-1.29 (m, 10H [2'-6']).

$^{13}\text{C}$  RMN  $\delta$  161.9 [12], 145.2 [5], 143.0 [3], 136.0 [6, 7], 134.9 [18], 133.0 [9], 130.8 [17, 19], 130.6 [10], 130.3 [8], 128.9 [16, 20], 127.9 [11], 127.3 [15], 117.8 [4], 48.5 [7'], 44.2 [1'], 33.8, 33.1, 32.1, 29.8, 28.4, 9.4 [14].

**EM (ESI+)**  $m/z$ : 495.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100%).

**Anal.** calculado  $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}$ : C 58.37, H 5.51, N 11.34, Cl 21.54. Encontrado: C 58.07, H 5.34, N 11.07, Cl 21.86.

***N*-(8-Aminoocetil)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (10f)**



Se emplea 58.0 mg (0.1 mmol) de la amina monoprottegida **8f** y 5.0 mL de la mezcla TFA/DCM al 50 %. Rendimiento: 77 %, sólido amarillo.

**P.f.** 71.5 °C

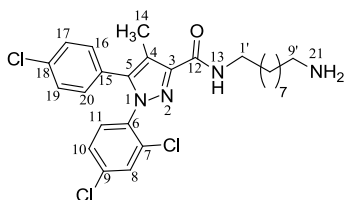
$^1\text{H}$  RMN  $\delta$  7.40 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H [8]), 7.29-7.23 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.04 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H [17, 19]), 6.97 (t,  $J = 5.9$  Hz, 1H [13]), 3.98 (sa, 2H [21]), 3.37 (c,  $J = 6.5$  Hz, 2H [1']), 2.76 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H [8']), 2.34 (s, 3H [14]), 1.61-1.16 (m, 4H [2'-7']).

$^{13}\text{C}$  RMN  $\delta$  162.6 [12], 145.0 [5], 143.0 [3], 135.9 [6], 135.8 [7], 134.8 [18], 132.9 [9], 130.8 [17, 19], 130.5 [10], 130.3 [8], 128.8 [16, 20], 127.9 [11], 127.1 [15], 117.6 [4], 41.1 [8'], 38.9 [1'], 29.7, 29.6, 29.1, 29.0, 26.8, 26.5, 9.4 [14].

**EM (ESI+)**  $m/z$ : 509.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100%).

**Anal.** calculado  $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}$ : C 59.12, H 5.76, N 11.03, Cl 20.94. Encontrado: C 59.05, H 5.63, N 12.97, Cl 20.77.

***N*-(9-Aminononil)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (10g)**



Se emplea 51.1 mg (0.1 mmol) de la amina monoprotendida **8g** y 4.0 mL de la mezcla TFA/DCM al 50 %. Rendimiento: 75 %, sólido amarillo.

**P.f.** 63.6 °C

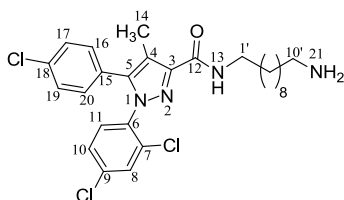
**<sup>1</sup>H RMN** δ 7.40 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H [8]), 7.29-7.23 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.04 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H [17, 19]), 6.93 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H [13]), 3.38 (c, *J* = 6.8 Hz, 2H [1']), 2.65 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H [9']), 2.35 (s, 3H [14]), 1.67-1.18 (m, 14H [2'-8']).

**<sup>13</sup>C RMN** δ 162.6 [12], 145.1 [5], 143.0 [3], 136.0 [6, 7], 134.8 [18], 133.0 [9], 130.8 [17, 19], 130.5 [10], 130.3 [8], 128.8 [16, 20], 127.8 [11], 127.2 [15], 117.6 [4], 42.1 [9'], 39.0 [1'], 33.6, 29.7, 29.4, 29.3, 29.2, 27.0, 26.8, 9.4 [14].

**EM (ESI+)** *m/z*: 523.2 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

**Anal.** calculado C<sub>26</sub>H<sub>31</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O: C 59.83, H 5.99, N 10.73, Cl 20.38. Encontrado: C 59.50, H 5.64, N 10.68, Cl 20.66.

***N*-(10-Aminodecil)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (10h)**



Se emplea 86.0 mg (0.1 mmol) de la amina monoprotendida **8h** y 6.8 mL de la mezcla TFA/DCM al 50 %. Rendimiento: 55 %, sólido amarillo.

**P.f.** 77.1 °C

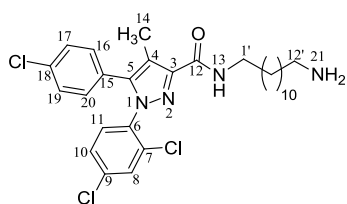
**<sup>1</sup>H RMN** δ 7.40 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H [8]), 7.29-7.23 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.04 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H [17, 19]), 6.93 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H [13]), 3.38 (c, *J* = 6.9 Hz, 2H [1']), 2.71-2.62 (m, 2H [10']), 2.35 (s, 3H [14]), 1.62-1.14 (m, 16H [2', 9']).

$^{13}\text{C}$  RMN  $\delta$  162.6 [12], 145.1 [5], 143.0 [3], 135.9 [6, 7], 134.8 [18], 133.0 [9], 130.8 [17, 19], 130.5 [10], 130.3 [8], 128.8 [16, 20], 127.8 [11], 127.2 [15], 117.7 [4], 42.0 [10'], 39.0 [1'], 33.3, 29.7, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 27.0, 26.8, 9.4 [14].

**EM (ESI+)**  $m/z$ : 537.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100%).

**Anal.** calculado  $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}$ : C 60.51, H 6.21, N 10.45, Cl 19.85. Encontrado: C 60.39, H 6.28, N 10.50, Cl 20.06.

### ***N*-(12-Aminododecil)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (10i)**



Se emplea 40.5 mg (0.1 mmol) de la amina monoprottegida **8i** y 3.0 mL de la mezcla TFA/DCM al 50 %. Rendimiento: 45 %, sólido amarillo.

**P.f.** 72.8 °C

$^1\text{H}$  RMN  $\delta$  7.44-7.41 (m, 1H [8]), 7.32-7.24 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.06 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H [17, 19]), 6.97-6.92 (m, 1H [13]), 3.40 (c,  $J$  = 6.6 Hz, 2H [1']), 2.76-2.68 (m, 2H [12']), 2.37 (s, 3H [14]), 1.64-1.15 (m, 20H [2'-11']).

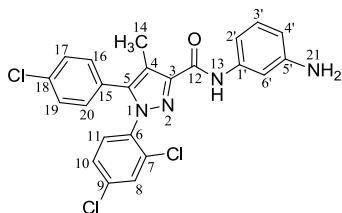
$^{13}\text{C}$  RMN  $\delta$  162.6 [12], 145.1 [5], 143.0 [3], 136.0 [6], 135.9 [7], 134.8 [18], 133.0 [9], 130.8 [17, 19], 130.5 [10], 130.3 [8], 128.9 [16, 20], 127.9 [11], 127.3 [15], 117.7 [4], 39.1 [12'], 29.8 [1'], 29.7, 29.6, 29.5 (2C), 29.4, 29.3, 27.0, 9.4 [14].

**EM (ESI+)**  $m/z$ : 565.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100%).

**Anal.** calculado  $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}$ : C 61.76, H 6.61, N 9.93, Cl 18.86. Encontrado: C 61.63, H 6.65, N 10.02, Cl 19.14.



***N*-(3-Aminofenil)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (10j)**



Se emplea 57.1 mg (0.1 mmol) de la amina monoprottegida **8j** y 5.0 mL de la mezcla TFA/DCM al 50 %. Rendimiento: 66 %, sólido marrón claro.

**P.f.** 134.6 °C

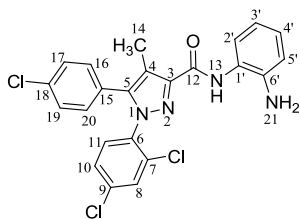
$^1\text{H RMN}$   $\delta$  8.69 (s, 2H [21]), 7.49-6.77 (m, 11H [aromáticos]), 6.46 (d,  $J= 8.0$  Hz, 1H [13]), 2.42 (s, 3H [14]).

$^{13}\text{C RMN}$   $\delta$  160.4 [12], 147.2 [5], 144.9 [3], 143.4 [5'], 138.9 [1'], 136.1 [6], 135.8 [7], 135.0 [18], 133.0 [9], 130.8 [17, 19], 130.5 [10], 130.3 [8], 129.7 [3'], 128.9 [16, 20], 127.9 [11], 127.0 [15], 118.2 [4], 110.8 [6'], 109.7, 106.3 [2', 4'], 9.5 [14].

**EM (ESI+)**  $m/z$ : 473.4 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

**Anal.** calculado C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O: C 58.56, H 3.63, N 11.88, Cl 22.54. Encontrado: C 58.50, H 3.80, N 11.96, Cl 22.28.

***N*-(2-Aminofenil)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (10k)**



Se emplea 57.5 mg (0.1 mmol) de la amina monoprottegida **8k** y 5.0 mL de la mezcla TFA/DCM al 50 %. Rendimiento: 87 %, sólido marrón anaranjado.

**P.f.** 181.7 °C

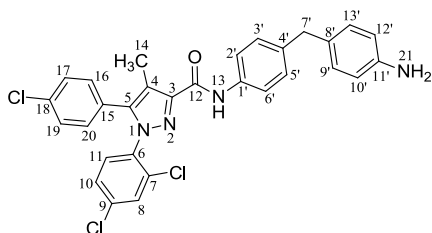
$^1\text{H RMN}$   $\delta$  8.64 (s, 2H [21]), 7.49-6.77 (m, 12H [aromáticos y 13]), 2.41 (s, 3H [14]).

$^{13}\text{C RMN}$   $\delta$  160.9 [12], 144.6, 143.3, 140.8, 136.1, 135.8, 135.0, 132.9, 130.8 [17, 19], 130.5, 130.4, 128.9 [16, 20], 127.9, 127.1, 126.9, 125.2, 123.9, 119.4, 118.3, 117.9, 9.5 [14].

**EM (ESI+)**  $m/z$ : 473.5  $[M+H]^+$  (100%).

**Anal.** calculado  $C_{23}H_{17}Cl_3N_4O$ : C 58.56, H 3.63, N 11.88, Cl 22.54. Encontrado: C 58.40, H 3.54, N 11.75, Cl 22.26.

***N*-(4-(4-Aminobencil)fenil)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (10l)**



Se emplea 60.0 mg (0.1 mmol) de la amina monoprotectada **8l** y 5.0 mL de la mezcla TFA/DCM al 50 %. Rendimiento: 44 %, sólido naranja claro.

**P.f.** 146.2 °C

**<sup>1</sup>H RMN**  $\delta$  8.68 (s, 1H [13]), 7.53 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H [16, 20]), 7.40-7.39 (m, 1H [8]), 7.29-6.90 (m, 12H<sub>ar</sub>), 6.39 (sa, 1H [13]), 3.80 (s, 2H [7']), 2.37 (s, 3H [14]).

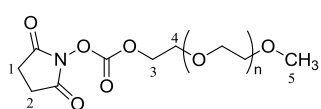
**<sup>13</sup>C RMN**  $\delta$  160.4 [12], 144.9, 144.4, 143.4, 137.6, 136.1, 135.8, 135.7, 135.0, 133.0, 131.2, 130.8 [17, 19], 130.5, 130.3, 129.7 [16, 20], 129.3 (2C), 128.9 (2C), 127.9, 127.0, 119.8 (2C), 118.2, 115.3 (2C), 40.5 [7'], 9.5 [14].

**EM (ESI+)**  $m/z$ : 563.3  $[M+H]^+$  (100%).

**Anal.** calculado  $C_{30}H_{23}Cl_3N_4O$ : C 64.13, H 4.13, N 9.97, Cl 18.93. Encontrado: C 64.27, H 4.30, N 10.02, Cl 19.26.

### 1.2.6. Síntesis de 2,5-dioxopirrolidin-1-il carbonato de metoxipolietilenglicol (11)

Una mezcla de 1.0 g (0.5 mmol) de mPEG-2000 en dioxano anhidro se calienta en baño de agua hasta su completa disolución. Se enfría y se adiciona otra disolución de 0.9 g (3.5 mmol) de N,N'-disuccinimidil carbonato en acetona anhidra. Posteriormente se adiciona una disolución de 423.0 mg (3.5 mmol) de DMAP en acetona anhidra. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante una noche. Se adiciona éter etílico hasta que se observa la precipitación del producto. Se filtra y se seca a vacío. Rendimiento: 62 %, sólido blanco.



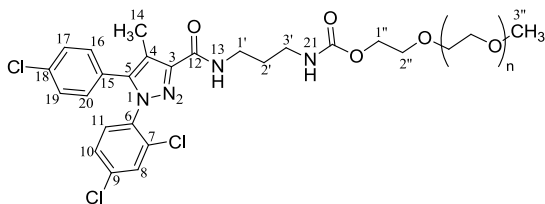
P.f. 48.1 °C

$^1\text{H RMN } \delta$  4.46 (t,  $J = 4.5$  Hz, 2H [3]), 3.88 (t,  $J = 4.9$  Hz, 2H [4]), 3.82-3.52 (m, 145H [PEG]), 3.38 (s, 3H [5]), 2.84 (s, 4H [1, 2]).

### 1.2.7. Síntesis de n-(5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)alquil carbamatos de metoxipolietilenglicol. Procedimiento general.

A una disolución de las aminoalquil y aminoaril carboxamidas indicadas en cada caso en DCM seco se le adiciona TEA y una disolución del mPEG activado **11** en DCM seco. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche y el disolvente se elimina a presión reducida. La purificación del producto se lleva a cabo mediante cromatografía en columna en las condiciones indicadas en cada caso.

**3-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)propil carbamato de metoxipoli(etilenglicol) (12a)**



Se emplea 33.6 mg (0.1 mmol) de la amina **10a** en 2.6 mL de DCM seco, 10.7  $\mu\text{L}$  (0.1 mmol) de TEA y 168.9 mg (0.1 mmol) del mPEG activado **11** en 2.0 mL de DCM

seco. Se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (50:1). Rendimiento: 23 %, sólido blanco.

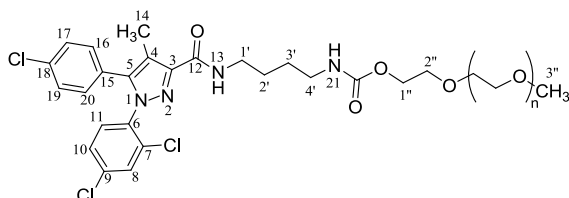
**P.f.** 49.4 °C

**$^1\text{H}$  RMN**  $\delta$  7.41 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H [8]), 7.32-7.24 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.13 (t,  $J = 6.3$  Hz, 1H [21]), 7.05 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H [17, 19]), 5.54 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H [13]), 4.19 (t,  $J = 4.6$  Hz, 2H [1'']), 3.90-3.51 (m, 128H [PEG]), 3.47 (c,  $J = 6.4$  Hz, 2H [1']), 3.37 (s, 3H [3'']), 3.24 (c,  $J = 6.2$  Hz, 2H [3']), 2.35 (s, 3H [14]), 1.75 (m, 2H [2']).

**$^{13}\text{C}$  RMN**  $\delta$  163.6 [C=O PEG], 157.1 [12], 145.2 [5], 143.5 [3], 136.4 [6], 136.3 [7], 135.3 [18], 133.3 [9], 131.2 [17, 19], 131.0 [10], 130.7 [8], 129.3 [16, 20], 128.3 [11], 127.6 [15], 118.1 [4], 72.3 [PEG], 70.9 [PEG], 64.3 [1''], 59.4 [3''], 38.3 [3'], 36.2 [1'], 30.6 [2'], 9.8 [14].

**EM (MALDI-TOF)**  $M_n$ : 2298.1,  $M_w$ : 2339.1 y IP: 1.02.

**4-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)butil carbamato de metoxipolietilenglicol (12b)**



Se emplea 18.4 mg (0.04 mmol) de la amina **10b** en 1.0 mL de DCM seco, 5.6  $\mu$ L (0.04 mmol) de TEA y 88.0 mg (0.04 mmol) del mPEG activado **11** en 1.0 mL de DCM seco. Se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (50:1). Rendimiento: 64 %, sólido amarillo.

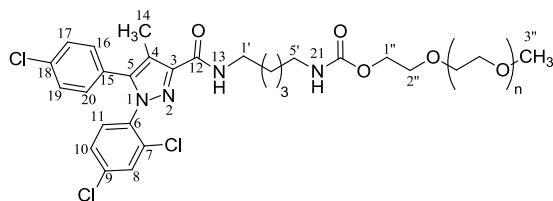
**P.f.** 50.5 °C

$^1\text{H RMN}$   $\delta$  7.42 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H [8]), 7.33-7.24 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.06 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H [17, 19]), 6.99 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H [21]), 4.93 (t,  $J = 5.4$  Hz, 1H [13]), 4.20 (t,  $J = 4.6$  Hz, 2H [1'']), 3.87 (t,  $J = 4.6$  Hz, 2H [2'']), 3.80-3.49 (m, 155H [PEG]), 3.49-3.39 (m, 2H [1']), 3.38 (s, 3H [3'']), 3.20 (c,  $J = 6.2$  Hz, 2H [4']), 2.36 (s, 3H [14]), 1.90-1.50 (m, 4H [2'-3']).

$^{13}\text{C RMN}$   $\delta$  161.7 [C=O PEG], 155.4 [12], 144.0 [5], 142.0 [3], 134.9 [6, 7], 133.9 [18], 132.0 [9], 129.8 [17, 19], 129.6 [10], 129.3 [8], 127.9 [16, 20], 126.9 [11], 126.2 [15], 116.7 [4], 70.9 [PEG], 70.1 [PEG], 62.9 [1''], 58.0 [3''], 39.7 [4'], 37.5 [1'], 26.5, 26.1, 9.4 [14].

**EM (MALDI-TOF)**  $M_n$ : 2560.0,  $M_w$ : 2585.8 y IP: 1.01.

**5-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)pentil carbamato de metoxipolietilenglicol (12c)**



Se emplea 27.0 mg (0.1 mmol) de la amina **10c** en 2.0 mL de DCM seco, 8.4  $\mu$ L (0.1 mmol) de TEA y 132.0 mg (0.1 mmol) del mPEG activado **11** en 2.0 mL de

DCM seco. Se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (50:1). Rendimiento: 37 %, sólido amarillo.

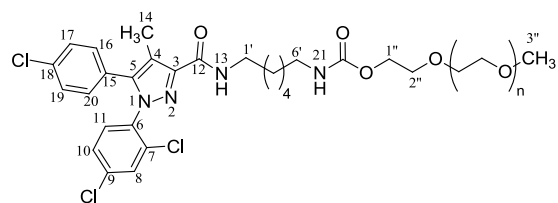
**P.f.** 55.9 °C

$^1\text{H RMN}$   $\delta$  7.43 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H [8]), 7.33-7.24 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.06 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H [17, 19]), 6.96 (t,  $J = 6.1$  Hz, 1H [21]), 4.89 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H [13]), 4.20 (t,  $J = 4.6$  Hz, 2H [1'']), 3.87 (t,  $J = 4.9$  Hz, 2H [2'']), 3.79-3.51 (m, 150H [PEG]), 3.47-3.39 (m, 2H [1']), 3.38 (s, 3H [3'']), 3.17 (c,  $J = 6.8$  Hz, 2H [5']), 2.37 (s, 3H [14]), 1.95-1.14 (m, 6H [2'-4]).

$^{13}\text{C RMN}$  161.7 [C=O PEG], 152.1 [12], 144.0 [5], 142.0 [3], 134.5 [6, 7], 133.9 [18], 132.0 [9], 129.8 [17, 19], 129.6 [10], 129.3 [8], 127.9 [16, 20], 126.9 [11], 126.3 [15], 116.7 [4], 70.9 [PEG], 69.6 [PEG], 62.8 [1''], 58.0 [3''], 39.9 [5'], 37.7 [1'], 28.6, 28.5, 23.1, 9.4 [14].

**EM (MALDI-TOF)**  $M_n$ : 2349.0,  $M_w$ : 2372.3 y IP: 1.01.

**6-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)hexil carbamato de metoxipolietilenglicol (12d)**



Se emplea 25.0 mg (0.05 mmol) de la amina **10d** en 2.0 mL de DCM seco, 7.0  $\mu\text{L}$  (0.05 mmol) de TEA y 110.0 mg (0.05 mmol)

del mPEG activado **11** en 2.0 mL de DCM seco. Se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (50:1). Rendimiento: 55 %, sólido amarillo.

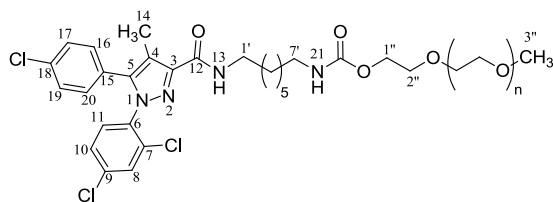
**P.f.** 49.7 °C

$^1\text{H RMN}$   $\delta$  7.43 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H [8]), 7.34-7.24 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.06 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H [17, 19]), 6.96 (t,  $J = 5.3$  Hz, 1H [21]), 4.92 (m, 1H [13]), 4.21 (c,  $J = 4.6$  Hz, 2H [1'']), 3.87 (t,  $J = 4.8$  Hz, 2H [2'']), 3.81-3.51 (m, 151H [PEG]), 3.46-3.39 (m, 2H [1']), 3.38 (s, 3H [3'']), 3.20-3.18 (m, 2H [6']), 2.37 (s, 3H [14]), 2.08-1.16 (m, 8H [2'-5']).

$^{13}\text{C}$  RMN  $\delta$  163.6 [C=O PEG], 155.4 [12], 144.0 [5], 141.1 [3], 134.9 [6, 7], 133.6 [18], 132.0 [9], 129.8 [17, 19], 129.5 [10], 129.3 [8], 127.9 [16, 20], 126.9 [11], 126.0 [15], 115.8 [4], 70.9 [PEG], 69.5 [PEG], 62.8 [1''], 58.0 [3''], 39.9 [6'], 37.8 [1'], 28.7, 25.5, 25.3, 24.4, 8.4 [14].

EM (MALDI-TOF)  $M_n$ : 2452.2,  $M_w$ : 2508.1 y IP: 1.02.

**7-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)heptil carbamato de metoxipolietilenglicol (12e)**



Se emplea 17.1 mg (0.03 mmol) de la amina **10e** en 1.0 mL de DCM seco, 4.0  $\mu\text{L}$  (0.03 mmol) de TEA y 66.0 mg (0.03 mmol) del mPEG activado **11** en 1.0

mL de DCM seco. Se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (50:1). Rendimiento: 95 %, sólido amarillo.

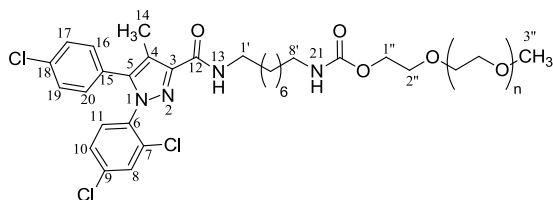
P.f. 49.1  $^\circ\text{C}$

$^1\text{H}$  RMN  $\delta$  7.41 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H [8]), 7.31-7.23 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.04 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H [17, 19]), 6.93 (t,  $J = 6.1$  Hz, 1H [21]), 4.83 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H [13]), 4.18 (t,  $J = 4.6$  Hz, 2H [1'']), 3.85 (t,  $J = 4.9$  Hz, 2H [2'']), 3.72-3.49 (m, 172H [PEG]), 3.41-3.36 (m, 2H [1']), 3.35 (s, 3H [3'']), 3.12 (c,  $J = 6.7$  Hz, 2H [7']), 2.35 (s, 3H [14]), 1.64-1.20 (m, 10H [2'-6']).

$^{13}\text{C}$  RMN  $\delta$  163.0 [C=O PEG], 156.8 [12], 145.5 [5], 143.4 [3], 136.4 [6], 136.3 [7], 135.3 [18], 133.4 [9], 131.2 [17, 19], 130.9 [10], 130.7 [8], 129.3 [16, 20], 128.3 [11], 127.7 [15], 118.1 [4], 72.3 [PEG], 71.0 [PEG], 64.2 [1''], 59.4 [3''], 41.4 [7'], 39.3 [1'], 30.3, 30.1, 29.3, 27.3, 27.0, 9.8 [14].

EM (MALDI-TOF)  $M_n$ : 2670.5,  $M_w$ : 2708.1 y IP: 1.01.

**8-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)octil carbamato de metoxipolietilenglicol (12f)**



Se emplea 150.0 mg (0.3 mmol) de la amina **10f** en 10.0 mL de DCM seco, 8.5  $\mu$ L (0.1 mmol) de TEA y 649.8 mg (0.3 mmol) del mPEG activado **11** en 10.0

mL de DCM seco. Se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (50:1). Rendimiento: 25 %, sólido blanco.

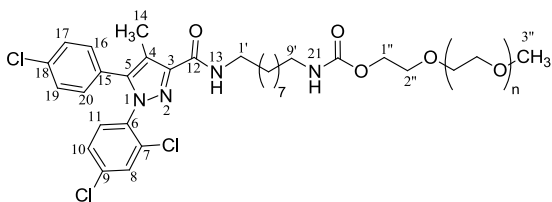
**P.f.** 40.7 °C

$^1\text{H RMN}$   $\delta$  7.36 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H [8]), 7.28-7.18 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 6.99 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H [17, 19]), 6.88 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H [21]), 4.79 (t,  $J = 5.2$  Hz, 1H [13]), 4.14 (t,  $J = 4.5$  Hz, 2H [1'']), 3.81 (t,  $J = 4.9$  Hz, 2H [2'']), 3.72-3.44 (m, 190H [PEG]), 3.39-3.32 (m, 2H [1']), 3.31 (s, 3H [3'']), 3.07 (c,  $J = 6.4$  Hz, 2H [8']), 2.30 (s, 3H [14]), 1.60-1.11 (m, 12H [2'-7']).

$^{13}\text{C RMN}$   $\delta$  162.5 [C=O PEG], 156.3 [12], 145.0 [5], 142.9 [3], 135.8 [6, 7], 134.8 [18], 132.9 [9], 130.7 [17, 19], 130.5 [10], 130.2 [8], 128.8 [16, 20], 127.8 [11], 127.2 [15], 117.6 [4], 71.8 [PEG], 70.5 [PEG], 63.7 [1''], 58.9 [3''], 40.9 [8'], 38.9 [1'], 29.8, 29.6, 29.1 (2C), 26.8, 26.6, 9.3 [14].

**EM (MALDI-TOF)**  $M_n$ : 2495.4,  $M_w$ : 2528.2 y IP: 1.01.

**9-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)nonil carbamato de metoxipolietilenglicol (12g)**



Se emplea 32.1 mg (0.1 mmol) de la amina **10g** en 2.5 mL de DCM seco, 8.6  $\mu$ L (0.1 mmol) de TEA y 136.0 mg (0.1 mmol) del mPEG activado **11** en 2.5 mL de



DCM seco. Se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (50:1). Rendimiento: 74 %, sólido blanco.

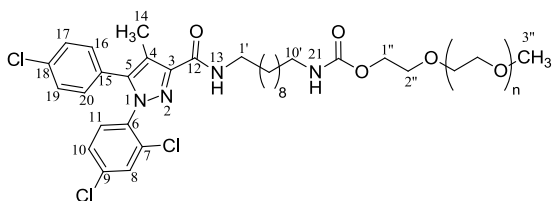
**P.f.** 51.2 °C

$^1\text{H RMN}$   $\delta$  7.40 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H [8]), 7.31-7.22 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.03 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H [17, 19]), 6.92 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H [21]), 4.83 (t,  $J = 5.4$  Hz, 1H [13]), 4.18 (t,  $J = 4.5$  Hz, 2H [1'']), 3.85 (t,  $J = 4.9$  Hz, 2H [2'']), 3.77-3.49 (m, 189H [PEG]), 3.43-3.36 (m, 2H [1']), 3.35 (s, 3H [3'']), 3.11 (c,  $J = 6.7$  Hz, 2H [9']), 2.34 (s, 3H [14]), 1.64-1.15 (m, 14H [2'-8']).

$^{13}\text{C RMN}$   $\delta$  161.6 [C=O PEG], 155.4 [12], 144.1 [5], 142.0 [3], 135.0 (2C) [6, 7], 133.9 [18], 132.0 [9], 129.8 [17, 19], 129.5 [10], 129.3 [8], 127.9 [16, 20], 126.9 [11], 126.3 [15], 116.7 [4], 70.9 [PEG], 70.1 [PEG], 62.8 [1''], 58.0 [3''], 40.0 [9'], 38.0 [1'], 28.9, 28.7, 28.3, 28.2 (2C), 25.9, 25.7, 8.4 [14].

**EM (MALDI-TOF)**  $M_n$ : 2427.1,  $M_w$ : 2485.6 y IP: 1.02.

**10-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)decil carbamato de metoxipolietilenglicol (12h)**



Se emplea 39.8 mg (0.1 mmol) de la amina **10h** en 3.0 mL de DCM seco, 10.3  $\mu\text{L}$  (0.1 mmol) de TEA y 163.0 mg (0.1 mmol) del mPEG activado **11** en 3.0

mL de DCM seco. Se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (50:1). Rendimiento: 49 %, sólido amarillo.

**P.f.** 62.2 °C

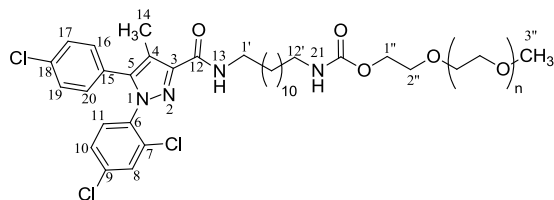
$^1\text{H RMN}$   $\delta$  7.36 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H [8]), 7.28-7.18 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.00 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H [17, 19]), 6.89 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H [21]), 4.81 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1H [13]), 4.14 (t,  $J = 4.5$  Hz, 2H [1'']), 3.81 (t,  $J = 4.8$  Hz, 2H [2'']), 3.69-3.41 (m,

182H [PEG]), 3.38-3.32 (m, 2H [1']), 3.31 (s, 3H [3'']), 3.08 (c,  $J = 6.6$  Hz, 2H [10']), 2.31 (s, 3H [14]), 1.59-1.08 (m, 16H [2'-9']).

$^{13}\text{C}$  RMN  $\delta$  161.6 [C=O PEG], 155.4 [12], 144.1 [5], 142.0 [3], 135.0 [6], 134.9 [7], 133.8 [18], 132.0 [9], 129.8 [17, 19], 129.6 [10], 129.3 [8], 127.9 [16, 20], 126.9 [11], 126.3 [15], 116.7 [4], 70.9 [PEG], 69.6 [PEG], 62.8 [1''], 58.0 [3''], 40.0 [10'], 38.0 [1'], 28.9, 28.7, 28.4 (2C), 28.3, 28.2, 26.0, 25.7, 8.4 [14].

**EM (MALDI-TOF)**  $M_n$ : 2492.2,  $M_w$ : 2531.9 y IP: 1.02.

**12-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)dodecil carbamato de metoxipolietilenglicol (12i)**



Se emplea 15.3 mg (0.03 mmol) de la amina **10i** en 1.0 mL de DCM seco, 3.8  $\mu\text{L}$  (0.03 mmol) de TEA y 59.7 mg (0.03 mmol) del mPEG activado **11** en 1.0 mL

de DCM seco. Se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (50:1). Rendimiento: 50 %, sólido blanco.

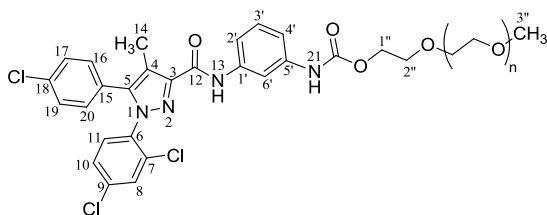
**P.f.** 52.7 °C

$^1\text{H}$  RMN  $\delta$  7.42 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H [8]), 7.35-7.23 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.05 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H [17, 19]), 6.93 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H [21]), 4.82 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H [13]), 4.20 (t,  $J = 4.5$  Hz, 2H [1'']), 3.87 (t,  $J = 4.9$  Hz, 2H [2'']), 3.74-3.48 (m, 138H [PEG]), 3.45-3.38 (m, 2H [1']), 3.37 (s, 3H [3'']), 3.14 (c,  $J = 6.5$  Hz, 2H [12']), 2.37 (s, 3H [14]), 1.71-1.01 (m, 20H [2'-11']).

$^{13}\text{C}$  RMN  $\delta$  161.6 [C=O PEG], 152.6 [12], 144.2 [5], 142.0 [3], 135.0 [6], 134.9 [7], 133.9 [18], 132.0 [9], 129.8 [17, 19], 129.5 [10], 129.3 [8], 127.9 [16, 20], 126.9 [11], 126.3 [15], 116.7 [4], 70.9 [PEG], 69.6 [PEG], 62.8 [1''], 58.0 [3''], 40.0 [12'], 38.0 [1'], 28.9, 28.7 (2C), 28.5 (3C), 28.3 (2C), 26.0, 25.7, 8.4 [14].

**EM (MALDI-TOF)**  $M_n$ : 1639.5,  $M_w$ : 1651.9 y IP: 1.01.

**3-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)fenil carbamato de metoxipolietilenglicol (12j)**



Se emplea 31 mg (0.1 mmol) de la amina **10j** en 2.2 mL de DCM seco, 9.2  $\mu\text{L}$  (0.1 mmol) de TEA y 144.6 mg (0.1 mmol) del mPEG activado **11** en 2.2 mL de

DCM seco. Se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (50:1). Rendimiento: 56 %, sólido amarillo.

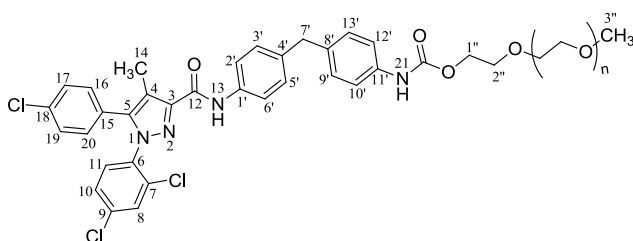
**P.f.** 123.4 °C

$^1\text{H RMN}$   $\delta$  8.81 (s, 1H [21]), 7.82-7.77 (m, 1H [6']), 7.54-7.03 (m, 10H<sub>ar</sub>), 4.30 (t,  $J = 4.5$  Hz, 2H [1'']), 3.85 (t,  $J = 4.9$  Hz, 2H [2'']), 3.81-3.43 (m, 141H [PEG]), 3.36 (s, 3H [3'']), 2.40 (s, 3H [14]).

$^{13}\text{C RMN}$   $\delta$  160.4 [C=O PEG], 153.3 [12], 144.7 [5], 143.4 [3], 138.7 [5'], 138.6 [1'], 136.1 [6], 135.8 [7], 135.0 [18], 132.9 [9], 130.8 [17, 19], 130.5 [10], 130.3 [8], 129.5 [3'], 128.9 [16, 20], 127.9 [11], 127.0 [15], 118.1[4], 114.4 [6'], 114.0, 109.6 [2', 4'], 71.9 [PEG], 70.6 [PEG], 64.1 [1''], 59.0 [3''], 9.4 [14].

**EM (MALDI-TOF)**  $M_n$ : 2465.9,  $M_w$ : 2496.9 y IP: 1.01.

**4-(4-(5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)encil)fenil carbamato de metoxipolietilenglicol (12l)**



Se emplea 20.5 mg (0.04 mmol) de la amina **10l** en 1.3 mL de DCM seco, 5.1  $\mu\text{L}$  (0.04 mmol) de TEA y 80.3 mg (0.04 mmol)

del mPEG activado **11** en 1.3 mL de DCM seco. Se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (50:1).

Rendimiento: 66 %, sólido anaranjado.

**P.f.** 46.4 °C

**<sup>1</sup>H RMN** δ 8.72 (s, 1H [21]), 7.58 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H [16, 20]), 7.46-7.42 (m, 1H [8]), 7.38-7.02 (m, 12H<sub>ar</sub>), 4.29 (t,  $J = 4.3$  Hz, 2H [1'']), 3.96-3.80 (m, 4H [2'', 7']), 3.79-3.44 (m, 146H [PEG]), 3.36 (s, 3H [3'']), 2.40 (s, 3H [14]).

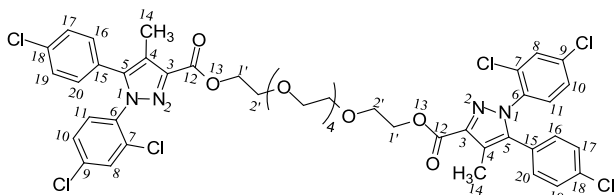
**<sup>13</sup>C RMN** δ 160.4 [C=O PEG], 153.5 [12], 144.8, 143.4, 136.9, 136.1, 135.9, 135.8, 135.0, 133.0, 130.8 [17, 19], 130.5, 130.3, 129.4 (2C), 129.3 (2C), 128.9 (2C), 127.9, 127.0, 119.8 (3C), 118.8, 118.1, 71.9 [PEG], 70.5 [PEG], 64.0 [1''], 59.9 [3''], 40.6 [7'], 9.4 [14].

**EM (MALDI-TOF)**  $M_n$ : 2415.8,  $M_w$ : 2441.0 y IP: 1.01.

### 1.2.8 Síntesis de derivados SR-PEG<sub>6</sub> sin espaciador

Sobre una disolución de 73.3 μL (0.3 mmol) de hexaetilenglicol comercial con 100.0 μL (0.7 mmol) de TEA en 3.0 mL de DCM a 0°C, se adiciona gota a gota una disolución de 234.0 mg (0.6 mmol) del cloruro de ácido **6** en 3.8 mL de DCM. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche y el disolvente se elimina a presión reducida. La purificación del producto se lleva a cabo mediante cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de DCM:MeOH (50:1). Obteniéndose los dos compuestos siguientes:

#### **3,6,9,12,15-Pentaoxaheptadecano-1,17-diil bis(5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxylato) (13)**



Rendimiento: 4 %, aceite amarillo.

**<sup>1</sup>H RMN** δ 7.38 (d,  $J = 1.9$  Hz, 2H [8]), 7.33-7.27 (m, 8H [10, 11, 16, 20]), 7.06 (d,

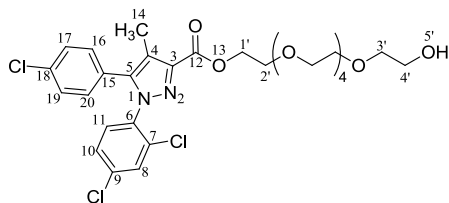
$J = 8.6$  Hz, 4H [17, 19]), 4.53 (t,  $J = 4.9$  Hz, 4H [1']), 3.84 (t,  $J = 5.0$  Hz, 4H [2']), 3.70-3.59 (m, 16H [PEG]), 2.31 (s, 6H [14]).

$^{13}\text{C}$  RMN  $\delta$  162.6 [12], 142.9 [5], 142.7 [3], 136.0 [6], 135.9 [7], 135.0 [18], 132.9 [9], 130.9 [17, 19], 130.7 [10], 130.1 [8], 128.9 [16, 20], 127.8 [11], 127.0 [15], 119.1 [4], 70.5 [PEG], 69.0 [2'], 63.7 [1'], 9.7 [14].

**MS (ESI+)**  $m/z$  1011.9  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100%).

**Anal.** calculado  $\text{C}_{46}\text{H}_{44}\text{Cl}_6\text{N}_4\text{O}_9$ : C 54.72, H 4.39, N 5.55, Cl 21.07. Encontrado: C 54.86, H 4.59, N 5.62, Cl 21.34.

### 5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxilato de hexaetilenglicol (14)



Rendimiento: 25 %, aceite amarillo.

$^1\text{H}$  RMN  $\delta$  7.35 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H [8]), 7.32-7.23 (m, 4H [10, 11, 16, 20]), 7.04 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H [17, 19]), 4.51 (t,  $J = 4.9$  Hz, 2H [1']), 3.83 (t,  $J = 4.8$  Hz, 2H

[2']), 3.74-3.45 (m, 20H [PEG]), 2.29 (s, 3H [14]).

$^{13}\text{C}$  RMN  $\delta$  162.6 [12], 142.8 [5], 142.7 [3], 136.0 [6], 135.8 [7], 135.0 [18], 132.9 [9], 130.8 [17, 19], 130.7 [10], 130.1 [8], 128.9 [16, 20], 127.8 [11], 127.0 [15], 119.1 [4], 70.5 [PEG], 69.0 [2'], 63.6 [1'], 61.6 [4'], 9.7 [14].

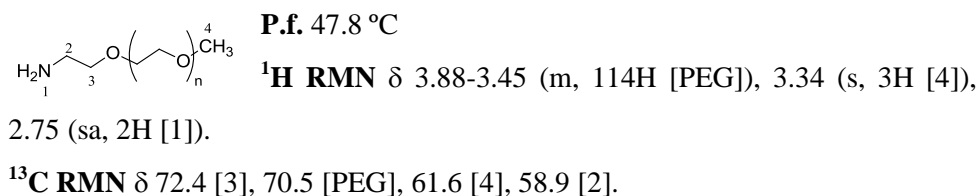
**MS (ESI+)**  $m/z$  647.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100%).

**Anal.** calculado  $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_8$ : C 53.92, H 5.46, N 4.34, Cl 16.47. Encontrado: C 54.13, H 5.71, N 4.18, Cl 16.68.

### 1.2.9. Síntesis de los compuestos derivados del LH21

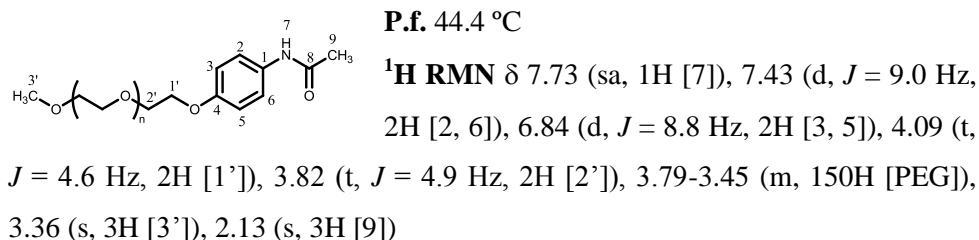
#### Amina de metoxipolietilenglicol (15)

Sobre una disolución de 4.0 g (2.0 mmol) de mPEG en 15.0 mL de DCM seco se le añaden 420.0  $\mu$ L de TEA. Se adiciona gota a gota una disolución de 410.0 mg (2.0 mmol) de 2-bromoetilamina en 5.0 mL de DCM y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 h. El disolvente se elimina a presión reducida y el producto se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de DCM:MeOH (20:1). Rendimiento: 82 %, sólido blanco.



#### 1.2.10. Síntesis de los compuestos derivados del paracetamol. N-(4-(metoxipolietilenglicol)fenil)acetamida (17)

Una mezcla de 9.7 mg (0.1 mmol) de paracetamol y 62.6 mg (0.2 mmol) de  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  en 2.0 mL de DMF se agita a temperatura ambiente durante una hora. Entonces se adiciona una disolución de 101.3 mg (0.05 mmol) del yoduro **1** en 2.0 mL de DMF y la mezcla se agita a reflujo durante 10 días. La muestra se seca en el liofilizador y el producto es purificado una vez por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de DCM:MeOH (20:1) y posteriormente se realiza una separación por HPLC semipreparativo. Rendimiento: 31 %, sólido anaranjado.



$^{13}\text{C}$  RMN  $\delta$  168.3 [8], 155.3 [4], 131.6 [1], 121.4 [2, 6], 114.8 [3, 5], 70.5 [PEG], 69.7 [2'], 67.7 [1'], 59.0 [3'], 24.3 [9].

EM (MALDI-TOF)  $M_n$ : 2197.9,  $M_w$ : 2266.1 y IP: 1.03.

### 1.2.11. Ensayos metabólicos de biotransformación

#### 1.2.11.1 FRACCIONES Y SISTEMAS ENZIMÁTICOS PRBADOS:

Para los ensayos metabólicos de biotransformación realizados al compuesto **12e** se utilizaron las siguientes fracciones y sistemas enzimáticos: Fracción S9 mix de rata (Sprague-Dawley) (Sigma), HLM (human liver microsomes) (BD), CYP3A4 supersomas que contienen enzima recombinante humana Citocromo P450 3A4 (CYP3A4) más P450 reductasa (BD).

La fracción S9 hepática puede contener enzimas microsomales y citosólicas encargadas del metabolismo. La fracción microsomal puede contener las enzimas del metabolismo fase 1 y fase 2, incluido citocromos, reductasas y otras. Tanto una como otra pueden tener contaminación de enzimas mitocondriales. Por tanto, se pensó que estos sistemas podrían dar una hidrólisis del conjugado **12e**.

#### 1.2.11.2 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO:

Se optimizó la separación analítica para conseguir determinar y cuantificar los posibles metabolitos de las reacciones enzimáticas. El método final fue:

Columna C18. Nova-pak 3.9 x 150 mm 4  $\mu\text{m}$  (Waters). Se optimizó la separación cromatográfica para conseguir la separación del sustrato **12e** y de los posibles metabolitos **10e** y **5**. El programa final fue:

Eluyente A: 100 mM tampón fosfato amónico ajustado a pH 3;

Eluyente B: 20% de A en acetonitrilo.

Programa de elución: 0 min, 100% de A; 8 min, 32% de B; 28 min, 90% de B; 35 min, 100% de B.

Los compuestos eluyeron en los siguientes tiempos: **10e** a 20.30 min, **5** a 23.67 min y el sustrato **12e** a 24.61 min. Detección DAD (Diode Array Detection) a 243, 254, 265 y 280 nm.

#### 1.2.11.3 ENSAYOS DE BIOTRANSFORMACIÓN METABÓLICA DE **12e**:

Se realizaron numerosos ensayos con los tres sistemas enzimáticos descritos anteriormente. Se partió del sustrato **12e** disuelto en agua y se varió la concentración del sustrato y del sistema enzimático, y se realizaron ensayos con y sin NADPH (Sigma) como cofactor necesario para las enzimas reductasas acopladas al sistema citocromo P450. También se varió la parada de la reacción enzimática y los tiempos de incubación (25-60 min). Los medios de reacción se centrifugaron y congelaron (-20°C hasta su inyección en HPLC).

#### 1.2.11.4 PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DEL ENSAYO:

El procedimiento estándar fue como se indica a continuación:

- a) A tubos Eppendorf que contienen de 10 a 100  $\mu\text{M}$  de **12e** en 100 mM de tampón fosfato a pH 7.4, se les adicionó CYP3A4 (823.5  $\mu\text{g}$  prot./mL), se les preincubó a 37°C durante 3 min, y se les añadió NADPH (1mM) hasta alcanzar un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 25 min, y la reacción fue parada con 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{HClO}_4:\text{MeOH}$  (1:1) o 100  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo. Los tubos fueron centrifugados a 10000 rpm durante 10 min, y 20  $\mu\text{L}$  del supernadante se inyectaron en el HPLC-DAD. Los ensayos se realizaron por duplicado y se usaron controles sin enzima y sin cofactor NADPH.



- b) A tubos Eppendorf que contienen de 10 a 100  $\mu\text{M}$  de **12e** en 100 mM de tampón fosfato a pH 7.4, se les adicionó mezcla S9 de rata (de 1 a 5 mg/mL) con y sin 1mM de NADPH como cofactor (volumen final 200  $\mu\text{L}$ ). La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 60 min, y la reacción fue parada con 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{HClO}_4\text{:MeOH}$  (1:1) o 100  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo. Los ensayos se realizaron por duplicado y se usaron controles sin enzima y sin cofactor NADPH. Los tubos fueron centrifugados a 10000 rpm durante 10 min, y 20  $\mu\text{L}$  del supernadante se inyectaron en el HPLC-DAD.
- c) A tubos Eppendorf que contienen de 10 a 100  $\mu\text{M}$  de **12e** en 100 mM de tampón fosfato a pH 7.4, se les adicionó HLM (Human Liver Microsomes) (700  $\mu\text{g}$  prot./mL), se les preincubó a 37°C durante 3 min, y se les añadió NADPH (1mM) hasta alcanzar un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 25 min, y la reacción fue parada con 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{HClO}_4\text{:MeOH}$  (1:1) o 100  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo. Los ensayos se realizaron por duplicado y los tubos fueron centrifugados a 10000 rpm durante 10 min, y 20  $\mu\text{L}$  del supernadante se inyectaron en el HPLC-DAD. Se usaron controles sin enzima y sin cofactor NADPH.

## **2. PARTE EXPERIMENTAL FARMACOLOGÍA:**

### **2.1. Ensayos de desplazamiento de radioligando:**

Las membranas de células transfectadas con los receptores humanos  $\text{CB}_1$  y  $\text{CB}_2$  (RBHCB1M400UA y RBXCB2M400UA) fueron suministradas por Perkin-Elmer Life y Analytical Sciences (Boston, MA). La concentración de las membranas del receptor  $\text{CB}_1$  utilizado fue 2,33 pmol/mg o 3,60 pmol/mg dependiendo del lote comercial. La concentración proteica en el ensayo fue de 8,0 mg/ml. En el caso del receptor  $\text{CB}_2$  la concentración fue de 5,20 pmol/mg o 6,20 pmol/mg según el lote. La concentración de proteína en cada ensayo fue de 4.0 mg/ml. La

membrana comercial se diluyó (1:20) con la correspondiente disolución tampón (50 mM TrisCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, 2,5 mM EDTA, 0,5 mg/mL BSA y pH = 7,4 para CB<sub>1</sub>; 50 mM TrisCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, 2,5 mM EGTA, 1 mg/mL BSA y pH = 7,5 para CB<sub>2</sub>). El radioligando empleado fue [<sup>3</sup>H]-CP55940 (PerkinElmer) a una concentración de  $K_D \times 0,8$  nM (siendo  $K_D$  la constante de la membrana empleada). El volumen final fue de 200  $\mu$ L para los ensayos de *binding* de CB<sub>1</sub> y 600  $\mu$ L para CB<sub>2</sub>. Se utilizaron placas de 96 pocillos previamente siliconizadas para la realización del experimento.

Las membranas fueron resuspendidas en el correspondiente tampón e incubadas con el radioligando y cada compuesto ( $10^{-4}$ - $10^{-11}$  M) durante 90 minutos a 30 °C. Las uniones no específicas fueron determinadas con 10  $\mu$ M de WIN55212-2. La unión del 100 % de radioligando a la membrana fue comprobada mediante su incubación con la membrana sin añadir compuesto. La filtración se llevó a cabo con un equipo FiltermateHarvester<sup>®</sup> (Perkin-Elmer) y filtros Filtermat A GF/C pretratados con polietilenimina al 0.05%. Tras el filtrado, se lava nueve veces el filtro con el tampón correspondiente, se seca y se fusiona con líquido de centelleo (Meltilex<sup>™</sup> A, Perkin Elmer). Tras ello, se cuantifica la radioactividad mediante un espectrofotómetro de líquido de centelleo (Wallac MicroBeta Trilux, Perkin-Elmer). Los datos del ensayo de competición fueron analizados usando el programa GraphPad Prism, los valores de  $K_i$  se expresan como la media de los valores obtenidos  $\pm$  el error estándar de la media (E.E.M.) de al menos tres experimentos llevados a cabo por triplicado para cada punto.

## 2.2. Ensayos *in vitro* en tejido deferente de ratón aislado:

Se usaron ratones macho ICR, cuyos conductos deferentes se aislaron según la técnica descrita por Hughes, y se montaron en un baño de órganos. Se sometieron a periodos alternos de estimulación eléctrica (trenes de 5 pulsos rectangulares de 70 V, 15 Hz y 2 ms de duración cada uno, que se aplican a cada

minuto) y de descanso (10 min). La fuerza isométrica se monitorizó utilizando un sistema de registro y análisis de datos MacLab.

1. Actividad agonista: El efecto agonista de los nuevos compuestos se evaluó realizando curvas concentración-respuesta no acumulativas ( $10^{-7}$ – $2 \times 10^{-5}$  M). Su efecto se comparó con el del agonista cannabinoide sintético no selectivo CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub> WIN55212-2.

2. Actividad antagonista: Para llevar a cabo estos ensayos, el efecto del agonista cannabinoide WIN55212-2, se evaluó tras la incubación con los compuestos en una concentración de  $10^{-6}$  M. Se realizaron curvas concentración-respuesta no acumulativas del agonista de referencia, y el efecto de los nuevos compuestos se comparó con el efecto antagonista ejercido por AM251, cannabinoide selectivo del receptor CB1. Para los compuestos que presentaron un perfil antagonista más interesante, se evaluó el efecto del agonista cannabinoide WIN 55,212-2, tras la incubación con dos concentraciones distintas ( $2 \times 10^{-6}$  y  $10^{-6}$ ) de dichos compuestos.

### **2.3. Ensayos de microdiálisis cerebral en animal despierto:**

#### **2.3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN:**

Los animales de experimentación utilizados en este estudio fueron ratas macho Sprague-Dawley de peso comprendido entre 250-300 gramos procedentes de Harlan interfauna Ibérica, S.A. (Barcelona, España). Hasta el momento de la realización de los experimentos los animales permanecieron estabulados, en grupos de entre tres y cinco, en las dependencias del animalario a una temperatura constante de 22°C, una humedad relativa del 65-70% y un ciclo luz/oscuridad de 12 h con acceso libre a agua y comida. El tratamiento de los animales se hizo acorde con la regulación europea para el uso de animales de experimentación (O.J. of E.C. L358/1 18/12/1986).

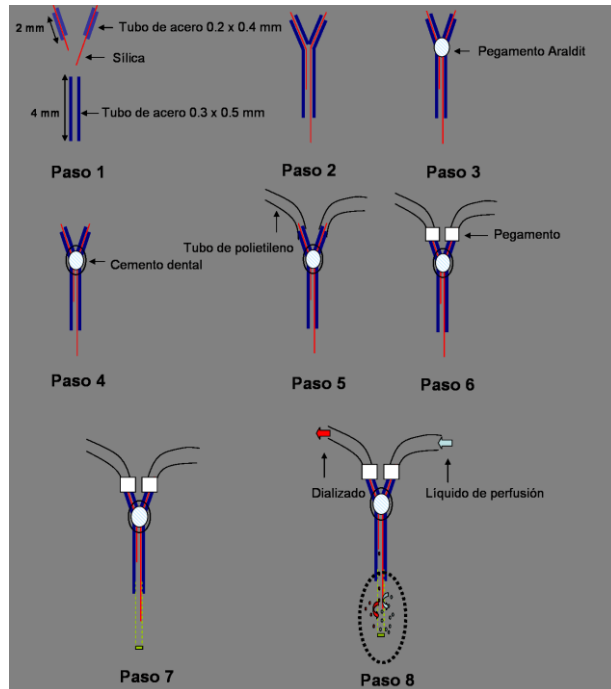
### 2.3.2. ADMINISTRACIÓN AGUDA DE FÁRMACOS:

La administración sistémica se realizó mediante inyección intraperitoneal del fármaco disuelto en solución salina (NaCl 0,9%). La dosis a administrar fue disuelta en 1 ml total de solución salina. El volumen total administrado no excedió de 0,3 ml. El grupo control consistió en la administración intraperitoneal (1 ml/kg) de solución salina.

### 2.3.3. PREPARACIÓN DE LAS SONDAS DE MICRODIÁLISIS.

Se emplearon como materiales, tubo de polietileno (0,28 mm (ID; diámetro interno) x 0,61 mm (OD; diámetro externo)) (ref. 800/110/100, Portex Limited, Hythe, Kent, U.K.), tubo de acero 27 G (0,2 mm ID x 0,4 mm OD) cortado a 0,7 cm de longitud y tubo de acero 25 G (0,3 mm ID x 0,5 mm OD) cortado a 2 cm de longitud (A-M Systems Inc; Carlsborg, WA, U.S.A.), tubo de sílice (Polymicro Technologies Inc., Phoenix, AZ, U.S.A.), membrana de diálisis de cuprophane (diámetro máximo de poro:10000 Da) de 0,25 mm de diámetro (Idemsa, Segovia, España), loctite gel (Super Glue-3©, Loctite España S.A., Madrid), pegamento Araldit© (Ciba-Geigy, Basilea, Switzerland), cemento dental TAB 2000 (Kerr©, Scafati, Italy) y plástico de bajo punto de fusión.

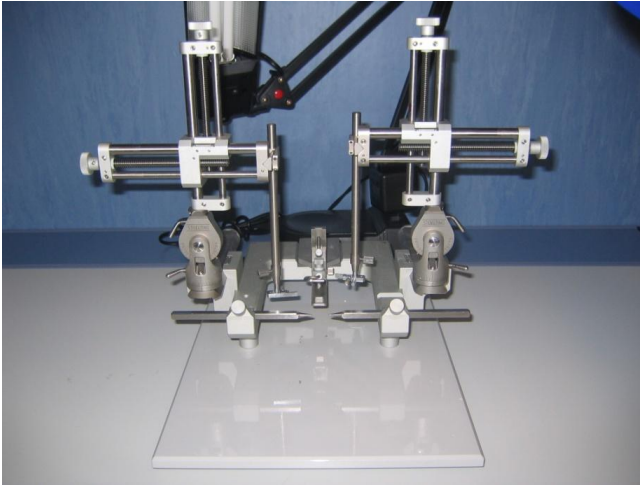
Las sondas de microdiálisis se construyeron ensamblando los diferentes materiales previamente enumerados en varias fases (figura 42). Estas sondas consisten básicamente en un sistema de canalización de sílice cubierto con un segundo sistema de tubería duro que sirve de guía y además mejora su resistencia. En el extremo inferior se inserta y sella una membrana de diálisis que será a posteriori la parte crítica de la sonda ya que es la que queda en las inmediaciones del área cerebral en estudio y permite el intercambio de sustancias. El tamaño del poro hace que la muestra de dializado obtenida quede libre de proteínas y sustancias de medio-alto peso molecular, lo que significa que la muestra no necesita ser purificada para su posterior análisis.



**Figura 42.** Secuencia de montaje para la construcción de las sondas de microdiálisis. En primer lugar se ensamblan las diferentes partes (pasos 1 y 2); se fijan (pasos 3 y 4). Posteriormente se añaden y sellan los tubos de polietileno que permitirán llevar el dializado hasta el vial (pasos 5 y 6) y finalmente se coloca y fija la membrana de diálisis (pasos 7 y 8).

#### 2.3.4. CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA.

Las sondas de microdiálisis se implantaron mediante cirugía estereotáxica utilizando un equipo Kopf® (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, U.S.A.), (figura 43). Dicho equipo consta de dos brazos independientes que permiten la implantación simultánea de dos sondas de microdiálisis cerebral. Los bastones utilizados para la fijación del cráneo durante la cirugía fueron del modelo 957 18° (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, U.S.A.).



**Figura 43:** Fotografía de uno de los equipos de cirugía estereotáxica utilizados.

Los animales, tras ser anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de hidrato de cloral (400 mg/kg i.p.), se colocaron en el equipo de estereotaxia. Se practicó una incisión longitudinal en la porción dorsal de la cabeza y un legrado sobre la superficie ósea quedando expuestas las suturas longitudinal, coronal y lamboidea. La cabeza fue orientada hacia abajo con un ángulo de  $15^\circ$  respecto a la superficie horizontal, de tal modo que la fontanela bregmática quedó 2 mm por debajo del plano que pasaba por la fontanela lamboidea (figuras 44 y 45).

A partir de este momento se hizo uso de un microscopio quirúrgico (OPMI 99, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) que permitió mejorar la precisión del proceso. Con una fresa de acero acoplada a una turbina eléctrica (Elco 5118, Salzburg, Austria; 0-25000 r.p.m.) se perforó un agujero de 3 mm de diámetro sobre las coordenadas elegidas para el núcleo LC derecho o la CPF derecha, calculadas con ayuda del atlas de Paxinos y Watson (1986). La duramadre, la aracnoides y los vasos sanguíneos meníngeos fueron desprendidos. Por el mismo procedimiento se practicaron dos agujeros de 0,5-1 mm y se insertó un pequeño tornillo en cada uno de ellos con el fin de fijar las sondas implantadas una vez terminada la cirugía.

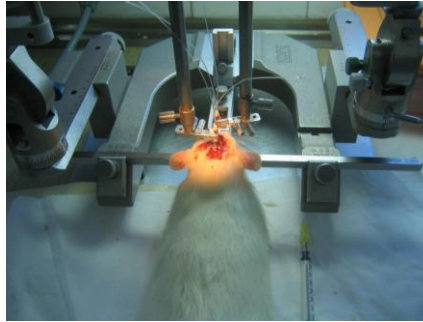
Posteriormente se implantó una sonda de microdiálisis de 2 mm de longitud de membrana hasta las proximidades del LC, siguiendo los parámetros marcados por el atlas Paxinos y Watson. Para calcular la coordenada antero-posterior (AP) y la coordenada lateral (L) se utilizó como referencia la sutura lambda en lugar del punto lambda como indica el atlas Paxinos y Watson, con objeto de mantener al máximo la homogeneidad en las coordenadas observadas para los distintos animales. La referencia para la coordenada dorsoventral (V) fue la superficie de tejido cerebral. Dichas coordenadas fueron:

- AP: -3,7 mm.
- L: -1,3 mm.
- V: -8,2 mm.

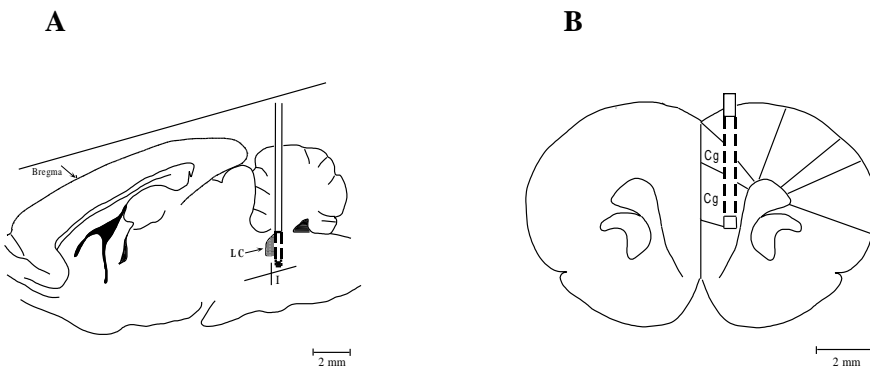
Una segunda sonda de 4 mm de longitud de superficie de membrana se implantó en la corteza prefrontal. Las coordenadas estereotáxicas para esta segunda sonda se calcularon en referencia a bregma para la coordenada antero-posterior (AP) y la coordenada lateral (L). De nuevo la superficie cerebral fue el punto de referencia para la coordenada dorsoventral (V). Estas coordenadas fueron:

- AP: +2,8 mm.
- L: +1,0 mm.
- V: -5,0 mm.

Una vez implantadas las sondas, se comprobó (haciendo pasar LCRA a flujo elevado) que funcionaban correctamente y se selló la entrada quemando los extremos de los tubos de polietileno. A continuación se fijaron las sondas con cemento dental utilizando dos tornillos que sirvieron como base de anclaje para la fijación de este.



**Figura 44.** Foto representativa de la implantación cerebral de dos sondas de microdiálisis mediante cirugía estereotáxica.



**Figura 45.** Diagramas de localización de las sondas de microdiálisis cerebral. Antes de la implantación de las sondas la cabeza fue orientada  $15^\circ$  hacia abajo, moviendo el cráneo sobre el eje interaural. (I: eje interaural). (A) LC; (B) CPF.

### 2.3.5. COLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE DIALIZADO.

La técnica de microdiálisis cerebral en animal despierto requiere de un complejo equipo que mantenga un flujo constante a través de las sondas implantadas mientras el animal se mueve con total libertad por la jaula. El equipo empleado (CMA/Microdialysis AB, Stockholm, Sweden) (figuras 46 y 47) consta de:

- a. Jaula especial donde permanece el animal tras la cirugía hasta el final del experimento.



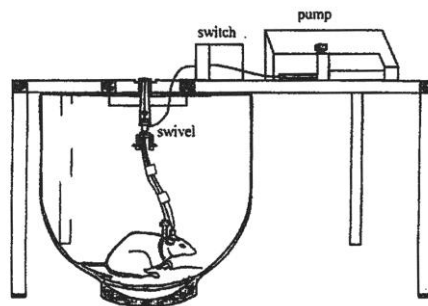
- b. Una bomba de precisión (CMA/102, CMA/Microdialysis AB, Stockholm Sweden) con capacidad para trabajar a flujos constantes entre 0,1 y 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  con dos jeringas independientes.
- c. Un intercambiador de jeringas o “swich” (CMA/110, CMA/Microdialysis AB, Stockholm, Sweden) cuya función consiste en permitir el intercambio de jeringas sin entrada de aire en el sistema.
- d. Una conexión giratoria o “swivel” (CMA/120, CMA/Microdialysis AB, Stockholm, Sweden) que permite el movimiento libre del animal y que posee dos soportes para la colocación de los insertos de viales donde se recogen las muestras.
- e. Un sistema de tuberías que interconectan todos los elementos del equipo de microdiálisis con las sondas implantadas sobre el animal de experimentación (FEP-tubing, Metalant AB, Stockholm, Sweden, volumen muerto de 1,2  $\mu\text{l}/10\text{ cm}$ ). Las conexiones de las tuberías con los distintos módulos se realizó por medio de unos adaptadores especiales (Tubing Adapters Metalant AB, Stockholm, Sweden).

Tras la implantación de las sondas de microdiálisis se dejó recuperar al animal un periodo aproximado de 20 h, estabulándose en una jaula individual con acceso a comida y agua *ad libitum*.

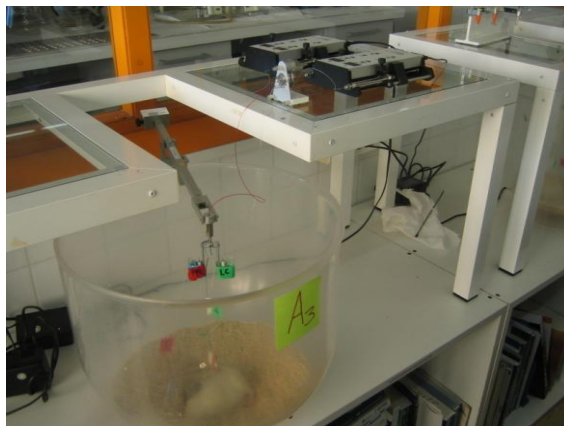
Posteriormente se colocó la rata en el equipo de microdiálisis y se conectó el sistema de tuberías del equipo de microdiálisis a las sondas. A través de cada una de ellas se hace pasar líquido de perfusión que consiste en una solución modificada de líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) (148 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub> y 0,85 mM MgCl<sub>2</sub>). El pH se ajusta a 7,4 con K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 mM. El flujo de perfusión tanto para la sonda del LC como para la de la CPF fue de 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  y se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento.

El LCRA, impulsado por la bomba recorre todo el sistema de microdiálisis (figura 42, paso 8) hasta llegar a la sonda, entra por la tubería de entrada y llega a la membrana de diálisis donde se realiza el intercambio de sustancias. Es importante destacar que la diálisis realizada es osmótica y que se da en ambos sentidos, permitiendo de esta manera recoger las diferentes moléculas que por su tamaño son capaces de atravesar la membrana porosa; así como administrar diferentes fármacos disueltos en el LCRA perfundido. Por el flujo constante mantenido por la bomba, el líquido dializado es empujado a lo largo de la tubería de salida y canalizado hasta un microvial. Llegado a este punto la muestra está lista para ser analizada en el equipo de cromatografía líquida.

Antes de comenzar la recogida de muestras se esperó un periodo de estabilización de diálisis de 1 hora. Una vez pasado este tiempo se recogieron muestras cada 35 minutos. Las tres últimas muestras previas a la manipulación farmacológica se consideraron como los niveles basales.



**Figura 46.** Esquema del equipo (CMA/120, CMA/ Microdiálisis AB, Stockholm, Sweden) empleado para el desarrollo de la técnica de microdiálisis cerebral en animal despierto.



**Figura 47.** Foto representativa de un animal conectado al equipo de microdiálisis cerebral para animal despierto.

Tras finalizar los experimentos se comprobó la correcta implantación de las sondas. Para ello, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de hidrato de cloral. Posteriormente se procedió a perfundir colorante Fast Green a través de las sondas de manera que el tejido circundante a la membrana de microdiálisis quedó coloreado. Tras retirar las sondas de su lugar de implantación se extrajeron y congelaron los cerebros a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se comprobó que la sonda estaba implantada en el lugar correcto y que se habían provocado daños menores durante la cirugía.

### 2.3.6. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LAS MUESTRAS.

El equipo de HPLC utilizado consta de las siguientes partes: un sistema desgasificador de la fase móvil HP Serie 1100 que impide la entrada de aire en el sistema, una bomba HP Serie 1100 que mantiene un flujo constante de fase móvil, un inyector automático termostatzado HP Serie 1100, un detector electroquímico Hewlett-Packard modelo 1049A, una estación de control con un software específico, (HP Chemstation plus) adquiridos en Hewlett Packard Ltd. (Waldbronn, Germany) y una columna BDS Hypersil C18 de  $3\ \mu\text{m}$  de tamaño de partícula ( $150 \times 2,1\ \text{mm}$ ; Thermo Electron Corporation, U.S.A.) para la medida de 5-HT.

La columna cromatográfica utilizada fue BDS Hypersil C18 de fase reversa, de 3  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula (150 x 2,1 mm; Thermo Electrón Corporation, U.S.A.) y la composición de la fase móvil 75 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 mM EDTA, 1 mM octilsodio sulfato, pH=3 (ajustado con HCl 6 N), 0,6% tetrahidrofurano y 15% de acetonitrilo. El flujo de la bomba del HPLC fue configurado a 0,2 ml/min y el tiempo de retención para 5-HT obtenido estuvo entre 8 y 10 minutos. El potencial de trabajo empleado por el detector electroquímico fue de 0,700 mV.

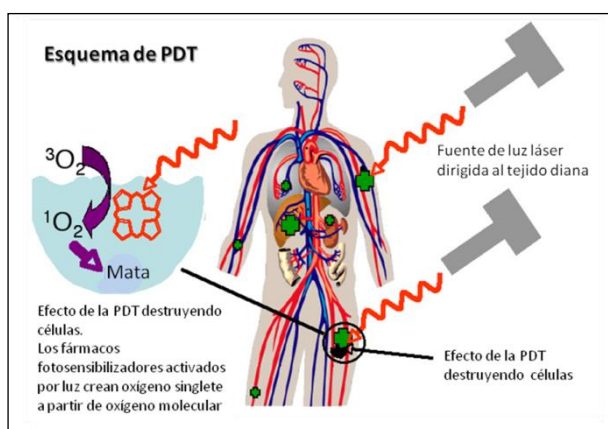
## ANEXO



Durante el periodo de realización de esta tesis doctoral, tuve la oportunidad de realizar una estancia predoctoral de tres meses de duración en el grupo de investigación del Prof. Kevin M. Smith en el departamento de Química del Choppin Hall Building de Louisiana State University (Baton Rouge - Louisiana), que cuenta con un reconocimiento mundial en el tema de porfirinas y de terapia fotodinámica, con el objetivo de estudiar la asociación de cannabinoides a otro tipo de macromoléculas, en concreto las porfirinas.

### ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La terapia fotodinámica (PDT)<sup>110</sup> consiste en la administración de un fármaco no tóxico, conocido como fotosensibilizador, tanto por vía sistémica, como local o tópica a un paciente con lesión (frecuentemente cáncer), seguido, después de algún tiempo, de iluminación de la lesión con luz visible (normalmente luz roja de larga longitud de onda), la cual, en presencia de oxígeno y del fotosensibilizador, da lugar a la generación de especies citotóxicas y, consecuentemente, a la muerte celular y a la destrucción del tejido.

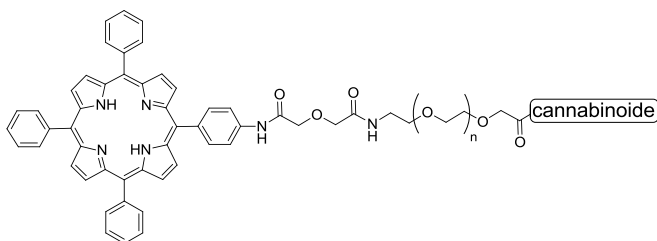


Es sabido que algunas porfirinas tienen la propiedad de acumularse en una amplia variedad de tumores. Esta propiedad junto con la habitual baja toxicidad de los macrociclos porfirínicos hace que sean elegidos como los fotosensibilizadores más prometedores para la terapia fotodinámica contra el cáncer.

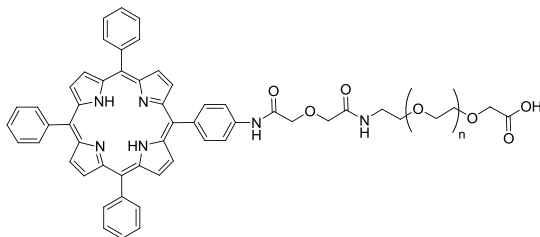
<sup>110</sup> C. A. Robertson, D. H. Evans y H. Abrahamse "Photodynamic Therapy (Pdt): A Short Review on Cellular Mechanisms and Cancer Research Applications for Pdt" *J Photochem Photobiol B* **2009**, *96*, 1.

Por otro lado, cabe decir que los ligandos cannabinoides, agonistas o antagonistas, juegan un papel importante en muchos procesos<sup>111</sup>, incluyendo la regulación metabólica, dolor, ansiedad, función inmune y tumor. Esta última aplicación ha sido confirmada en estos últimos años por diferentes estudios que muestran la inhibición del crecimiento celular del tumor mediante la modulación de varias rutas de supervivencia celular.

El hecho de que tanto los cannabinoides como las porfirinas tengan un objetivo terapéutico común, el cáncer, junto con el crecimiento del interés de los ligandos múltiples nos llevó a diseñar potenciales agentes antitumorales. Por lo tanto, la estrategia que se propone consiste en la síntesis de un compuesto, como el representado a continuación, que visa dos dianas terapéuticas para luchar contra los tumores cancerígenos.



El objetivo concreto que se propuso para realizar durante la estancia fue la síntesis de una tetrafenilporfirina unida a un polietilenglicol (PEG) cuya estructura se recoge a continuación:

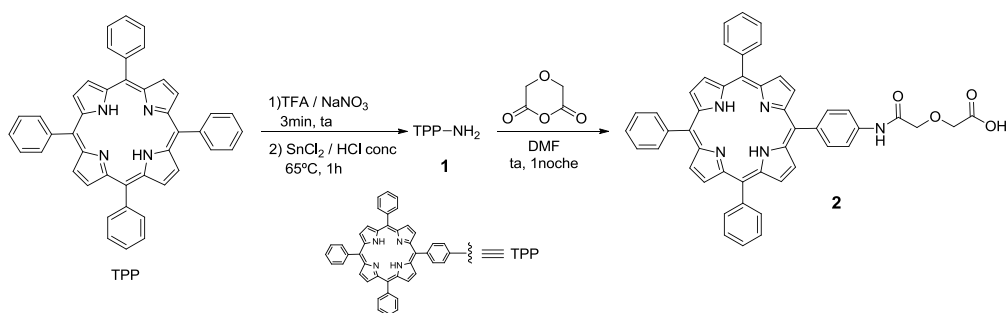


<sup>111</sup> a) I. Svíženská, P. Dubový y A. Šulcová "Cannabinoid Receptors 1 and 2 (Cb1 and Cb2), Their Distribution, Ligands and Functional Involvement in Nervous System Structures—a Short Review" *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **2008**, *90*, 501. b) M. Guzman "Cannabinoids: Potential Anticancer Agents" *Nat Rev Cancer* **2003**, *3*, 745.



## DESARROLLO DEL TRABAJO Y METODOLOGÍA

El trabajo que se desarrolló durante esta estancia consistió en la síntesis de un carboxilato de porfirina PEGilado. Para ello, como se indica en el Esquema 1, se partió de la tetrafenilporfirina (TPP) la cual fue nitrada en la posición *para* de un grupo fenilo por acción de nitrato sódico. La reducción del grupo nitro se realizó por tratamiento con dicloruro de estaño en medio ácido. Finalmente, la monoaminotetrafenilporfirina **1** obtenida reaccionó con el anhídrido diglicólico dando lugar al compuesto **2**<sup>112,113</sup>. Se intentaron poner a punto las condiciones de reacción y de aislamiento de los productos de reacción de cada uno de los pasos de síntesis porque existían problemas de bajo rendimiento.



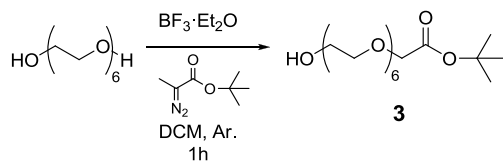
**Esquema 1**

Una vez conseguido el carboxilato de porfirina **2**, se realizó la síntesis del aminopoli(etilenglicol) necesario para condensarlo con dicha porfirina. Para ello, fue necesario encontrar las condiciones de reacción adecuadas para la preparación del producto final. Así, lo primero era obtener la especie *t*-butilada del hexaetilenglicol, para lo cual se hizo reaccionar el hexaetilenglicol con *t*-

<sup>112</sup> R. Luguay, L. Jaquinod, F. R. Fronczek, M. G. H. Vicente y K. M. Smith "Synthesis and Reactions of Meso-(*p*-Nitrophenyl) Porphyrins" *Tetrahedron* **2004**, 60, 2757.

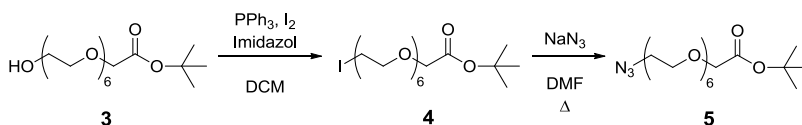
<sup>113</sup> M. Sibrian-Vazquez, T. J. Jensen, R. P. Hammer y M. G. Vicente "Peptide-Mediated Cell Transport of Water Soluble Porphyrin Conjugates" *J Med Chem* **2006**, 49, 1364.

butildiazoacetato en presencia de trifluoruro de boro eterato según se representa en el esquema 2<sup>114</sup>.



**Esquema 2**

El siguiente paso fue la transformación del grupo alcohol en un grupo amino. Para ello, se intentó transformar dicho grupo hidroxilo en un buen grupo saliente como el yoduro y así, seguir el esquema 3 de reacción representado.

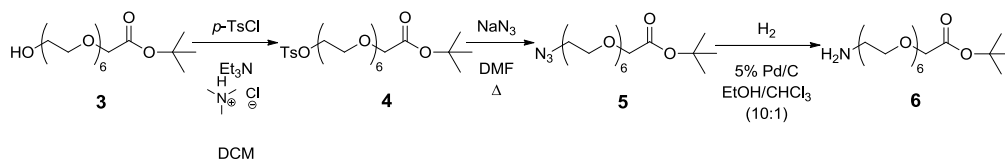


**Esquema 3**

Así, se hizo reaccionar el alcohol **3** con yodo en presencia de imidazol y trifetilfosfina. Después de intentar purificar el producto yodado **4** mediante cromatografía en columna se observó por RMN que quedaba trifetilfosfina pero, aun así, se siguió con el siguiente paso de reacción a la espera de que dicho compuesto pudiera eliminarse en posteriores purificaciones. No obstante, tras la purificación por cromatografía en columna de la azida **5** se siguió observando por RMN que seguía habiendo trifetilfosfina mezclada con el compuesto con lo que este método de obtención de la amina del hexaetilenglicol fue descartado.

Se decidió cambiar de procedimiento<sup>5</sup> haciendo reaccionar la especie *t*-butilada **3** con ácido *p*-toluensulfónico en presencia de trietilamina y de cloruro de trimetilamonio para obtener el tosilato del hexaetilenglicol **4** y así, llegar a la azida **5** la cual, tras una hidrogenación catalítica nos daría el compuesto deseado del hexaetilenglicol **6**, como se encuentra representado en el Esquema 4.

<sup>114</sup> G. Thumshirn, U. Hersel, S. L. Goodman y H. Kessler "Multimeric Cyclic Rgd Peptides as Potential Tools for Tumor Targeting: Solid-Phase Peptide Synthesis and Chemoselective Oxime Ligation" *Chemistry* **2003**, 9, 2717.

**Esquema 4**

Por lo tanto, en estos tres meses de estancia se consiguieron dos partes de la molécula que se quería alcanzar, las cuales habrían de unirse posteriormente a un cannabinoide. Esta última parte se realizaría a continuación en el laboratorio del CSIC pero se decidió pausar este proyecto y así poder centrarnos en los otros proyectos desarrollados en esta tesis.